

# Međustanična komunikacija u ranom razvoju kraljevnjaka

---

**Beretin, Lorena**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2021**

*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:217:586142>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-23**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO - MATEMATIČKI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

**MEĐUSTANIČNA KOMUNIKACIJA U RANOM**  
**RAZVOJU KRALJEŽNJAKA**  
**CELL-CELL COMMUNICATION IN EARLY**  
**STAGES OF VERTEBRATE DEVELOPMENT**

SEMINARSKI RAD

Lorena Beretin  
Preddiplomski studij Biologije  
Undergraduate study of Biology  
Mentor: doc. dr. sc. Romana Gračan

Zagreb, 2021.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEMELJI STANIČNE KOMUNIKACIJE</b> .....	2
<b>3. INDUKCIJA</b> .....	3
<b>4. PARAKRINA SIGNALIZACIJA</b> .....	5
4.1. Fibroblastni faktori rasta.....	5
4.2. Obitelj ježevih faktora.....	7
4.3. Obitelj beskrlnih faktora.....	8
4.4. Superfamilija transformirajućih faktora rasta $\beta$ .....	9
<b>5. JUKSTAKRINA SIGNALIZACIJA</b> .....	11
5.1. Notch signalni put.....	11
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	14
<b>7. LITERATURA</b> .....	15
<b>8. SAŽETAK</b> .....	18
<b>9. SUMMARY</b> .....	19
<b>10. ŽIVOTOPIS</b> .....	20

## 1. UVOD

Spajanje spermija i jajne stanice označava početak razvoja životinjskog organizma. Od samo jedne stanice, zigote, nastaje složen sustav s pripadajućim zadaćama. Zigota je stanica koja sadrži diploidan broj kromosoma u jezgri i sve organele koji se nalaze u eukariotskim stanicama. Dijeljenjem zigote nastaje dvostanični stadij, narednim dijeljenjem četverostanični, trećim mitotskim dijeljenjem osmostanični stadij, i dijeljenja se nastavljaju do same smrti organizma (Sadler 2010).

Stanice u ranim stadijima životinjskog organizma su totipotentne. Totipotentnost označava mogućnost stanica da se diferenciraju u svaki tip stanica ili tkiva. U narednim diobama dolazi do podjele zadaća između stanica, to jest diferencijacije u određene, specifične tipove (Condic 2014). Tijekom razvojnog procesa, embriogene stanice komuniciraju uz pomoć signalnih molekula koje omogućuju proces diferencijacije i organogeneze. Da signalizacija bude uspješno provedena, stanice međusobno trebaju biti u nekoj vrsti kontakta (Alberts i sur. 2002).

U razvoju kralježnjaka osnovni mehanizam zaslužan za diferencijaciju stanica je proces indukcije. Tijekom procesa indukcije određena skupina stanica putem signalnih molekula utječe na tok razvoja druge skupine stanica. Stanica ili tkivo koje je izvor signala naziva se induktor, a tkivo koje je kompetentno za primanje signala je receptivno tkivo. Ukoliko se stanice nalaze na maloj udaljenosti, signalne molekule procesom difuzije dopijevaju do ciljane skupine stanice i potiču promjene. Ovakav tip signalnih molekula nazivaju se parakrini faktori, a strukturno ih se može podijeliti u četiri kategorije: fibroblastni faktori rasta, obitelj ježevih faktora, obitelj beskrilnih faktora i superfamilija transformirajućih faktora rasta  $\beta$ . U slučaju kontakta stanica, signali se prenose pomoću inducirajućeg proteina i receptora na susjednoj stanici, a ovakav oblik signaliziranja naziva se jukstakrina signalizacija. Najpoznatiji signalni put ovog tipa je Notch signalni put. Tijekom ranog razvoja signalni putevi se isprepleću i nadomještaju jedan drugog, a normalno funkcioniranje ove mreže prijenosa informacija tijekom ranog razvoja rezultira zdravim fenotipom organizma (Gilbert 2013).

## 2. TEMELJI STANIČNE KOMUNIKACIJE

Svaka stanica, ovisno o svojoj fiziološkoj funkciji, posjeduje mogućnost sudjelovanja u signalnim putevima i prijenosu informacija unutar svojega okoliša. Pod staničnom komunikacijom podrazumijevamo primanje vanjskih signala, unutarstanični signalni put i stanični odgovor na primljeni signal (Pires-daSilva i Sommer 2003). Vanjski signali aktiviraju receptore na ciljanim stanicama. Aktivacijom receptora pokreće se signalna kaskada unutar stanice koja za posljedicu ima promjenu u ponašanje stanice, to jest stanica odgovara na informaciju koju je primila iz okoliša. Interakcija između vanjskog signala i receptora stanice visoko je selektivna (Scott i Pawson 2000). Iako su receptori selektivni za vanjske signale, oni unutar stanice mogu utjecati na više staničnih procesa istodobno. Ovakav način djelovanja naziva se pleiotropni učinak (Pires-daSilva i Sommer 2003). Stanični procesi koji se odvijaju uglavnom uključuju transkripciju molekule DNA i sintezu proteina ili promjenu metaboličke stope stanice (Majidinia i sur. 2018).

Tijekom ranog razvoja signalizacija između stanica se odvija na malim udaljenostima. Postoje tri osnovna mehanizma prijenosa signala između stanica, a to su difuzija, putem transmembranskih proteina kod stanica u direktnom kontaktu ili putem tijesnih spojeva, također kod stanica koje su u direktnom kontaktu, odnosno u ovom slučaju povezane citoplazmama (Alberts i sur. 2002). Difuzija je prijenos tvari koji nastaje zbog razlike u koncentracijama (<https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=57136>). Signalne molekule putem izvanstaničnog prostora dopjevaju do receptora na površini ciljane stanice. Procesom difuzije stanice koje su udaljene mogu međusobno komunicirati (Perrimon i sur. 2012). Transmembranski proteini su dijelovi bioloških membrana. Ove molekule protežu se kroz cijelu membranu i spajaju izvanstanični prostor s unutarstaničnim prostorom. Obzirom na sastav aminokiselina unutar proteinskog kanala i njegovu strukturu, ove molekule su selektivne i mogu služiti kao prenosnica signalnim molekulama između dvije susjedne stanice (Pera i sur. 2014). Tijesnim spojevima povezane su citoplazme dviju susjednih stanica. Koneksini su bjelančevine koje tvore hidrofobni kanal i omogućuju uspostavu ovakvog spoja između stanica (Alberts i sur. 2002).

