

Ekspresija proteina za popravak DNA u testisu miševa s homozigotnom mutacijom u genu SPRTN

Barun, Žana

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:217:328432>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-07**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Žana Barun

**Ekspresija proteina za popravak DNA u
testisu miševa s homozigotnom mutacijom u
genu *SPRTN***

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Žana Barun

**DNA repair protein expression in testis of
mice with a homozygous mutation in the
SPRTN gene**

Master thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za istraživanje raka na Katedri za imunologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu, pod vodstvom prof. dr. sc. Ivane Marinović Terzić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Ekspresija proteina za popravak DNA u testisu miševa s homozigotnom mutacijom u genu *SPRTN*

Žana Barun

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Spermatogeneza je složen proces reguliran velikim brojem gena. Identifikacija specifičnih proteina u tkivu testisa ključna je za razumijevanje pravilnog razvoja zametnih stanica. U ovoj studiji istražili smo mijenja li se ekspresija proteina koji imaju ulogu u spermatogenezi i popravku DNA s obzirom na poremećaj funkcije proteina Spartan. Protein Spartan (kodiran *SPRTN* genom) uklanja DNA lezije koje mogu zaustaviti replikaciju i dovesti do nastanka dvolančanih lomova i genomske nestabilnosti. Mutacije u genu *SPRTN* uzrokuju nastanak hepatocelularnog karcinoma te sindroma preuranjenog starenja nazvanog Ruijs-Aalfs, poznatog i kao Spartan sindrom. U ranijim studijama je dokazana veća ekspresija *SPRTN* gena u testisima u odnosu na ostala tkiva što ukazuje na njegovu važnu ulogu u tkivu testisa. U našoj studiji testirali smo promjene izražaja odabranih proteina uključenih u održavanje stabilnosti DNA i replikaciju. Imunohistokemijskom metodom pokazali smo da postoji promijenjena ekspresija pojedinih proteina u tkivu testisa miševa s homozigotnom mutacijom u genu *SPRTN*.

(50 stranica, 13 slika, 10 tablica, 88 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: spermatogeneza, ekspresija proteina, imunohistokemija, transgenični miševi

Voditelj: Prof. dr. sc. Ivana Marinović Terzić, dr. med.

Suvoditelj: Prof. dr. sc. Nada Oršolić

Ocjenitelji: Prof. dr. sc. Nada Oršolić

Izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner

Doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević

Rad prihvaćen: 25.11.2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

DNA repair protein expression in testis of mice with a homozygous mutation in the *SPRTN* gene

Žana Barun

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Spermatogenesis is a complex process regulated by a large number of genes. Identification of specific proteins in testicular tissue is important for development of germ cells. In this study, we investigated whether the expression of proteins that play a role in spermatogenesis and DNA repair changes with dysfunction of Spartan protein. The Spartan protein (encoded by the *SPRTN* gene) removes DNA lesions that can stop replication and lead to double-stranded breaks and genomic instability. Mutations in the *SPRTN* gene cause hepatocellular carcinoma and a syndrome of premature aging called Ruijs-Aalfs, also known as Spartan syndrome. Previous studies have shown greater expression of the *SPRTN* gene in the testes compared to other tissues indicating its important role in testicular tissue. By immunohistochemical method, we showed that there is an altered expression of certain proteins in testis tissue of mice with a homozygous mutation in the *SPRTN* gene.

(50 pages, 13 figures, 10 tables, 82 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: spermatogenesis, protein expression, immunohistochemistry, transgenic mice

Supervisor: Dr Ivana Marinović Terzić, Full Prof., MD

Co-supervisor: Dr Nada Oršolić, Full Prof.

Reviewers: Dr Nada Oršolić, Full Prof.

Dr Jasna Lajtner, Assoc. Prof.

Dr Sofia Ana Blažević, Asst. Prof.

Thesis accepted: 25.11.2021.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Spartan.....	1
1.1.1. Sindrom Ruijs-Aalfs	4
1.2. Fiziologija testisa.....	7
1.3. Uloga testiranih proteina u fiziologiji stanice i spermatogenezi	10
1.3.1. hnRNPK.....	10
1.3.2. PCNA.....	11
1.3.3. γ H2AX	13
1.3.4. p53.....	14
1.4. Cilj istraživanja	15
2. MATERIJALI I METODE.....	16
2.1. Mjesto i ustroj istraživanja	16
2.2. Materijal	16
2.2.1. Tehnologija stvaranja <i>knock-in</i> transgeničnih miševa	17
2.3. Metoda imunohistokemije.....	18
2.3.1. Uklapanje tkiva u parafin i rezanje	18
2.3.2. Fiksacija tkiva	19
2.3.3. Deparafinizacija i rehidracija.....	20
2.3.4. Razotkrivanje antigena pomoću topline.....	20
2.3.5. Detekcija antigena i imunohistokemijsko bojanje	20
2.3.6. Imunohistokemijska analiza.....	22
2.3.7. Analiza morfologije tkiva	24
2.3.8. Statistička analiza.....	24
3. REZULTATI.....	25
3.1. Analiza ekspresije hnRNPK.....	25
3.2. Analiza ekspresije PCNA.....	28
3.3. Analiza ekspresije γ H2AX.....	31
3.4. Analiza ekspresije p53	34
4. RASPRAVA	37
5. ZAKLJUČAK.....	42
6. LITERATURA	43
7. ŽIVOTOPIS.....	50

1. UVOD

1.1. Spartan

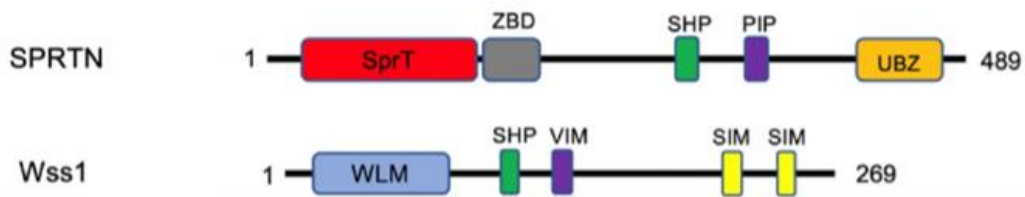
Protein Spartan (kodiran *SPRTN* genom, poznat i kao Dvc1 ili C1orf124) je DNA ovisna proteaza sisavaca koja doprinosi stabilnosti genoma i staničnoj homeostazi, a sudjeluje u uklanjanju citotoksičnih DNA lezija (engl. *DNA-protein crosslinks*, DPC). DPC su složene lezije koje nastaju kada je protein kovalentno vezan na molekulu DNA (Stingele i sur. 2016). Ako se DPC ne uklone, postaju prepreka za DNA replikaciju, transkripciju gena i modifikaciju kromatina (Stingele i sur. 2015). To dovodi do nestabilnosti genoma, stanične smrti i nemogućnosti sinteze proteina koji su neophodni za staničnu homeostazu (Vaz i sur. 2016). Tijekom DNA replikacije Spartan uklanja različite supstrate koji se vežu na DNA tijekom S-faze i tako štiti proliferacijske stanice od toksičnosti (Vaz i sur. 2016). Spartan je esencijalni protein jer miševi bez *SPRTN* gena umiru vrlo rano tijekom embrionalnog razvoja, a miševi sa mutiranim *SPRTN* genom pokazuju znakove preuranjenog starenja (Maskey i sur. 2014).

Iako je Spartan neupitno bitan za stabilnost genoma, njegova molekularna funkcija i dalje ostaje nedovoljno jasna. Početna istraživanja sugerirala su da je Spartan važan za regulaciju popravka translezijskom sintezom (TLS), iako postoje različiti izvještaji o njegovom stvarnom molekularnom mehanizmu (Centore i sur. 2012; Mosbech i sur. 2012). Međutim, pokazalo se da fenotipovi uočeni u miševima i ljudskim stanicama nisu povezani s TLS-om, što sugerira da Spartan održava cjelovitost genoma po nepoznatom mehanizmu (Lessel i sur. 2014; Maskey i sur. 2014). Trenutno je poznato da Spartan pomoću metaloproteazne domene uklanja proteine kovalentno vezane za DNA, što spada u najčešće tipove DNA lezija (Stingele i sur. 2016).

Aktivnost proteina Spartan modulira se na tri razine: pomoću post-translacijskih modifikacija, vezanjem na definiranu strukturu DNA i interakcijom s proteinima (Ruggiano i Ramadan 2021). Deubikvitinacija proteina Spartan je važna za njegovo vezanje za kromatin i aktivaciju. Kao odgovor na DPC, VCPIP1/VCIP135 bude fosforilirana i aktivirana djelovanjem ATM/ATR. VCPIP1 zauzvrat deubikvitinira Spartan i potiče njegovo vezanje za kromatin. Deubikvitinacija proteina Spartan je potrebna za njegovu acetilaciju, što pospješuje vezanje proteina Spartan na mjesta oštećenja kromatina. Također, VCPIP1 *knock-out* miševi su skloni genomskoj nestabilnosti

i preranom starenju što je uočeno i kod miševa sa mutiranim *SPRTN* genom (Huang i sur. 2020). Spartan sadrži više domena: metaloproteazna SprT (engl. *SprT-like domain*); domena koja veže cink (engl. *Zinc binding domain*, ZBD); SHP domena preko koje se Spartan veže za protein VCP (p97) koji sudjeluje u DNA popravku; PIP regija (*PIP box*) koja predstavlja vezno mjesto za PCNA i domena s motivom cinkovih prstiju koja veže ubikvitin (engl. *ubiquitin binding zinc finger domain*, UBZ). Vežanje proteina Spartan i ubikvitina na PCNA potiče njegovo vežanje na mjesta oštećenja DNA (Mosbech i sur. 2012). C-terminalne domene Spartana su važne u procesu popravka DNA putem translezijske sinteze i prepoznavanju DNA oštećenja, a SprT domena, lokalizirana u N-terminalnom dijelu ima metaloproteaznu aktivnost (Vaz i sur. 2016).

Metaloproteaza Wss1 u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* uklanja DPC inducirane formaldehidom i antitumorskim sredstvom Topotekanom (*Camptothecin*) (Lopez-Mosqueda i sur. 2016). Zbog slične funkcije, ali i strukture metaloproteazne domene SprT s WLM domenom u Wss1, smatra se da je Spartan homolog proteazi Wss1, odnosno da imaju zajedničko evolucijsko podrijetlo (Slika 1) (Stingele i sur. 2014; Stingele i sur. 2015). Wss1 putem svoje dvije SIM c-terminalne domene prepoznaje i veže proteine posttranslacijski modificirane SUMO proteinima (engl. *small ubiquitin like modifier*, SUMO), koji su strukturno slični ubikvitinu, što rezultira usmjerenjem Wss1 proteina na mjesto oštećenja DNA (Stingele i sur. 2014; Zhang i sur. 2020). Ulogu SIM domena u proteinu Spartan preuzimaju UBZ domena koja prepoznaje i veže ubikvitinirane proteinske partnere, te MIU domena na N-terminalnom dijelu proteina koja prepoznaje i veže ubikvitinirane i sumoilirane proteine (Ruggiano i Ramadan 2021). Inaktivacija Spartana uzrokuje akumulaciju DPC-a u proliferacijskim ljudskim stanicama, kao i nemogućnost uklanjanja topoizomeraza Topo1 i Topo2a s DNA. Suprotno tome, stanice kvasca u kojima je inaktiviran Wss1 ne akumuliraju DPC (Stingele i sur. 2014).



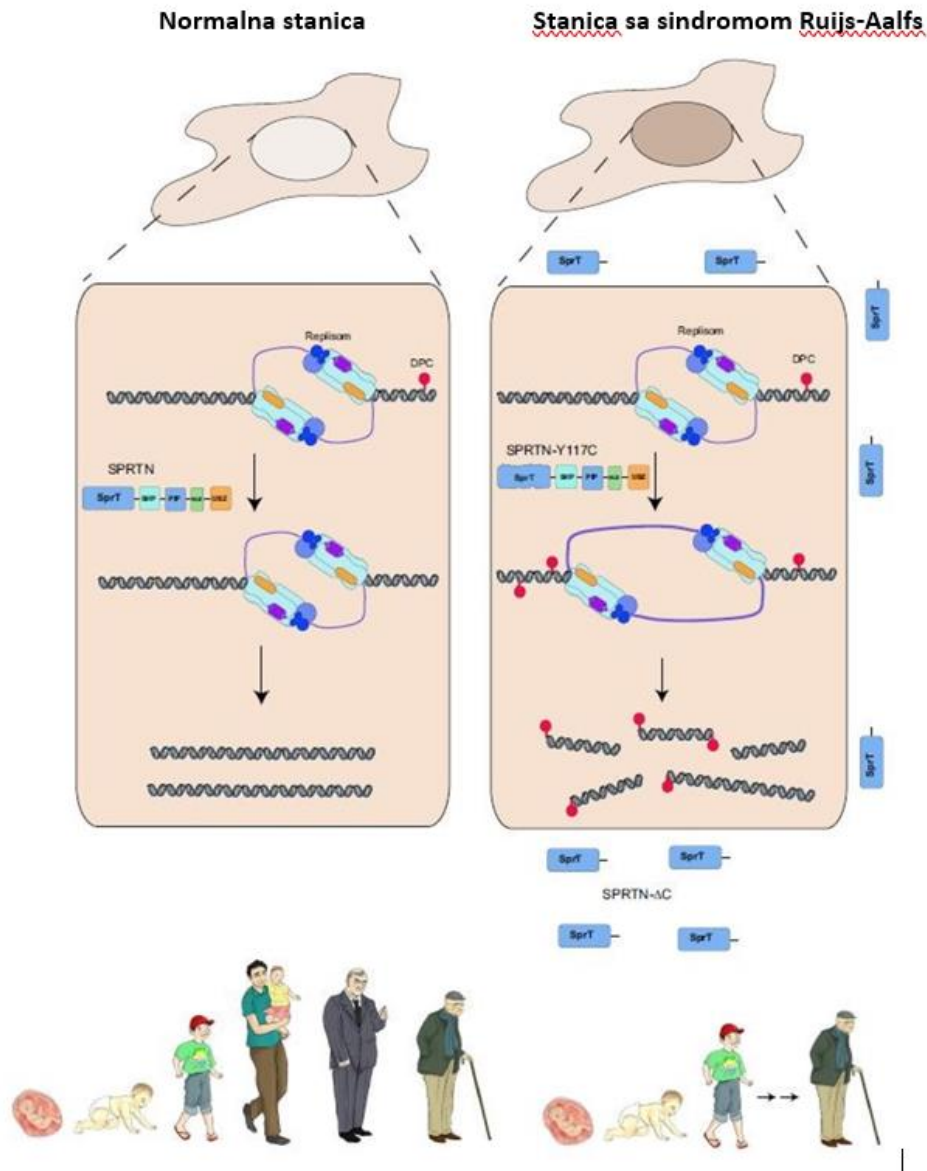
Slika 1. Usporedba organizacije domena *SPRTN* i *Wss1*. SprT, metaloproteazna domena; ZBD, domena vezanja cinka; PIP, vezno mjesto PCNA; SHP, vezno mjesto za VCP; UBZ, domena koja veže ubikvitin; WLM, metaloproteazna domena; VIM, vezno mjesto za VCP; SIM, vezno mjesto Sumo proteina (Sun i sur. 2020).

1.1.1. Sindrom Ruijs-Aalfs

Ruijs-Aalfs, poznat kao Spartan sindrom je segmentalni progeroidni sindrom koji nastaje kao rezultat mutacija u genu *SPRTN*. Progeroidni sindrom je rijedak nasljedni poremećaj u kojem su fiziološki pokazatelji starenja ubrzani kao što su nizak rast, sijeda kosa, mišićna atrofija i gubitak vida (Centore i sur. 2012; Hiom 2014; Lessel i sur. 2014). Stanice pacijenata sa mutacijama u genu *SPRTN* iskazuju genomsku nestabilnost, a dokazano je da pojedinci oboljeli od Ruijs-Aalfs sindroma razvijaju hepatocelularni karcinom u adolescentnoj dobi (Lessel i sur. 2014). Biopsijom jetre pokazano je da fibroblasti osoba sa Ruijs-Aalfs sindromom imaju slabiju proliferaciju, što upućuje na poteškoće u replikaciji DNA (Hiom 2014). Funkcija uklanjanja DNA lezija je poremećena u osoba s Ruijs-Aalfs sindromom (Lopez-Mosqueda i sur. 2016).

