

Ekspresijska analiza čimbenika uključenih u popravak unakrsnih veza DNA-protein

Medved, Vanna

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:952991>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, ožujak 2022.

Vanna Medved

**EKSPRESIJSKA ANALIZA
ČIMBENIKA UKLJUČENIH U
POPRAVAK UNAKRSNIH VEZA
DNA-PROTEIN**

Rad je izrađen pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Igora Stuparevića (Prehrambeno-biotehnološki fakultet), na Institutu Ruđer Bošković pod komentorstvom dr. sc. Marte Popović te uz pomoć Christine Supine, mag. biol. mol.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom *Razumijevanje popravka unakrsnog vezanja DNA-protein in vivo koristeći zebricu kao istraživački model* (HRZZ-UIP-2017-05-5258, voditeljica projekta: dr. sc. Marta Popović).

Prije svega, želim se zahvaliti mentoru izv. prof. dr. sc. Igoru Stupareviću na preporuci i mentorici dr. sc. Marti Popović na ukazanoj prilici za izradu diplomskog rada u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju. Tijekom vremena provedenog kod Vas sam pobliže upoznala svijet znanosti, stekla nova znanja i srela zanimljive ljude. Omogućili ste mi jedno lijepo iskustvo za kraj studiranja, koje ću uvijek pamtiti. Veliko hvala mentorici na podijeljenom znanju i savjetima, na susretljivosti i ugodnom druženju. Također, hvala ostalim zaposlenicima laboratorija na pomoći, strpljenju i prijateljskoj atmosferi u ovim mjesecima zajedničkog druženja.

Posebno hvala ide mojim roditeljima i sestri na neizmjerne podršci svih ovih godina.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za biokemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

EKSPRESIJSKA ANALIZA ČIMBENIKA UKLJUČENIH U POPRAVAK UNAKRSNIH VEZA DNA-PROTEIN

Vanna Medved, univ. bacc. nutr. 0058209057

Sažetak: DNA je kontinuirano izložena agensima koji uzrokuju oštećenja, a integritet DNA posebno narušavaju unakrsne veze DNA i proteina (engl. *DNA-protein crosslink*, DPC). Navedeno oštećenje ugrožava osnovne transakcije DNA molekule, zbog čega se kod ljudi akumulacija DPC-ova povezuje sa starenjem, nastankom karcinoma i neurodegeneracijom. Proteini Acrc, Zatt i Xpa imaju ulogu u različitim mehanizmima popravka DPC-ova. Acrc vjerojatno provodi proteolizu oštećenja, Zatt vjerojatno sudjeluje u procesu hidrolize unakrsne veze, a Xpa je dio puta popravka koji je ovisan o nukleaznoj aktivnosti. U ovome radu, provedena je ekspresijska analiza gena *ACRC*, *ZATT* i *XPA* u tkivima domaćeg miša (*Mus musculus*), te usporedba ekspresijskih profila ovisno o dobi i spolu. Također, ekspresijski profili proučavanih gena uspoređeni su sa ekspresijom kod čovjeka.

Ključne riječi: ekspresija gena, unakrsna veza DNA-protein, popravak DNA, miš (*Mus musculus*), kvantitativni PCR

Rad sadrži: 71 stranica, 9 slika, 8 tablica, 105 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: izv. prof. dr. sc. Igor Stuparević

Komentor: dr.sc. Marta Popović, znan. sur., IRB

Pomoć pri izradi: Christine Supine, mag. biol. mol.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. dr. sc. Marta Popović, znan. sur., IRB (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Igor Stuparević (mentor)
3. dr. sc. Jovica Lončar, znan. sur., IRB (član)
4. izv. prof. dr. sc. Igor Slivac (zamjenski član)

Datum obrane: 28. ožujak 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Biochemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

EXPRESSION ANALYSIS OF FACTORS INVOLVED IN THE REPAIR OF DNA-PROTEIN CROSSLINKS

Vanna Medved, univ. bacc. nutr. 0058209057

Abstract: DNA is constantly exposed to agents that cause damage. DNA integrity is particularly affected by DNA-protein crosslink (DPC). DPC lesions threaten basic DNA transactions, which is why in humans the accumulation of DPCs is associated with aging, cancer and neurodegeneration. The proteins Acrc, Zatt, and Xpa play roles in various mechanisms of DPC repair. Acrc likely performs DPC proteolysis, Zatt is probably involved in the process of crosslink hydrolysis, and Xpa is part of a repair pathway that is dependent on nuclease activity. In this work, expression analysis of the genes *ACRC*, *ZATT*, and *XPA* was performed in the tissues of the house mouse (*Mus musculus*) and expression profiles were compared as a function of age and sex. In addition, the expression profiles of the studied genes were compared with the expression in humans.

Keywords: gene expression, DNA-protein crosslink, DNA repair, house mouse (*Mus musculus*), quantitative PCR

Thesis contains: 71 pages, 9 figures, 8 tables, 105 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Igor Stuparević, PhD, Associate professor

Co-mentor: Marta Popović, PhD, Research Associate, IRB

Technical support and assistance: Christine Supina, mag. biol. mol.

Reviewers:

1. Marta Popović, PhD, Research Associate, IRB (president)
2. Igor Stuparević, PhD, Associate professor (mentor)
3. Jovica Lončar, PhD, Research Associate, IRB (member)
4. Igor Slivac, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: March 28th, 2022

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. OŠTEĆENJA I POPRAVAK DNA	3
2.2. UNAKRSNO VEZANJE DNA I PROTEINA	4
2.3. POPRAVAK UNAKRSNOG VEZANJA DNA I PROTEINA	6
2.3.1. Popravak ovisan o nukleazama	7
2.3.2. Popravak ovisan o proteolizi	8
2.3.3. Hidroliza kovalentne veze između DNA i proteina.....	10
2.4. ACRC, XPA I ZATT	12
2.4.1. Acrc	13
2.4.2. Zatt.....	14
2.4.3. Xpa	15
2.5. MIŠ KAO MODELNI ORGANIZAM	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. MATERIJALI	18
3.1.1. Pribor	18
3.1.2. Osnovne kemikalije.....	18
3.1.3. Boje	18
3.1.4. Markeri veličine.....	18
3.1.5. Nukleotidi i početnice.....	18
3.1.6. Enzimi	18
3.1.7. Komercijalni kompleti.....	18
3.1.8. Instrumenti.....	18
3.2. METODE	19
3.2.1. Dizajniranje početnica	19
3.2.2. Izolacija ukupne RNA	20
3.2.3. Određivanje koncentracije izolirane RNA	22
3.2.4. Elektroforeza nukleinskih kiselina na agaroznom gelu	22
3.2.5. Reverzna transkripcija	23
3.2.6. Lančana reakcija polimerazom.....	24
3.2.7. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom	26
3.2.8. Obrada podataka.....	29
4. REZULTATI I RASPRAVA	30
4.1. TESTIRANJE POČETNICA ZA KVANTITATIVNI PCR	30
4.2. ODABIR REFERENTNOG GENA ZA EKSPRESIJSKU ANALIZU KOD MIŠA	37

4.3.	ANALIZA KVALITETE IZOLIRANE RNA	40
4.4.	EKSPRESIJA GENA <i>ACRC</i>, <i>XPA</i> i <i>ZATT</i> U TKIVIMA DOMAĆEG MIŠA	45
4.4.1.	Usporedba ekspresije gena od interesa između odraslih i starih jedinki	52
4.4.2.	Usporedba ekspresije gena od interesa između mužjaka i ženki	55
4.4.3.	Usporedba ekspresije gena <i>ACRC</i> , <i>ZATT</i> i <i>XPA</i> u tkivima jedinki miša.....	56
4.5.	USPOREDBA EKSPRESIJE GENA <i>ACRC</i>, <i>ZATT</i> i <i>XPA</i> IZMEĐU MIŠA I ČOVJEKA	59
5.	ZAKLJUČCI	62
6.	LITERATURA	64

1. UVOD

Očuvanje genetičke informacije u živim organizmima presudno je za održavanje života. Molekula DNA, kao osnovna jedinica nasljeđivanja, složene je strukture te je unutar stanice podložna raznovrsnim oštećenjima uzrokovanim endogenim i egzogenim čimbenicima. Endogeni čimbenici odnose se na produkte staničnog metabolizma, prvenstveno reaktivne kisikove (ROS) i reaktivne dušikove čestice (RNS) te aldehide. Oštećenja DNA mogu uzrokovati i male reaktivne molekule u stanici, primjerice metilirajuće molekule, dok uzrok oštećenja može biti i promjena heliksa DNA molekule. Kada govorimo o egzogenim uzročnicima oštećenja DNA, najčešći su ultraljubičasto i ionizirajuće zračenje te raznovrsni lijekovi, kemoterapeutici i okolišni zagađivači. Najčešći tipovi oštećenja DNA molekule koji nastaju su abazična mjesta, supstitucije baza, intralančane i interlančane veze DNA molekule, unakrsne veze DNA-protein te jednolančani i dvolančani lomovi DNA molekule.

Najčešća oštećenja DNA nakon abazičnih mjesta, su unakrsna vezanja DNA i proteina (engl. *DNA-protein crosslink*, DPC) koji nastaju uslijed ireverzibilnog kovalentnog vezanja proteina na DNA. DPC-ovi su vrlo raznolike lezije koje ovise o veličini i karakteristikama vezanog proteina, strukturi kemijske veze i topologiji okolne DNA. DPC-ovi se mogu podijeliti u dvije skupine: (1) općeniti DPC-ovi koji nastaju vezanjem bilo kojeg proteina koji se nalazi u blizini intaktne DNA molekule uslijed izlaganja endogenim ili egzogenim uzročnicima vezanja i (2) enzimski DPC-ovi koji nastaju unakrsnim vezanjem enzima koji uobičajeno imaju ulogu u metabolizmu DNA molekule i to u blizini jednolančanog ili dvolančanog loma. Prvotno se smatralo kako stanica DPC oštećenja popravlja nespecifično, jednim od osnovnih puteva DNA popravka, no otkrićem proteaza koje specifično djeluju na DPC oštećenja, pokazano je kako stanica posjeduje popravke kojima molekulu DNA štiti isključivo od DPC oštećenja. Prema dosadašnjim istraživanjima, ključnu ulogu u popravku DPC oštećenja imaju metaloproteaze Wss1 kod kvasca te Sprtn kod eukariota, a nedavno su identificirane i druge proteaze koje vjerojatno sudjeluju u proteolitičkoj razgradnji DPC oštećenja. Osim mehanizama popravka koji su ovisni o proteolizi, stanica posjeduje i mehanizme popravka koji su usmjereni na hidrolizu unakrsne veze između DNA i proteina te puteve popravka koji su ovisni o djelovanju nukleaza. U ovome radu, istraživana su tri proteina za koje je pokazano da sudjeluju u popravku DPC oštećenja; potencijalnoj proteazi Acrc/Gcna (engl. *acid repeat-containing protein/germ cell nuclear antigen*) koja je dio mehanizma usmjerenog na proteolizu, Zatt (engl. *Zinc-finger associated with Top2 i Tdp2*) koji sudjeluje u mehanizmu usmjerenom na hidrolizu unakrsne

veze DPC oštećenja te Xpa (engl. *Xeroderma pigmentosum complementation group A*) koji je dio popravka ovisnog o nukleazama.