### 3. INDUKCIJA

Indukcija je proces koji se vremenski smjestio u rani razvoj životinjskog organizma, a omogućuje diferencijaciju i organogenezu. Aktivno tkivo ili induktor djeluje putem signalnih molekula na nediferencirane stanice i potiče određene promjene (<https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=27347>). Za otkriće ovog procesa davne 1935. godine njemački znanstvenik Hans Spemann dobio je Nobelovu nagradu za fiziologiju ili medicinu. On je u svojim eksperimentima sa zamecima vodozemaca pokazao da je indukcijom moguće potaknuti razvoj sekundarnog zametka na tkivu primarnog zametka (<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1935/spemann/biographical/>).

Indukcija se naziva i neposredna interakcija obzirom da je preduvjet za ovaj proces blizina stanica ili tkiva koje su u kontaktu. Na Slici 1. prikazani su mogući načini prijenosa induktivnih molekula. Ukoliko su dvije stanice u kontaktu induktivni signal se naziva i jukstakrini, a sama signalizacija jukstakrina signalizacija. U slučaju difuzije signalnih molekula na male udaljenosti odvija se proces parakrine signalizacije putem parakrinih faktora.

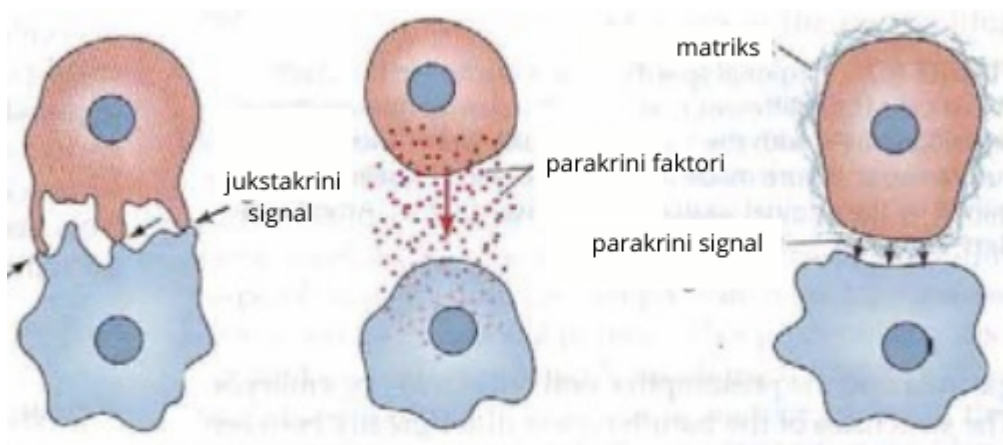
Faktor kompetentnosti je čimbenik koji receptivnoj stanici omogućuje odgovor na primljeni signal, to jest kompetentnost. Faktor kompetentnosti rezultat je ekspresije gena u receptivnoj stanici i kao takav nije potreban induktivnom tkivu, ali bez njega ciljano tkivo neće moći primljeni signal obraditi, reagirati i nastaviti diferencijaciju u potrebnom smjeru (Gilbert 2013).

U nekim stanicama i tkivima induktivni signal iz točno određenog tkiva je obligatan faktor za diferencijaciju u određenom smjeru. Bez induktivnog signala određenog tkiva ili u prisutnosti signala iz nekog od drugih tkiva do diferencijacije neće doći. U ostalim stanicama i tkivima proces diferencijacije pokrenut je i bez induktivnog signala, ali za ekspresiju nekih gena potrebni su određeni uvjeti i okoliša kako bi se namijenjeni geni mogli ispoljiti (Pera i sur. 2014).

Koristeći piliće kao modelne organizme do detalja je proučen najpoznatiji primjer procesa indukcije u životinjskom svijetu, interakcija epitelnih i mezenhimskih stanica. Epitelne i mezenhimske stanice su osnovne građevne stanice svih organa i tkiva pa je i njihova zastupljenost u organizmima visoka. Proučavajući odnose epitelnih i mezenhimskih stanica, indukciju i tok diferencijacije izvedena su dva osnovna obilježja ovog procesa, a to su regionalna specifičnost indukcije i genetska specifičnost. Interakcijom epitela i mezenhima putem sekretornih proteina na točno određenim mjestima na tijelu nastaju, na primjer, rožnate strukture. Ukoliko se mezenhimske stanice jedne regije premjeste u drugu regiju, epitelne

stanice reagirati će na signale mezenhima koji se nalazi trenutno ispod njega i tvoriti strukture za koje je dobio uputu. Epitelne stanice odgovarati će na signale iz mezenhima i tvoriti strukture jedino u uvjetima u kojima njihov set gena podržava takav proces. Obzirom da proteini nastaju translacijom gena, u nedostatku određenog gena unutar genoma epitelnih stanica one neće biti u mogućnosti reagirati na induktivni signal mezenhimskih stanica (Gilbert 2013).

Leća oka sisavaca razvija se iz očnih mjehurića koji nastaju anteriorno tijekom zatvaranja neuralne cijevi. U samom početku formiranja leće, ektoderm u neposrednoj blizini očnih mjehurića zadebljava. Time nastaje lećna plakoda. Tijekom daljnjeg razvoja dolazi do pojave optičke čase, invaginacije ektoderma, razdvajanja slojeva retine i formiranja kapsule leće. Tokom cijelog procesa signalizacija između stanica je prisutna, počevši sa signalizacijom između stanica epitela i stanica neuralne cijevi (Gunhaga 2011). Tijekom razvoja leće oka u miša protein nazvan Pax6 uočen je u regiji vršnog ektoderma, a u ostalim regijama njegovo prisustvo nije dokazano. Bez prisustva Pax6 proteina kojemu su izvor stanice anteriornog dijela neuralne cijevi, stanice ektoderma nisu u mogućnosti pokrenuti pravilan obrazac razvoja oka miša (Gilbert 2013).