Identificirane su mutacije *SPRTN* gena zametnih stanica kod triju muškaraca iz dvije nepovezane obitelji koji su imali Ruijs-Aalfs sindrom. Prvi pacijent je naslijedio homozigotnu deleciju mutaciju koja je rezultirala prijevremenim stop kodonom, a kao posljedica dolazi do gubitka karboksilno-terminalnog dijela proteina Spartan (*SPRTN-ΔC*). Preostala dva pacijenta su naslijedila bialelne mutacije. Na jednom alelu je prisutna točkasta mutacija koja uzrokuje prijevremeni prekid translacije slično kao i *SPRTN-ΔC*, dok je na drugom alelu *missense* mutacija (mutacija krivog smisla) uzrokovala zamjenu aminokiseline tirozina u cistein na položaju 117 u proteinu (*SPRTN-Y117C*). Proteolitička aktivnost Spartana ključna je za pružanje tolerancije na spojeve koji induciraju DPC. Mutant *SPRTN-ΔC* na karboksilno-terminalnoj domeni nema ubikvitin vezujuću domenu UBZ, jezgrin lokalizacijski signal (engl. *nuclear localization signal*, NLS) koji je potreban za ulazak u jezgru i SHP domenu koja je potrebna za vezanje VCP (Lessel i sur. 2014; Lopez-Mosqueda i sur. 2016). Zbog toga dolazi do djelomičnog gubitka proteolitičke aktivnosti koja je i dalje dostatna za preživljavanje stanice. Na taj način pacijent sa Ruijs-Aalfs sindromom može preživjeti adolescentne godine dok se ne razvije hepatocelularni karcinom. Mutant *SPRTN-Y117C* ima sposobnost lokalizacije oštećenja DNA, što pokazuje da nemogućnost vezanja VCP nije bila uzrok replikacijskog stresa u ovog mutanta. Ipak, mutanta *SPRTN-Y117C* ne može nadomjestiti nedostatak funkcije mutanta *SPRTN-ΔC*, čime ukazuje na veliku važnost funkcije domene SprT lokalizirane na aminoterminalnom kraju proteina (Hiom 2014). Pokazalo se da svi pacijenti koji imaju ove mutacije pokazuju značajke progeroidnog sindroma i razviju hepatocelularni karcinom (Lopez-Mosqueda i sur. 2016). Uz to, izolirane stanice pacijenata

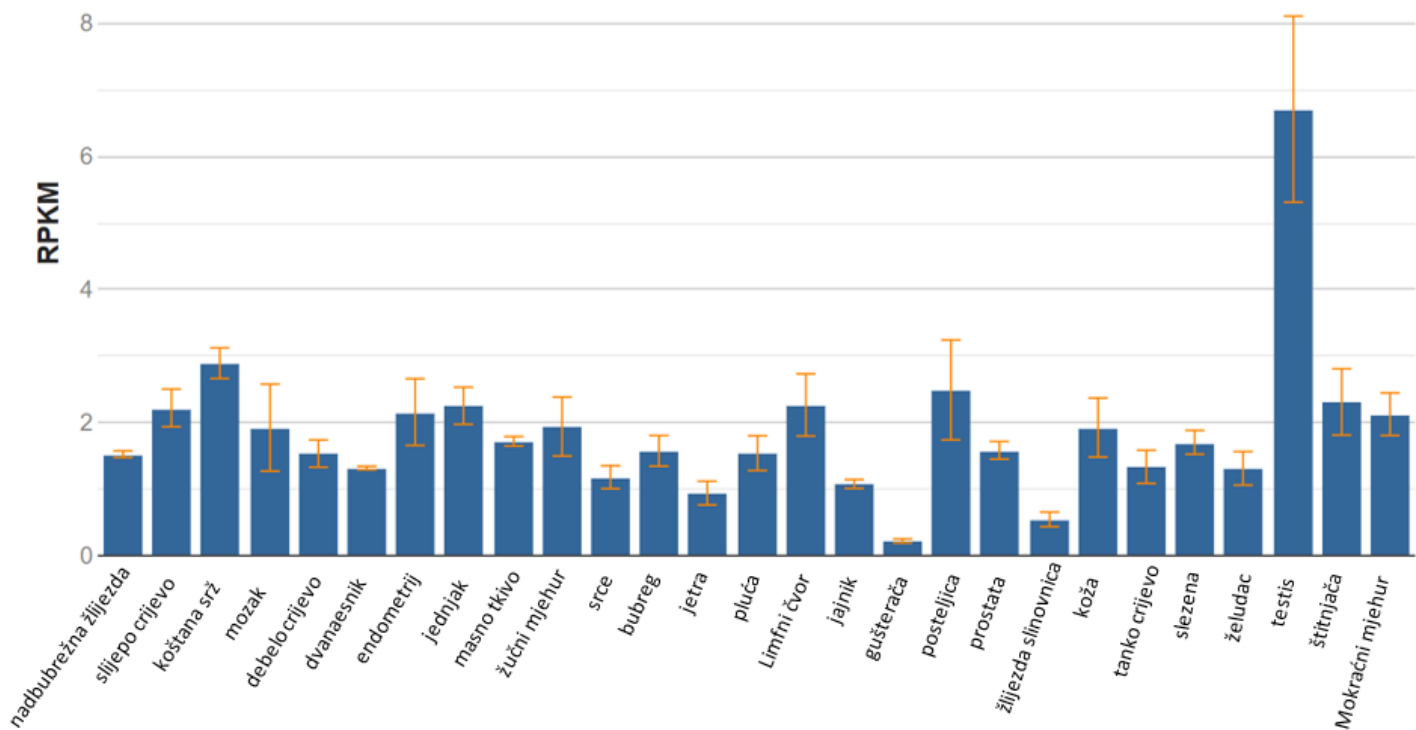
pokazale su genomsku nestabilnost, sporiju replikaciju i povećani broj dvostrukih lomova (Slika 2) (Vaz i sur. 2016).



Slika 2. Model uklanjanja DNA lezija djelovanjem proteina Spartan. Spartan uklanja DPC kako bi se DNA replikacija nesmetano odvijala. Ako je Spartan odsutan ili nefunkcionalan kao u pacijenata sa Ruijs-Aalfs sindromom (SPRTN-Y117C ili SPRTN-ΔC), DPC se nakuplja i ometa transkripciju i replikaciju DNA što dovodi do tumorigeneze, genomске nestabilnosti i ubrzanog starenja (preuzeto i prilagođeno od Lopez-Mosqueda i sur. 2016).

Homozigotni *SPRTN knock-out* (KO) miševi umiru u vrlo ranoj fazi embrionalnog razvoja i nemaju mogućnost stvaranja potomaka. Miševi sa hipomorfnim (reducirana genska ekspresija) alelima *SPRTN*-a usporeni su u rastu, imaju lipodistrofiju, razvijaju mreću i kaheksiju, simptome koji su tipični za progeroidni sindrom. Usporedba hipomorfničkih *SPRTN* miševa s pacijentima s Ruijs Aalfsovim sindromom koji nose mutacije gena *SPRTN* pokazuje sličnosti koje dokazuju evolucijski očuvanu funkciju ovog proteina, što nadalje implicira važnu ulogu proteina Spartan (Ruijs i sur. 2003; Maskey i sur. 2014).

U ovoj pilot studiji koristili smo miševe s mutacijom Y117C u genu *SPRTN* proizvedene tehnologijom *knock-in*. U istraživanju smo koristili tkivo testisa jer su u našim prijašnjim analizama masenom spektrometrijom pronađeni važni interaktori proteina Spartan koji su ključni za spermatogenezu. Nadalje, ekspresija *SPRTN* gena u testisima je veća nego u ostalim testiranim tkivima, što ukazuje na njegovu važnu ulogu u tkivu testisa (Slika 3). Činjenice da je sposobnost razmnožavanja homozigotnih *knock-in* miševa oštećena, te da nema zabilježenih slučajeva mutacija kod žena su nas navele da usmjerimo naše istraživanje upravo na tkivo testisa. Kao kontrola koju smo koristili za usporedbu proteinske ekspresije u tkivu testisa su korišteni *knock-in* miševi heterozigotni za mutaciju Y117C u genu *SPRTN*, s obzirom da su roditelji oboljelih dječaka opisanih u literaturi bili heterozigoti za istovjetnu mutaciju u genu *SPRTN* poput navedenih kontrolnih miševa, te su bili potpuno bez simptoma progeroidnog poremećaja i nisu razvijali hepatocelularni karcinom.



Slika 3. Ekspresija *SPRTN* gena u tkivima

Kratica: RPKM - engl. reads per kilobase per million reads placed, očitavanja po kilobazi na milijun očitavanja

(preuzeto sa stranice <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/83932>).

1.2. Fiziologija testisa

Dvije glavne funkcije testisa su proizvodnja spermija i hormona. Sjemenski kanalić testisa se sastoji od ovojnice od vezivnog tkiva, bazalne lamine i sjemenog epitela u kojem se nalaze Sertolijeve stanice koje podupiru razvoj zametnih stanica, somatske stanice i stanice spermatogenetske loze koje su poredane u 4-6 redova: spermatogonije, primarne i sekundarne spermatocite, spermatide i spermiji (Slika 4) (Russell i sur. 1990; Junquiera i Carneiro 2005).

Spermatogeneza se odvija u sjemenim kanalićima testisa da bi se proizveli zreli funkcionalni spermiji (Neto i sur. 2016). U sjemenim kanalićima spermatogeneza se ne odvija u isto vrijeme.

Zbog ovakve razlike histološki rezovi testisa imaju različite faze spermatogeneze, pa je u nekima više spermatida, a u drugima više spermija što se naziva ciklusom sjemenskog epitela (Junquiera i Carneiro 2005).

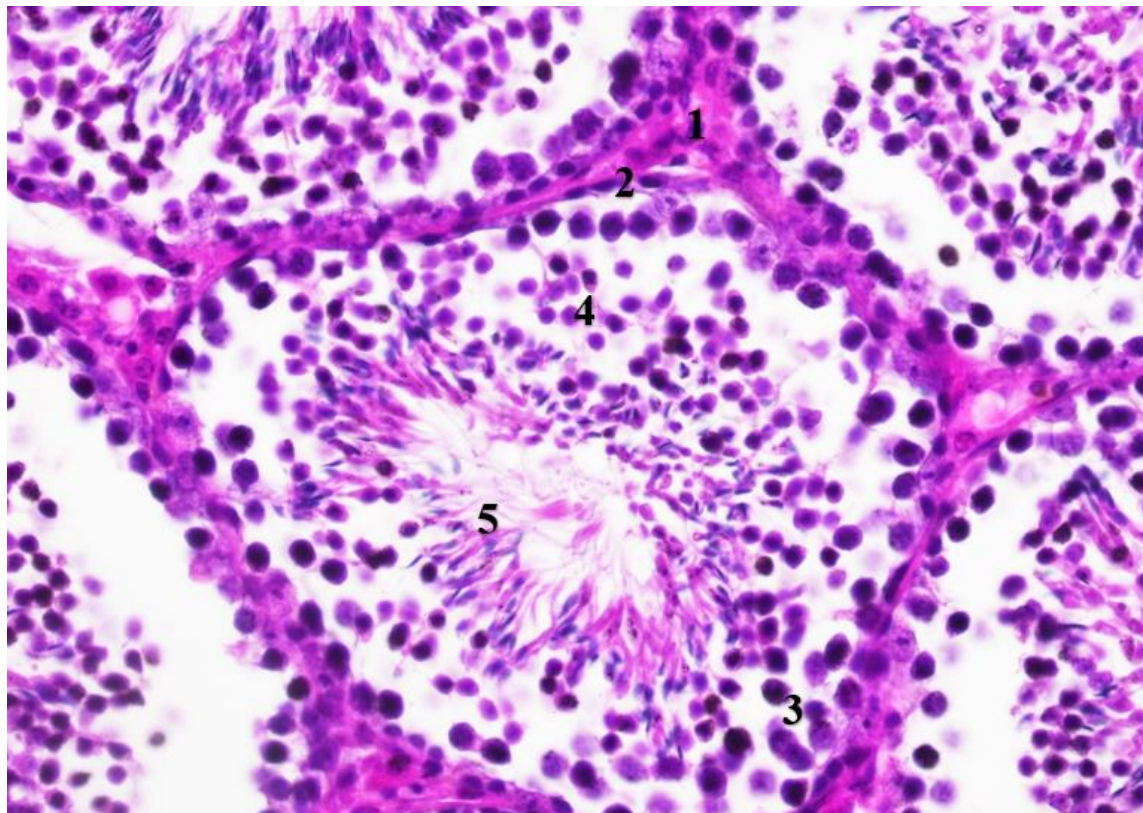
U testisu odraslog miša mitotski aktivne spermatogonije su najosjetljivije, dok su spermatocite koje prolaze kroz mejotičke diobe i spermatide koje se razvijaju u spermije otpornije na ionizirajuće zračenje. Spermatogonije se dijele na spermatogonije tipa A koje su nediferencirane matične stanice i spermatogonije tipa B, a nalaze se na periferiji sjemenskih kanalića i u dodiru sa krvlju. Spermatogonije tipa B se dijele mitotskom diobom i tvore primarne spermatocite (Russell i sur. 1990; Hamer i sur. 2003). Primarne spermatocite ulaze u profazu prve mejotske diobe. Na histološkim preparatima se veliki dio stanica nalazi u ovoj fazi. Iz primarnih spermatocita nastaju sekundarne spermatocite koje su kratkog vijeka i teško ih je prepoznati na histološkim rezovima (Junquiera i Carneiro 2005). Sekundarne spermatocite ulaze u drugu mejotsku diobu koja dovodi do nastajanja okruglih spermatida koje su haploidne stanice. Spermatide postupno prelaze u fazu diferencijacije koja vodi razvoju zrelih spermija. Do 8. dana nakon rođenja u sjemenim kanalićima miša su prisutne samo Sertolijeve stanice i spermatogonije. Mejoza počinje deseti dan, spermatide se pojavljuju do 18. dana nakon završetka mejoze, a za spermije je potrebno dodatnih 14 dana za diferencijaciju i otpuštanje u sjemeni epitel (Bellve i sur. 1977; Murta i sur. 2013).

Navedene procese podupiru Sertolijeve stanice koje su važne za razvoj zametnih stanica, posebno stvaranjem i osiguravanjem energije (Russell i sur. 1990). Tijekom fetalnog razvoja, Sertolijeve stanice se diferenciraju prve i okružuju zametne stanice (Magre i Jost 1991). Kod miševa Sertolijeve stanice se nastavljaju proliferirati do 17. dana nakon rođenja, a nakon toga je uspostavljena njihova stalna količina. U odrasloj dobi, spermatogeneza je ovisna o broju i funkciji Sertolijevih stanica jer pružaju strukturnu potporu za sazrijevanje zametnih stanica (Orth 1982; Vergouwen i sur. 1991). U sjemenskim kanalićima izlučuju tekućinu koja je medij za prijenos spermija, a važne su i za koncentriranje testosterona u sjemenskim kanalićima gdje je ovaj hormon potreban za proces spermatogeneze (Junquiera i Carneiro 2005). Glavni regulator njihove funkcije je folikulostimulirajući hormon, FSH. Nakon početne diferencijacije Sertolijevih stanica počinju se diferencirati Leydigove stanice u intersticijskom prostoru (Migrenne i sur. 2012).

Leydigove stanice su intersticijske endokrine stanice koje proizvode muški spolni hormon, testosteron. Postoje dva razdoblja nastajanja Leydigovih stanica. Prva generacija Leydigovih

stanica razvija se tijekom fetalnog razvoja, a izlučeni testosteron odgovoran je za razvoj urogenitalnog sustava (Habert i sur. 2001). Većina fetalnih Leydigovih stanica propada, ali neke opstaju u odrasloj dobi (Ariyaratne i Mendis-Handagama 2000). Druga generacija Leydigovih stanica pojavljuje se u pubertetu lučeći testosteron potreban za početak spermatogeneze i održavanje reproduktivne funkcije (Habert i sur. 2001).

Tijekom spermatogeneze Spartan protein lokalizira se na replicirajući genom i potreban je za segregaciju kromosoma tijekom prve embrionalne diobe (Delabaere i sur. 2014). S obzirom da je poznato da Spartan sudjeluje u uklanjanju citotoksičnih lezija i doprinosi stabilnosti genoma, u ovoj pilot studiji istraživali smo utjecaj funkcije proteina Spartan u tkivu testisa na ekspresiju proteina hnRNPK, PCNA, γ H2AX i p53 koji su uključeni u osnovne mehanizme popravka i replikacije DNA.



Slika 4. Građa sjemenog kanalića testisa obavijenog ovojnicom vezivnog tkiva. 1-Leydigove stanice u intersticijskom prostoru, 2- Sertolijeve stanice, 3-primarne spermatocite, 4-spermatide, 5-spermiji u lumenu (slikano pomoću svjetlosnog mikroskopa Olympus CKX4)

1.3. Uloga testiranih proteina u fiziologiji stanice i spermatogenezi

Spermatogeneza je složen proces u kojem se spermatogonije razvijaju u zrele spermije kontinuiranom mitozom, mejozom i staničnom diferencijacijom u testisima (Fattahi i sur. 2017).

Iako je većina tkiva u organizmu genetski identična, biokemija svakog je jedinstvena i ima fiziološku ulogu s važnim posljedicama za zdravlje ljudi. Jedinstvena fiziologija svakog tkiva zahtijeva reguliranu ekspresiju gena i proteina, stoga smo proučili tkivo testisa i proces spermatogeneze koji je reguliran nizom gena koji kodiraju proteine, uključujući hnRNPK, PCNA, γ H2AX i p53 koji sudjeluju u proliferaciji i diferencijaciji stanica u testisima, popravku DNA i kontroli staničnog ciklusa (Huttlin i sur. 2010; Griswold 2016; Zhao i sur. 2018).