Cilj ovoga rada bio je utvrditi relativnu ekspresiju gena *ACRC*, *ZATT* i *XPA* u tkivima domaćeg miša (*Mus musculus*) koristeći kvantitativnu lančanu reakciju polimerazom (engl. *quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) te usporediti razlike u ekspresijama gena prema dobi i spolu. Također, rezultati ekspresije kod miša uspoređeni su s ekspresijom navedenih gena u čovjeka. Ekspresijska analiza triju gena uključivala je dizajniranje i testiranje početnica za qPCR analizu triju gena od interesa, odabir referentnog gena za relativnu kvantifikaciju ekspresije, izolaciju ukupne RNA iz tkiva miša, prevođenje RNA u komplementarnu DNA (engl. *complementary DNA*, cDNA), provođenje qPCR reakcije i kvantifikaciju i analizu rezultata.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. OŠTEĆENJA I POPRAVAK DNA

Stanična DNA je konstantno izložena endogenim i egzogenim faktorima koji uzrokuju njena oštećenja (Chatterjee i Walker, 2017). Oštećenje DNA odnosi se na svako odstupanje od karakteristične strukture dvostruke uzvojnice čiji su lanci građeni od međusobno povezanih nukleotida. Oštećenja molekule mogu nastati prilikom uobičajenih fizioloških procesa u stanici kao što su replikacija i razmatanje kada može doći do uvođenja krivo sparenih baza ili pojave lomova DNA lanaca uslijed aktivnosti topoizomeraza 1 i 2. Osim toga, spontana metilacija nukleinskih baza pomoću S-adenozilmetionina, spontana depurinizacija ili depirimidinizacija te deaminacija baza uzrokuju tisuće oštećenja DNA molekule u jednome danu (Jackson i Bartek, 2009). Nadalje, reaktivne kisikove vrste (ROS) i reaktivne dušikove vrste (RNS) su uobičajeni nusprodukti staničnog metabolizma koji ukoliko se u stanici nalaze u povišenoj koncentraciji, uzrokuju razna oštećenja nukleinskih baza i okosnice molekule DNA, kao što su supstitucije baza, abazična mjesta te jednolančani i dvolančani lomovi (Carusillo i Mussolino, 2020). Najštetniji egzogeni faktori za molekulu DNA su ultraljubičasto (UV) i ionizirajuće zračenje. UV zračenje može inducirati i do 100.000 oštećenja po satu u stanici (Jackson i Bartek, 2009), a ionizirajuće, između ostalih, može uzrokovati za stanicu najtoksičnije oštećenje, dvolančani lom DNA. U svrhu očuvanja stabilnosti genoma, postoje mehanizmi kojima se prepoznaju i specifično popravljaju raznovrsna oštećenja DNA. Postoji najmanje pet glavnih mehanizama kojima se popravljaju oštećenja DNA tijekom staničnog ciklusa. Bazni ekscizijski popravak (engl. *base excision repair*, BER) popravlja manja oštećenja nukleinskih baza u DNA, dok nukleotidni ekscizijski popravak (engl. *nucleotide excision repair*, NER) prepoznaje veća oštećenja nukleinskih baza, koja uzrokuju značajnu distorziju uzvojnice DNA. Popravak nesparenih i krivo sparenih baza (engl. *mismatch repair*, MMR) je postreplikativni put popravka koji, između ostalog, uvelike doprinosi vjernosti replikacije DNA, a mehanizmima homologne rekombinacije (engl. *homologous recombination*, HR) i nehomolognog spajanja krajeva (engl. *non-homologous end joining*, NHEJ) u stanici se popravljaju dvolančani lom (Chatterjee i Walker, 2017). Osim navedenih, postoji čitav niz mehanizama kojima stanica vrši reverziju i/ili eliminaciju raznovrsnih oštećenja koja svakodnevno narušavaju integritet DNA molekule, a uz stanične mehanizme koji toleriraju nastala oštećenja, osigurava se očuvanje genoma te preživljenje cjelokupnog organizma. U nastavku, veća pažnja posvećena je unakrsnoj vezi DNA i proteina (engl. *DNA-protein crosslink*, DPC) te putevima popravka navedenog oštećenja.

2.2. UNAKRSNO VEZANJE DNA I PROTEINA

Interakcije molekule DNA i proteina u jezgri stanice osnova su svih procesa u kojima DNA molekula sudjeluje u životu stanice. Interakcijama između DNA i histona uspostavlja se kromatinska struktura, a tijekom transkripcije, replikacije i popravka DNA veliki broj proteinskih faktora veže se na DNA i time ostvaruje svoje funkcije. Interakcije koje se formiraju između proteina i DNA molekule su reverzibilne, čime se omogućuje da proteinski kompleks obavi biološku funkciju za koju je namijenjen te nakon toga kompleks disocira s DNA (Wilson i sur., 2014). Ukoliko se uspostavi ireverzibilna kovalentna interakcija između proteina i DNA molekule, protein postaje zarobljen na DNA te predstavlja prepreku svim DNA transakcijama (replikaciji, transkripciji, razmatanju, smatanju i popravku) (Kojima i Machida, 2020), a takav tip oštećenja naziva se unakrsno vezanje DNA i proteina (DPC).

DPC oštećenje može nastati uslijed izlaganja endogenim ili egzogenim agensima u stanici te uslijed neispravne aktivnosti enzima koji imaju ulogu u metabolizmu DNA. Endogeni čimbenici koji uzrokuju DPC oštećenja u prvome redu odnose se na endogene produkte staničnog metabolizma, a to su aldehidi te reaktivne kisikove (ROS) i reaktivne dušikove čestice (RNS). Aldehidi se u stanici učestalo generiraju u reakcijama demetilacije histona, uslijed popravka aktivnošću AlkB, prilikom metabolizma aminokiselina te lipidne peroksidacije (Vaz i sur., 2017). Mehanizam nastanka DPC-ova uzrokovanih aldehydima prvotno se sastoji od reakcije aldehida s lizinskim, cisteinskim i histidinskim ostacima proteina, čime dolazi do vezanja aldehida na protein, te potom reakcije proteina s amino skupinama nukleinskih baza DNA molekule, točnije s egzocikličkim amino skupinama gvanina, citozina i adenina te N7 skupinom gvanina i C5 metilnom skupinom timina (Tretyakova i sur., 2015). ROS i RNS nastaju kao nusprodukti stanične respiracije, imunološkog odgovora i upalnih procesa, a mogu reagirati s DNA i/ili proteinima, generirajući slobodne radikale koji tada reagiraju s drugim proteinima te drugim dijelovima molekule DNA, stvarajući unakrsne veze (Tretyakova i sur., 2015). Osim produkata staničnog metabolizma, abazična mjesta i oksanini (oštećenja gvanina izazvana dušikovim oksidom) također predstavljaju endogene izvore DPC oštećenja, kojima se mogu zarobiti proteini nakon što se vežu na DNA (Sczepanski i sur., 2010; Chen i sur., 2007). Nadalje, egzogeni izvori DPC oštećenja su ionizirajuće zračenje te ultraljubičasto zračenje (UV), kao i anikancerogeni lijekovi. Ionizirajuće zračenje može direktno i indirektno inducirati nastanak DPC oštećenja. Direktno djelovanje odnosi se na ozračivanje okosnice DNA molekule, čime se stvaraju nestabilni DNA radikali koji vežu proteine u blizini, dok indirektnim djelovanjem ionizirajuće zračenje uzrokuje radiolizu vode, koja dovodi do povećanja lokalne

koncentracije ROS. Ozračivanje DNA UV zračenjem uzrokuje kovalentno vezanje, najčešće timidina s aminokiselinama proteina u blizini, a s najvećom efikasnošću baze vežu aminokiseline cistein, lizin, fenilalanin, triptofan te tirozin (Zhang i sur., 2004). Također, postoji cijeli niz spojeva koji pospješuju nastanak DPC oštećenja, kao što su mitomicin C, platinski spojevi, inhibitori metiltransferaze (5-aza-dC) te inhibitori topoizomeraza 1 i 2 (kamptotecin i etopozid), koji se koriste u liječenju karcinoma (Fielden i sur., 2018).

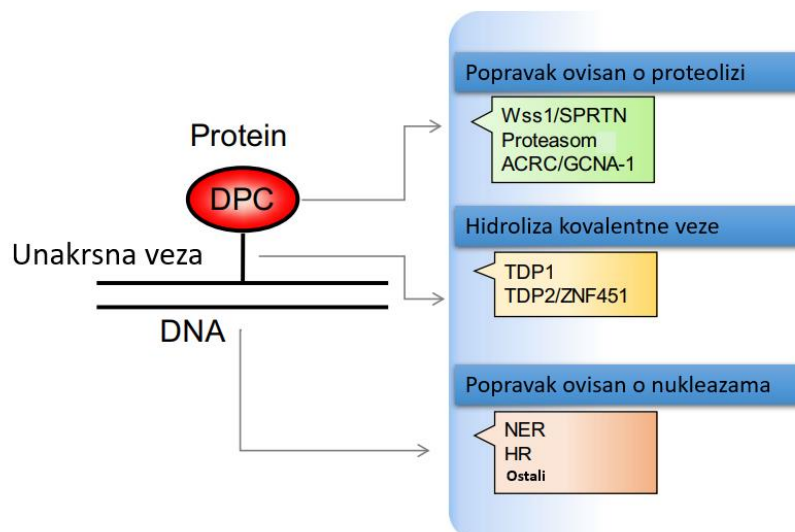
Općenita ili ne-enzimska DPC oštećenja nastaju unakrsnim vezanjem bilo kojeg proteina koji se u trenutku izlaganja agensu nalazi u blizini DNA molekule. Tako je utvrđeno da su histoni među najzastupljenijim DPC-ovima, a unakrsno se na DNA vežu i transkripcijski faktori, proteini replisoma, proteini koji sudjeluju u putevima popravka DNA, kao i proteini koji inače ne ulaze u interakciju s DNA (Wei i sur., 2021; Kiiianitsa i Maizels, 2020; Groehler i sur., 2017). Za razliku od općenitih DPC-ova, enzimske DPC-ove čine enzimi čija aktivnost uključuje formaciju kovalentne veze s molekulom DNA te nastanak nestabilnog, prolaznog intermedijera DNA-enzim. Međutim, u određenim uvjetima, uspostavljena kovalentna veza između DNA i enzima može postati ireverzibilna, čime enzimi ostaju trajno vezani na DNA molekulu. Skupini enzimskih DPC oštećenja pripadaju primjerice topoizomeraze 1 i 2 (engl. *topoisomerase 1/2 DNA covalent complex*, TOP1-cc i TOP2-cc), DNA-polimeraza β (Pol β), poli(ADP-ribozil)-polimeraza 1 (PARP1) te metiltransferaze (DNMT) (Zhang i sur., 2020). Od navedenih, najbolje opisana oštećenja su TOP1-DPC i TOP2-DPC. Topoizomeraze 1 i 2 (Top 1 i 2) su enzimi koji modificiraju topologiju DNA molekule, generirajući jednolančane ili dvolančane lomove DNA čime se odmataju superzavoji molekule tijekom replikacije, transkripcije, rekombinacije i popravka DNA molekule. Mehanizam djelovanja topoizomeraza uključuje aktivnost katalitičkog tirozinskog ostatka u aktivnom mjestu topoizomeraza, koji nukleofilno napada fosfodietersku okosnicu DNA, čime se enzim kovalentno veže na fosfat na 3' (Top1), odnosno 5' (Top2) kraju DNA molekule. Nastanak jednolančanog (Top1) ili dvolančanog loma (Top2) omogućava rotaciju lanca, odnosno lanaca DNA što smanjuje torzijski stres molekule, nakon čega topoizomeraze provode religaciju lomova te disociraju s DNA. Međutim, u određenim uvjetima Top1 i Top2 ostaju zarobljene na DNA, čime nastaje DPC oštećenje te nepopravljeni lom DNA molekule. Spojevi kamptotecin i etopozid specifično uzrokuju TOP1-DPC i TOP2-DPC, a topoizomeraze se mogu unakrsno vezati na DNA i ukoliko se prilikom aktivnosti nalaze u blizini oksidativnih radikala, velikih DNA adukata, ribonukleotida ili abazičnih mjesta (Vaz i sur., 2017). S obzirom na učestalu aktivnost topoizomeraza u stanici,

incidencija TOP1-DPC i TOP2-DPC u stanici je visoka, što se povezuje s razvojem karcinoma i neurodegenerativnih poremećaja (Sun i sur., 2020a).