Slika 1. Jukstakrino i parakrino signaliziranje (preuzeto i prilagođeno iz Gilbert 2013)

## 4. PARAKRINA SIGNALIZACIJA

Pojam parakrina signalizacija označava način stanične komunikacije tijekom kojega procesom difuzije jedan tip stanica inducira drugi tip stanica. Parakrinom signalizacijom stanice koje su udaljene mogu međusobno izmjenjivati signale. Difuzibilni proteini koji sudjeluju u ovom načinu prijenosa informacija nazivaju se parakrini faktori ili faktori rasta i diferencijacije (Gilbert 2013).

Parakrini faktori su proteini koje stanice izlučuju u izvanstanični prostor, a nošene koncentracijskim gradijentom putuju do ostalih stanica u kojima su potrebni (Richards i Ascoli 2018). Sam mehanizam djelovanja parakrinih faktora je visoko konzerviran stoga se saznanja dobivena na nekolicini modelnih organizama može primijeniti na većinu životinjskih vrsta (McNatty i sur. 2000).

U parakrine faktore ubrajaju se mnogi proteini, a strukturno se mogu grupirati u četiri kategorije, a to su fibroblastni faktori rasta, obitelj ježevih faktora, obitelj beskrilnih faktora i superfamilija transformirajućih faktora rasta  $\beta$  (Gilbert 2013).

### 4.1. Fibroblastni faktori rasta

Fibroblastni faktori rasta (FGF, od eng. *fibroblast growth factor*) obuhvaćaju skupinu strukturno i funkcionalno sličnih proteina. Unutar koljena kralježnjaka mogu se pronaći 22 različita proteina iz ove skupine. Aktivnost proteina ove skupine vidljiva je i tijekom embrionalnog i fetalnog razvoja, a isto tako i u ostalim stadijima života. Tijekom embrionalnog razvoja pripadnici FGF obitelji uključeni su u procese stanične proliferacije, migracije i diferencijacije (Ornitz i Itoh 2001). Na Slici 2. prikazani su neki od razvojnih puteva u koje su uključeni fibroblastni faktori rasta, ali i njihova povezanost s ostalim signalnim putevima.

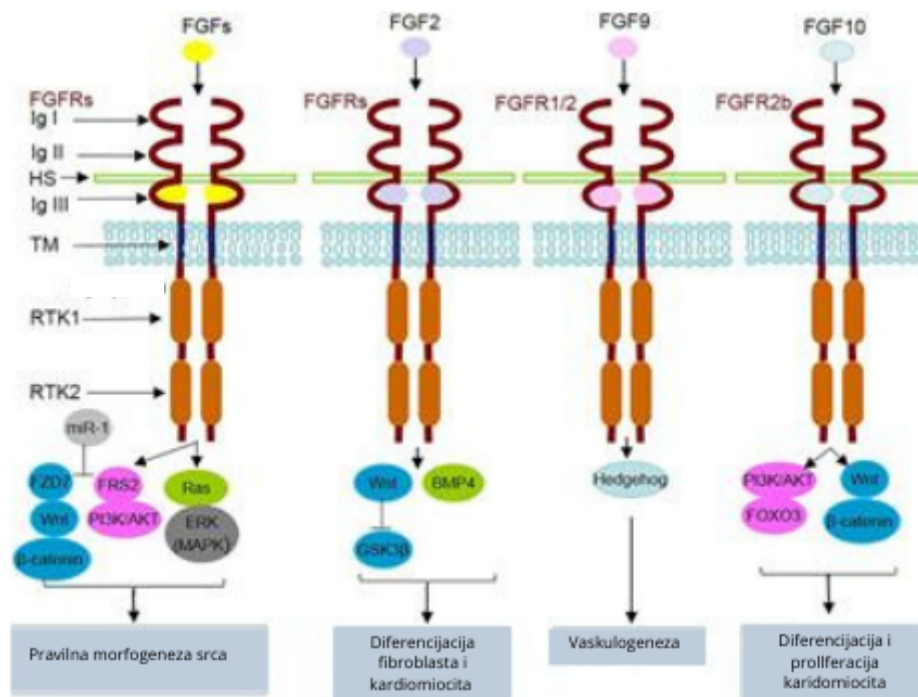
Članovi FGF skupine mogu se klasificirati i u podgrupe prema strukturi, biokemijskim svojstvima i ekspresiji. FGF8, FGF17 i FGF18 proteini dijele i do 80% sekvence aminokiselina, a posljedično tome i receptori s kojima stupaju u interakcije su sličnih biokemijskih obilježja. Ova tri proteina pripadaju podskupini nazvanoj FGF8 (Böttcher i Niehrs 2005).

FGF receptori (FGFR) su tirozinske kinaze koje fosforilacijom tirozina pokreću unutarstanične signalne puteve nakon vezanja liganda. Prvi korak unutarstanične reakcije je dimerizacija receptora čime se aktivira tirozin kinaza i dolazi do autofosforilacije



unutarstanične domene. Fosforilirani tirozin vezno je mjesto Src proteina, PI3K, MAPK i drugih koji u interakciji s tirozinom bivaju aktivirani fosforilacijom (Khosravi i sur. 2021).

Tijekom ranog razvoja srčanog tkiva fibroblastni faktori rasta uključeni su u regulaciju morfogeneze. FGF djeluju na sekundarno srčano područje i srčani neuralni greben. Stanice neuralnog grebena određuju formaciju izlaznog trakta. Izlazni trakt srčanog mišića označava područje izlaska i ulaska krvnih žila iz i u područje miokarda. U staničnoj komunikaciji između matičnih stanica sekundarnog područja sudjeluju FGF2, FGF3, FGF4, FGF8, FGF10, FGF16 i FGF20. Interakcija stanica i navedenih proteina dovodi do stanične proliferacije, razvoja miokarda i izlaznog trakta srčanog mišića (Khosravi i sur. 2021).