1.3.1. hnRNPK

Heterogeni nuklearni ribonukleoprotein K (hnRNPK) je multifunkcionalni protein koji sudjeluje u staničnoj signalizaciji i regulaciji ekspresije gena. Multifunkcionalni je protein koji sudjeluje u transkripciji, translaciji, popravku DNA i remodeliranju kromatina, a ima ključnu ulogu u procesu spermatogeneze i karcinogeneze (Barboro i sur. 2014; Gallardo i sur. 2016). Identificiran je kao interakcijski partner proteina Spartan u analizi masenom spektrometrijom (Marinović, neobjavljeni podaci). HnRNPK se eksprimira u spermatogonijama, spermatocitima, spermatidama, Sertolijevim i Leydigovim stanicama (Xu i sur. 2018). U eukariota se hnRNPK eksprimira u mnogim stanicama i tkivima, ali razine ekspresije variraju tijekom različite razvojne faze. Nalazi se pretežno u jezgri i citoplazmi, te u mitohondrijima i plazma membranama (Gallardo i sur. 2016). HnRNPK ima dvije izoforme. Izoforma a je izražena u zdravim testisima, a izoforma b je izražena u različitim staničnim linijama tumora (Chen i sur. 2017). HnRNPK služi kao transkripcijski kofaktor za p53 tijekom odgovora na oštećenje DNA (Moumen i sur. 2005).

Prekomjerna ekspresija hnRNPK je povezana sa tumorigenozom (Chen i sur. 2017), odnosno ima važnu ulogu u progresiji raka, budući da visoka razina njegove ekspresije korelira s lošim kliničkim ishodom (Carpenter i sur. 2006; Barboro i sur. 2009). Prethodna istraživanja su pokazale da manja ekspresija hnRNPK u somatskim stanicama uzrokuje zastoj staničnog ciklusa

kao odgovor na oštećenje DNA. Suprotno, prekomjerna ekspresija hnRNPK pojačava proliferaciju tumorskih stanica (Yu i sur. 2011).

Miševi sa bialelnom mutacijom *hnRNPK* ne preživljavaju embrionalni razvoj što pokazuje značajnu ulogu hnRNPK u razvoju i preživljavanju kroz regulaciju stanične proliferacije i diferencijacije (Dinh i sur. 2013; Gallardo i sur. 2015).

Najmanje se zna o tome koliko je hnRNPK eksprimiran i reguliran u spermatogenezi (Xu i sur. 2018). Zdravo tkivo testisa miša sadrži hnRNPK koji je uglavnom lokaliziran u jezgri primarnih spermatacita, ali može biti izražen i u abnormalnim stanicama. Smanjena ekspresija hnRNPK u testisima može inhibirati proliferaciju i pokrenuti apoptozu stanica (Yu i sur. 2011).

Istraženo je da se hnRNPK eksprimira u različitim razvojnim fazama testisa tijekom spermatogeneze, a lokaliziran je u različitim dijelovima stanica, što podrazumijeva potencijalno važne uloge ovog proteina u spermatogenezi sisavaca (Xu i sur. 2018).

1.3.2. PCNA

PCNA je nuklearni antigen proliferirajućih stanica (engl. *proliferating cell nuclear antigen protein*). Sintetizira se tijekom G1 i S faze staničnog ciklusa, a sudjeluje u DNA replikaciji i DNA popravku. U ranoj S fazi ga nema u jezgri, ali u kasnoj S fazi se premješta u jezgru. Na histološkim preparatima PCNA antitijelo pokazuje nuklearno obojenje (<https://datasheets.scbt.com/sc-56.pdf>). PCNA kao regulatorni proteinski biljeg staničnog ciklusa, povezan je sa sintezom DNA i uključen je u inicijaciju proliferacije stanica (Park i sur. 2014). PCNA je uključen u replikaciju DNA, rekombinaciju kromosoma, metilaciju DNA i transkripciju RNA. Njegova interakcija s proteinom Spartan je dokazana i biokemijski karakterizirana (Centore i sur. 2012). Ekspresija PCNA se koristi kao biljeg za procjenu proliferacije stanica (Kubota i sur. 2013), a ima multifunkcionalnu ulogu jer može biti u interakciji sa drugim staničnim proteinima (Fukuda i sur. 1995).

PCNA gen je induciran sa p53, dok PCNA protein stupa u interakciju s Gadd45, MyD118, CR6, p21 i brojnim proteinima koji sudjeluju u DNA replikaciji kao i različitim tipovima popravka DNA te ima ključnu ulogu u odgovoru na DNA oštećenje (engl. *DNA damage response*, DDR).

Prikladno je pozicioniran na replikacijskoj viljušci i koordinira replikaciju DNA s popravkom i putovima tolerancije oštećenja DNA, tako što je podložan različitim posttranslacijskim modifikacijama, koje alternativno signaliraju aktiviranje različitih funkcija održavanja cjelovitosti DNA (Boehm i sur. 2016).

Prekomjerna ekspresija PCNA je najčešća pojava u tumorskim stanicama (Paunesku i sur. 2001). Dokazan je veći postotak PCNA pozitivnih stanica u zloćudnim tumorima što ukazuje na razliku u proliferaciji stanica između dobroćudnih i zloćudnih tumora (Preziosi i sur. 1995).

Analiza procesa spermatogeneze pomoću PCNA ekspresije se može koristiti kao rani biomarker za otkrivanje kemijski inducirane toksičnosti u testisu. Dokazano je da dolazi do smanjenja PCNA ekspresije i smanjenja proliferacije stanica testisa u štakora tretiranih ciklofosamidom za koji je dokazano da djeluje toksično na testis tako da se može koristiti kao biljeg za toksičnost u testisu (Lawrence i sur. 2008).

Izloženost etanolu smanjuje proliferaciju u testisima štakora i dovodi do značajnog smanjenja razine PCNA (Koh i Kim 2006). Dokazano je smanjenje razine PCNA u testisima miševa koji su bili izloženi visokoj temperaturi, što dovodi do poremećaja spermatogeneze, koja bi mogla biti posljedica smanjenja razine testosterona i povećanja oksidativnog stresa (Kanter i Aktas 2009; Roy i sur. 2016).

Mitoza spermatogonija važna je za održavanje homeostaze testisa i razvoj spermija, a PCNA ima važnu ulogu u DNA replikaciji, sintezi, popravku i kontroli staničnog ciklusa. PCNA se eksprimira u mitotski proliferirajućim spermatogonijama, ali ne i u spermatocitima koje su tek ušle u mejozu. Dokazano je da dolazi do povećane ekspresije PCNA tijekom ranog postnatalnog razdoblja, a smanjenja tijekom razdoblja prije puberteta i odrasle dobi. Ekspresija PCNA u Sertolijevim stanicama ukazuje na to da te stanice najviše proliferiraju pri rođenju (Jarvis i sur. 2005). Raspodjela stanica pozitivnih na PCNA pokazuje naznake abnormalnosti testisa. Uzrok može biti ako stanice ostaju u mitozu i nastavljaju se proliferirati ili ako spermatogonije izgube potporu Sertolijevih stanica (Chen i sur. 2017).

1.3.3. γ H2AX

γ H2AX je fosforilirani oblik histona H2AX na serinu 139, a koristi se kao biomarker oštećenja i popravka DNA te za procjenu djelovanja kemikalija ili zračenja (Motoyama i sur. 2018). γ H2AX se eksprimira kao odgovor na zračenje i genotoksični stres (Hamer i sur. 2003). Lokaliziran je u jezgri, a najviše eksprimiran u testisima, timusu i slezeni (<https://www.uniprot.org/uniprot/P27661>).

Kada se DNA ošteti i nastane dvostruki lom (engl. *double-strand break*, DSB), histon H2AX se fosforilira na serinu 139 i formira γ H2AX na mjestima oštećenja DNA. Ukoliko se DSB ne poprave nastaju mutacije, genomske nestabilnost i tumori. Mjesta lokalizacije γ H2AX imaju glavnu ulogu u aktivaciji DNA popravka (Hamer i sur. 2003). Fosforilirani H2AX aktivira p21, inhibitor kinaze ovisne o ciklinu, preko kojeg stanica zaustavlja stanični ciklus dok traje popravak DNA. Najveća tkivna razina fosforiliranog γ H2AX je pronađena u testisima neozračenih miševa, što ukazuje na to da se γ H2AX može povezati sa DSB-ovima koji nastaju tijekom mejoze u stanicama testisa (Mahadevaiah i sur. 2001). Fosforilacija histona H2AX smatra se najranijim zabilježenim staničnim odgovorom na DSB jer razine γ -H2AX dostižu svoj maksimum 10-30 minuta nakon izlaganja ionizirajućem zračenju (Mahadevaiah i sur. 2001). Interakciju proteina Spartan i fosforilirane verzije histona H2AX u ovom radu pokazali smo u analizi masenom spektrometrijom.

Kao odgovor na ionizirajuće zračenje, γ H2AX se eksprimira u spermatogonijama, spermatocitima i spermatidama (Hamer i sur. 2003). Gubitak γ H2AX-a dovodi do povećanja kromosomskih abnormalnosti, nemogućnosti DNA popravka, povećane osjetljivosti na zračenja i genomske nestabilnosti (Bassing i sur. 2002). U ozračenju spermatogoniji γ H2AX stupa u interakciju s p53 i ako je oštećenje veliko pokreće se apoptoza, a u slučaju uspješnog popravka nastavlja se stanični ciklus. P53 se aktivira s γ H2AX i kao odgovor na DNA oštećenja postaje hiperfosforiliran što pokazuje da je stvaranje γ H2AX rani korak u spermatogonijalnoj aktivaciji p53, a time i u spermatogonijalnoj apoptozi kao odgovoru na ionizirajuće zračenje. Iako i druge stanice testisa eksprimiraju ove proteine, njihova kolokalizacija je dokazana samo u spermatogonijama (Hamer i sur. 2003). Neovisno o zračenju, γ H2AX se eksprimira u B spermatogonijama i spermatocitima što pokazuje da tijekom spermatogeneze γ H2AX ima i druge funkcije koje ne moraju uključivati DSB (Hamer i sur. 2003).

1.3.4. p53

Apoptoza ima važnu ulogu u kontroli ukupnog broja zametnih stanica i ograničavanju abnormalne proliferacije stanica tijekom spermatogeneze. Protein supresor tumora p53 može biti izražen u testisima i uključen je u proces apoptoze te u kontrolu staničnog ciklusa, rast i diferencijaciju stanica (Hiroshi i sur. 2003). Djeluje kao supresor tumora u mnogim vrstama tumora, izaziva zaustavljanje rasta ili apoptozu ovisno o fiziološkim okolnostima i tipu stanice. Uključen je u regulaciju staničnog ciklusa kao trans-aktivator koji djeluje negativno na regulaciju stanične diobe kontrolirajući skup gena potrebnih za ovaj proces.

Lokaliziran je jezgri, mitohondrijima, endoplazmatskom retikulumu, citoplazmi i citosolu (<https://www.uniprot.org/uniprot/P02340>). U posljednjih nekoliko godina postoji interes za proučavanje drugih funkcija p53, uključujući regulaciju autofagije, staničnog metabolizma, regulacije funkcije matičnih stanica, nekrozu i njihovu potencijalnu ulogu u supresiji tumora (Biegging i sur. 2014). Iako nismo dokazali direktnu interakciju proteina Spartan i proteina Tp53, masenom spektrometrijom smo dokazali interakciju s TP53BP1, proteinom koji direktno veže i regulira aktivnost proteina Tp53, stoga nam je zanimljiva uloga proteina Spartan u regulaciji aktivnosti ovog biološkog puta.

Miševi sa mutiranim *p53* ne pokazuju poremećaje u spermatogenezi i plodnosti, ali je uočen veći broj ranih spermatogonija i njihova povećana proliferacija (Beumer i sur. 1998). Gubitak p53 u testisima dovodi do kontinuirane proliferacije, nakupljanja stanica s oštećenjem DNA, nastanka abnormalnih stanica i muške neplodnosti (Zalzali i sur. 2018).

Protein p53 je uključen u proliferaciju spermatogonija u testisima i u odgovoru na zračenje. U normalnom stanju, u većini tjelesnih stanica, p53 protein je prisutan u niskoj koncentraciji, ali kada su stanice izložene oštećenju DNA, poput ultraljubičastog zračenja, ekspresija proteina p53 se povećava (Raimondo i sur. 2019). Nakon zračenja ima važnu ulogu u uklanjanju oštećenih spermatogonija aktivacijom apoptoze (Beumer i sur. 1998).

1.4. Cilj istraživanja

Cilj istraživanja je istražiti utjecaj funkcije proteina Spartan na ekspresiju ciljanih proteina uključenih u osnovne mehanizme popravka DNA u tkivu testisa između *knock-in* miša s homozigotnom mutacijom u genu *SPRTN* i heterozigotnog miša. Koristili smo protutijela hnRNPK, PCNA, γ H2AX i p53 specifična za proteine koji sudjeluju u procesu spermatogeneze i imaju važnu ulogu u replikaciji DNA, odgovoru na DNA oštećenje i apoptozi. Rezultati našeg pilot istraživanja dati će nam smjernice za daljnje istraživanje funkcije i utjecaja proteina Spartan na popravak, replikaciju i održavanje cjelovitosti DNA.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Mjesto i ustroj istraživanja

Istraživanje je provedeno u Laboratoriju za istraživanje raka na Katedri za imunologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu. Istraživanje je prema ustroju pilot istraživanje, što spada u skupinu opažajnih istraživanja.

2.2. Materijal

U ovom radu koristili smo parafinske blokove s uzorcima tkiva testisa 4 miša od kojih su po genotipu dva miša *knock-in*, a dva miša su heterozigoti (Tablica 1). Korišteni su *knock-in* miševi s homozigotnom točkastom *missense* mutacijom u genu *SPRTN*, koja dovodi do zamjene tirozina u cistein na položaju 117 (*SPRTN*-Y117C), pozicioniran u metaloproteaznoj domeni. Također smo koristili heterozigot miševe u kojima je na isti način izmijenjen samo jedan alel, dok je drugi alel na homolognom kromosomu neizmijenjen (divlji tip gena ili *wild type*, wt). Miševi su kreirani za Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu u The Jackson laboratory, USA.

Tablica 1. Osnovni podaci miševa korištenih u istraživanju.

Oznaka parafinskog bloka	Genotip	Datum rođenja	Žrtvovanje	Tkivo	Starost
1169/19	<i>knock-in</i>	03.03.2017.	28.06.2019.	testis	27 mjeseci
1170/19	<i>knock-in</i>	03.03.2017.	28.06.2019.	testis	27 mjeseci
1171/19	heterozigot	25.03.2017.	28.06.2019.	testis	27 mjeseci
1172/19	heterozigot	20.06.2017.	28.06.2019.	testis	24 mjeseca

2.2.1. Tehnologija stvaranja *knock-in* transgeničnih miševa

Tehnika uvođenja strane (tuđe ili izmijenjene) DNA u zametnu liniju miša smatra se velikim tehnološkim napretkom u području razvojne biologije i genetike. Izmjena ekspresije nekih gena dovela je do razvoja nove ere u biomedicinskim znanostima (Kumar i sur. 2009). Ovakvom tehnologijom moguće je promatrati utjecaj funkcije pojedinog gena na rast, razvoj, preživljavanje ili razvoj bolesti. Do danas je razvijeno više tisuća mišjih transgeničnih linija. Tehnologija stvaranja transgeničnih linija podrazumijeva izbacivanje pojedinog gena iz funkcije u svim stanicama (*knock-out* tehnologija), uvođenje željene izmjene u gensku sekvencu u svim stanicama (*knock-in* tehnologija), te uvođenje neke od spomenutih izmjena samo u ciljanim stanicama, tkivima ili organima ili aktivaciju genske promjene u željenom trenutku pomoću odgovarajućih kemikalija, tehnologija stvaranja kondicijskih (engl. *conditional*) transgeničnih životinja (Ryding i sur. 2001; Doyle i sur. 2012). Tehnologija stvaranja transgeničnih životinja postala je najpopularnija metoda izmjene DNA u genomu domaćina. Miševi su vrsta pogodna za spomenutu tehnologiju jer je njihov uzgoj relativno jeftin i lako ih je množiti i održavati (Nagy i sur. 2003). Miš je koristan i kao model za istraživanje raka ili drugih bolesti kod ljudi jer ima više anatomskih, staničnih i molekularnih karakteristika sličnih ljudima. Također, miš se smatra ljudskim ortologom zbog 80 % sličnosti genoma i potpuno je poznat slijed baza u oba genoma (Waterston i sur. 2002).

Strana DNA se može unijeti u genom miša na tri načina. Prva metoda uključuje unos DNA retrovirusnom transfekcijom embrija miša u različitim fazama razvoja. Zbog mnogih tehničkih problema ova metoda nije u praksi za rutinsku proizvodnju transgenih miševa (Nagy i sur. 2003). Druga metoda uključuje izravnu mikroinjekciju strane DNA u pronukleus stanica mišjih blastocista, te je takva integracija u genom nasumična (Palmiter i Brinster 1986). Treća metoda ciljane mutacije gena (engl. *gene targeting* ili *editing*) koristi ciljanu manipulaciju mišjih embrionalnih matičnih stanica na željenim lokusima što dovodi do unošenja stranih sekvenci (transgena) u mišji genom ili modificiranja specifičnog endogenog mišjeg gena (*knock-out/knock-in*). Takva ugradnja je ciljana homolognom rekombinacijom (Doyle i sur. 2012). Genetski modificirane embrionalne matične stanice se mikroinjektiraju u mišje blastociste i nastaju kimerični miševi koji se u prvoj generaciji trebaju spariti sa divljim tipom da bi došlo do stvaranja heterozigotne transgenične linije. Ova tehnologija omogućuje istraživanja patofizioloških procesa i upotrebu transgeničnih modela u translacijskim istraživanjima u medicini.