Na temelju prethodno navedenog, može se zaključiti kako je DPC oštećenje vrlo kompleksno zbog raznolikosti fizikalno-kemijskih svojstava proteina koji se mogu ireverzibilno kovalentno vezati na DNA te zahvaljujući različitim vrstama i broju kemijskih veza koje se formiraju između proteina i DNA molekule. DPC oštećenje toksično je za stanicu jer predstavlja prepreku osnovnim DNA transakcijama, te ako se ne popravi vodi do pojave dvolančanih lomova čime značajno doprinosi genomskoj nestabilnosti stanice (Vaz i sur., 2017).

2.3. POPRAVAK UNAKRSNOG VEZANJA DNA I PROTEINA

Zbog raznolikosti DPC oštećenja, u stanici ne postoji jedan specifični senzor detekcije oštećenja, već su u identifikaciji i popravku DPC-ova uključeni različiti mehanizmi popravka (Kojima i Machida, 2020). Prema Zhang i sur. (2020), svako DPC oštećenje sadrži tri komponente; DNA, protein i unakrsnu vezu među njima, čime se mehanizmi popravka navedenog oštećenja mogu podijeliti u tri skupine, prema komponenti DPC-a na koju su usmjereni. Sukladno tome, postoji popravak ovisan o nukleazama koji je usmjeren na DNA, popravak ovisan o proteolizi koji je usmjeren na zarobljeni protein te popravak hidrolizom kovalentne veze između proteina i DNA (slika 1).



NER- nukleotidni ekscizijski, HR – homologna rekombinacija

Slika 1. Shematski prikaz popravaka DPC oštećenja, usmjerenih na tri komponente unakrsno povezane DNA i proteina (DPC) (prema Zhang i sur., 2020).

2.3.1. Popravak ovisan o nukleazama

Genetička i biokemijska istraživanja bakterija i kvasca dovela su do dugogodišnje pretpostavke kako se DPC oštećenja uklanjaju do tada poznatim, osnovnim putevima popravka, prvenstveno nukleotidnim ekscizijskim popravkom (NER) i homolognom rekombinacijom (HR). Istraživanjem staničnog preživljenja i mutagenih učinaka DPC-inducirajućih agenasa, formaldehida i 5-aza-dC u *E.coli*, utvrđeno je da su *uvrA* i *recA* mutanti sa inaktiviranim NER i HR popravkom, osjetljivi na formaldehid, modelni uzročnik općenitih/ne-enzimskih DPC-ova, koji variraju u veličini (Takahashi i sur., 1985). Međutim, samo *recA* mutanti su pokazali osjetljivost na tretman 5-aza-dC agansom, koji inducira unakrsno vezanje metiltransferaza na DNA (veća DPC oštećenja) (Lal i sur., 1988). Osim toga, genetičke studije u kvascu ukazuju na uključenost NER-a u popravku DPC-ova nakon akutne izloženosti visokim dozama formaldehida, a HR-a u popravku DPC-ova nakon kroničnog izlaganja niskim dozama formaldehida (de Graaf i sur., 2009). Međutim, iako je pokazana aktivacija HR-a uslijed nastanka DPC oštećenja (Nakano i sur., 2007), ne postoje direktni dokazi o funkciji HR-a u popravku DPC-ova. S druge strane, NER ima ulogu u popravku DPC oštećenja i to u popravku unakrsno povezanih proteina manje mase (12-14 kDa) (Zhang i sur., 2020). NER uključuje izrezivanje lanca DNA uzvodno i nizvodno od oštećenja, nakon čega nastalu jednolančanu regiju DNA molekule od otprilike 30 nukleotida popunjavaju DNA polimeraza i ligaza. DPC oštećenja su uglavnom velike mase (od 10 – 250 kDa), zbog čega mogu blokirati faktore NER popravka i reducirati efikasnost cijepanja NER nukleazama (Zhang i sur., 2020). Iz tog razloga, u svrhu popravka DPC-a velike mase, NER zahtijeva prethodno procesiranje DPC-a proteazama, kako bi se zarobljenom proteinu smanjila veličina (Kojima i Machida, 2020).

Osim NER-a, ulogu u popravku DPC oštećenja ima nukleaza Mre11, kao dio Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) kompleksa. Pokazano je kako nukleaznom aktivnošću MRN uklanja TOP2-DPC (Hoa i sur., 2016; Aparicio i sur., 2016) te SPO11-DPC oštećenja (Milman i sur., 2009; Hartsuiker i sur., 2009). Spo11 je protein primarno eksprimiran u germinativnim stanicama, gdje ima ulogu u stvaranju dvolančanog loma, u svrhu pokretanja rekombinacije (Kühbacher i Duxin, 2020). Aktivnost Spo11 slična je enzimskoj aktivnosti Top2, s obzirom da Spo11 na sličan način stvara fosfotirozilnu vezu na 5' kraju DNA molekule, čime u određenim uvjetima može ostati zarobljen na DNA. Kada je DPC oštećenje prisutno na 5' kraju dvolančanog loma, kao što je to slučaj s TOP2- i SPO11-DPC-ovima, oštećenje je moguće ukloniti zajedno s dijelom lanca DNA molekule, pomoću MRN. MRN kompleks endonukleaznom aktivnošću uzrokuje nastanak jednolančanog loma 15-20 parova baza od oštećenja, nakon čega 3'-5'

egzonukleaznom aktivnošću razgrađuje lanac DNA, što rezultira oslobađanjem DPC-a vezanog na oligonukleotid (Neale i sur., 2005). Nakon toga, MRN kompleks asimetrično uvodi dodatan jednolančani lom u komplementarnom lancu DNA, a nastali dvolančani lom, popravlja se putem HR ili NHEJ (Kojima i Machida, 2020) (slika 2).

Također, nedavno je utvrđena potencijalna funkcija nukleaze Ape2 u popravku TOP1-DPC oštećenja. Naime, pokazano je kako nukleaza Ape2 može uklanjati adukte vezane na 3' kraj jednolančanog loma DNA molekule, uslijed čega nastala hidroksilna skupina na 3' kraju molekule omogućuje popravak oštećenja, putem naknadne polimerizacije i ligacije DNA molekule. Na temelju prethodnog, pokazano je kako nukleaza Ape2, alternativno aktivnosti Tdp1 enzima, može uklanjati TOP1-DPC oštećenja nakon provedene proteolize (Álvarez-Quilón i sur., 2020).

2.3.2. Popravak ovisan o proteolizi

Hipoteza o proteolizi kao putu popravka DPC oštećenja postavljena je 2006. godine (Reardon i sur., 2006), ali je dokazana tek 2014. god. u kvascu (Stingele i sur., 2014) te 2016. god. kod sisavaca (Vaz i sur., 2016; Stingele i sur., 2016; Lopez-Mosqueda i sur., 2016).

Kvaščeva metaloproteaza Wss1 (engl. *weak suppressor of smt3—331*) cijepa DNA-vezujuće proteine *in vitro*, a nakon inaktivacije Wss1, stanice postaju osjetljive na formaldehid, snažni induktor općenitih DPC-ova (Stingele i sur., 2014). Istodobno, utvrđeno je postojanje proteolitičkog mehanizma za popravak DPC oštećenja, povezan s replikacijom, a neovisnim o proteasomu (Duxin i sur., 2014). Bioinformatičkom analizom temeljenom na utvrđivanju sličnosti sekvenci i organizaciji domena, počelo se nagađati da je Sprtn (engl. *SprT-like N-terminal domain*) funkcionalni homolog Wss1 proteaze kod čovjeka (Stingele i sur., 2015). I Sprtn i Wss1 sadrže proteolitičku domenu, s konzerviranim HEXXH aktivnim mjestom te posjeduju motiv zaslužan za interakciju sa segregazom Cdc58 (p97 kod viših eukariota). Također, obje proteaze sadrže domene kojima mogu vezati ubikvitin i SUMO. Istraživanja u stanicama sisavaca opisala su ključnu funkciju i mehanizam djelovanja Sprtn-a u proteolizi DPC oštećenja u stanicama sisavaca (Vaz i sur., 2016; Stingele i sur., 2016).

Sprtn cijepa DNA-vezujuće proteine različitih veličina i struktura uključujući histone H2A, H2B, H3, H4 (Vaz i sur., 2016), linker histon H1 (Stingele i sur., 2016), topoizomeraze 1 i 2a i Chk1 kinazu Top2 (Halder i sur., 2019; Vaz i sur., 2016). Sprtn ne posjeduje strogu specifičnost za određenom sekvencom, ipak preferencijalno cijepa proteine vezane na DNA u

slabo strukturiranim regijama, koje obiluju lizinom, argininom i serinom (Vaz i sur., 2016). *In vivo* istraživanja pokazala su da su stanice s nedostatkom Sprtn-a hipersenzitivne na tretman agensima koji induciraju DPC oštećenja, da su neuspješne u uklanjanju oštećenja te da akumuliraju DPC oštećenja zahvaljujući defektivnoj proteaznoj aktivnosti (Vaz i sur., 2016; Stinglee i sur., 2016). Sprtn je okarakteriziran kao proteaza povezana s replikacijom, s obzirom da putuje zajedno s replikacijskom vilicom te uklanja DPC oštećenja na koja nailazi. Ekspresija Sprtn-a ovisno o staničnom ciklusu pokazuje da je proteaza odsutna u G0 fazi, dok je njena ekspresija na najvišoj razini u S fazi (Vaz i sur., 2016). Zbog toga, Sprtn sudjeluje u popravku DPC oštećenja u ovisnosti o replikaciji u proliferativnim stanicama. Također, ne može se isključiti potencijalna uloga proteaze u nereplikativnim stanicama, ali ukoliko postoji, ona nije povezana s replikacijom. Mutacije u *SPRTN*-u uzrokuju humani autosomalno recesivni poremećaj, Ruijs-Aalfsov sindrom, kojeg karakterizira genomska nestabilnost, preuranjeno starenje i rana pojava hepatocelularnog karcinoma (Vaz i sur., 2016; Lessel i sur., 2014). Također, nedostatak Sprtn-a kod miševa pokazao je slične fenotipe, kromosomsku nestabilnost te pojavu preuranjenih fenotipa povezanih sa starenjem (Maskey i sur., 2017; Maskey i sur., 2014).

Nedavno je pokazano da proteasom također može sudjelovati u DPC popravku, iako za sada nije razjašnjen odnos specijaliziranih proteaza i proteasoma u DPC popravku. Proteasom je glavni sustav za reguliranu degradaciju proteina u eukariotskoj stanici pomoću proteolitičkih proteina koji prepoznaju i razgrađuju ubikvitinilirane proteine. Prasad i sur. (2019) dokazali su ulogu proteasoma u popravku PARP1-DPC oštećenja koja nastaju vezanjem poli(ADP-ribozil)-polimeraze 1 na DNA. Nakon inhibicije proteasoma pomoću MG-132 pokazano je da dolazi do akumulacije DPC oštećenja te da ubikvitinilacija DPC oštećenja prethodi degradaciji DPC-ova putem proteasoma. Nadalje, prema Larsen i sur. (2019), *in vitro* eksperimenti na ekstraktu *Xenopus* jajašaca upućuju na ulogu proteasoma u popravku općenitih DPC oštećenja tijekom replikacije. Larsen i sur. (2019) su pokazali da kontakt replisoma sa DPC oštećenjem vodi do poliubikvitinilacije DPC-ova pomoću E3 ubikvitin-protein ligaze TRAIIP (engl. *TRAF-interacting protein*). Također, potvrdili su da suzbijanje ubikvitinilacije DPC-ova, putem metilacije lizinskih ostataka zarobljenog proteina, onemogućava aktivnost proteasoma. Na temelju opisanih rezultata, DPC oštećenje se tijekom replikacije može degradirati aktivnošću Sprtn-a, ali i aktivnošću proteasoma (Larsen i sur., 2019).

Nedavno su identificirane i druge proteaze s potencijalnom ulogom u DPC popravku: Acrc/Gcna (engl. *acid repeat-containing protein/germ cell nuclear antigen*), Fam111A i B

(engl. *family with sequence similarity 111 member A and B*), DdI1 i DdI2 (engl. *DNA damage inducible 1 and 2 proteins*) u čovjeka te njihovi ortolozi (Kojima i sur., 2020; Kottemann i sur., 2018; Carmell i sur., 2016). U ovome radu, veća pažnja je posvećena potencijalnoj proteazi Acrc, a dosadašnja saznanja navedena su u poglavlju 2.4.1.