Slika 2. Prikaz najvažnijih parakrinih faktora uključenih u signalizaciju prilikom diferencijacije srčanog tkiva (preuzeto i prilagođeno Khosravi i sur. 2021)

## 4.2. Obitelj ježevih faktora

Obitelj ježevih faktora (od eng. *The Hedgehog family*) skupina je strukturno sličnih proteina koji su uključeni u razvojne puteve kako bi inducirali stanice ka pravilnoj diferencijaciji i omogućili jasne granice tkiva (Gilbert 2013). Ova skupina parakrinih faktora naziva se još i *Hedgehog-Gli*, *Hedgehog-Patched* i *Hedgehog-Patched-Smoothened*. Ježevi faktori prvi put su uočeni i opisani u vinskoj mišici (*Drosophila melanogaster*), a obzirom da su geni za proteine ove skupine visoko konzervirani, a mehanizmi signalnih puteva istog principa, saznanja dobivena radom s vinskim mušicama mogu se primijeniti i na razvojne obrasce evolucijski odvedenijih organizama (Murone i sur. 1999).

Osnovni mehanizam signalnog puta zasniva se na interakciji ježevih faktora i Patched receptora. U kralježnjaka su prisutna tri gena koja kodiraju za proteine iz obitelji ježevih faktora i to su sonic hedgehog (shh), desert hedgehog (dhh) i indianhedgehog (ihh) (Gilbert 2013). Osim proteina Patched, u signalnom putu je prisutan i nužno potreban protein Smoothened. Smoothened je sekundarni glasnik signala. U prisutnosti bilo kojeg od mogućih liganda iz obitelji ježevih faktora, dolazi do promjene konformacije i prestaje inhibicija Smoothened proteina od strane Patched proteina. Ovom konformacijskom promjenom i otpuštanjem dolazi do kaskadne reakcije i na posljetku transkripcije željenih gena (Liao i sur. 2009). Sonic hedgehog (shh), desert hedgehog (dhh) i indianhedgehog (ihh) specifični su za određena tkiva, a njihova aktivnost ovisi o razvojnom stadiju organizma (Gupta i sur. 2010).

Svitak je osnovno obilježje koljena svitkovaca, a označava potpornu strukturu duž leđne strane tijela građenu od posebne vrste vezivnog tkiva (<https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=59097> ). Svitak je tijekom razvoja kralježnjaka primarna os tijela, a njegove stanice izlučuju N-Shh protein i time pokreću diferencijaciju neurona u ovisnosti o koncentracijskom gradijentu. Ovaj gradijent određuje pet različitih tipova neurona, a to su V0, V1, V2 i V3 interneuroni, a uz interneurone nastaju i glijalne stanice. Glija stanice nastaju iz bazalne ploče, a induktivni signal je najviša koncentracija N-Shh faktora. V3 stanice nastaju pri drugoj najvišoj koncentraciji, a pri nižim koncentracijama diferenciraju se V0, V1 i V2 (Ribes i Briscoe 2009).

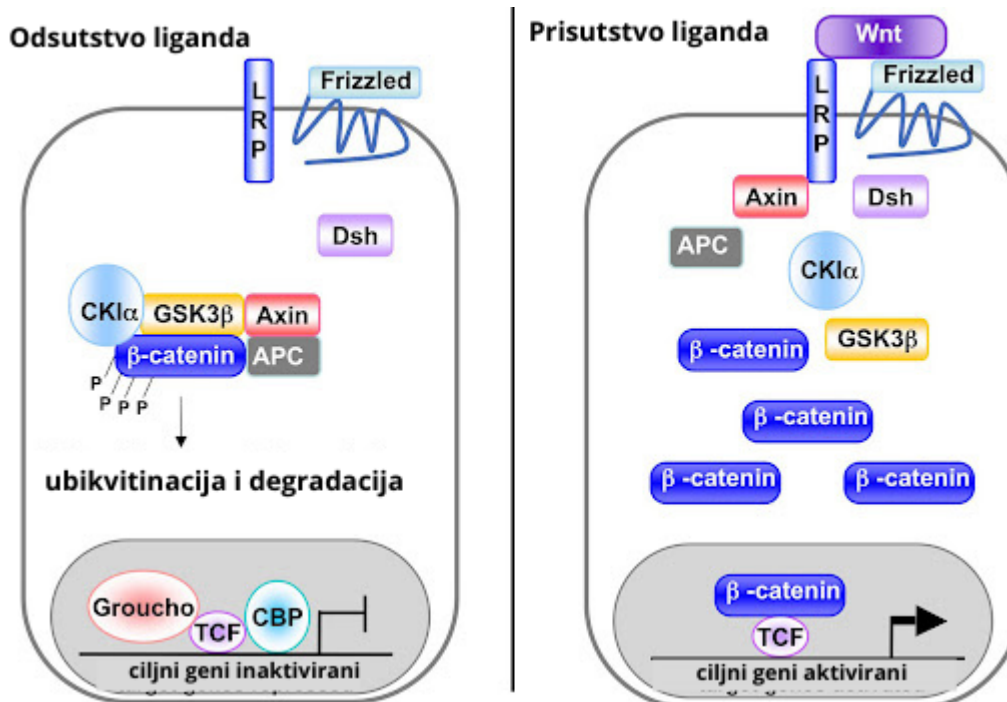
### 4.3. Obitelj beskrilnih faktora

Obitelj beskrilnih faktora (Wnt, od eng. *wingless*) imaju ključnu ulogu u diferencijaciji, proliferaciji, rastu i određivanju sudbine stanica tijekom ranog razvoja organizma. Wnt/ $\beta$ -kateninski signalni put bitan je u očuvanju pluripotencije embrionalnih matičnih stanica i pravilnom razvoju stanica središnjeg živčanog sustava (Majidinia i sur. 2017).

Skupini beskrilnih faktora pripadaju glikoproteini s visokom zastupljenošću cisteina. U kralježnjaka se pojavljuje 15 različitih proteina iz Wnt skupine, a 2003. godine prvi put su uspješno izolirani iz životinjskog organizma. Svaki od Wnt proteina kovalentno je vezan za lipidnu molekulu. Ovakva hidrofobna interakcija ključna je za aktivnost ovih proteina jer omogućava povećanje koncentracije beskrilnih faktora u staničnoj membrani (Gilbert 2013).