U *knock-in* mišu se modificira gen u točno određenom genskom lokusu (Tratar i sur. 2018). U ovom radu smo koristili dva *knock-in* miša s homozigotnom točkastom *missense* mutacijom u genu *SPRTN*, koja dovodi do zamjene tirozina u cistein na položaju 117 (*SPRTN-Y117C*), pozicioniran u metaloproteaznoj domeni. To je mutacija opisana kod dva pacijenta, koji su u adolescenciji razvili progeriju i hepatocelularni karcinom (Ruijs-Aalfs sindrom). Također smo koristili dva heterozigot miša u kojima je na isti način izmijenjen samo jedan alel, dok je drugi alel na homolognom kromosomu neizmijenjen (divlji tip gena ili *wild type*, wt), te kod takvih heterozigotnih miševa do sada nije opisan nikakav razvojni poremećaj ili patologija.

2.3. Metoda imunohistokemije

Za određivanje prisutnosti i razmještaja proteina u tkivu testisa koristili smo metodu imunohistokemije. Imunohistokemija (IHC) je metoda koja se temelji na specifičnom vezanju protutijela za antigen nakon čega nastaje kompleks čija vizualizacija omogućuje otkrivanje i lokalizaciju specifičnih antigena u stanicama i tkivu. Signal je najčešće vizualiziran svjetlosnim mikroskopom. Imunohistokemija je važna metoda u kliničkoj dijagnostici različitih patoloških stanja kao i za detekciju biomarkera, a također se koristi u znanosti kako bi se bolje razumjela ekspresija proteina u različitim tkivima (Lin i Chen 2014). Koraci u pripremi tkiva za imunohistokemiju su: uklapanje i rezanje tkiva, fiksacija, razotkrivanje antigena, dodavanje primarnog protutijela, dodavanje sekundarnog protutijela i dodatak detekcijskog reagensa za lokalizaciju kompleksa.

2.3.1. Uklapanje tkiva u parafin i rezanje

Uzorci tkiva koji se pripremaju za imunohistokemijska bojanja uklapaju se u parafin jer omogućava dobru rezoluciju i očuvanost detalja. Parafin koji se koristi za uklapanje je mješavina parafinskog voska i smola, a može se i potpuno otopiti do tekućeg stanja, potom hlađenjem ponovno pretvoriti u čvrsto stanje i osigurati strukturnu potporu prilikom narezivanja te se može razgraditi i ukloniti sa tkiva pomoću ksilena. Otapalo isparava pod utjecajem visoke temperature, a tekući parafin ulazi u tkivo. Nastaje parafinski blok sa tkivom jer se parafin skrutne (Prophet i sur. 1994).

Uzorke smo odmah nakon ekstrakcije inkubirali preko noći u 4 % PFA (paraformaldehid). Nakon toga smo uzorke inkubirali jedan dan u 75 % etanolu na +4 °C. Slijedi inkubacija jedan sat u 80 % etanolu, jedan sat u 90 % etanolu i po jedan sat dva puta u 95 % etanolu na sobnoj temperaturi. Treća inkubacija sa 95 % etanolom se odvijala preko noći na sobnoj temperaturi. Nakon toga smo uzorke inkubirali tri puta po jedan sat u 100 % etanolu na sobnoj temperaturi, a nakon toga smo ih prebacili u kasete. Inkubacijom tkiva u rastućim koncentracijama etanola dolazi do dehidriranja tkiva kako bi se lakše uklopilo u parafin. Tkiva smo potom inkubirali tri puta po 30 minuta u ksilolu uz miješanje na magnetskoj miješalici. Slijedi inkubacija jedan sat u parafinu na +60 °C, a potom inkubacija preko noći u parafinu na +60 °C. Sve do ksilola etanole smo miješali u istoj tubici. Uz pomoć instrumenta mikrotoma parafinski blok smo izrezali na tanke rezove određene debljine koje smo stavili na predmetna stakla.

2.3.2. Fiksacija tkiva

Fiksacija tkiva je važna za održavanje strukture tkiva i morfologije samih stanica. Adekvatan fiksativ u imunohistokemiji omogućuje brzu i potpunu imobilizaciju antigena i očuvanje njegove imunoreaktivnosti i pristupačnosti imunokemijskim reagensima za lokalizaciju. Neodgovarajuća fiksacija može umanjiti mogućnost protutijela da se veže na odgovarajući antigen. Prihvatljiv fiksativ treba onemogućiti bubrenje, deformiranje i smanjenje stanica, zaštititi tkivo i stanice od štetnih utjecaja prilikom daljnje obrade tkiva tijekom postupka imunohistokemije i spriječiti raspadanje stanica uzrokovano bakterijama. Najčešće korišteni fiksativi su bazirani na formalinu, a uglavnom se koriste neutralni puferirani formalin ili otopina 10 % formalina u vodi (Berod i Pujol 1981). Nakon 24 satne fiksacije tkivo se uklapa u parafin, a potom slijedi narezivanje tkiva pomoću mikrotoma (Ramos-Vara i sur. 2014). Uz izbor fiksativa jako je važna duljina vremena fiksacije, pH i temperatura (Berod i Pujol 1981).

2.3.3. Deparafinizacija i rehidracija

Tkiva na stakalcu smo isprali dva puta po 5 minuta u ksilenu. Zatim smo proveli rehidraciju stakalaca s uzorcima kroz silazne koncentracije etanola, dva puta po 10 minuta u 100 % etanolu i dva puta po 10 minuta u 95 % etanolu. Na kraju smo uzorke isprali tri puta po 5 minuta u destiliranoj vodi.

2.3.4. Razotkrivanje antigena pomoću topline

Svrha razotkrivanja antigena je učiniti ih dostupnijima za vezanje protutijela (Yong i sur. 2014). Postoje različite metode razotkrivanja antigena, ovisno o specifičnom ciljnom antigenu i protutijelu, a najpoznatije su enzimatska digestija i razotkrivanje epitopa antigena pomoću topline (pomoću autoklava, mikrovalne pećnice i iskuhavanjem stakalaca pod visokim tlakom). Zagrijavanjem dolazi do razbijanja proteinskih molekularnih veza koje su uzrokovane fiksativima, poput formalina. Na taj način antigeni nisu više skriveni što omogućuje stvaranje kompleksa sa protutijelom (Shi i sur. 2011).

Razotkrivanje antigena ili demaskiranje (engl. *epitope retrieval*) smo proveli u citratnom puferu, pH 6. Pufer smo ugrijali u mikrovalnoj pećnici na temperaturi od 95 °C i prekrili plastičnom folijom kako bi se spriječilo da se kondenzacijom promijeni koncentracija. Nakon zagrijavanja, tkiva na stakalcu smo odložili u citratni pufer na 30 minuta. Nakon toga posudu s uzorcima smo izvadili iz kupelji i ohladili 15 minuta na sobnoj temperaturi.

2.3.5. Detekcija antigena i imunohistokemijsko bojanje

Imunohistokemijska detekcija antigena u tkivu je moguća direktnom i indirektnom metodom. U direktnoj metodi, primarno protutijelo je obilježeno na način da je na njega vezan enzim peroksidaza, alkalna fosfataza ili fluorescentna molekula. Ova metoda se obično ne koristi zbog nedostatka pojačanja signala, zbog čega zahtjeva veću koncentraciju protutijela. U neizravnoj ili indirektnoj metodi enzimom je obilježeno sekundarno protutijelo. U reakciji se primarno protutijelo veže na antigen, a sekundarno protutijelo se veže za Fc fragment primarnog protutijela što omogućuje pojačavanje signala, pa je metoda osjetljivija. Primarno protutijelo može biti

monoklonalno ili poliklonalno, a koristi se kako bi se osigurao kontrast između pozitivno obojenog tkiva i nespecifičnog obojenja pozadine (Lin i Chen 2014). Općenito, monoklonalna protutijela su usmjerena na jedan specifični epitop antigena i imaju tendenciju biti specifičnija, dok poliklonalna protutijela mogu vezati mnogo različitih epitopa i obično su osjetljivija (D'Amico i sur. 2009). Enzimi stvaraju vidljivo obojenje nakon inkubacije s kromogenim supstratom kao što je diaminobenzidin (DAB) koji stvara smeđi pigment (D'Amico i sur. 2009; Lin i Chen 2014).

Vakuom sisaljkom smo osušili stakalca oko tkiva na način da se tkivo ne presuši. Hidrofobnom olovkom smo označili prostor oko tkiva, a potom smo stakalca s tkivom stavili u destiliranu vodu. Svaki rez tkiva smo inkubirali 10 minuta u 50 μ L 3 % vodikovog peroksida. Nakon toga tkiva na stakalcu smo isprali dva puta po 5 minuta u destiliranoj vodi i dodatnih 5 minuta u otopini koja je sadržavala TBS i 0,025 % Tween 20 (Washing buffer). Svaki rez tkiva smo inkubirali 1 sat s 50 μ L otopine za blokiranje (1 % goveđi serumski albumin u TBS-u s 0,025 % Tween 20), kako bi se spriječilo nespecifično vezanje sekundarnog protutijela. Nakon toga uslijedila je inkubacija s primarnim protutijelom (Tablica 2) na način da smo vakuomom uklonili otopinu za blokiranje s tkiva i na svaki rez dodali 50 μ L primarnog protutijela razrijeđenog u otopini za blokiranje. Tkiva su inkubirana preko noći na 4 °C. Vakuomom smo uklonili primarno protutijelo sa tkiva. Tkiva na stakalcu smo isprali tri puta po 5 minuta u otopini koja je sadržavala TBS i 0,025 % Tween 20. Na svaki rez tkiva smo dodali 50 μ L sekundarnog protutijela (Tablica 2) razrijeđenog u otopini za blokiranje i tkiva smo inkubirali 1 sat na sobnoj temperaturi, a zatim isprali tri puta po 5 minuta u otopini koja je sadržavala TBS i 0,025 % Tween 20 i dodatnih 5 minuta u destiliranoj vodi. Uklonili smo višak vode i na svaki rez tkiva dodali 50 μ L 0,05 % otopine diaminobenzidina s 0,02 % vodikovog peroksida (otopina DAB za bojanje tkiva). Tkiva s DAB-om su inkubirana 15 minuta. Reakciju smo zaustavili ispiranjem tkiva u destiliranoj vodi. Tkiva smo stavili u hemalaon-eozin na 3 sekunde i isprali u destiliranoj vodi. Tkiva na stakalcu su dehidrirana kroz uzlazne koncentracije etanola, dva puta po 1 minutu u 95 % alkoholu i dva puta po 1 minutu u 100 % alkoholu. Na kraju smo ih isprali dva puta po 1 minutu u svježem ksilenu. Na završetku dehidracije na svaki rez tkiva smo dodali kap Eukita koji služi kao medij za uklapanje (engl. *quick-hardening mounting medium*). Na stakalce smo dodali pokrovno stakalce i uklonili mjehuriće zraka iz tkiva. Tkiva na stakalcu su se sušila 30 minuta na sobnoj temperaturi.

Tablica 2. Protutijela upotrijebljena za postupak imunohistokemije.

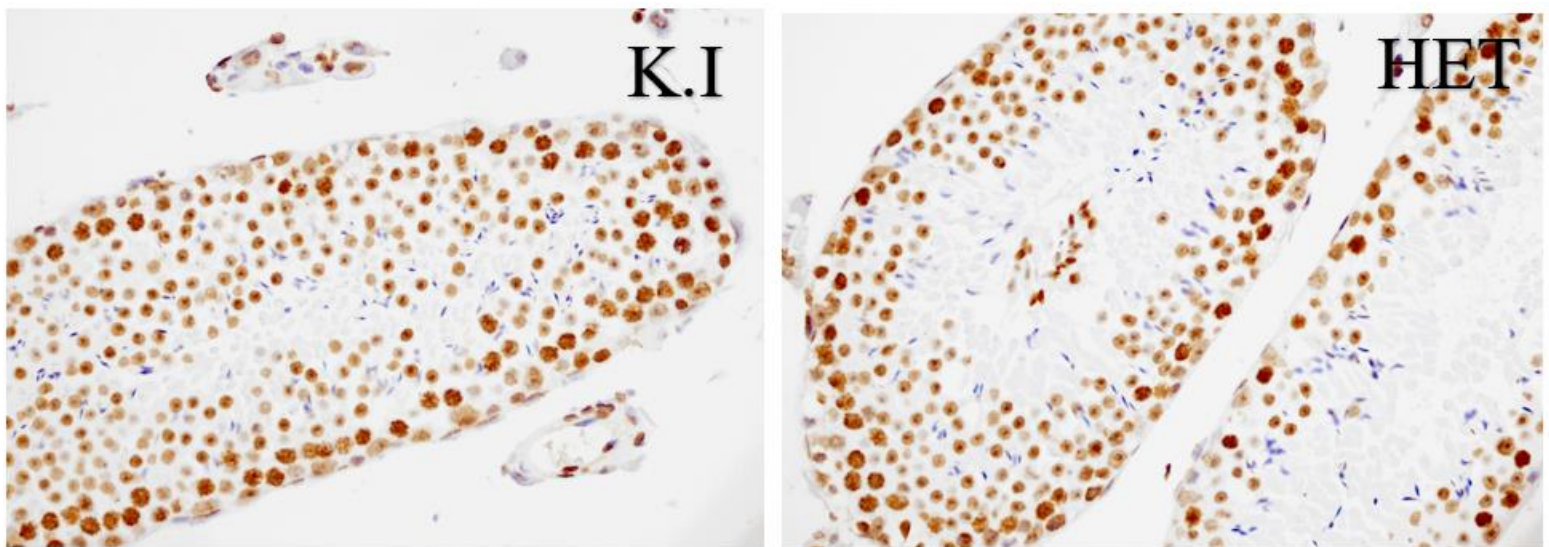
Primarno protutijelo	Proizvođač	Razrjeđenje	Sekundarno protutijelo	Proizvođač	Razrjeđenje
p53	Invitrogen MA5-12453	1:20	monoklonalno mišje protutijelo	Agilent Dako P0447	1:500
γ H2AX	Cell signaling 9718s	1:480	monoklonalno zečje protutijelo	Agilent Dako P0448	1:500
PCNA	Santa Cruz sc-56	1:250	monoklonalno mišje protutijelo	Agilent Dako P0447	1:500
hnRNP K	Santa Cruz sc-28380	1:250	monoklonalno mišje protutijelo	Agilent Dako P0447	1:500
Histon 1	Santa Cruz sc-8030	1:200	monoklonalno mišje protutijelo	Agilent Dako P0447	1:500

2.3.6. Imunohistokemijska analiza

U svrhu brojanja pozitivnih stanica (smeđe obojene stanice ili jezgre u bilo kojem intenzitetu) u tkivu testisa, za svakog miša smo napravili fotografije tkiva obilježenog protutijelom pomoću svjetlosnog mikroskopa Olympus CKX4, uz povećanje 10x20. Brojnost stanica izračunali smo uporabom računalnog programa ImageJ/FIJI 1.53k. Izračunali smo postotak pozitivnih stanica u ukupnom broju stanica u jednom sjemenskom kanaliću na histološkim prerezima tkiva testisa te utvrdili postoji li statistički značajna razlika u ekspresiji testiranih proteina u tkivu testisa kod heterozigotnog i *knock-in* miša.

Pozitivnu imunohistokemijsku reakciju za sva protutijela odredili smo s obzirom na nastanak smeđeg pigmenta u stanicama tkiva testisa. Tijekom eksperimenta koristili smo negativnu i pozitivnu kontrolu. Negativnu kontrolu pripremili smo na način da uzorak tkiva testisa nije bio inkubiran primarnim protutijelom tijekom postupka imunohistokemije. Uzorci negativne kontrole ne smiju imati smeđe obojenje u stanici, što je dokaz specifičnosti reakcije. Pozitivnu kontrolu pripremili smo obilježavanjem uzorka tkiva testisa protutijelom specifičnim za protein za koji iz znanstvene literature znamo da je prisutan u tkivu kojeg istražujemo. Kao pozitivnu

kontrolu koristili smo monoklono mišje protutijelo Histon 1 (Santa Cruz sc-8030). Eukariotski histoni su osnovni i u vodi topljivi nuklearni proteini. Dvije molekule svakog od četiri histona jezgre (H2A, H2B, H3 i H4) tvore oktamer koji zajedno sa DNA čini nukleosom. Preko 80 % nukleosoma sadrži protein Histon H1 koji služi kao povezičav oktamera i posreduje u stvaranju kondenziranog oblika DNA (<https://www.scbt.com/p/histone-h1-antibody-ae-4>). Pozitivna kontrola nam služi kao dokaz da metoda radi ispravno jer je očekivan smeđe obojeni signal bio prisutan u jezgrama svih stanica na histološkom preparatu (Slika 5).



Slika 5. Ekspresija Histona 1 u jezgrama stanica tkiva testisa.