Za kraj, treba naglasiti kako se proteolizom DPC-ova ovo oštećenje ne uklanja u potpunosti, već na DNA molekuli ostaju kovalentno vezani mali peptidi. Preostalo oštećenje vjerojatno se može popraviti pomoću NER puta popravka, dok se peptidni ostaci TOP1 i TOP2-DPC-ova uklanjaju pomoću tirozil-DNA-fosfodiesteraze 1 i 2 (Tdp1 i Tdp2) (poglavlje 2.3.3.). Osim popravka zaostalog peptida, u stanici se DPC oštećenje može tolerirati (engl. *DNA damage tolerance*). Ukoliko je zaostali peptid u stanici prisutan tijekom replikacije može doći do translezijske sinteze DNA molekule (TLS), koju provode specijalizirane DNA polimeraze (slika 2). TLS polimeraze imaju veća aktivna mjesta, koja im omogućuju uvođenje nukleinskih baza nasuprot oštećenim nukleotidima i sintezu lanca preko oštećenja. Navedena aktivnost može dovesti do ugradnje krivog nukleotida zbog čega se TLS polimeraze smatraju potencijalno mutagenima (Vaz i sur., 2017; Sale i sur., 2012).

2.3.3. Hidroliza kovalentne veze između DNA i proteina

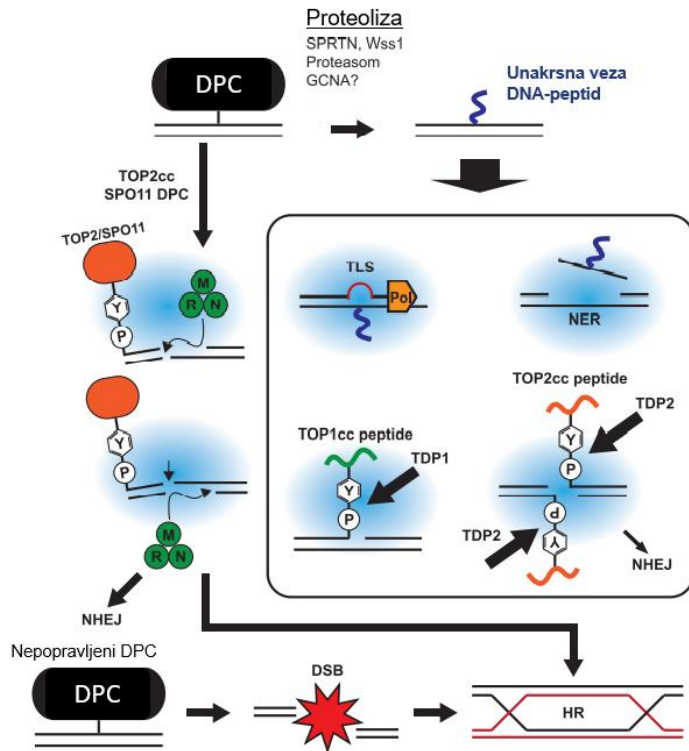
Iako su unakrsne veze DPC oštećenja raznovrsne te u stanici ne postoji mehanizam kojim se specifično mogu uklanjati pojedine kovalentne veze, postoje primjeri enzima koji specifično uklanjaju jednu vrstu enzimskih DPC-ova. Tirozil-DNA fosfodiesteraze 1 i 2 (Tdp1 i 2) su enzimi koji specifično mogu popraviti TOP1-DPC i TOP2-DPC oštećenja (Sun i sur., 2020b).

Prvotno je otkriven Tdp1 u kvascu i to na temelju aktivnosti proteina u hidrolizi fosfotirozilnih veza na 3' kraju molekule DNA (Yang i sur., 1996). Pokazano je kako Tdp1 u kvascu sudjeluje u popravku TOP1-DPC oštećenja, s obzirom da stanice kvasca postaju osjetljive na kamptotecin uslijed delecije *TDP1* i *RAD9* gena (engl. *RAD9 checkpoint clamp component A*) (Pouliot i sur., 1999). Ubrzo je utvrđeno da nedostatak Tdp1 uzrokuje osjetljivost na TOP1 inhibitore u stanicama različitih organizama, od kvasca do čovjeka (Zhang i sur., 2020). Tdp1 djeluje kao monomer, a svoje supstrate procesira stvarajući prolazne kovalentne intermedijere (Davies i sur., 2002). Nakon hidrolize putem Tdp1 na 3' kraju DNA ostaje fosfatna skupina koju je potrebno ukloniti kako bi popravak TOP1-DPC oštećenja bio završen. Odcjepanje provodi bifunkcionalna polinukleotid-kinaza/fosfataza, PNKP (engl. *bifunctional polynucleotide kinase/phosphatase*). Nakon aktivnosti PNKP enzima na 3' kraju molekule ostaje hidroksilna

skupina koja potom omogućuje religaciju loma pomoću ligaze III α (Rashid i sur., 2021). Mutacije u katalitičkoj domeni Tdp1 enzima dovode do akumulacije Tdp1-DNA intermedijera te do rijetke autosomalne recesivne neurodegenerativne bolesti, spinocerebralna ataksija s aksonskom neuropatijom (SCAN1) (Sun i sur., 2020a). Funkcija Tdp2 enzima u popravku DPC oštećenja otkrivena je tijekom identifikacije supresora osjetljivosti na kamptotecin u stanicama kvasca s deletiranim *TDP1* i *RAD1* (engl. *RAD1 checkpoint DNA exonuclease*) genima (Cortes Ledesma i sur., 2009). Tdp2 cijepa 5' tirozilne krajeve DNA, a stanice s nedostatkom Tdp2 osjetljive su na tretman TOP2 inhibitora (Zeng i sur., 2011). Katalitička aktivnost Tdp2 enzima uključuje dva divalentna metalna iona, a za razliku od Tdp1, Tdp2 ne stvara kovalentno vezane intermedijere (Gao i sur., 2012). Nakon hidrolize putem Tdp2, DNA sadrži fosfatnu skupinu na 5' kraju, pa ligaze provode direktnu religaciju dvolančanog loma. Kao i u slučaju Tdp1, homozigotne mutacije *TDP2* gena povezuju se s nastankom bolesti, točnije s autosomalno recesivnom spinocerebralnom ataksijom 23 (SCAR23). Bolest karakteriziraju intelektualne poteškoće, epileptični napadaji i ataksija (Sun i sur., 2020a).

Kao i u slučaju popravaka koji uključuju endonukleaze, aktivnost Tdp1 i Tdp2 ograničena je dostupnošću supstrata, odnosno kovalentne veze, koju zaklanja zarobljeni protein. Enzimi Tdp1 i Tdp2 ne mogu ukloniti intaktne TOP1-DPC i TOP2-DPC, već je nužna prethodna proteoliza zarobljenih proteina pomoću SPRTN protaze (Maskey i sur., 2017; Vaz i sur., 2016; Lopez-Mosqueda i sur., 2016). Mogući izuzetak je popravak TOP2-DPC-ova djelovanjem Zatt i Tdp2 proteina bez proteolize što je za sada pokazano samo *in vitro* (*in tube*) i objašnjeno je u poglavlju 2.4.2.

Najčešća oštećenja DNA su abazična mjesta koja se javljaju čak i do 10.000 puta dnevno u svakoj ljudskoj stanici (Lindahl, 1993). Abazična mjesta jedan su od endogenih uzročnika DPC-ova te znatno doprinosi učestalosti stvaranja DPC oštećenja (Sczepanski i sur., 2010). Procjenjuje se da se u stanicama sisavaca, tijekom eksponencijalnog rasta, formira oko 6.000 DPC oštećenja po stanici (Oleinick i sur., 1987), čime DPC-ovi predstavljaju drugo najčešće oštećenje DNA molekule. Slika 2 pokazuje pregled mehanizama uključenih u DPC popravak. Međudjelovanje i koordinacija do danas detektiranih mehanizama popravka DPC oštećenja nije u potpunosti opisano, ali se može pretpostaviti da stanica pokreće aktivaciju pojedinih mehanizama ovisno o vrsti DPC oštećenja, o tipu veze između proteina i DNA, o fazi staničnog ciklusa, o vrsti stanice, odnosno tkiva, kao i razvojnoj fazi organizma (Ruggiano i Ramadan, 2021; Vaz i sur., 2017).



TLS- translezijska sinteza, NER – nukleotidni ekscizijski popravak, HR – homologna rekombinacija, MRN-Mre11-Rad50-Nbs1 kompleks, NHEJ- nehomologno spajanje krajeva, DSB-dvolančani lom

Slika 2. Shematski prikaz mehanizama uključenih u popravak DPC oštećenja (prema Kojima i Machida, 2020).

2.4. ACRC, XPA I ZATT

U ovome radu, veća pažnja posvećena je trima faktorima za koje je pokazano kako imaju ulogu u popravku DPC oštećenja, a to su proteini Acrc (engl. *acid repeat-containing protein*), Zatt (engl. *Zinc-finger associated with Top2 i Tdp2*) i Xpa (engl. *Xeroderma pigmentosum complementation group A*). Dok je Acrc najvjerojatnije uključen u popravak koji ovisi o proteolizi, Zatt je uključen u popravak hidrolizom unakrsne veze između proteina i DNA, a Xpa je uključen u popravak ovisan o nukleaznoj aktivnosti (slika 1). U nastavku slijede dosadašnja saznanja o uključenosti triju proteina u popravku DPC oštećenja.

2.4.1. Acrc

Protein Acrc (engl. *acid repeat-containing protein*) ili Gcna (engl. *germ cell nuclear antigen*), nedavno je okarakteriziran kao potencijalna dodatna DPC proteaza u viših eukariota (Fielden i sur., 2018), s obzirom da sadrži očuvanu SprT domenu. U početku se Acrc nije povezivao s proteazama sličnim Sprtn-u zbog prisutnosti nestrukturiranih regija koje su otežavale točno poravnanje sekvenci pri pretraživanju ortologa te zbog toga što ortolog Acrc-a u miša ne sadrži SprT domenu (Carmell i sur., 2016). Naknadno je filogenetska analiza pokazala kako je Acrc vrlo sličan Sprtn-u, dok je 3D modeliranje pokazalo sličnost SprT domene i aktivnog mjesta Sprtn-a i Acrc-a (Fielden i sur., 2018).

Acrc je, kod višestaničnih organizama, pretežno eksprimiran u germinativnim stanicama i tijekom ranog embrionalnog razvoja (Carmell i sur., 2016), zbog čega su sva istraživanja rađena na životinjskim modelima umjesto na ljudskim stanicama. Kod vinske mušice (*Drosophila melanogaster*) i *C.elegans*, mutacija u ACRC-u uzrokuje replikacijski stres i genomsku nestabilnost u germinativnim stanicama i embrijima, te smanjenu fertilitnost kod zebrice (*Danio rerio*) (Bhargava i sur., 2020; Dokshin i sur., 2020). Osim toga, mutacije u genima ACRC i *mh* (homolog *SPRTN*-a) uzrokuju zaustavljanje embriogeneze u vinskoj mušici (Bhargava i sur., 2020). Uloga Acrc-a u popravku DPC oštećenja pretpostavljena je, jer delecija ACRC gena u vinske mušice i zebrice uzrokuje povećanje DPC-ova specifične molarne mase (Bhargava i sur., 2020). Mutacija u ACRC-u dovela je do akumulacije posebice TOP2-DPC oštećenja u germinativnim stanicama i ranim embrijima *C.elegans*, *Drosophila* i zebrice (Bhargava i sur., 2020). Germinativne stanice i embriji posebno su osjetljivi na genomsku nestabilnost uzrokovanu akumulacijom DPC oštećenja, s obzirom da se pogreške nasljeđuju. Također, promjene u ekspresiji gena i histonskoj demetilaciji tijekom embriogeneze mogu posebno izložiti germinativne stanice nakupljanju formaldehida i time DPC-ova, što bi objasnilo potrebu za višestrukim proteazama u tom tkivu (Ruggiano i Ramadan, 2021).