Aktivacija Wnt signalnog puta kreće interakcijom Wnt glikoproteina i transmembranskog receptora Frizzled (Fz). Dvije su različite vrste Wnt signalnih puteva koje ovise o kombinaciji liganda i receptora. U kanonskom signalnom putu, Wnt utječe na unutarstaničnu koncentraciju  $\beta$ -katenina. Kanonski put uključen je u određivanje stanične sudbine i proliferaciju (Kim i sur. 2005). Na Slici 3. prikazana je promjena koncentracije  $\beta$ -katenina unutar stanice u prisutnosti liganda i posljedična aktivacija željenih gena. Ne-kanonski signalni put ne ovisi o  $\beta$ -kateninu, a utječe na aktin i mikrotubule staničnog skeleta (Gilbert 2013).

Ukoliko u okolišu stanice nije prisutan neki od beskrilnih faktora,  $\beta$ -katenin se nalazi u kompleksu s proteinima APC i axinom, a kinaze GSK3 $\beta$  i CK1 osiguravaju fosforiliranost ovog kompleksa. U prisutnosti Wnt faktora dolazi do interakcije Frizzled receptora uz prisustvo LRP-a (od eng. *low-density lipoprotein receptor-related protein*) i pokretanja kanonskog signalnog puta. Konformacijska promjena aktivira Dsh protein u citosolu,  $\beta$ -katenin se oslobađa iz kompleksa i translocira u jezgru. U jezgri dolazi do aktivacije i ekspresije gena uključenih u diferencijaciju stanica (Verheyen i Gottardi 2010).



Slika 3. Wnt signalni put u odsustvu i prisustvu liganda (preuzeto i prilagođeno [http://www.wormbook.org/chapters/www\\_wntsignaling/wntsignaling.html](http://www.wormbook.org/chapters/www_wntsignaling/wntsignaling.html) )

#### 4.4. Superfamilija transformirajućih faktora rasta $\beta$

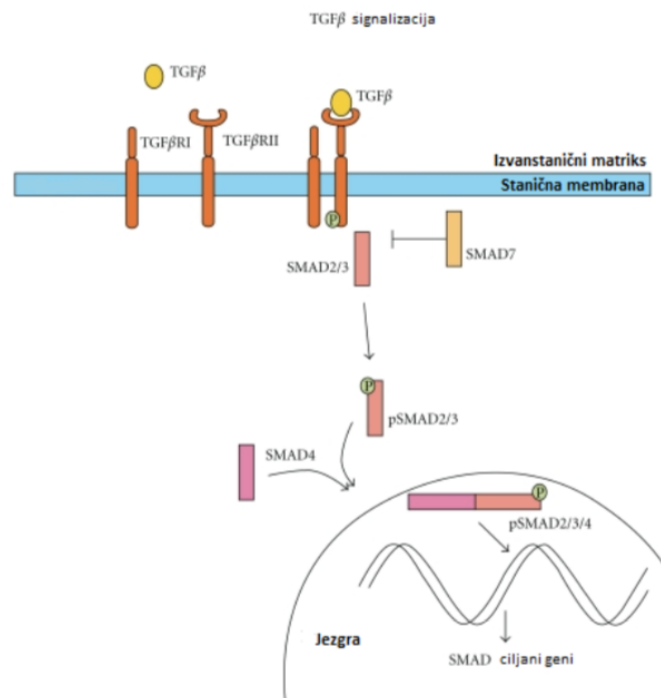
Transformirajući faktori rasta  $\beta$  (TGF- $\beta$ , od eng. *transforming growth factor* ) je skupina od trideset i tri srodna proteina koji su uključeni u procese diobe i migracije stanica, diferencijacije i apoptoze. Imaju bitnu ulogu u nastanku bubrežnih kanalića, pluća i žlijezda slinovnica, ali i mnogih drugih komponenti životinjskog organizma (Gilbert 2013). Njihova aktivnost ne prestaje embrionalnim razvojem, već su uključeni u signalne puteve i tijekom kasnijih stadija života (Zinski i sur. 2018). Strukturno su proteini ove skupine dimerni sekretorni polipeptidi (Tzavlaki i Maustaks 2020).

Koštani morfogenetski protein (BMP, od eng. *bone morphogenetic proteins*) može se izdvojiti od ostalih proteina ove skupine po broju konzerviranih cisteina unutar polipeptidnog lanca. Kod ovog proteina prisutno je sedam cisteina, dok je kod ostalih pripadnika ove skupine taj broj jednak devet (Gilbert 2013). Iako se nekoć tako mislilo, a i po tome su dobili ime, BMP molekule nisu aktivne samo tijekom formacije koštanog tkiva, već su uključeni i u procese određivanja polarnosti tijela, aksijalne osi tijela i mnoge druge (Zinski i sur. 2018).

Osnovni mehanizam prijenosa informacija između stanica putem TGF- $\beta$  parakrinih faktora shematski je prikazan na Slici 4. Ligandi iz TGF- $\beta$  superfamilije aktiviraju Smad

transkripcijske faktore koji jezgri dovode signal o potrebi za početkom transkripcije (Yokobori i Nishiyama 2017). Protein TGF- $\beta$  veže se za receptor tipa II, a receptor tipa II posljedično se veže za receptor tipa I. Aktivacija receptora tipa I odvija se fosforilacijom putem receptora tipa II. Nakon aktivacije, receptor tipa I je u mogućnosti fosforilirati Smad transkripcijski faktor. Smad protein 1, 2, 3 i 5 u kompleksu sa Smad 4 proteinom prelaze iz citoplazme u jezgri i aktiviraju transkripciju željenog gena (Gilbert 2013).