2.3.7. Analiza morfologije tkiva

Mikroskopske preparate prereza tkiva obojane metodom hemalaun-eozin promatrali smo s obzirom na morfologiju histoloških struktura testisa. Uspoređivali smo uzorke dobivene iz tkiva homozigotnih miševa s mutacijom u genu *SPRTN* i heterozigotnih miševa. Metoda usporedbe uključivala je mjerenje strukture, veličine i oblika sjemenih kanalića, njihove brojnosti (gustoće po jedinici površine tkivnog prereza) (uporabom ImageJ računalnog programa), kao i veličine i rasporeda stanica.

2.3.8. Statistička analiza

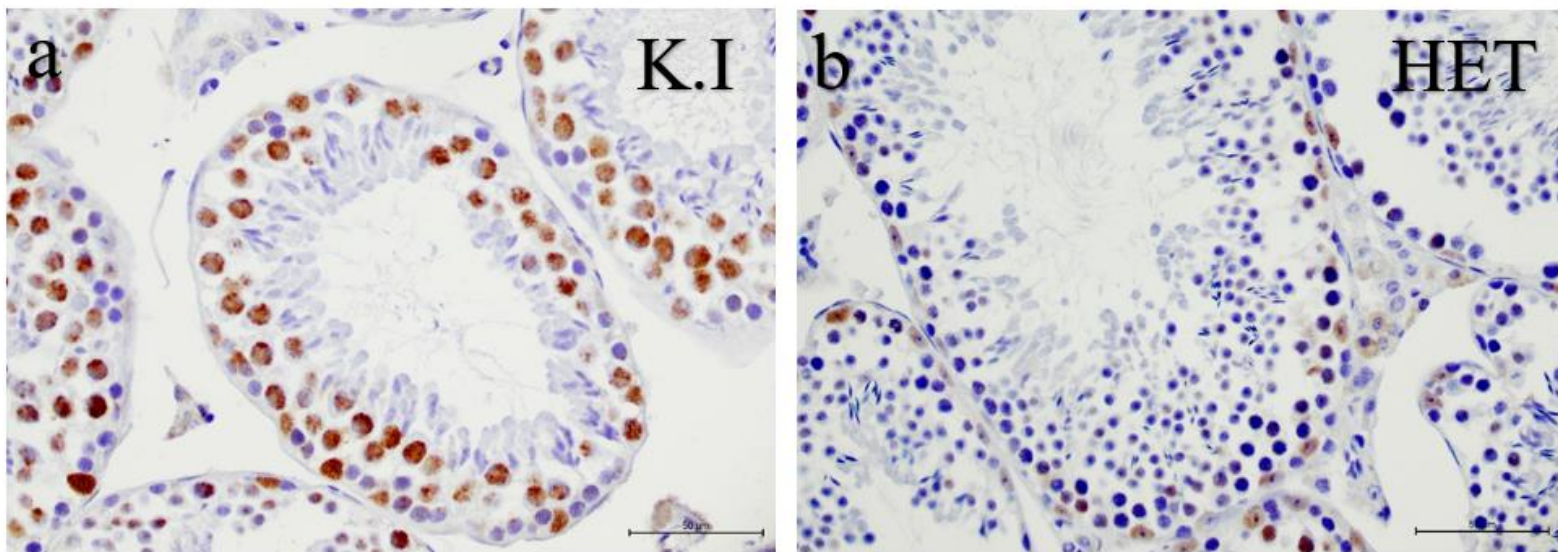
Koristili smo 20 prereza tkiva testisa za testiranje svakog od proteina, po pet replikata za svaki od dva *knock-in* miša i pet replikata za svaki od dva heterozigotna miša. Tkiva su snimljena fotoaparatom te je broj pozitivnih i ukupan broj stanica izračunat ImageJ/FIJI 1.53k programom i njegovim umetkom za brojanje stanica (engl. *Cell Counter plugin*), autora Kurt De Vos.

Statistička analiza provedena je koristeći statistički paket GraphPad Prism 9 (SAD). Podatci su statistički analizirani T-testom za nezavisne uzorke. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija. Srednja vrijednost prikazuje ekspresiju proteina, a standardna devijacija varijabilnost podataka. Razina statističke značajnosti postavljena je na $p < 0,05$.

3. REZULTATI

3.1. Analiza ekspresije hnRNPK

Imunohistokemijska ekspresija hnRNPK proteina u zametnim stanicama testisa prikazuje jače izraženu ekspresiju hnRNPK proteina u uzorcima testisa *knock-in* miša (Slika 6a) u odnosu na tkivo heterozigotnog miša (Slika 6b). U Tablici 3 prikazani su rezultati brojanja pozitivnih stanica sa izražajem hnRNPK proteina po pet replikata za svaki uzorak. T-testom za nezavisne uzorke utvrđena je razlika u ekspresiji navedenog proteina kod heterozigotnog i *knock-in* miša ($p < 0,0001$) (Tablica 4), te je isti rezultat prikazan i grafički (Slika 7). Na prerezima hnRNPK je eksprimiran u primarnim spermatocitima. Analiza morfologije tkiva testisa nije pokazala značajne strukturne razlike u tkivima.



Slika 6. Imunohistokemijska detekcija hnRNPK proteina u zametnim stanicama testisa *knock-in* miša, (a) i heterozigotnog miša, (b). Smeđi signal označava pozitivne stanice, stanice u kojima je detektiran protein, a plavi signal označava stanice u kojima nije detektiran protein.

Tablica 3. Udio stanica pozitivnih na ekspresiju hnRNPK u tkivu testisa miša*

Sprtn Y117C K.I (homozigoti), miševi 1169 i 1170				Sprtn Y117C/wt (heterozigoti), miševi 1171 i 1172			
Replikati	Broj pozitivnih stanica	Ukupan broj stanica	Udio pozitivnih stanica	Replikati	Broj pozitivnih stanica	Ukupan broj stanica	Udio pozitivnih stanica
1169-1	126	246	51,22%	1171-1	10	208	4,81%
1169-2	64	107	59,81%	1171-2	34	90	37,78%
1169-3	97	159	61,00%	1171-3	24	180	13,33%
1169-4	68	141	48,23%	1171-4	6	151	3,974%
1169-5	94	126	74,60%	1171-5	30	83	36,14%
1170-1	63	109	57,80%	1172-1	19	162	11,73%
1170-2	71	108	65,75%	1172-2	38	93	40,86%
1170-3	54	77	70,13%	1172-3	36	128	28,13%
1170-4	51	87	58,62%	1172-4	32	117	27,35%
1170-5	50	98	51,02%	1172-5	30	77	38,96%

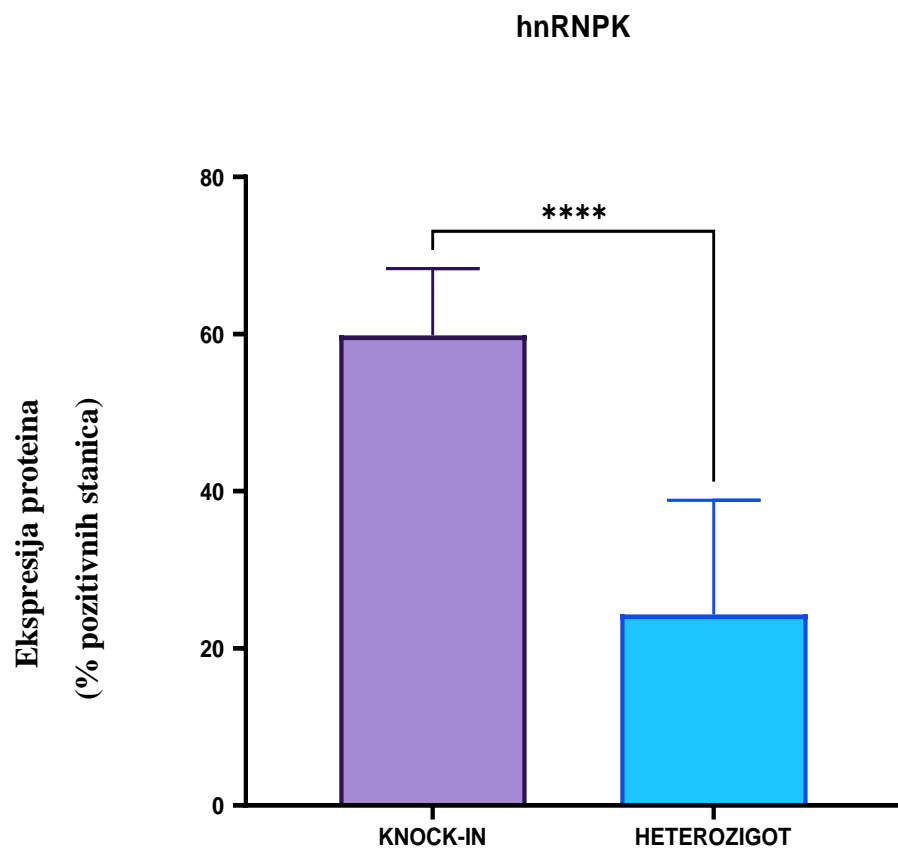
* 5 replikata po eksperimentalnoj životinji.

Tablica 4. Ekspresija (postotak pozitivnih stanica u ukupnom broju stanica) hnRNPK proteina kod heterozigotnog i *knock-in* miša

Protein	<i>Knock-in</i> miš (SV)	Heterozigotni miš (SV)	<i>Knock-in</i> miš (SD)	Heterozigotni miš (SD)	t-vrijednost	df	p*
hnRNPK	59,82%	24,31%	8,5155042	14,554480	2,131450	15	<0,0001

*Rezultati su obrađeni T-testom za nezavisne uzorke

Kratice: SV, srednja vrijednost; SD, standardna devijacija; df, stupnjevi slobode; p, mjera pouzdanosti

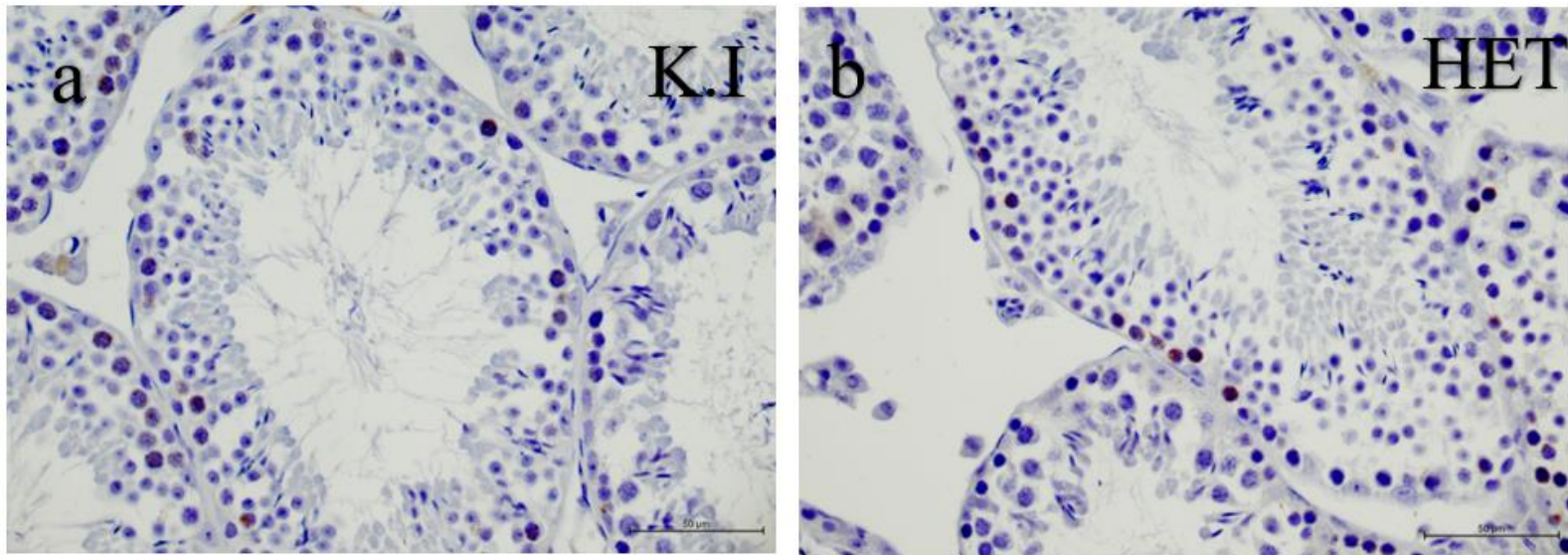


Slika 7. Ekspresija hnRNPk proteina u tkivu testisa *knock-in* i heterozigotnog miša.

 $p < 0,0001$

3.2. Analiza ekspresije PCNA

Imunohistokemijska ekspresija PCNA proteina u zametnim stanicama testisa prikazuje podjednaku ekspresiju PCNA proteina u uzorcima testisa *knock-in* miša (Slika 8a) u odnosu na tkivo heterozigotnog miša (Slika 8b). U Tablici 5 prikazani su rezultati brojanja pozitivnih stanica sa izražajem PCNA proteina po pet replikata za svaki uzorak. T-testom za nezavisne uzorke nije utvrđena razlika u ekspresiji navedenog proteina kod heterozigotnog i *knock-in* miša ($p>0,05$) (Tablica 6), te je isti rezultat prikazan i grafički (Slika 9). Na slikama 9a i b PCNA je izražen u primarnim spermatocitima.



Slika 8. Imunohistokemijska detekcija PCNA proteina u zametnim stanicama testisa *knock-in* miša, (a) i heterozigotnog miša, (b). Smeđi signal označava pozitivne stanice, stanice u kojima je detektiran protein, a plavi signal označava stanice u kojima nije detektiran protein.

Tablica 5. Udio stanica pozitivnih na ekspresiju PCNA u tkivu testisa miša*.

Sprtn Y117C K.I (homozigoti), miševi 1169 i 1170				Sprtn Y117C/wt (heterozigoti), miševi 1171 i 1172			
Replikati	Broj pozitivnih stanica	Ukupan broj stanica	Udio pozitivnih stanica	Replikati	Broj pozitivnih stanica	Ukupan broj stanica	Udio pozitivnih stanica
1169-1	14	148	9,46%	1171-1	16	177	9,04%
1169-2	11	163	6,75%	1171-2	13	139	9,35%
1169-3	22	171	12,87%	1171-3	19	158	12,03%
1169-4	9	123	7,32%	1171-4	16	204	7,84%
1169-5	10	101	9,90%	1171-5	10	156	6,41%
1170-1	12	82	14,63%	1172-1	12	150	8,00%
1170-2	9	88	10,23%	1172-2	21	128	16,40%
1170-3	11	76	14,47%	1172-3	26	126	20,63%
1170-4	6	120	5,00%	1172-4	4	145	2,76%
1170-5	10	193	5,18%	1172-5	26	220	11,82%

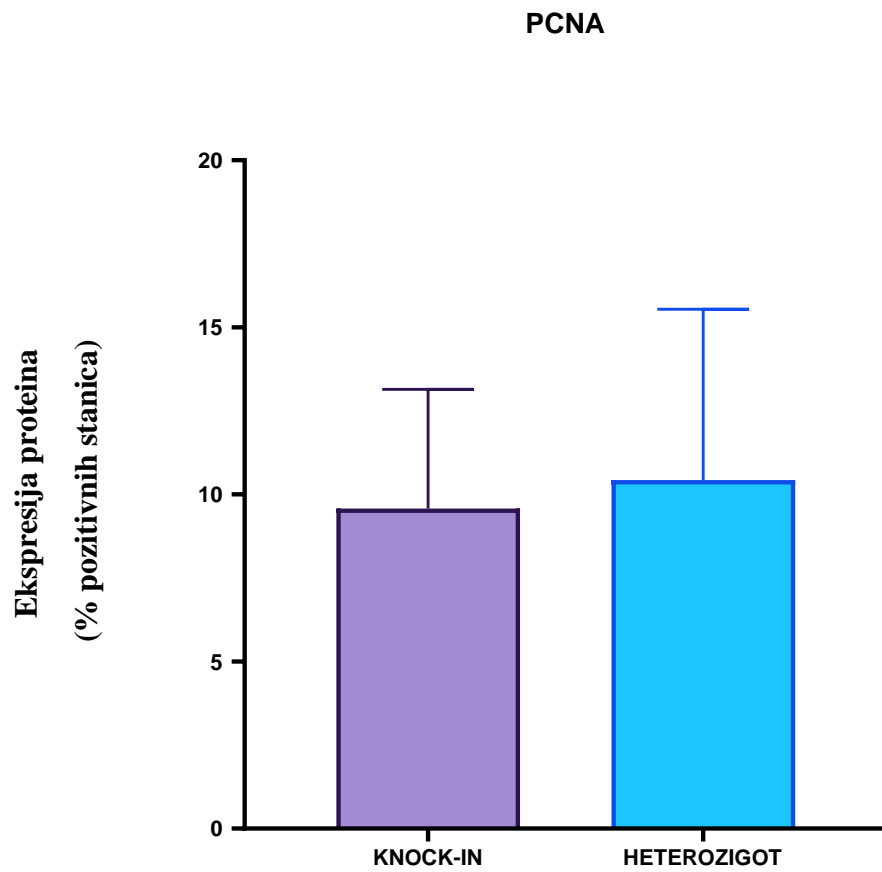
* 5 replikata po eksperimentalnoj životinji

Tablica 6. Ekspresija (postotak pozitivnih stanica u ukupnom broju stanica) PCNA proteina kod heterozigotnog i *knock-in* miša.