Nadalje, *dvc-1* (homolog *SPRTN*-a) i *gcna-1* mutanti embrija *C.elegans* su osjetljivi na formaldehid, uzročnik DPC-ova (Borgerman i sur., 2019). Navedeno ukazuje da i Sprtn i Acrc sudjeluju u popravku DPC-ova u embrijima *C.elegans* (Borgermann i sur., 2019). Osim toga, pokazano je kako ACRC nakon prekomjerne ekspresije u kulturi stanica sisavaca utječe na razinu DNMT1-DPC-ova nakon njihove indukcije pomoću 5-azadC (Borgerman i sur., 2019). Navedeno istraživanje ukazuje da je Acrc, kao i Sprtn aktivan u S fazi staničnog ciklusa, s obzirom da DNMT1-DPC-ovi obično nastaju iza replikacijske vilice, kada je potrebno provesti metilaciju novosintetizirane DNA. S obzirom da je ekspresija ACRC-a najviša u mitozu te da je

pokazana prisutnost proteaze na metafaznim kromosomima, moguće je da Acrc djeluje i izvan S faze (Dokshin i sur., 2020). S obzirom da su tijekom mitoze TOP2-DPC-ovi česta oštećenja, predložena je uloga Acrc-a u popravku TOP2-DPC s obzirom (1) da ACRC mutanti pokazuju osjetljivost na etopozid, koji specifično inducira nastanak TOP2-DPC-ova, (2) na kolokalizaciju Acrc-a i TOP2-DPC oštećenja u stanicama te (3) da Acrc i Top2 stupaju u interakciju (Bhargava i sur., 2020; Dokshin i sur., 2020).

2.4.2. Zatt

Zatt (engl. *Zinc-finger associated with Top2 i Tdp2*) ili Znf451 (engl. *Zinc finger protein 451*) je protein, čija je aktivnost povezana s popravkom TOP2-DPC (Schellenberg i sur., 2017). Zatt je inače transkripcijski korepresor androgenog receptora te sadrži veći broj domena koje ukazuju na raznolike funkcije u stanici. U popravku TOP2 oštećenja *in vitro*, protein djeluje kao E3 SUMO2 ligaza (Schellenberg i sur., 2017; Cappadocia i sur., 2015).

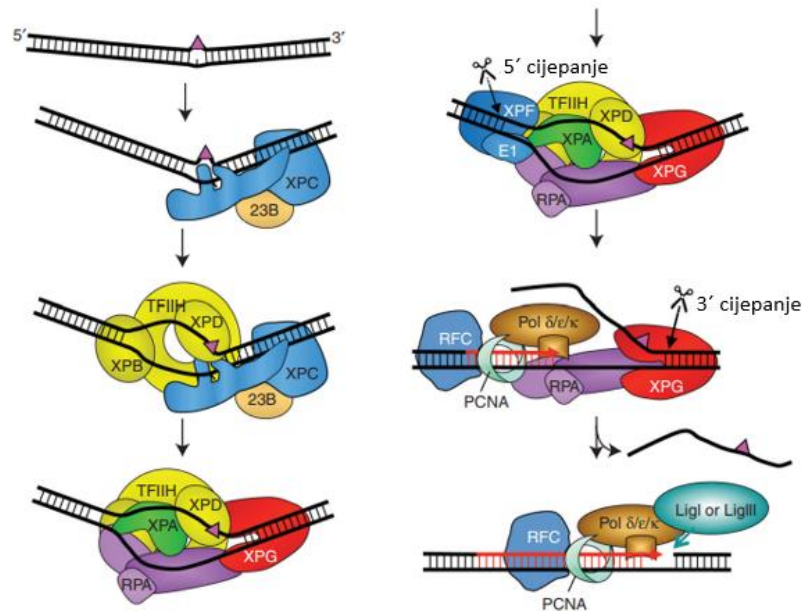
U popravku TOP2-DPC oštećenja, enzim Tdp2 ima ključnu ulogu jer provodi direktno cijepanje unakrsne veze između Top2 i DNA. S obzirom na veliku masu Top2 proteina, fosfotirozilna veza proteina s DNA je zaklonjena, te Tdp2 enzim ne može pristupiti leziji *in vitro* (Riccio i sur., 2020). S obzirom da je nakon izlaganja etopozidu primjećena razgradnja Top2 u stanici, pretpostavljeno je da Tdp2 popravljiva Top2-DNA oštećenje nakon proteolitičke razgradnje (Mao i sur., 2001). Prema Schellenber i sur. (2017) utvrđeno je kako Tdp2 stupa u interakciju s intaktnim, odnosno protelitički nedegradiranim Top2 α ili Top2 β , koje su kovalentno modificirane sa SUMO2. Nadalje, Zatt, Top2 α i Top2 β tvore funkcionalni kompleks sa SUMO2 u stanici (Schellenberg i sur., 2017). Također, ustanovljeno je *in vitro* (eksperiment *in tube*) da Zatt direktnom interakcijom s Top2 mijenja konformaciju TOP2-DPC-a te time omogućuje Tdp2 hidrolizu (Schellenberg i sur., 2017). Osim toga, pokazalo se da Zatt uzrokuje SUMOilaciju Top2 nakon tretmana etopozidom.

U zaključku, u *in vitro* eksperimentima pokazano je da Zatt inducira konformacijsku promjenu TOP2-DPC-a, izravnom interakcijom i/ili SUMO modifikacijom, što omogućuje Tdp2 enzimu pristup 5' tirozilnoj unakrsnoj vezi između proteina i DNA, neovisno o proteolitičkoj degradaciji TOP2 adukta.

2.4.3. Xpa

Protein Xpa (engl. *Xeroderma pigmentosum complementation group A*) je ključni faktor u nukleotidnom ekscizijskom popravku (NER) (slika 3). NER započinje prepoznavanjem oštećenja kada se Xpc-HR23B kompleks (engl. *Xeroderma pigmentosum group C protein complex XPC-HR23B*) veže na oštećenja DNA koja destabiliziraju uzvojniciu kao što su pirimidinski dimeri uzrokovani UV zračenjem, adukti benz(a)pirena ili aromatskih amina, oksidativna oštećenja (npr. ciklopurini) te oštećenja uzrokovana kemoterapeuticima (npr. cisplatin) (Chatterjee i Walker, 2017). Prisutnost Xpc-HR23B kompleksa na oštećenju preduvjet je za mobilizaciju drugih NER faktora (Schärer, 2013). Nakon prepoznavanja oštećenja putem Xpc-HR23B kompleksa, slijedi vezanje transkripcijskog faktora TFIIH (engl. *transcription factor II H*) koji sadrži podjedinice Xpb (engl. *Xeroderma pigmentosum group B*) i Xpd (engl. *Xeroderma pigmentosum group D*) važne u NER putu popravka. Podjedinica Xpb ATPaznom aktivnošću započinje razdvajanje lanaca DNA, što omogućuje djelovanje Xpd podjedinice, koja se ATPaznom i helikaznom aktivnošću pomiče duž DNA dok ne naiđe na oštećenje. Zaustavljanje Xpd-a na oštećenju omogućuje dolazak Xpa, Rpa (engl. *Replication protein A*) i Xpg (engl. *Xeroderma pigmentosum group G*) proteina koji zajedno čine preincizijski kompleks (engl. *preincision complex*), dok Xpc-HR23B kompleks disocira s DNA. Xpa predstavlja centralnu komponentu NER kompleksa s obzirom da ulazi u interakciju s većinom NER faktora; TFIIH, Rpa, Xpc-Rad23B, DDB2 (engl. *Damaged-DNA binding protein 2*), ERCC1-Xpf (engl. *Excision Repair Cross Complementary Group 1-xeroderma Pigmentosum Group F*) te PCNA (engl. *proliferating cell nuclear antigen*) proteinima (Petruševa i sur., 2014; Schärer, 2013). Brojne interakcije s drugim NER faktorima čini Xpa ključnim u pozicioniranju svih NER faktora preincizijskog kompleksa. Vezanje Rpa na jednolančanu DNA i interakcija s Xpa neophodna je za optimalnu aktivnost NER-a. Rpa ima važnu ulogu u koordinaciji izrezivanja i naknadnoj sintezi DNA lanca, dok Xpg ima nukleaznu ulogu. Cijepanje katalizirano Xpg faktorom odvija se kasnije tijekom NER puta popravka, nakon cijepanja DNA pomoću Ercc1-Xpf kompleksa. Preincizijski kompleks, koji se sastoji od TFIIH, Xpa, Rpa i Xpg relativno je stabilan, a dvojno cijepanje lanca DNA pokreće se tek kada se Ercc1-Xpf pridruži kompleksu, odnosno interakcijom Ercc1-Xpf s Xpa proteinom (Petruševa i sur., 2014; Schärer, 2013). Kratki peptid Xpa proteina (TGGGFI) potom mijenja konformaciju kako bi vezao središnju domenu Ercc1 proteina. Nakon vezanja dviju NER nukleaza, Ercc1-Xpf cijepa lanac uzvodno od oštećenja, čime na 3' kraju jednolančanog loma ostaje slobodna hidroksilna skupina. Nastala 3'-OH skupina supstrat je za stanične polimeraze koje započinju sintezu novog lanca DNA. Nakon toga Xpg cijepa lanac nizvodno od oštećenja, ostavljajući 5'

fosfatnu skupinu koja je važna za naknadnu ligaciju jednolančanog loma. U ovome radu Xpa je izabran kao predstavnik NER puta popravka s obzirom da nema druge stanične uloge za razliku od ostalih NER faktora koji među ostalim sudjeluju i u održavanju telomera (ERCC1-XPF), DNA replikaciji i/ili transkripciju (Lehmann i sur., 2017; Kikuchi i sur., 2013; Schärer, 2013; Vannier i sur., 2009; van Steeg i sur., 2001).



Slika 3. Shematski prikaz nukleotidnog ekscizijskog popravka (Pol $\delta/\epsilon/\kappa$ - stanične polimeraze, LigI i LigIII- stanične ligaze, PCNA- engl. *proliferating cell nuclear antigen*, RFC- engl. *replication factor C*) (prema Schärer, 2013).

2.5. MIŠ KAO MODELNI ORGANIZAM

Modelni organizmi se koriste u istraživanjima u svrhu boljeg razumijevanja bioloških procesa kod čovjeka. U ovome radu, kao modelni organizam koristi se domaći miš (*Mus musculus*) s obzirom da je najčešće korišten model u genetičkim istraživanjima sisavaca. Čak 59 % studija u znanosti o životu koristi miša za znanstvena istraživanja (Dutta i Sengupta, 2016).

Unatoč velikim razlikama u životnom vijeku, čovjek i miš pokazuju sličnosti u organskoj i sistemske fiziologiji, anatomiji, genetici i patogenezi bolesti. Gotovo 99 % gena miša i čovjeka su slični, što miša čini dobrim kandidatom za proučavanje funkcija ljudskih gena (Your Genome, 2022). Također, molekularni mehanizam starenja kod miševa sličan je onome kod ljudi (Dutta i Sengupta, 2016). U prilog korištenju miševa prilikom ispitivanja učinaka starenja ide i kratki životni ciklus organizma. Laboratorijski miševi žive otprilike 2 godine te imaju

relativno kratko generacijsko vrijeme (prosječno vrijeme do spolne zrelosti je 10 mjeseci). Također, odrasli miševi se brzo razmnožavaju i mogu se reproducirati svaka tri tjedna. Ne zauzimaju puno prostora, a njihov uzgoj je relativno jednostavan i jeftin.