Proteini Nodal pripadaju superfamiliji TGF- $\beta$ , a njihova uloga iznimno je bitna u procesima diferencijacije mezoderma te uspostave osi tijela u kralježnjaka (Gilbert 2013). Istraživanjima na žabama, zebricama, pilićima i miševima utvrđena je evolucijska očuvanost ovog signalnog puta u različitim vrstama (Shen 2007). U miša, Nodal je eksprimiran u epiblastu, a regulacija se odvija putem specifičnog pojačivača zvanog HBE. HBE je cis-regulatorni element specifičan za sisavce, a signali na koje reagira su OCT4, SOX2, NANOG i KLF4. Nodalni signali iz epiblasta aktiviraju BMP-4 signalni put u izvanembrionalnom ektodermu, BMP-4 aktivira Wnt signalizaciju, a Wnt signalizacija formiranjem pozitivne povratne sprege aktivira Nodalnu ekspresiju u susjednom epiblastu. Pozitivna povratna sprega u proksimalnom posteriornom dijelu epiblasta ključna je za formiranje primitivne pruge (Zinski i sur. 2017).



Slika 4. Shematski prikaz TGF- $\beta$  signalnog puta (preuzeto i prilagođeno Ottenhof i sur. 2011)

## 5. JUKSTAKRINA SIGNALIZACIJA

Jukstakrina signalizacija označava način stanične komunikacije tijekom koje stanice u izravnom kontaktu izmjenjuju signalne molekule. Jukstakrina signalizacija odvija se putem transmembranskih proteina ili tijesnih spojeva dviju stanica. Poseban tip jukstakrine signalizacije je indukcija same stanice svojim receptorom koji se nalazi na susjednoj stanici (Gilbert 2013). Notch signalni put jedan je od primjera ovog tipa signalizacije, a zastupljenost u staničnoj komunikaciji tijekom ranog razvoja mu je visoka (Carrieri i Dale 2017).

### 5.1. Notch signalni put

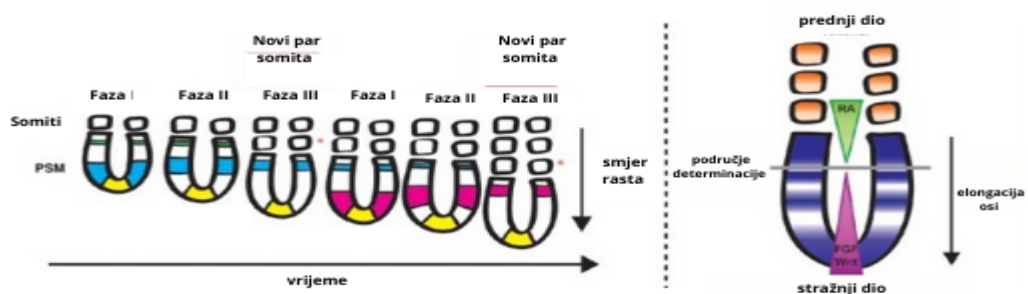
Notch je transmembranski proteinski receptor tipa I. Ovaj receptor polipeptidni je lanac od 2703 aminokiseline, a lokus na kojemu je smješten gen za ovaj receptor prvi puta je otkriven i kloniran u vinskoj mušici (Cappacione i Pine 2013). Notch signalni put ima ulogu u regulaciji, kontroli i upravljanju diferencijacije stanica, apoptozi, održavanju matičnih stanica i napredovanju loze (Carrieri i Dale 2017).

U sisavaca se pojavljuju četiri Notch proteina (Notch 1, Notch 2, Notch 3, Notch 4) koja se strukturno sastoje od tri domene: unutarstanične, transmembranske i izvanstanične. Zadaća unutarstanične domene je transdukcija signala koju stanica prima izvanstaničnom domenom proteina koji služi za vezanje liganda. Transmembranska domena je jednostruka (Bolós i sur. 2007). Ligandi koji se vežu za Notch proteine proizvod su stanice koja je u kontaktu sa stanicom koja prima signal, a u nekim slučajevima se radi i o istoj stanici. Ligandi su proteini iz obitelji Delta i Jagged (Lewis 1998). Receptori kralježnjaka mogu reagirati na pet različitih liganda ove skupine (Bolós i sur. 2007). U interakciji vezanja transmembranskih proteina i prijenosu signala sa stanice na susjednu stanicu bitnu ulogu imaju ponavljanja slična epidermalnom faktoru rasta (EGF, od eng. *epidermal growth factor*) koji su sastavni dio izvanstanične domene Notch proteina. Uz EGF ponavljanja ova domena sadrži i LNR ponavljanja koje karakterizira abundancija cisteinom. LNR ponavljanja imaju zadaću sprječavanja signalizacije ukoliko je ligand odsutan u okolišu stanice (Bolós i sur. 2007). Uz navedena ponavljanja, unutar ove domene nalazi se i heterodimerizacijska domena koja aktivira Notch signalni put tijekom vezanja Notch proteina i valjanog liganda (Guo i sur. 2014). Unutarstanična domena Notch proteina sastoji se od RAM23 domene, ankirinskih ponavljanja, jezgrinih lokalizacijskih signala, regije poliglutaminskih ponavljanja te PEST sekvence koja je

bogata aminokiselinama prolinom, glutaminskom kiselinom, serinom i treoninom te sadrži signal za degradaciju proteina (Bolós i sur. 2007).

Osnovni mehanizam signalnog puta Notch zasniva se na proteolitičkom procesiranju. Da bi sam protein postao kompetitivan za prijenos signala, prilikom transporta na samu površinu stanice protein se cijepa konvertazom nalik furinu u heterodimerizacijskoj domeni. Mjesto cijepanja naziva se S1, a ovim postupkom se nekvalentno povezuju izvanstanična i transmembranska domena. Cijepanje na mjestu S2 metaloproteinazom posljedica je konformacijske promjene prilikom vezivanja receptora za ligand, a sam ligand nakon vezanja ulazi u proces endocitoze. Nakon drugog cijepanja nastaje kratkoživi intermedijer. Ovakva molekula prolazi kroz još jedan proces cijepanja uz pomoć  $\gamma$ -serataze, a mjesto cijepanja se naziva S3. Nakon navedenog proteolitičkog procesiranja, unutarstanična domena Notch proteina je slobodna i odlazi u jezgru (Carrieri i Dale 2017).