Protein	<i>Knock-in</i> miš (SV)	Heterozigotni miš (SV)	<i>Knock-in</i> miš (SD)	Heterozigotni miš (SD)	t-vrijednost	df	<i>p</i> *
PCNA	9,58%	10,43%	3,563496	5,110202	2,119905	16	0,672591

*Rezultati su obrađeni T-testom za nezavisne uzorke

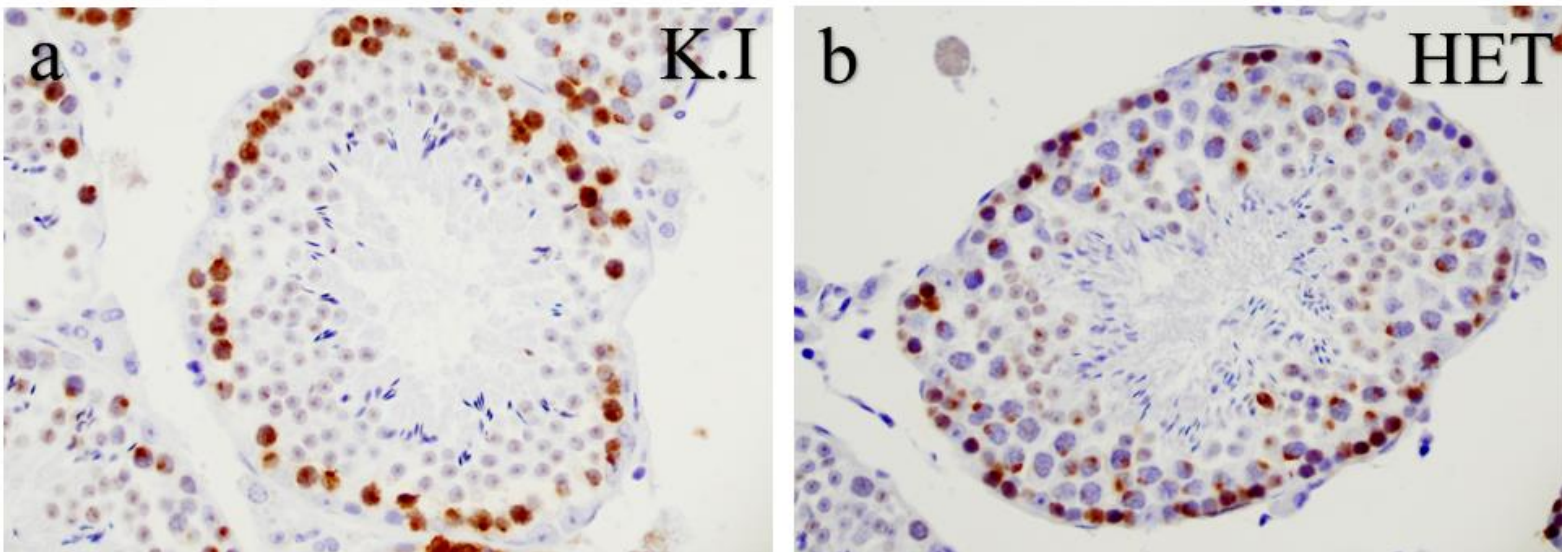
Kratice: SV, srednja vrijednost; SD, standardna devijacija; df, stupnjevi slobode; p, mjera pouzdanosti



Slika 9. Ekspresija PCNA proteina u tkivu testisa *knock-in* i heterozigotnog miša.

3.3. Analiza ekspresije γ H2AX

Imunohistokemijska ekspresija γ H2AX proteina u zametnim stanicama testisa prikazuje jače izraženu ekspresiju γ H2AX proteina u uzorcima testisa *knock-in* miša (Slika 10a) u odnosu na tkivo heterozigotnog miša (Slika 10b). U Tablici 7 prikazani su rezultati brojanja pozitivnih stanica sa izražajem γ H2AX proteina po pet replikata za svaki uzorak. T-testom za nezavisne uzorke utvrđena je razlika u ekspresiji navedenog proteina kod heterozigotnog i *knock-in* miša ($p < 0,0001$) (Tablica 8), te je isti rezultat prikazan i grafički (Slika 11). Na slikama 11a i b izražaj γ H2AX je prisutan u primarnim spermatocitima i spermatidama.



Slika 10. Imunohistokemijska detekcija γ H2AX proteina u zametnim stanicama testisa *knock-in* miša, (a) i heterozigotnog miša, (b). Smeđi signal označava pozitivne stanice, stanice u kojima je detektiran protein, a plavi signal označava stanice u kojima nije detektiran protein.

Tablica 7. Udio stanica pozitivnih na ekspresiju γ H2AX u tkivu testisa miša*

Sprtn Y117C K.I (homozigoti), miševi 1169 i 1170				Sprtn Y117C/wt (heterozigoti), miševi 1171 i 1172			
Replikati	Broj pozitivnih stanica	Ukupan broj stanica	Udio pozitivnih stanica	Replikati	Broj pozitivnih stanica	Ukupan broj stanica	Udio pozitivnih stanica
1169-1	110	205	53,66%	1171-1	77	232	33,19%
1169-2	93	164	56,71%	1171-2	45	111	40,54%
1169-3	111	172	64,53%	1171-3	36	103	34,95%
1169-4	77	134	57,46%	1171-4	45	146	30,82%
1169-5	96	137	70,07%	1171-5	102	129	79,07%
1170-1	86	131	65,65%	1172-1	44	130	33,84%
1170-2	89	112	79,46%	1172-2	49	140	35,00%
1170-3	119	136	87,50%	1172-3	42	111	37,84%
1170-4	103	139	74,10%	1172-4	42	122	34,43%
1170-5	105	154	68,18%	1172-5	40	123	32,52%

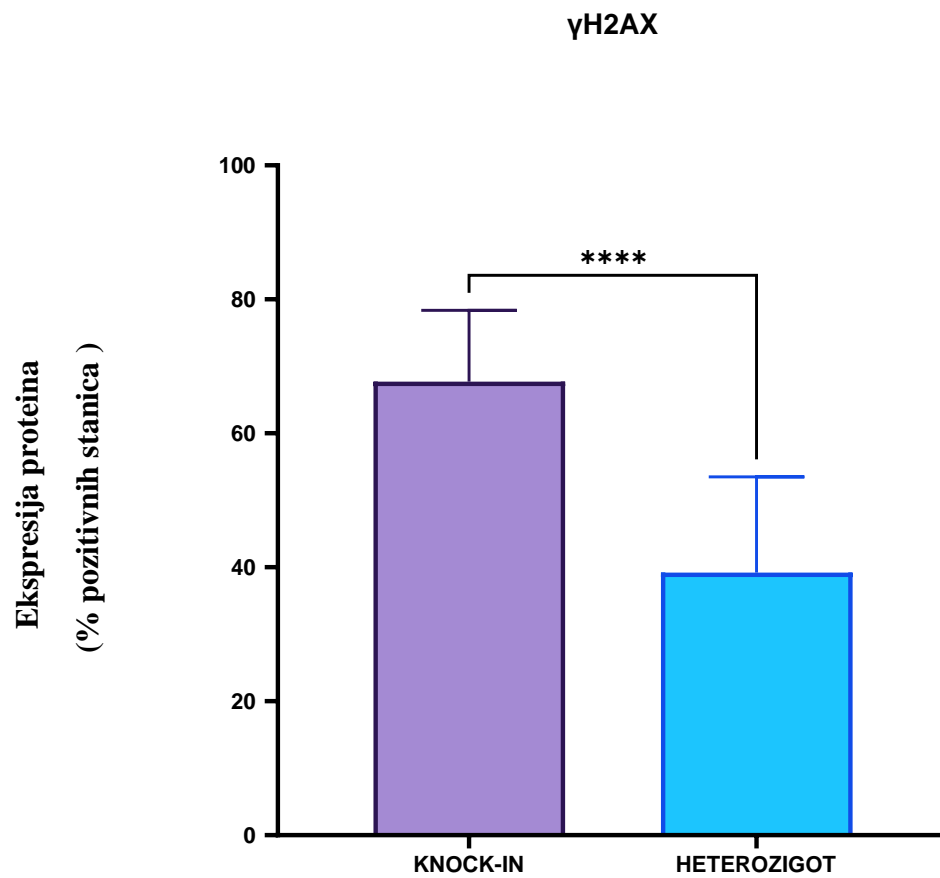
*5 replikata po eksperimentalnoj životinji

Tablica 8. Ekspresija (postotak pozitivnih stanica u ukupnom broju stanica) γ H2AX proteina kod heterozigotnog i *knock-in* miša.

Protein	<i>Knock-in</i> miš (SV)	Heterozigotni miš (SV)	<i>Knock-in</i> miš (SD)	Heterozigotni miš (SD)	t-vrijednost	df	<i>p</i> *
γ H2AX	67,73%	39,22%	10,615970	14,264657	2,109816	17	<0,0001

*Rezultati su obrađeni T-testom za nezavisne uzorke

Kratice: SV, srednja vrijednost; SD, standardna devijacija; df, stupnjevi slobode; p, mjera pouzdanosti

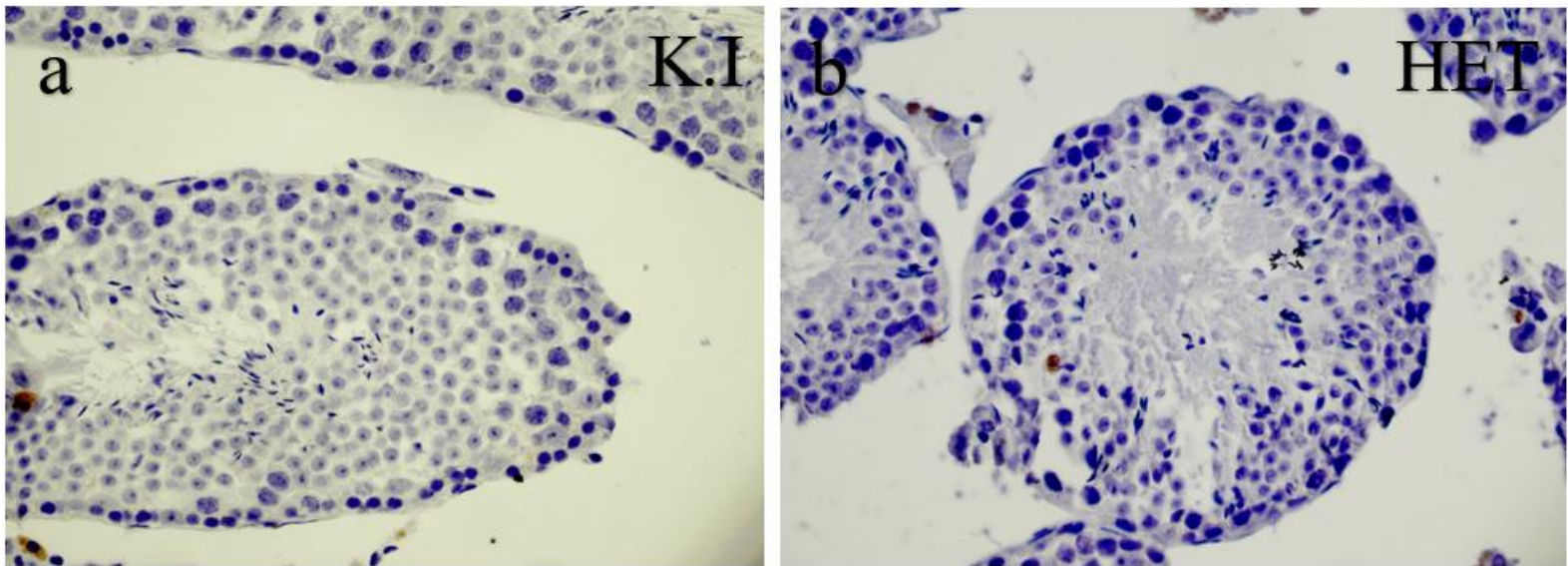


Slika 11. Ekspresija γ H2AX proteina u tkivu testisa *knock-in* i heterozigotnog miša.

 $p < 0,0001$

3.4. Analiza ekspresije p53

Imunohistokemijska ekspresija p53 proteina u zametnim stanicama testisa prikazuje podjednaku ekspresiju p53 proteina u uzorcima testisa *knock-in* miša (Slika 12a) u odnosu na tkivo heterozigotnog miša (Slika 12b). U Tablici 9 prikazani su rezultati brojanja pozitivnih stanica sa izražajem p53 proteina po pet replikata za svaki uzorak. T-testom za nezavisne uzorke nije utvrđena razlika u ekspresiji navedenog proteina kod heterozigotnog i *knock-in* miša ($p > 0,05$) (Tablica 10), te je isti rezultat prikazan i grafički (Slika 13). Na slici 13a signal je vidljiv u primarnoj spermatociti, a na slici 13b u spermatidi.



Slika 12. Imunohistokemijska detekcija p53 proteina u zametnim stanicama testisa *knock-in* miša, (a) i heterozigotnog miša, (b). Smeđi signal označava pozitivne stanice, stanice u kojima je detektiran protein, a plavi signal označava stanice u kojima nije detektiran protein.

Tablica 9. Udio stanica pozitivnih na ekspresiju p53 u tkivu testisa miša*

Sprtn Y117C K.I (homozigoti), miševi 1169 i 1170				Sprtn Y117C/wt (heterozigoti), miševi 1171 i 1172			
Replikati	Broj pozitivnih stanica	Ukupan broj stanica	Udio pozitivnih stanica	Replikati	Broj pozitivnih stanica	Ukupan broj stanica	Udio pozitivnih stanica
1169-1	2	266	0,75%	1171-1	4	147	2,72%
1169-2	1	358	0,28%	1171-2	1	176	0,57%
1169-3	3	148	2,03%	1171-3	1	129	0,78%
1169-4	1	148	0,68%	1171-4	2	193	1,04%
1169-5	2	210	0,95%	1171-5	2	199	1,01%
1170-1	1	348	0,29%	1172-1	4	192	2,08%
1170-2	2	147	1,37%	1172-2	2	86	2,33%
1170-3	2	267	0,75%	1172-3	5	218	2,29%
1170-4	1	141	0,71%	1172-4	1	205	0,49%
1170-5	3	263	1,14%	1172-5	3	185	1,62%

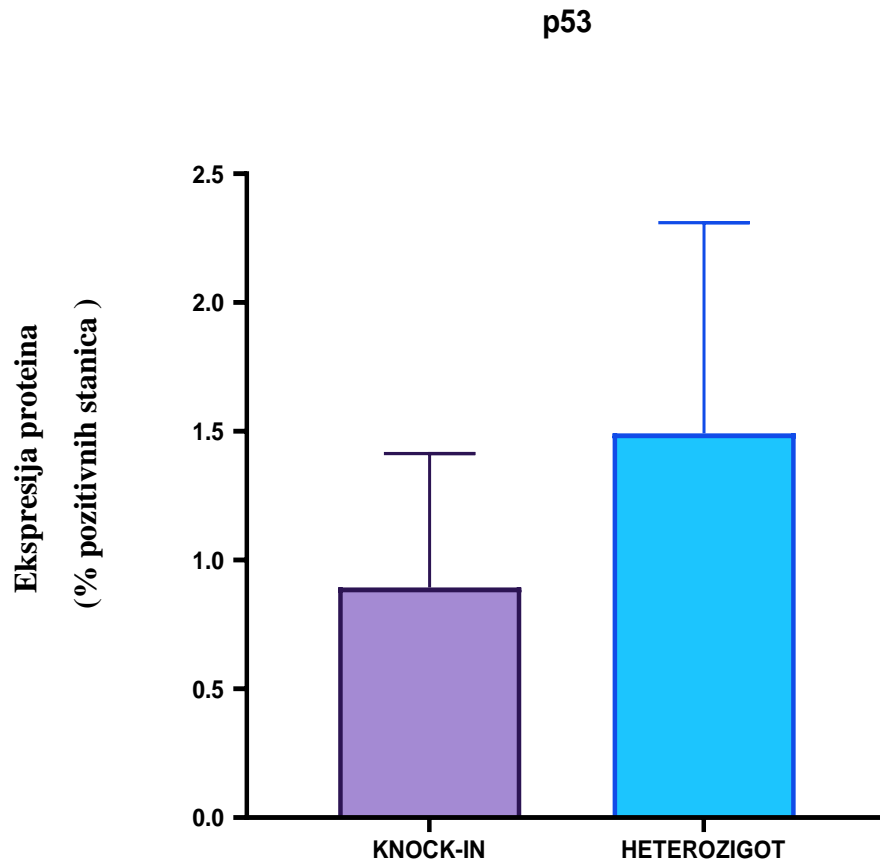
*5 replikata po eksperimentalnoj životinji

Tablica 10. Ekspresija (postotak pozitivnih stanica u ukupnom broju stanica) p53 proteina kod heterozigotnog i *knock-in* miša.

Protein	<i>Knock-in</i> miš (SV)	Heterozigotni miš (SV)	<i>Knock-in</i> miš (SD)	Heterozigotni miš (SD)	t-vrijednost	df	* <i>p</i>
p53	0,89%	1,49%	0,520098	0,8188755	2,131450	15	0,070014

*Rezultati su obrađeni T-testom za nezavisne uzorke

Kratice: SV, srednja vrijednost; SD, standardna devijacija; df, stupnjevi slobode; p, mjera pouzdanosti



Slika 13. Ekspresija p53 proteina u tkivu testisa *knock-in* i heterozigotnog miša.