Miš se često koristi u istraživanju mnogih ljudskih bolesti. Široko je korišten kao modelni organizam u istraživanju kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti, karcinoma, starenja i metaboličkih poremećaja (Dutta i Sengupta, 2016). Primjerice, izuzetno su korisni za proučavanje kompleksnih bolesti kao što su ateroskleroza i hipertenzija, jer gene odgovorne za navedene bolesti dijele s čovjekom, pa istraživanja na miševima pružaju uvid u genetičke čimbenike rizika ovih bolesti u ljudskoj populaciji. Također, iako je mozak miša manje složen od mozga čovjeka, na staničnoj razini postoje mnoge sličnosti (Vanhooren i Libert, 2013). Iako ne razvijaju Alzheimerovu bolest, miševi pokazuju smanjenje kognitivnih funkcija i pamćenja, koji su zamijećeni u ljudskoj populaciji. Osim toga upotreba transgenih miševa kod kojih je inducirano stvaranje amiloidnih plakova predstavlja bitan alat u razumijevanju Alzheimerove bolesti (Hall i Roberson, 2012). Karcinomi se kod miševa prirodno razvijaju tijekom starenja. Mišji tumori su histološki slični humanima te se pojavljuju u istim tkivima kao i u čovjeka, a osim toga razvoju tumora prethode mutacije nastale u istim genima kod miša i čovjeka (Balmain i Harris, 2000). Mišji model upotrebljava se u različitim fazama razvoja novih antikancerogenih lijekova, prilikom testiranja farmakokinetike lijeka i u pretkliničkim istraživanjima. Također, miš je primarni model u ispitivanjima patogeneze humanih bolesti i procesa starenja. S obzirom da je akumulacija DPC oštećenja u čovjeka povezana sa starenjem, kardiovaskularnim bolestima, neurodegeneracijom i nastankom karcinoma (Vaz i sur., 2017), miš predstavlja dobar modelni organizam u istraživanjima bolesti povezanim s DPC-ovima. Štoviše, upravo je miš korišten kao modelni organizam prilikom utvrđivanja posljedica mutacija u *SPRTN* genu. Hipomorfni i *knock out* miševi, pokazali su akumulaciju TOP1-DPC i drugih DNA oštećenja, aneuploidiju i spontanu tumorogenezu u jetri (Maskey i sur., 2017; Maskey i sur., 2014).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Pribor

Plastične epruvete, ependorfice 1,5 ml i 0,2 ml, stalci za epruvete i ependorfice, pinceta, nož za sekciju tkiva, ledeni stalci, špatula, lađice za vaganje, laboratorijska čaša, Erlenmeyerova tikvica, menzura, alu-folija, pipetmani, optički stripovi *MicroAmp Optical 8-Cap Strips* (*Applied Biosystems*), optičke mikrolitarske ploče *MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate* (*Applied Biosystems*).

3.1.2. Osnovne kemikalije

Agaroz (Sigma), etanol (Kemika), „RNase away“ reagens (*Thermo Scientific*), RNase-free voda (*Invitrogen*), TAE pufer.

3.1.3. Boje

6× DNA Gel Loading Dye (*Thermo Scientific*), GelStar Nucleic Acid Gel Stain (*Lonza*).

3.1.4. Markeri veličine

GeneRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use (*Thermo Scientific*) za agaroznu gel-elektroforezu.

3.1.5. Nukleotidi i početnice

dNTP smjesa (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (*Thermo Scientific*), početnice u lančanoj reakciji polimerazom naručeni od komercijalnog dobavljača (*Macrogen*).

3.1.6. Enzimi

Taq-DNA-polimeraza s odgovarajućim 10× PCR puferom (*HighQu*).

3.1.7. Komercijalni kompleti

Monarch Total RNA Miniprep Kit (*NEB*) za izolaciju ukupne RNA, *ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis Kit* (*NEB*) za sintezu cDNA reverznom transkripcijom, *GoTaq qPCR Master Mix* (*Promega*) i *Power SYBR Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*) za qPCR analizu.

3.1.8. Instrumenti

Analitička vaga *BP6100 Basic Plus Balance* (*Sartorius*), centrifuge *MPW-223e* (*ProfiLab24*) i *Universal 32R* (*Hettich*), autoklav *LS-75-HG* (*Bari*), elektroforetski sustav *Biometra Compact XS/S* (*Analytic Jena*), homogenizator *Ultra-Turrax T25* (*IKA – Janke & Kunkel*), PCR-uređaj *T100 Thermal Cycler* (*Bio-Rad*), spektrofotometar *BioSpec-nano* (*Shimadzu*), sustav za slikanje gelova *ChemiDoc XRS+ System* (*Bio-Rad*), termoblok *Thermomixer 5436* (*Eppendorf*), uređaj za qPCR *7300 Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*).

3.2. METODE

3.2.1. Dizajniranje početnica

Prvi korak u ekspresijskoj analizi kod domaćeg miša bio je dizajniranje početnica za umnažanje željenih produkata pomoću kvantitativne lančane reakcije polimerazom (PCR, engl. *Polymerase Chain Reaction*). Pretraživanjem NCBI (engl. *National Center for Biotechnology Information*) odnosno Ensembl baza podataka, pronađene su sekvence gena *ACRC (GCNA)*, *ZATT*, *RPLP0* i *ATPO* domaćeg miša (*Mus musculus*). Za dizajn početnica korišten je *NCBI-Primer Blast* alat (NCBI, 2021). U *Primer Blast* unesene su kodirajuće sekvence (engl. *coding DNA sequence*, CDS) prethodno navedenih gena te uvjeti koje početnice moraju zadovoljavati; duljina početnica postavljena je na 18-25 nukleotida, temperatura mekšanja početnica (engl. *melting temperature*, T_m) na 58-62 °C (optimalno 60 °C), a udio GC baza u njima 40-80 %. Raspon duljine željenog amplikona postavljen je na 85-115 pb, kako je preporučeno u literaturi (Thornton i Basu, 2015). Osim toga, vrlo važan uvjet prilikom dizajniranja početnica bio je da one moraju umnažati samo željeni fragment na cDNA molekuli. Iz tog razloga, početnice su dizajnirane na način da barem jedna početnica iz para jednim svojim krajem bude komplementarna jednom egzonu, a drugim krajem njemu susjednom egzonu na mRNA (engl. *messenger RNA*), odnosno da ne dolazi do umnažanja introna. Time se osigurava da početnice umnažaju samo fragment koji se nalazi na granici dvaju susjedna egzona na zreloj mRNA (engl. *exon-exon junction*), odnosno onemogućuje se umnažanje genomske DNA (gDNA), koja potencijalno može zaostati u uzorku i tako utjecati na rezultate ekspresije (Sandhu i Acharya, 2005).

Sekvencama početnica dobivenih *Primer Blast* alatom, dodatno je provjerena vjerojatnost stvaranja sekundarnih struktura pomoću programa *Primer Select* te je potom u *BioEdit* programu provedena provjera početnica njihovim poravnanjem s kodirajućim sekvencama gena i gDNA, a zatim su početnice naručene od tvrtke *Macrogen*. Početnice za kvantifikaciju ekspresije *Xpa* i *18S rRNA* gena prethodno su dizajnirane na isti način u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju (LME). Sekvence svih korištenih početnica prikazane su u tablici 1.

Tablica 1. Parovi početnica dizajnirani za ekspresijsku analizu kod domaćeg miša; nukleotidni slijed, duljina, udio gvanina i citozina te temperature mekšanja uzvodnih (engl. *forward*, F) i nizvodnih (engl. *reverse*, R) početnica.

Gen	Počelnica	Slijed nukleotida (5'-3')	Duljina (nt)	% GC	Tm (°C)
<i>ACRC</i>	MmAcre F1	AAAGGCTAGCTGTGTCGTGA	20	50	58
	MmAcre R1	TGTCAGAAGTCTCATCTCCACTG	23	48	61
	MmAcre F2	TGTGAAATAAGCAGTGGAGATGAGA	25	40	60
	MmAcre R2	ATCAGGGCTGCCATCATCA	19	53	58
<i>XPA</i>	MmXpa F	GAATGCGGGAAAGAGTTCATGG	22	50	62
	MmXpa R	TGTGTTTATCATCAGCATCTCTGC	24	42	59
<i>ZATT</i>	MmZatt F1	GACAGTGACGATAGCTCGGG	20	60	59
	MmZatt R1	AATTCCACATCCTCCGTGGC	20	55	60
	MmZatt F2	GGCATCAGAGTCTACCACGG	20	60	60
	MmZatt R2	CGGGTCTTAACGGTCCTTCA	20	55	60
<i>RPLP0</i>	MmRplp F1	CTGCACTCTCGCTTTCTGGA	20	55	59
	MmRplp R1	TGATGATGGAGTGTGGCACC	20	55	59
	MmRplp F2	GCTGATCATCCAGCAGGTGT	20	55	59
	MmRplp R2	TCCAGAAAGCGAGAGTGCAG	20	55	59
<i>ATPO</i>	MmAtpo F1	GACTGTCTCGACAGGTTCGG	20	60	60
	MmAtpo R1	CGATGCCGTAGACCTGAACA	20	55	59
	MmAtpo F2	TATGCAACCGCCCTGTACTC	20	55	59
	MmAtpo R2	CCTTCAGGAGTTGCCCTACG	20	60	60
<i>18S rRNA</i>	Mm18S F	GATGGTAGTCGCCGTGCCTA	20	60	61
	Mm18S R	CCTGCTGCCTTCCTTGGA	18	61	60

3.2.2. Izolacija ukupne RNA

Prvi korak pripreme cDNA u svrhu ekspresijske analize bio je izolacija ukupne RNA iz pojedinih tkiva domaćeg miša. RNA je vrlo nestabilna molekula, sklona je degradaciji jednom kad se izolira iz tkiva, a njenom raspadu u prilog ide i prisutnost RNaza u okolišu (Tan i Yiap, 2009; Fleige i Pffafel, 2006). RNaze su termički stabilne nukleaze, koje je potrebno inaktivirati prilikom manipulacije s RNA, zbog čega je prije početka izolacije potrebno sve površine i korišteni pribor prebrisati sa 70 %-tnim etanolom i reagensom „RNase away“. Također, u svrhu

što uspješnije izolacije, laboratorijske rukavice su obavezne, uzorke tkiva potrebno je držati na ledu, a sve postupke izolacije poželjno je izvoditi brzo.

Sekcija miševa nije rađena u sklopu ovoga rada, već su organi jedinki miša ranije dopremljeni u Laboratorij za molekularnu ekotoksikologiju gdje su čuvani u tekućem dušiku. Organi miša su otopljeni i potom stavljeni na led, te je iz svakog pojedinog organa uzet reprezentativni uzorak tkiva, maksimalne mase 50 mg, iz kojeg je uz pomoć *Monarch Total RNA Miniprep Kita* (NEB) izolirana ukupna RNA. *Monarch Total RNA Miniprep Kit* sadrži *1×DNA/RNA Protection Reagents*, koji se dodaje komadiću tkiva ovisno o njegovoj masi. Prema uputama, dodano je 300-600 µL *1×DNA/RNA Protection Reagents*-a na 10-30 mg tkiva, odnosno više od 600 µL *Protection Reagents*-a većim masama tkiva. Zatim je provedena homogenizacija tkiva upotrebom prethodno očišćenog mehaničkog homogenizatora *Ultra turrax t25* proizvođača *Ika*, pri čemu je postavljen broj okretaja od 13 500 min⁻¹ (srednja jačina). Svaki uzorak tkiva homogeniziran je 15 s, a između svake homogenizacije homogenizator je pomno ispran 70 %-tnim etanolom i destiliranom vodom. Nakon homogenizacije, uzorcima je dodana Proteinaza K s odgovarajućim puferom (za svakih 300 µL homogenizirane smjese, dodano je 30 µL pufera i 15 µL Proteinaze K), kako bi se razgradili proteini u uzorku i pospješila izolacija RNA. Smjesa je tada kratko vorteksirana i inkubirana 5 min na temperaturi od 55 °C. Nakon inkubacije, uzorci su vorteksirani te centrifugirani 2 min pri 16 000 g na 4 °C. Potom je izdvojen supernatant te mu je dodan jednak volumen *RNA Lysis* pufera i provedeno je vorteksiranje. Nakon dodatka *RNA Lysis* pufera, daljni koraci provedeni su pri sobnoj temperaturi. Zatim je proveden prijenos uzoraka na kolonicu za uklanjanje gDNA s pripadajućom kolekcijском tubicom i centrifugiranje (13 000 g, 30 s), čime se gDNA uklanja iz uzorka. Nadalje, uzorku je dodan jedan volumen ≥ 95 %-tnog etanola te provedeno miješanje pipetiranjem, nakon čega je uzorak prebačen na kolonicu koja veže RNA i centrifugiran (13 000 g, 30 s). Nakon vezanja RNA za kolonicu, provedeno je ispiranje kolonice s 500 µL *RNA Wash* pufera i centrifugiranje, a potom dodatni tretman uzorka s DNazom I, kako bi se uklonila potencijalno zaostala DNA. Dodano je 5 µL DNase I i 75 µL *DNaza I Reaction* pufera na kolonicu, nakon čega je kolonica inkubirana 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon 15 minuta, na kolonicu je dodano 500 µL *RNA Priming* pufera, uzorak je centrifugiran (13,000 g, 30 s), a filtrat odbačen. Zatim je dodano 500 µL *RNA Wash* pufera te provedeno centrifugiranje 30 s, pri 13,000 g i odbacivanje filtrata te nakon toga ponovno dodano 500 µL *RNA Wash* pufera nakon čega je uslijedilo dvominutno centrifugiranje pri 13,000 g. Za kraj, RNA je eluirana s kolonice s 50 µL ultračiste vode. Nakon

određivanja koncentracije izolirane RNA u uzorcima, otopina je alikvotizirana i uskladištena na -80 °C.