U ranom razvoju kralježnjaka Notch signalni put uključen je u više procesa, a jedan od najbolje opisanih, ali i najvažnijih od njih je somitogeneza (Bolós i sur. 2007). Somitogeneza je proces nastanka somita. Somiti su segmentirane nakupine epitelnih stanica. Nalaze se duž neuralne cijevi, a njihovo ishodište je paraksijalni mezoderm. Iz ovih kuglastih nakupina diferenciraju se kralješci, leđno mišićje, mišićje tjelesne stijenke i dermis kože (<https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=57136>). Shematski prikaz procesa somitogeneze vidljiv je na Slici 5. Molekularni mehanizam nastanka somita pod kontrolom je Notch signalnog puta. U posteriornom dijelu paraksijalnog mezoderma dolazi do interakcije transmembranskog proteina Notch i Delta liganda. Ovakva reakcija aktivira Lfng, Hes1 i Hes7 čimbenike. Lfng djeluje na Notch-Delta interakciju potičući ju, dok Hes1 i Hes7 putem negativne povratne sprege utječu na smanjenje transkripcije Lfng i svoje vlastite. Ponovnu transkripciju Hes1 i Hes7 čimbenika mogu pokrenuti aktivatori, uključujući i Notch. U anteriornom dijelu paraksijalnog mezoderma Mesp2 potiče aktivaciju ekspresije Lfng gena putem promotora. U ovom dijelu paraksijalnog mezoderma ekspresija Lfng gena i njegova prisutnost inhibirati će Notch-Delta interakciju. Ovakav odnos ekspresije, aktivnosti i prisutnosti navedenih čimbenika dovodi do nastanka segmenata unutar paraksijalnog mezoderma (Bolós i sur. 2007).



Slika 5. Shematski prikaz somitogeneze. Iz nepotpuno podijeljenih nakupina stanica mezoderma koje se nazivaju somitomere razdvajanjem nastaju somiti. Somiti se pojavljuju kraniokaudalnim slijedom, a prvi par se pojavljuje u području vrata (preuzeto i prilagođeno prema Carrieri i Dale 2017)



## 6. ZAKLJUČAK

Međustanična komunikacija tijekom ranog razvoja organizma omogućava pravilnu diferencijaciju, morfogenezu i organogenezu. Evolucijski očuvani putevi signalizacije prisutni su već u koljenima beskralježnjaka, a osnova su razvoja kralježnjaka. Specijalizacija stanica i višestaničnost ne bi mogla biti ostvarena bez mogućnosti stanica za primanje signala iz okoliša i odgovora na iste.

Da bi stanica primila signal treba posjedovati odgovarajući receptor, a vezivanje liganda za receptor uzrokuje promjenu unutar stanice. Poruka koju je ligand prenio na stanicu prelazi kroz lanac kemijskih glasnika i rezultira promjenom u stanici.

Signalne molekule putem kojih se prenosi informacija mogu djelovati i između udaljenih stanica, a koncentracijski gradijent koji nastaje može poslužiti kao induktor za više razvojnih puteva istovremeno. Proučavanje izmjene signala između stanica pokazalo je i važnost povratnih sprega i transkripcijskih kaskada kao osnovnih mehanizama regulacije razvoja.

Međustanična komunikacija upravlja mnogim procesima u tijelu, ali isto tako unutar tijela dolazi do integracije signalnih puteva i njihove međuovisnosti. Signalne molekule aktiviraju jedna drugu, nadopunjuju se ukoliko dođe do pogreške i zajedno, ovisno o lokaciji unutar stanica ili u izvanstaničnom prostoru, kao i stupnju razvoja ostvaruju pravilnu aktivaciju gena i njihove ekspresije.

Međustanična signalizacija i razvojni putevi karakteristični su za određeni tip tkiva i određeno razvojno razdoblje. Njihova aktivnost u organizmima prisutna je i u odraslo doba i pridonosi normalnoj fiziologiji organizma. Ukoliko se razvojni putevi nekontrolirano aktiviraju mogu uzrokovati mnoge bolesti, a često i tumorigenezu.

## 7. LITERATURA

- Alberts B.J., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., 2002. *Molecular Biology of the cell*. Garland Science, New York, New York.
- Bolós V., Grego-Bessa J., de la Pompa J.L., 2007. Notch Signaling in Development and Cancer. *Endocrine Reviews* **28**, 339-363.
- Böttcher R.T., Niehrs C., 2005. Fibroblast Growth Factor Signaling during Early Vertebrate Development. *Endocrine Reviews* **26**, 63–77.
- Capaccione K. M., Pine S. R., 2013. The Notch signaling pathway as a mediator of tumor survival. *Carcinogenesis* **34**, 1420–1430.
- Carrieri F. A., Dale J. K., 2017. Turn It Down a Notch. *Frontiers in cell and developmental biology* **4**, 151.
- Condic M. L., 2014. Totipotency: what it is and what it is not. *Stem cells and development* **23**, 796–812.
- Gilbert S.F., 2013. *Developmental Biology*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Gunhaga L., 2011. The lens: a classical model of embryonic induction providing new insights into cell determination in early development. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **366**, 1193–1203.
- Guo H., Lu Y., Wang J., Liu X., Keller E. T., Liu Q., Zhou Q., Zhang J., 2014. Targeting the Notch signaling pathway in cancer therapeutics. *Thoracic cancer* **5**, 473–486.
- Khosravi F., Ahmadvand N., Bellusci S., Sauer H., 2021. The Multifunctional Contribution of FGF Signaling to Cardiac Development, Homeostasis, Disease and Repair. *Frontiers in cell and developmental biology* **9**, 672935.
- Kim H.J., Schleiffarth J.R., Jessurun J. i sur., 2005. Wnt5 signaling in vertebrate pancreas development *BMC Biology* **3**, 23.
- Lewis J., 1998. Notch signalling and the control of cell fate choices in vertebrates. *Seminars in cell & developmental biology* **9**, 583–589.
- Liao X., Siu M.K.Y., Au C.W.H., Wong E.S.Y., Chan H.Y., Ip P.P.C., Ngan H.Y.S., Cheung A.N.Y., 2009. Aberrant activation of hedgehog signaling pathway in ovarian cancers: effects on prognosis, cell invasion and differentiation. *Carcinogenesis* **30**, 131-140.
- Majidinia M., Aghazadeh J., Jahanban-Esfahlani R., Yousefi B., 2018. The roles of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in tissue development and regenerative medicine. *Journal of cellular physiology* **233**, 5598–5612.
- McNatty K. P., Fidler A. E., Juengel J. L., Quirke L. D., Smith P. R., Heath D. A., Lundy T.,