4. RASPRAVA

Proces spermatogeneze uključuje razvoj spermija iz nediferenciranih zametnih stanica u sjemenim tubulima te uključuje uzastopne mitotičke, mejotičke i postmejotičke faze. Više istraživanja objašnjava ulogu brojnih proteina u spermatogenezi (Zalzali i sur. 2018). Proteini koje smo u ovom radu istraživali reguliraju spermatogenezu i sudjeluju u popravku DNA, proliferaciji stanica i apoptozi.

SPRTN je DNA ovisna proteaza sisavaca koja doprinosi stabilnosti genoma i staničnoj homeostazi, a sudjeluje u uklanjanju lezija nastalih kovalentnim vezanjem proteina na molekulu DNA (engl. *DNA-protein crosslinks*, DPC) (Stingele i sur. 2016). Mutacije u genu *SPRTN* kod ljudi uzrokuju preuranjeno starenje i razvoj hepatocelularnog karcinoma u adolescentnoj dobi. Usporedba hipomorfnih *SPRTN* miševa s pacijentima s Ruijs Aalfsovim sindromom koji nose mutacije u genu *SPRTN* pokazuje sličnosti koje dokazuju evolucijski očuvanu funkciju ovog proteina, kao i njegovu važnu ulogu u razvoju genetske nestabilnosti i rizika za nastanak tumora (Ruijs i sur. 2003; Maskey i sur. 2014). Ekspresija Spartan proteina je esencijalna za preživljavanje miševa; miševi bez *SPRTN* gena umiru vrlo rano tijekom embrionalnog razvoja, a miševi s mutiranim *SPRTN* genom pokazuju znakove preuranjenog starenja.

Podaci iz literature o utjecaju proteina Spartan na ekspresiju i funkciju proteina uključenih u mehanizme popravka DNA vrlo su oskudni. U našem istraživanju smo promatrali promjene ekspresije ciljnih proteina koji sudjeluju u procesima održavanja cjelovitosti DNA u tkivu testisa miša. Koristili smo *knock-in* miševe s homozigotnom točkastom *missense* mutacijom u genu *SPRTN*, koja na proteinskoj razini uzrokuje zamjenu aminokiseline tirozin u cistein u metaloproteaznoj domeni (Spartan Y117C). Navedena mutacija istovjetna je mutaciji kod pacijenata, kod kojih se u adolescenciji razvio hepatocelularni karcinom i Ruijs Aalfs sindrom progerije.

Knock-in miševi korišteni u našem istraživanju pripadaju soju miševa koji još nije objavljen, (opisan) u literaturi. Fokusirali smo se na analizu tkiva testisa miševa iz nekoliko razloga. Prvo, svi slučajevi opisanih mutacija u genu *SPRTN* kod čovjeka su opisani na muškim pacijentima. Drugo, miševi s mutacijama u genu *SPRTN* pokazuju smanjenu fertilitet, kao i smanjen broj živorođenih potomaka. I treće, ekspresija gena *SPRTN* u tkivu testisa vrlo je visoka

i predstavlja najveću izmjerenu aktivnost tog gena u humanim tkivima. Zbog svega navedenog, istraživanje morfologije i funkcije muških gonada predstavlja zanimljiv odabir. Budući je naše istraživanje osmišljeno kao pilot istraživanje, a naša inicijalna hipoteza je predviđela promjenu ekspresije odabranih proteina uključenih u neke osnovne biološke mehanizme održavanja cjelovitosti DNA, koja je uvjetovana funkcijom i izražajem proteina Spartan, predviđeli smo da će nam rezultati ovog istraživanja osigurati daljnje smjernice u nastavku istraživanju uloge proteina Spartan. Naime, dosadašnji podaci iz literature nedovoljno detaljno prikazuju funkciju proteina Spartan, te su u nekim slučajevima nedorečeni ili čak oprečni, pa se pokazala potreba za ovakvim pilot istraživanjem koje bi ukazalo ima li naznaka da je Spartan uključen i u neke druge biološke mehanizme i procese osim uklanjanja oštećenja nastalih zbog proteina kovalentno vezanih na DNA.

U ispitivanim uzorcima tkiva testisa uočili smo veću ekspresiju hnRNPK i γ H2AX proteina kod miševa sa homozigotnom mutacijom u genu *SPRTN* u odnosu na heterozigotne miševe, dok je ekspresija PCNA i p53 proteina podjednako izražena. Ipak, iako promjene ekspresije p53 proteina nisu pokazale statističku značajnost ($p=0,07$), vrlo je vjerojatno da bi se razlika u ekspresiji proteina u tkivu pokazala značajnom da smo u istraživanje uključili veći broj uzoraka. Ovako, možemo zaključiti da ekspresija p53 proteina u testisu pokazuje trend smanjenja kod miševa s mutacijom u genu *SPRTN*, koji je potrebno dodatno istražiti.

Heterogeni nuklearni ribonukleoprotein K (hnRNPK) je protein od ključne važnosti za stanice zbog brzog odgovora na genotoksične spojeve, odnosno DNA oštećenja. HnRNPK surađuje s p53 i kontrolira stanični ciklus, a pretjerana ekspresija ovog proteina je povezana s nizom karcinoma (Moumen i sur. 2005). HnRNPK je DNA/RNA vezujući protein koji sudjeluje u procesiranju, transportu i metabolizmu pre-mRNA molekula i regulira širok raspon bioloških procesa i patogenezu bolesti. Multifunkcionalni je protein koji sudjeluje u stabilnosti, remodeliranju kromatina, transkripciji i translaciji DNA (Xu i sur. 2018). Malo se zna o tome koliko je hnRNPK izražen i reguliran u spermatogenezi. Zdravo tkivo testisa miša sadrži hnRNPK koji je uglavnom lokaliziran u jezgri primarnih spermatocita (Yu i sur. 2011), što je vidljivo i na našem primjeru heterozigota. Prethodno istraživanje je pokazalo da se hnRNPK eksprimira u različitim razvojnim fazama testisa tijekom spermatogeneze, u spermatogonijama, spermatocitama i u membrani spermatida, a lokaliziran je u različitim dijelovima stanica (Xu i sur. 2018). Na prerezu tkiva testisa

knock-in miša protein hnRNPK je eksprimiran u primarnim spermatocitima. Ekspresija hnRNPK proteina u testisima može implicirati više njegovih potencijalnih uloga u razvoju testisa, što će pružiti teorijsku osnovu za buduće proučavanje regulacije molekularnog mehanizma spermatogeneze. Stanice s oštećenom funkcijom proteina Spartan pokazuju pojačanu ekspresiju proteina hnRNPK. U cijelosti je nepoznato koju bi ulogu protein Spartan mogao imati u regulaciji funkcije hnRNPK proteina, ali je zanimljiva ideja da Spartan sudjeluje u regulaciji i procesiranju mRNA molekula, što se značajno razlikuje od do sada mu pripisanih proteolitičkih funkcija u popravku DNA.

Fosforilacija H2AX u oblik γ H2AX jedan je od najranijih staničnih odgovora na stvaranje dvolančanih lomova DNA (Fernandez-Capetillo i sur. 2003). Prethodni radovi pokazuju da je γ -H2AX jedan od glavnih biljega genotoksičnih stresova povezanih s razvojem raka i progresijom tumora (Dickey i sur. 2009). S obzirom da prethodna istraživanja pokazuju nuklearno γ -H2AX bojenje u spermatocitima, spermatogonijama i spermatidama smatra se da funkcija fosforilacije H2AX tijekom spermatogeneze nije ograničena samo na stvaranje γ -H2AX žarišta na dvolančanim lomovima DNA, nego da γ -H2AX ima i druge funkcije u procesu spermatogeneze (Hamer i sur. 2003). γ H2AX se eksprimira u spermatogonijama, spermatocitima i spermatidama kao odgovor na ionizirajuće zračenje (Hamer i sur. 2003). Na slikama je ekspresija γ H2AX proteina prisutna u primarnim spermatocitima i spermatidama. Pojačana ekspresija fosforiliranog histona H2AX u stanicama s oštećenom funkcijom proteina Spartan mogla bi biti posljedica akumulacije DPC oštećenja i posljedičnih jednolančanih i dvolančanih lomova DNA. Međutim, postoji mogućnost da se radi o mehanizmu regulacije histonske ekspresije koji je potaknut proteinom Spartan, budući da smo pokazali da ova dva proteina stupaju u direktnu interakciju (Marinović, neobjavljeni rezultati). Dodatni eksperimenti, poput komet testa i biokemijskih testova karakteriziranja interakcije, pomoći će u daljnjem usmjeravanju istraživanja i razumijevanju procesa koji se odvijaju u stanicama testisa.

Produkt tumor supresor gena *TP53* je p53 koji inducira stanične odgovore kao što su zaustavljanje staničnog ciklusa, starenje i apoptozu, koji doprinose supresiji tumorskog rasta (Biegging i sur. 2014). Protein p53 je važan u regulaciji proliferacije stanica tijekom normalne spermatogeneze kao i reguliranju procesa apoptoze u spermatogonijama (Beumer i sur. 1998). U testisima glavna funkcija p53 je kontrola cjelovitosti DNA (Lech i sur. 2013). p53 je nuklearni

transkripcijski čimbenik s pro-apoptotskom funkcijom. Budući da više od 50% humanih karcinoma nosi mutacija u genu *p53* s gubitkom funkcije proteina, smatra se da je *p53* jedan od najvažnijih supresora tumora, te je popularno nazvan „čuvar genoma“ (engl. *Guardian of the genome*) (Lane, 1992). Aktivirani *p53* potiče zaustavljanje staničnog ciklusa kako bi se omogućilo popravljavanje DNA ili potiče apoptozu kako bi se spriječila proliferacija stanica s ozbiljnim oštećenjima DNA (Ozaki i Nakagawara 2011). Regulirana ekspresija *p53* neophodna je tijekom razvoja za homeostazu i diferencijaciju stanica testisa. Moguće je da pretjerana ekspresija *p53* u spermatidama dovodi do apoptoze (Allemand i sur. 1999). U normalnom stanju, u većini tjelesnih stanica, *p53* protein je prisutan u niskoj koncentraciji, ali kada su stanice izložene tretmanima koji bi mogli oštetiti DNA, poput ultraljubičastog zračenja ekspresija proteina *p53* se povećava (Raimondo i sur. 2019). Stanice testisa sa oštećenom funkcijom proteina Spartan pokazuju smanjenje ekspresije proteina *p53*. Nepoznato je na kojoj bi razini protein Spartan mogao biti povezan s funkcijom *p53* proteina, ali postoje pretpostavke da bi to moglo biti upravo na razini regulacije apoptotske aktivnosti u stanicama s nepopravljivim oštećenjem DNA.

Kod pacijenata sa bilateralnim mutacijama u genu *SPRTN* dokazan je veći broj dvolančanih lomova DNA, ali se karcinom razvija samo kod jetrenih stanica, dok ostale stanice u organizmu ne razvijaju karcinome i na određeni način nadoknađuju poremećenu funkciju Spartan proteina. Moguće je da poremećaj funkcije ili smanjena količina proteina Spartan dovodi do povećanja ekspresije drugih proteina povezanih s popravkom DNA, kao što su hnRNPK i γ -H2AX, te na taj način djelomičnu kompenzaciju poremećaja funkcije proteina Spartan što može zaustaviti nastanak tumora ostalih stanica u organizmu. Spartan ima važan utjecaj na očuvanje stabilnosti genoma i moguće je da ima ulogu u procesima u koje su uključeni proteini hnRNPK i γ -H2AX. Moguće je da je u testisima veća ekspresija *SPRTN*-a s obzirom na druga tkiva jer se kontinuirano događa veliki broj dioba stanica. U morfoloiji promatranih struktura testisa i lokalizaciji stanica pozitivnih na ekspresiju testiranih proteina nismo uočili razliku. Veličina, oblik i gustoća sjemenih kanalića, kao i veličina i raspored stanica u njima, prema našim rezultatima ne pokazuju značajnu razliku između heterozigotnog i homozigotnog miša.

Ovo istraživanje je osmišljeno kao pilot istraživanje, tako da bi u daljnjim istraživanjima trebalo potvrditi rezultate ove studije drugim metodama, kao što su gel elektroforeza, Western blot (prijenos proteina na membranu), ELISA ili masena spektrometrija, uz veći broj ponavljanja i veći

broj uzoraka te uključiti u istraživanje i druge proteine uključene u procese DNA popravka i spermatogeneze. S obzirom da homozigotna mutacija u genu *SPRTN* dovodi do promjene ekspresije nekih od testiranih proteina naša buduća istraživanja će biti utvrđivanje uloge proteina Spartan u procesima u kojima sudjeluju ovi proteini: DNA popravku, replikaciji, karcinogenezi i apoptozi.

5. ZAKLJUČAK

- Naši rezultati su pokazali značajnu razliku u ekspresiji proteina hnRNPK i γ -H2AX u tkivu testisa *knock-in* miša i heterozigotnog miša, kao i jasan trend promjene ekspresije proteina p53, što implicira važnu ulogu proteina Spartan u procesima spermatogeneze, karcinogeneze i popravka DNA.
- Nije uočena značajna razlika u ekspresiji PCNA proteina u tkivu testisa *knock-in* miša i heterozigotnog miša.
- Ako je u stanici prisutna homozigotna mutacija *SPRTN* gena postoji mogućnost da se nadoknađuje funkcija proteina Spartan tako da dolazi do povećanja ekspresije hnRNPK i γ H2AX proteina koji sudjeluju u popravku različitih vrsta oštećenja DNA.
- Ovo istraživanje ukazuje na važnost proteina Spartan u popravku oštećenja i replikaciji DNA i njegovu moguću poveznicu sa drugim proteinima koji sudjeluju u popravku DNA.

6. LITERATURA

- Allemand I., Anglo A., Jeantet A.Y., Cerutti I., Evelyne M. (1999): Testicular wild-type p53 expression in transgenic mice induces spermiogenesis alterations ranging from differentiation defects to apoptosis. *Oncogene* **18**: 6521–6530.
- Ariyaratne H.B.S., Mendis-Handagama S.M.L.C. (2000): Changes in the testis interstitium of Sprague Dawley rats from birth to sexual maturity. *Biol. Reprod.* **62**: 680–690.
- Barboro P., Ferrari N., Balbi C. (2014): Emerging roles of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) in cancer progression. *Cancer Lett.* **352**: 152–159.
- Barboro P., Repaci E., Rubagotti A., Salvi S., Boccardo S., Spina B., Truini M., Introini C., Puppo P., Ferrari N., Carmignani G., Boccardo F., Balbi C. (2009): Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K: Altered pattern of expression associated with diagnosis and prognosis of prostate cancer. *Br. J. Cancer* **100**: 1608–1616.
- Bassing C.H., Chua K.F., Sekiguchi J.A., Suh H., Whitlow S.R., Fleming J.C., Monroe B.C., Ciccone D.N., Yan C., Vlasakova K., Livingston D.M., Ferguson D.O., Scully R., Alt F.W. (2002): Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 8173–8178.
- Bellve A.R., Cavicchia J.C., Millette C.F., O'Brien D.A., Bhatnagar Y.M., Dym M. (1977): Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. *J. Cell Biol.* **74**: 68–85.
- Berod, A., Hartman, B. K., & Pujol, J. F. (1981). Importance of fixation in immunohistochemistry: use of formaldehyde solutions at variable pH for the localization of tyrosine hydroxylase. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **29(7)**, 844–850.
- Beumer T.L., Roepers-Gajadien H.L., Gademan I.S., Buul P.P.W. Van, Gil-Gomez G., Rutgers D.H., Rooij D.G. De (1998): The role of the tumor suppressor p53 in spermatogenesis. *Cell Death Differ.* **5**: 669–677.
- Biegging K.T., Mello S.S., Attardi L.D. (2014): Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* **14**: 359–370.
- Boehm E.M., Gildenberg M.S., Washington M.T. (2016): The many roles of PCNA in eukaryotic DNA replication. *The Enzymes*: 231-254.
- Carpenter B., McKay M., Dundas S.R., Lawrie L.C., Telfer C., Murray G.I. (2006): Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is over expressed, aberrantly localised and is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Br. J. Cancer* **95**: 921–927.
- Centore R.C., Yazinski S.A., Tse A., Zou L. (2012): Spartan/C1orf124, a reader of PCNA ubiquitylation and a regulator of UV-induced DNA damage response. *Mol. Cell* **46**: 625–635.
- Chen A., Li J., Song L., Ji C., Böing M., Chen J., Brand-Saberi B. (2017): GGNBP2 is necessary for testis morphology and sperm development. *Sci. Rep.* **7**: 1–8.