3.2.3. Određivanje koncentracije izolirane RNA

Nakon provedene izolacije RNA iz tkiva miševa, uzorcima je izmjerena koncentracija i čistoća na uređaju *BioSpec-nano* (*Shimadzu*). Volumen od 1 µL uzorka ispušten je na podložak uređaja, koji je prethodno kalibriran nanošenjem slijepe probe, odnosno ultračiste vode, korištene za eluaciju RNA prilikom izolacije. Koncentracija RNA i njena čistoća pokazatelj su uspješnosti izolacije, a točna koncentracija molekula RNA potrebna je za provođenje idućeg koraka eksperimenta, reverzne transkripcije (objašnjene u poglavlju 3.2.5.). Uređaj *BioSpec-nano*, odnosno Nanodrop je spektrofotometar uz pomoć kojega je izmjerena optička gustoća (*engl. optical density*, OD) uzoraka u UV spektru, pri valnim duljinama od 230 nm, 260 nm i 280 nm. Nukleinske baze u RNA imaju maksimum apsorpcije pri 260 nm, zbog čega se pri toj valnoj duljini mjeri koncentracija RNA u uzorku. Pri valnoj duljini od 280 nm maksimum je apsorpcije proteina, zbog čega je omjer OD_{260/280} pokazatelj onečišćenja otopine RNA s proteinima, dok je maksimum apsorpcije drugih onečišćenja, koja su učestala posljedica korištenih reagensa prilikom izolacije RNA, pri 230 nm, zbog čega omjer OD_{260/230} pokazuje onečišćenja uzorka s različitim solima i organskim spojevima (Johnson i sur., 2012; Fleige i Pfaffl, 2006). Vrijednosti OD_{260/280} oko 2.1 te OD_{260/230} blizu 2.0 smatraju se prihvatljivim pokazateljima dobre kvalitete RNA (NEB, 2021; Johnson i sur., 2012).

3.2.4. Elektroforeza nukleinskih kiselina na agaroznom gelu

Elektroforeza nukleinskih kiselina na agaroznom gelu kao nosaču, metoda je kojom se mogu razdvojiti fragmenti DNA ili RNA, na temelju njihovih fizikalno kemijskih svojstava. Nukleinske kiseline u električnom polju, kroz pore nosača migriraju prema pozitivno nabijenoj elektrodi, zahvaljujući negativno nabijenoj fosfodieterskoj okosnici molekula, a s obzirom da nukleinske kiseline imaju ujednačen omjer mase i naboja, u agaroznom gelu razdvajaju se na temelju veličine. Time manje molekule migriraju brže jer lakše prolaze kroz pore nosača. Osim veličine molekula, na brzinu migracije kroz pore nosača utječe i konformacija molekula. Primjerice, jednolančana RNA u nenedenaturirajućim uvjetima elektroforeze stvara sekundarne strukture, zbog kojih kroz gel neće migrirati isključivo na temelju veličine fragmenta. Također, brzina migracije ovisi i o korištenom puferu i uspostavljenom naponu, ali i o koncentraciji nosača; što je koncentracija nosača veća, manji je promjer njegovih pora, pa je migracija molekula sporija. Agarozni gel priprema se iz prirodnog polisaharida izoliranog iz morskih algi

(rodovi *Gelidium* i *Gracilaria*), građenog od D-galaktoze i 3,6-anhidro-L-galaktoze povezane α -1,3 i β -1,4 glikozidnom vezom. Upotrebom agaroznog gela, moguće je razdvajati fragmente od 100 pb do 25 kb, ovisno o gustoći gela.

U svrhu izrade 1 %-tnog agaroznog gela za elektroforezu nukleinskih kiselina, u Erlenmeyerovu tikvicu je dodano 100 mL TAE pufera (1X) i 1 g agaroze. Agarozna ima nisku topljivost pri sobnoj temperaturi, zbog čega je smjesa zagrijavana u mikrovalnoj pećnici, dok otopina nije postala bistra. Nakon potpunog otapanja agaroze, tikvica sa homogenom smjesom ostavljena je da se ohladi na približno 45 °C, nakon čega je u otopinu dodano 0,5 μ L *GelStar* boje za naknadnu detekciju nukleinskih kiselina. Nakon toga, otopina je izlivena u kalup, na koji je potom postavljen češljic za formiranje jažica gela te je ostavljena da se ohladi i da gel polimerizira. Nakon otprilike 25 minuta, kalup s gelom je premješten u kadicu za elektroforezu, koja se zatim napunila s otprilike 400 mL TAE pufera (1X), nakon čega je pažljivo izvađen češljic. Zatim je uslijedilo nanošenje uzoraka na gel. U prvu jažicu dodan je 1 μ L *GeneRuler DNA Ladder Mix* kao standard veličine fragmenata, a uzorci su prije nanošenja na gel pomiješani s *DNA Gel Loading Dye* (6 \times) bojom u omjeru 1:6 (boja:uzorak). Elektroforeza je provedena pri 100 V u trajanju od 40 minuta, a RNA je vizualizirana uz *ChemiDoc XRS+ System* (Bio-Rad) uređaj.

Agarozna gel elektroforeza RNA molekula provedena je nakon izolacije ukupne RNA iz tkiva miševa i određivanja njene koncentracije, u svrhu dodatne provjere kvalitete izolirane RNA, dok je agarozna gel elektroforeza fragmenata DNA provedena nakon lančane reakcije polimerazom, prilikom ispitivanja rada dizajniranih početnica.

3.2.5. Reverzna transkripcija

Nakon izolacije ukupne RNA iz tkiva, istu je potrebno prevesti u formu DNA, s obzirom da metoda lančane reakcije polimerazom zahtjeva DNA molekulu kao kalup. To je moguće provesti procesom reverzne transkripcije, gdje se upotrebom RNA-ovisnih DNA-polimeraza, prvotno izoliranih iz retrovirusa, jednolančana RNA može prevesti u jednolančanu komplementarnu DNA (engl. *complementary DNA*, cDNA). U tu svrhu, najčešće korištene reverzne transkriptaze su M-MuLV (engl. *Moloney murine leukemia virus*) i AMV (engl. *avian myeloblastosis virus*). Za prevođenje ukupne izolirane RNA iz mišjih tkiva u jednolančanu cDNA, korišten je *ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis Kit*. Komplet sadrži rekombinantnu M-MuLV sa smanjenom aktivnošću RNaze H i povećanom termostabilnošću (aktivna je do 48 °C). Naime, RNA molekula je jednolančana te pri nižim temperaturama

(primjerice 37 °C) češće tvori različite sekundarne strukture, koje mogu usporiti napredak reverzne transkriptaze duž RNA te dovesti do prijevremene terminacije sinteze cDNA (Haddad i Baldwin, 2010). Iz tog razloga, poželjno je koristiti enzim čija je aktivnost optimalna pri višim temperaturama, pri kojima se kidaju intramolekulske veze u RNA. Također, smanjena RNaza H aktivnost enzima smanjuje degradaciju RNA lanca u RNA/DNA hibridu, čime se omogućava transkripcija kroz dugi kalup RNA i dobivanje visokog prinosa sintetizirane cDNA (Haddad i Baldwin, 2010). Kao početnice u reakciji reverzne transkripcije mogu se koristiti oligo dT početnice, koje se komplementarno sparuju s poliA na 3'-kraju mRNA molekule, nasumične početnice (često heksameri ili dekameri) koji se nasumično sparuju duž cijele RNA ili početnice specifične za određeni gen. U ovome radu, korišteni su nasumični heksameri, s obzirom da se njima nasumično transkribira ukupna RNA, čime se omogućava analiza i drugih transkripata a ne samo mRNA (primjerice 18S rRNA).

U reakcijsku smjesu za reverznu transkripciju izolirane RNA dodano je: 10 µL *Protoscript II Reaction Mixa (2X)*, koji sadrži potreban pufer i dNTPove, 2µL *Protoscript Enzyme Mixa (10X)* koji sadrži M-MuLV i murinski inhibitor RNaze te 2 µL *Random Primer Mixa* s nasumičnim početnicama. U reakcijsku smjesu potom je dodan onaj volumen otopine RNA koji odgovara masi RNA od 1 µg, te određeni volumen ultračiste vode kako bi ukupni volumen reakcijske smjese iznosio 20 µL. Reakcijska smjesa je potom inkubirana 5 minuta na 25 °C, nakon čega je uslijedila inkubacija u trajanju od 1 sata na temperaturi od 42 °C te završna inaktivacija enzima pri 80 °C u trajanju od 5 minuta. S obzirom da je dodano 1000 ng RNA, u volumenu od 20 µL, koncentracije sintetizirane cDNA iznosila je 50 ng/µL.

3.2.6. Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) je metoda eksponencijalnog umnažanja točno određenog dijela DNA molekule *in vitro*. PCR metoda razvijena je zahvaljujući otkriću termorezistentnih DNA-polimeraza kod mikroorganizama koji žive u ekstremnim uvjetima temperature. Prva termorezistentna DNA-polimeraza korištena za PCR reakciju je Taq, enzim izoliran iz termofilne eubakterije *Thermus aquaticus*. Optimalna aktivnost termorezistentnih DNA-polimeraza odvija se pri visokim temperaturama, pa je tako optimalna temperatura elongacije Taq polimeraze 75-80 °C, iako se preporuča provođenje Taq-PCR reakcije pri nižim temperaturama, 68-72 °C (Terpe, 2013). Osim termorezistentnog enzima, za odvijanje PCR reakcije potrebni su DNA kalup, početnice, deoksiribonukleotidi (dNTP-ovi) i pripadajući pufer za polimerazu s magnezijevim ionima. PCR reakcija se sastoji

od uzastopnog ponavljanja tri faze reakcije, a to su: (1) denaturacija kalupa, odnosno razdvajanje lanaca DNA, (2) komplementarno sparivanje početnica i DNA kalupa te (3) sinteza DNA aktivnošću termorezistentne polimeraze. Svaka faza reakcije odvija se pri različitoj temperaturi, a broj uzastopnih ponavljanja faza reakcije obično iznosi 30-35. Početna denaturacija traje duže od ostalih, kako bi se osiguralo potpuno razdvajanje lanaca kalupa u prvom koraku reakcije. Također, završna elongacija traje duže kako bi se do kraja sintetizirali željeni fragmenti.