- O'Connell A., Tisdall D. J., 2000. Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. *Molecular and cellular endocrinology* **163**, 11–20.
- Murone M., Rosenthal A., de Sauvage F. J., 1999. Hedgehog signal transduction: from flies to vertebrates. *Experimental cell research* **253**, 25–33.
- Ornitz D. M., Itoh N., 2001. Fibroblast growth factors. *Genome biology* **2**, reviews3005.1.
- Ottendorf N. A., de Wilde R. F., Maitra A., Hruban R. H., Offerhaus G. J., 2011. Molecular characteristics of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pathology research international* **2011**, 620601.
- Pera E. M., Acosta H., Gougnard N., Climent M., Arregi, I., 2014. Active signals, gradient formation and regional specificity in neural induction. *Experimental cell research* **321**, 25–31.
- Perrimon N., Pitsouli C., Shilo B. Z., 2012. Signaling mechanisms controlling cell fate and embryonic patterning. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **4**, a005975.
- Pires-daSilva A., Sommer R.J., 2003. The evolution of signalling pathways in animal development. *Nature Reviews Genetics* **4**, 39–49.
- Ribes V., Briscoe J., 2009. Establishing and interpreting graded Sonic Hedgehog signaling during vertebrate neural tube patterning: the role of negative feedback. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **1**, a002014.
- Richards J. S., Ascoli M., 2018. Endocrine, Paracrine, and Autocrine Signaling Pathways That Regulate Ovulation. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **29**, 313–325.
- Sadler T.W., 2008. Langmanova medicinska embriologija. Školska knjiga, Zagreb, Hrvatska.
- Scott J.D., Pawson T., 2000. Cell communication: the inside story. *Scientific American* **282**, 72–79.
- Shen M. M., 2007. Nodal signaling: developmental roles and regulation. *Development* **134**, 1023–1034.
- Tzavlaki K., Moustakas A., 2020. TGF- $\beta$  Signaling. *Biomolecules* **10**, 487.
- Verheyen E. M., Gottardi C. J., 2010. Regulation of Wnt/beta-catenin signaling by protein kinases. *Developmental dynamics:an official publication of the American Association of Anatomists* **239**, 34–44.
- Yokobori T., Nishiyama M., 2017. TGF- $\beta$  Signaling in Gastrointestinal Cancers: Progress in Basic and Clinical Research. *Journal of clinical medicine* **6**, 11.
- Zinski J., Tajer B., Mullins M. C., 2018. TGF- $\beta$  Family Signaling in Early Vertebrate Development. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **10**, a033274.

Izvori s interneta:

<https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=27347> (pristupljeno: 25.08.2021.)

<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1935/spemann/biographical/> (pristupljeno: 25.08.2021.)

<https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=57136> (pristupljeno: 02.09.2021.)

<https://enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=15048> (pristupljeno: 10.09.2021.)

<https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=59097> (pristupljeno: 10.09.2021.)

[http://www.wormbook.org/chapters/www\\_wntsignaling/wntsignaling.html](http://www.wormbook.org/chapters/www_wntsignaling/wntsignaling.html) (pristupljeno: 11.09.2021.)

## 8. SAŽETAK

Potkoljeno kralježnjaka broji preko 70 000 različitih vrsta. Svaka jedinka unutar ovog potkoljena nastaje iz jedne oplodene stanice, zigote, spajanjem spermija i jajne stanice. Iz zigote se uzastopnim dijeljenjem i složenim procesima razvija cijeli organizam, složeni sustav koji radi prema evolucijski naslijeđenim mehanizmima, ali je ujedno i unikatan i jedinstven za svaku jedinku. Za formiranje embrija iz zigote potrebne su pravilne diobe stanica i povećanje njihovog broja, stvaranje asimetrija i određivanje strana tijela, diferencijacija stanica i složeniji procesi koji je slijede, a to su morfogeneza i organogeneza. Tijekom ranog razvoja kralježnjaka diferencijacija stanica potaknuta je induktivnim signalima iz okoliša u kojemu se ta stanica nalazi. Proces indukcije temelji se na izmjeni signala između stanica. Putem signalnih molekula u koje ubrajamo parakrine i jukstakrine faktore stanice komuniciraju te se međusobno usmjeravaju ka pravilnom razvojnog putu. Cilj ovog rada bio je predstaviti osnovne signalne puteve tijekom ranog razvoja kralježnjaka.

Ključne riječi: kralježnjaci, oplodnja, razvoj, signalizacija

## **9. SUMMARY**

The vertebrate subphylum counts over 70,000 different species. Each individual within this subphylum is formed from a single fertilised cell called the zygote, by merging a sperm and ovum cell. From a zygote stadium, through successive divisions and complex processes, an entire organism develops as a complex system that works according to evolutionarily inherited mechanisms but is also unique to each individual. The formation of embryos from zygotes requires proper cell division and increase in their number, creation of asymmetry and determination of body axis, cell differentiation, and more complex processes that follow, morphogenesis and organogenesis. During early vertebrate development, cell differentiation is stimulated by inductive signals from the environment in which that cell is located. The induction process is based on the exchange of signals among cells. Through signalling molecules, which include paracrine and juxtacrine factors, cells communicate and direct each other towards the correct developmental path. The aim of this paper was to present the basic signalling pathways during early vertebrate development.

Key words: vertebrates, fertilisation, development, signalling

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Zadru gdje sam ujedno završila prirodoslovno-matematički smjer Gimnazije Franje Petrića i Glazbenu i plesnu školu Blagoje Bersa pri plesnom odsjeku. 2017. godine upisala sam preddiplomski studij Biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Tijekom preddiplomskog studija bila sam uključena u rad udruge BIUS putem organizacije Simpozija studenata bioloških usmjerenja i pisanja članaka u studentskom časopisu InVivo. Aktivno govorim engleski jezik, a pasivno se služim njemačkim jezikom.