- Chen X., Gu P., Xie R., Han J., Liu H., Wang B., Xie W., Xie W., Zhong G., Chen C., Xie S., Jiang N., Lin T., Huang J. (2017): Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is associated with poor prognosis and regulates proliferation and apoptosis in bladder cancer. *J. Cell. Mol. Med.* **21**: 1266–1279.
- D'Amico F., Skarmoutsou E., Stivala F. (2009): State of the art in antigen retrieval for immunohistochemistry. *J. Immunol. Methods* **341**: 1–18.
- Delabaere L., Orsi G.A., Sapey-Triomphe L., Horard B., Couble P., Loppin B. (2014): The Spartan ortholog maternal haploid is required for paternal chromosome integrity in the drosophila zygote. *Curr. Biol.* **24**: 2281–2287.
- Dickey J.S., Redon C.E., Nakamura A.J., Baird B.J., Sedelnikova O.A., Bonner W.M. (2009): H2AX: Functional roles and potential applications. *Chromosoma* **118**: 683–692.
- Dinh P.X., Das A., Franco R., Pattnaik A.K. (2013): Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K supports vesicular stomatitis virus replication by regulating cell survival and cellular gene expression. *J. Virol.* **87**: 10059–10069.
- Doyle A., McGarry M.P., Lee N.A., Lee J.J. (2012): The construction of transgenic and gene knockout/knockin mouse models of human disease. *Transgenic Res.* **21**: 327–349.
- Fattahi A., Latifi Z., Ghasemnejad T., Nejabati H.R., Nouri M. (2017): Insights into in vitro spermatogenesis in mammals: Past, present, future. *Mol. Reprod. Dev.* **84**: 560–575.
- Fernandez-Capetillo O., Mahadevaiah S.K., Celeste A., Romanienko P.J., Camerini-Otero R.D., Bonner W.M., Manova K., Burgoyne P., Nussenzweig A. (2003): H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Dev. Cell* **4**: 497–508.
- Fukuda K., Morioka H., Imajou S., Ikeda S., Ohtsuka E., Tsurimoto T. (1995): Structure-function relationship of the eukaryotic DNA replication factor, proliferating cell nuclear antigen. *J. Biol. Chem.* **270**: 22527–22534.
- Gallardo M., Hornbaker M.J., Zhang X., Hu P., Bueso-Ramos C., Post S.M. (2016): Aberrant hnRNP K expression: All roads lead to cancer. *Cell Cycle* **15**: 1552–1557.
- Gallardo M., Lee H.J., Zhang X., Bueso-Ramos C., Pagoon L.R., McArthur M., Multani A., Nazha A., Manshouri T., Parker-Thornburg J., Rapado I., Quintas-Cardama A., Kornblau S.M., Martinez-Lopez J., Post S.M. (2015): HnRNP K is a haploinsufficient tumor suppressor that regulates proliferation and differentiation programs in hematologic malignancies. *Cancer Cell* **28**: 486–499.
- Griswold M.D. (2016): Spermatogenesis: The commitment to Meiosis. *Physiol. Rev.* **96**: 1–17.
- Habert R., Lejeune H., Saez J.M. (2001): Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **179**: 47–74.
- Hamer G., Roepers-Gajadien H.L., Duyn-Goedhart A. Van, Gademan I.S., Kal H.B., Buul P.P.W. Van, Rooij D.G. De (2003): DNA double-strand breaks and γ -H2AX signaling in the testis. *Biol. Reprod.* **68**: 628–634.

- Hiom K. (2014): SPRTN is a new player in an old story. *Nat. Genet.* **46**: 1155–1157.
- Hiroshi O., Shinichi A., Yoshitake N. (2003): Functional analysis of the p53 gene in apoptosis induced by heat stress or loss of stem cell factor signaling in mouse male germ cells. *Biol. Reprod.* **68**: 2249–2254.
- Huang J., Zhou Q., Gao M., Newshean S., Zhao F., Kim W., Zhu Q., Kojima Y., Yin P., Zhang Y., Guo G., Tu X., Deng M., Luo K., Qin B., Machida Y., Lou Z. (2020): Tandem deubiquitination and acetylation of SPRTN promotes DNA-protein crosslink repair and protects against aging. *Mol. Cell* **79**: 824-835.e5.
- Huttlin E.L., Jedrychowski M.P., Elias J.E., Goswami T., Rad R., Beausoleil S.A., Villén J., Haas W., Sowa M.E., Gygi S.P. (2010): A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression. *Cell* **143**: 1174–1189.
- Jarvis S., Elliott D.J., Morgan D., Winston R., Readhead C. (2005): Molecular markers for the assessment of postnatal male germ cell development in the mouse. *Hum. Reprod.* **20**: 108–116.
- Junquiera L.C., Carneiro J. (2005): *Osnove histologije: udžbenik i atlas*. 11. izdanje. 418-433.
- Kanter M., Aktas C. (2009): Effects of scrotal hyperthermia on Leydig cells in long-term: A histological, immunohistochemical and ultrastructural study in rats. *J. Mol. Histol.* **40**: 123–130.
- Koh P.O., Kim M.O. (2006): Ethanol exposure decreases cell proliferation and increases apoptosis in rat testes. *J. Vet. Med. Sci.* **68**: 1013–1017.
- Kubota T., Nishimura K., Kanemaki M.T., Donaldson A.D. (2013): The Elg1 replication factor C-like complex functions in PCNA unloading during DNA replication. *Mol. Cell* **50**: 273–280.
- Kumar T.R., Larson M., Wang H., McDermott J., Bronshteyn I. (2009): Transgenic mouse technology: principles and methods. *Methods Mol. Biol.* **590**: 335–362.
- Lane D. (1992): p53, guardian of the genome. *Nature* **358**, 15–16.
- Lawrence D., Nagele R.G., Wang C.Y., Damiano B.P. (2008): PCNA indexing as a preclinical immunohistochemical biomarker for testicular toxicity. *Biotech. Histochem.* **83**: 211–220.
- Lech T., Golas A., Styrna J. (2013): Is p53 controlling spermatogenesis in male mice with the deletion on the Y chromosome? *Zygote* **21**: 65–70.
- Lessel D., Vaz B., Halder S., Lockhart P.J., Marinovic-Terzic I., Lopez-Mosqueda J., Philipp M., Sim J.C.H., Smith K.R., Oehler J., Cabrera E., Freire R., Pope K., Nahid A., Norris F., Leventer R.J., Delatycki M.B., Barbi G., Ameln S. Von, Högel J., Degoricija M., Fertig R., Burkhalter M.D., Hofmann K., Thiele H., Altmüller J., Nürnberg G., Nürnberg P., Bahlo M., Martin G.M., Aalfs C.M., Oshima J., Terzic J., Amor D.J., Dikic I., Ramadan K., Kubisch C. (2014): Mutations in SPRTN cause early onset hepatocellular carcinoma, genomic instability and progeroid features. *Nat. Genet.* **46**: 1239–1244.
- Lin F., Chen Z. (2014): Standardization of diagnostic immunohistochemistry: Literature review and Geisinger experience. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **138**: 1564–1577.

- Lopez-Mosqueda J., Maddi K., Prgomet S., Kalayil S., Marinovic-Terzic I., Terzic J., Dikic I. (2016): SPRTN is a mammalian DNA-binding metalloprotease that resolves DNA-protein crosslinks. *Elife* **5**: 1–19.
- Magre S., Jost A. (1991): Sertoli cells and testicular differentiation in the rat fetus. *J. Electron Microsc. Tech.* **19**: 172–188.
- Mahadevaiah S.K., Turner J.M.A., Baudat F., Rogakou E.P., Boer P. De, Blanco-Rodríguez J., Jasin M., Keeney S., Bonner W.M., Burgoyne P.S. (2001): Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat. Genet.* **27**: 271–276.
- Maskey R.S., Kim M.S., Baker D.J., Childs B., Malureanu L.A., Jeganathan K.B., Machida Y., Deursen J.M. Van, Machida Y.J. (2014): Spartan deficiency causes genomic instability and progeroid phenotypes. *Nat. Commun.* **5**: 1–12.
- Migrenne S., Moreau E., Pakarinen P., Dierich A., Merlet J., Habert R., Racine C. (2012): Mouse testis development and function are differently regulated by follicle-stimulating hormone receptors signaling during fetal and prepubertal life. *PLoS One* **7**: .
- Mosbech A., Gibbs-Seymour I., Kagias K., Thorslund T., Beli P., Povlsen L., Nielsen S.V., Smedegaard S., Sedgwick G., Lukas C., Hartmann-Petersen R., Lukas J., Choudhary C., Pocock R., Bekker-Jensen S., Mailand N. (2012): DVC1 (C1orf124) is a DNA damage-targeting p97 adaptor that promotes ubiquitin-dependent responses to replication blocks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**: 1084–1092.
- Motoyama S., Takeiri A., Tanaka K., Harada A., Matsuzaki K., Taketo J., Matsuo S., Fujii E., Mishima M. (2018): Advantages of evaluating γ H2AX induction in non-clinical drug development. *Genes Environ.* **40**: 1–7.
- Moumen A., Masterson P., O'Connor M.J., Jackson S.P. (2005): hnRNP K: An HDM2 target and transcriptional coactivator of p53 in response to DNA damage. *Cell* **123**: 1065–1078.
- Murta D., Batista M., Silva E., Trindade A., Henrique D., Duarte A., Lopes-da-Costa L. (2013): Dynamics of notch pathway expression during mouse testis post-natal development and along the spermatogenic cycle. *PLoS One* **8**: 1–12.
- Nagy, A., Gertsenstein, M., Vintersten, K., Behringer, R. (2003): *Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual*; 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Neto F.T.L., Bach P.V., Najari B.B., Li P.S., Goldstein M. (2016): Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Semin. Cell Dev. Biol.* **59**: 10–26.
- Orth J.M. (1982): Proliferation of sertoli cells in fetal and postnatal rats: A quantitative autoradiographic study. *Anat. Rec.* **203**: 485–492.
- Ozaki T., Nakagawara A. (2011): Role of p53 in cell death and human cancers. *Cancers (Basel)*. **3**: 994–1013.
- Palmiter, R. D., & Brinster, R. L. (1986). Germ-Line Transformation of Mice. *Annual Review of Genetics*, **20**(1), 465–499.

- Park J.M., Yang S.W., Yu K.R., Ka S.H., Lee S.W., Seol J.H., Jeon Y.J., Chung C.H. (2014): Modification of PCNA by ISG15 plays a crucial role in termination of error-prone translesion DNA synthesis. *Mol. Cell* **54**: 626–638.
- Paunesku T., Mittal S., Protić M., Oryhon J., Korolev S. V., Joachimiak A., Woloschak G.E. (2001): Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): Ringmaster of the genome. *Int. J. Radiat. Biol.* **77**: 1007–1021.
- Prophet E.B., Mills B., Arrington J.B., Sobin L.H. (1994): *Armed Forces Institute of Pathology: Laboratory Methods in Histotechnology*. Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington DC.
- Preziosi R., Sarli G., Benazzi C., Marcato P.S. (1995): Detection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in canine and feline mammary tumours. *J. Comp. Pathol.* **113**: 301–313.
- Raimondo S., Gentile T., Gentile M., Morelli A., Donnarumma F., Cuomo F., Filippo S. De, Montano L. (2019): P53 protein evaluation on spermatozoa DNA in fertile and infertile males. *J. Hum. Reprod. Sci.* **12**: 114–121.
- Ramos-Vara J.A., Webster J.D., DuSold D., Miller M.A. (2014): Immunohistochemical Evaluation of the Effects of Paraffin Section Storage on Biomarker Stability. *Vet. Pathol.* **51**: 102–109.
- Roy V.K., Marak T.R., Gurusubramanian G. (2016): Alleviating effect of *Mallotus roxburghianus* in heat-induced testicular dysfunction in Wistar rats. *Pharm. Biol.* **54**: 905–918.
- Ruggiano A., Ramadan K. (2021): The trinity of SPRTN protease regulation. *Trends Biochem. Sci.* **46**: 2–4.
- Ruijs M.W.G., Andel R.N.J. Van, Oshima J., Madan K., Nieuwint A.W.M., Aalfs C.M. (2003): Atypical progeroid syndrome: An unknown helicase gene defect? *Am. J. Med. Genet.* **116**: 295–299.
- Russell L.D., Ren H.P., Hikim I.S., Schulze W., Hikim A.P.S. (1990): A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the sertoli cell. *Am. J. Anat.* **188**: 21–30.
- Ryding A.D.S., Sharp M.G.F., Mullins J.J. (2001): Conditional transgenic technologies. *J. Endocrinol.* **171**: 1–14.
- Shi S.R., Shi Y., Taylor C.R. (2011): Antigen retrieval immunohistochemistry: Review and future prospects in research and diagnosis over two decades. *J. Histochem. Cytochem.* **59**: 13–32.
- Stingele J., Bellelli R., Alte F., Hewitt G., Sarek G., Maslen S.L., Tsutakawa S.E., Borg A., Kjær S., Tainer J.A., Skehel J.M., Groll M., Boulton S.J. (2016): Mechanism and regulation of DNA-protein crosslink repair by the DNA-dependent metalloprotease SPRTN. *Mol. Cell* **64**: 688–703.
- Stingele J., Habermann B., Jentsch S. (2015): DNA-protein crosslink repair: Proteases as DNA repair enzymes. *Trends Biochem. Sci.* **40**: 67–71.

- Stingele J., Schwarz M.S., Bloemeke N., Wolf P.G., Jentsch S. (2014): A DNA-dependent protease involved in DNA-protein crosslink repair. *Cell* **158**: 327–338.
- Sun Y., Saha L.K., Saha S., Jo U., Pommier Y. (2020): Debulking of topoisomerase DNA-protein crosslinks (TOP-DPC) by the proteasome, non-proteasomal and non-proteolytic pathways. *DNA Repair (Amst)*. **94**: 102926.
- Tratar U.L., Horvat S., Cemazar M. (2018): Transgenic mouse models in cancer research. *Front. Oncol.* **8**: 1–18.
- Vaz B., Popovic M., Newman J.A., Fielden J., Aitkenhead H., Halder S., Singh A.N., Vendrell I., Fischer R., Torrecilla I., Drobnitzky N., Freire R., Amor D.J., Lockhart P.J., Kessler B.M., McKenna G.W., Gileadi O., Ramadan K. (2016): Metalloprotease SPRTN/DVC1 orchestrates replication-coupled DNA-protein crosslink repair. *Mol. Cell* **64**: 704–719.
- Vergouwen R.P.F.A., Jacobs S.G.P.M., Huiskamp R., Davids J.A.G., Rooij D.G. De (1991): Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *J. Reprod. Fertil.* **93**: 233–243.
- Waterston R.H., Lindblad-Toh K., Birney E., Rogers J., Abril J.F., Agarwal P., Agarwala R., Ainscough R., Lander E.S. (2002): Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**: 520–562.
- Xu H., Zhang P., Li R., Wu W., Wang S., Xu Y. (2018): Expression analysis of multifunctional RNA-binding protein hnRNP K during development of mammalian testis. *Pol. J. Vet. Sci.* **21**: 343–351.
- Yao C., Liu Y., Sun M., Niu M., Yuan Q., Hai Y., Guo Y., Chen Z., Hou J., Liu Y., He Z. (2015): MicroRNAs and DNA methylation as epigenetic regulators of mitosis, meiosis and spermiogenesis. *Reproduction* **150**: R25–R34.
- Yong W.H., Dry S.M., Shabihkhani M. (2014): A practical approach to clinical and research biobanking. *Methods Mol. Biol.* **1180**: 137–162.
- Yu Y., Zhao C., Lv Z., Chen W., Tong M., Guo X., Wang L., Liu J., Zhou Z., Zhu H., Zhou Q., Sha J. (2011): Microinjection manipulation resulted in the increased apoptosis of spermatocytes in testes from intracytoplasmic sperm injection (icisi) derived mice. *PLoS One* **6**: 15–17.
- Zalzali H., Rabeh W., Najjar O., Abi Ammar R., Harajly M., Saab R. (2018): Interplay between p53 and Ink4c in spermatogenesis and fertility. *Cell Cycle* **17**: 643–651.
- Zhang H., Xiong Y., Chen J. (2020): DNA-protein cross-link repair: What do we know now? *Cell Biosci.* **10**: 1–10.
- Zhao W.P., Wang H.W., Liu J., Tan P.P., Luo X.L., Zhu S.Q., Chen X.L., Zhou B.H. (2018): Positive PCNA and Ki-67 expression in the testis correlates with spermatogenesis dysfunction in fluoride-treated rats. *Biol. Trace Elem. Res.* **186**: 489–497.

<https://www.scbt.com/p/histone-h1-antibody-ae-4>, pristupljeno 25. lipanj 2021.

<https://datasheets.scbt.com/sc-56.pdf>, pristupljeno 10. srpanj 2021.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/83932>, pristupljeno 12. srpanj 2021.

<https://www.uniprot.org/uniprot/P27661>, pristupljeno 25. srpanj 2021.

<https://www.uniprot.org/uniprot/P02340>, pristupljeno 05. kolovoz 2021.

7. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Žana Barun

Datum rođenja: 03.08.1996.

Obrazovanje:

2011-2015 V. gimnazija Vladimir Nazor, Split

2015-2019 Preddiplomski studij biologija i kemija
Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet

2019-2021 Diplomski sveučilišni studij Eksperimentalna biologija, Fiziologija i imunobiologija
Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek

Radno iskustvo:

2020. Laboratorijska stručna praksa
Institut Ruđer Bošković, Zavod za molekularnu medicinu, Laboratorij za
molekularnu neuropsihijatru
Mentor: dr.sc. Gordana Nedić Erjavec

2021. Poliklinika Lab plus, Split

Dodatno:

2018/2019 Erasmus program
Università degli Studi del Sannio, Benevento, Italia

2020. Tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama: LabAnim A
kategorija (Laboratory Animal Science Course: FELASA equivalent (60 sati)).