U ovome radu, PCR reakcija provedena je uz *HighQu Taq DNA Polymerase* protokol, u svrhu ispitivanja rada dizajniranih početnica i kvalitete sintetizirane cDNA. U reakcijsku smjesu dodano je 5 μ L 10X PCR pufera, 1.25 μ L dNTP Mixa (10mM), 3 μ L MgCl₂ (50mM), po 2 μ L svake od 10 μ M otopine početnica, određeni volumen otopine cDNA koji odgovara njenoj masi od 100 ng te na kraju voda kako bi ukupan volumen reakcijske smjese bio 50 μ L. Uzorci su potom stavljeni na PCR-uređaj *T100 Thermal Cycler (Bio-Rad)* na kojemu su postavljeni uvjeti prikazani u tablici 2. Nakon završetka PCR reakcije, provedena je agarozna gel elektroforeza uzorka kako bi se analizirali produkti reakcije.

Tablica 2. Uvjeti provedene Taq-PCR reakcije.

Faza	Broj ciklusa	Temperatura (°C)	Vrijeme
Početna denaturacija	1	95	60 s
Denaturacija	35	95	15 s
Sparivanje početnica	35	Ovisi o paru početnica*	15 s
Elongacija	35	72	20 s
Završna elongacija	1	72	5 min

*Vrijednosti prikazane u tablici 3.

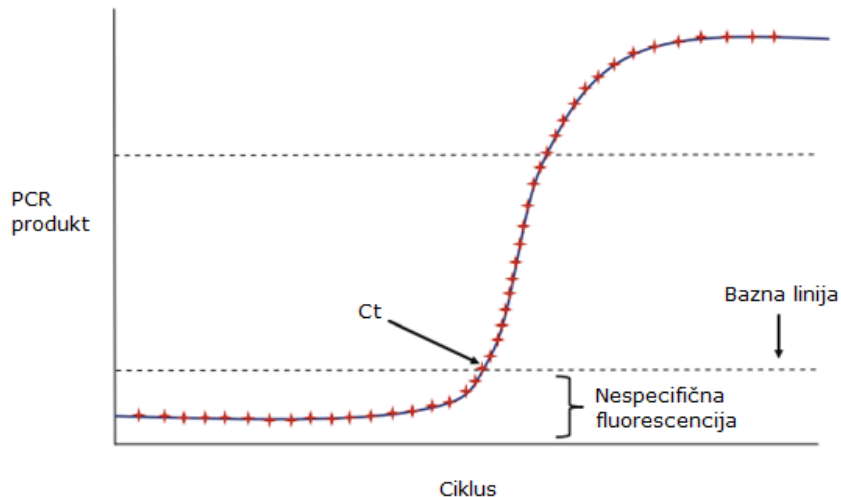
Tablica 3. Temperature sparivanja početnica (engl. *annealing temperature*, Ta), izmjerene uz NEB Tm kalkulator.

Par početnica	Ta (°C)
MmAcre F1+R1	53
MmAcre F2+R2	52
MmXpa F+R	52
MmZatt F1+R1	55
MmZatt F2+ R2	54

3.2.7. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom

Jedna od najčešće korištenih metoda za kvantifikaciju ekspresije gena je kvantitativna lančana reakcija polimerazom (engl. *quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) ili PCR u stvarnom vremenu (engl. *real time PCR*, RT-PCR). Iako je otkrićem i razvojem klasične metode PCR-a bilo moguće specifično umnožiti željeni segment DNA u velikom broju unutar par sati, kvantifikacija dobivenog produkta bila je otežana s obzirom da dolazi do umnažanja otprilike iste količine produkta, neovisno o početnoj količini kalupa u PCR reakciji (Kubista i sur., 2006). Takvo ograničenje kvantifikacije uslijed PCR reakcije razriješeno je razvojem kvantitativnog PCR-a. Za provođenje qPCR reakcije potrebne su iste komponente kao i u klasičnom PCR-u; DNA kalup (cDNA), par specifičnih početnica, dNTP-ovi, reakcijski pufer i termorezistentna DNA polimeraza, a dodatno se u reakcijsku smjesu dodaje određeni fluorofor, koji fluorescira nakon vezanja na DNA molekulu. S obzirom da tijekom pojedinih ciklusa reakcije dolazi do umnažanja određenog segmenta DNA, detektor qPCR uređaja mjeri povećanje fluorescencije u uzorku, koja je proporcionalna količini umnoženog produkta. Zahvaljujući mjerenju fluorescencije u svakom pojedinom ciklusu reakcije, moguće je utvrditi početnu količinu kalupa u uzorku, odnosno početnu razinu ekspresije gena od interesa.

qPCR reakcija uključuje tri faze, koje mogu biti objašnjene sigmoidalnom krivuljom (slika 4). U prvoj fazi reakcije, detektor bilježi određenu vrijednost fluorescencije, ali ona ne prelazi vrijednost fluorescencije bazne linije (engl. *baseline*), odnosno ta fluorescencija nije specifična za reakciju te je ona konstantna tijekom cijelog ciklusa reakcije. Fluorescencija bazne linije (engl. *baseline*) granična je vrijednost fluorescencije, pri kojoj još nije zabilježeno povećanje fluorescencije uslijed sinteze PCR produkta. Druga faza započinje kada fluorescencija amplifikacije PCR produkta prijeđe fluorescenciju bazne linije, što označava početak eksponencijalnog umnažanja PCR produkta. Umnažanje je eksponencijalno jer su u uzorku komponente prisutne u suvišku. Zadnja faza odnosi se na linearnu fazu i fazu platoa, u kojima efikasnost reakcije opada zahvaljujući iscrpljivanju jedne ili više komponenata reakcije.



Slika 4. Grafički prikaz sigmoidalne krivulje karakteristične za qPCR reakciju (prema San Segundo-Val i Sanz-Lozano, 2016).

Količina PCR produkta tijekom eksponencijalne faze proporcionalna je početnoj količini kalupa, odnosno cDNA u uzorku. Zbog toga se prag granične fluorescencije (engl. *threshold*) postavlja u eksponencijalnoj fazi (iznad vrijednosti fluorescencije bazne linije). Zatim se određuje u kojem ciklusu qPCR-a određenog uzorka je dostignuta fluorescencija koja odgovara pragu granične fluorescencije, a taj ciklus se naziva Ct (engl. *cycle threshold*). Što je vrijednost Ct određenog uzorka niža, to je početna količina kalupa u tom uzorku veća, odnosno na početku reakcije postojala je veća količina kalupa, zbog čega je u ranijem ciklusu dostignuta fluorescencija praga granične fluorescencije. I obrnuto, što je vrijednost Ct uzorka viša, to je početna količina kalupa u tom uzorku bila manja, pa je bilo potrebno više ciklusa qPCR reakcije kako bi se umnožilo dovoljno DNA produkta koji bi dostigao fluorescenciju praga granične fluorescencije.

Za kvantifikaciju ekspresije određenog gena, mogu se koristiti dvije metode; apsolutna i relativna kvantifikacija. Apsolutna kvantifikacija odnosi se na precizno određivanje broja kopija DNA u uzorku, na način da se mjere Ct vrijednosti uzoraka, a uz pripremu serijskih razrjeđenja standarda razvija se standardna krivulja koja u ovisnost stavlja broj kopija DNA i Ct vrijednosti te time omogućava kvantifikaciju uzoraka (San Segundo-Val i Sanz-Lozano, 2016). U sklopu ovoga rada, provedena je relativna kvantifikacija, koja uključuje utvrđivanje ekspresije određenog gena u odnosu na referentni gen. Referentni gen jest konstitutivni gen, jednako ili slično eksprimiran u svim ispitivanim tkivima (HKG, engl. *housekeeping gene*), koji se koristi kao endogena kontrola za ispravljanje određenih eksperimentalnih varijabilnosti

između bioloških uzoraka, kao što su kvaliteta izolirane RNA, efikasnost reverzne transkripcije i tehničke pogreške (Chapman i Waldenström, 2015; Huggett i sur., 2005).

Kvantitativni PCR proveden je u svrhu testiranja efikasnosti prethodno dizajniranih početnica te utvrđivanja relativne kvantifikacije *Acrc*, *Zatt* i *Xpa* gena u tkivima domaćeg miša. U oba slučaja, pipetiranje komponenata reakcijskih smjesa provedeno je u kabinetu za sterilni rad s laminarnim protokom zraka pri sobnoj temperaturi, upotrebom optičkih stripova (8×) ili optičkih mikrotitarskih pločica (96×). U svrhu kvantifikacije korišteni su *GoTaq qPCR Master Mix* (Promega) i *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems). Ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 10 μL , a smjesa je sadržavala: 5 μL *GoTaq qPCR Master Mix* ili *Power SYBR Green PCR Master Mix*, 0,5 μL uzvodne početnice (6 μM) te 0,5 μL nizvodne početnice (6 μM), 1,5 μL cDNA te vodu. U slučaju korištenja *Power SYBR Green PCR Master Mix*, dodano je 2,5 μL ultračiste vode, dok se prilikom korištenja *GoTaq qPCR Master Mix* dodaje 2,4 μL ultračiste vode te 0,1 μL fluorescencijske boje CXR (engl. *Carboxy-X-Rhodamine*). Kod kvantifikacije gena, masa cDNA za ispitivani gen i za HKG iznosila je 10 ng (6,67 ng/ μL), dok su prilikom testiranja efikasnosti početnica, pripremljena serijska razrjeđenja cDNA od 10 ng (6,67 ng/ μL), 5 ng (3,33 ng/ μL), 2,5 ng (1,67 ng/ μL), 1 ng (0,67 ng/ μL), 0,3 ng (0,2 ng/ μL) i 0,1 ng (0,067 ng/ μL). Svaka reakcija postavljena je u triplicatu, a prilikom svakog od eksperimenata postavljena je i negativna kontrola, odnosno reakcijska smjesa koja ne sadrži kalup (engl. *no template control*, NTC). Nakon završenog postavljanja reakcija, optički stripovi ili mikrotitarske ploče centrifugirani su 5 minuta pri $500 \times g$, kako bi se osiguralo spuštanje reakcijske smjese na dno jažice, a potom je mjerenje fluorescencije provedeno na *7300 Real-Time PCR System* uređaju (Applied Biosystems). Početna denaturacija pri 95°C trajala je 10 min, nakon čega je uslijedilo 40 ciklusa amplifikacije, koji su uključivali denaturaciju pri 95°C u trajanju od 15 s te sparivanje početnica i elongaciju pri 60°C u trajanju od 1 min.

3.2.8. Obrada podataka

Za relativnu kvantifikaciju ispitivanih gena, korištena je *Q-Gene* metoda (Muller i sur., 2002), koja se temelji na izračunavanju MNE vrijednosti (engl. *Mean Normalized Expression*), prema formuli:

$$[1] \text{ MNE} = E(\text{HKG})^{\text{Ct}(\text{HKG})} / E(\text{gen})^{\text{Ct}(\text{gen})},$$

gdje je: E (HKG) – efikasnost početnica specifičnih za kvantifikaciju HKG, Ct (HKG) – srednja Ct vrijednost HKG za pojedino tkivo, E (gen) – efikasnost početnica specifičnih za kvantifikaciju ispitivanog gena, Ct (gen) – srednja Ct vrijednost ispitivanog gena za određeno tkivo. Dobiveni rezultati prikazani su kao vrijednosti MNE pomnožene s 10^6 .

Efikasnost početnica (E) izračunata je uz pomoć programa *Microsoft Office Excel 2013*, kako slijedi:

$$[2] \text{ E (\%)} = \left(10^{\frac{-1}{a}} - 1\right) \cdot 100 \text{ ili } \text{ E} = 10^{\frac{-1}{a}} - 1,$$

gdje a predstavlja koeficijent smjera pravca linearne regresije (nagib pravca).

S obzirom na prisutnost bioloških triplikata (triju jedinki) u ovome eksperimentu, izračunate su srednje vrijednosti normaliziranih ekspresija gena dobivenih za svako tkivo. Rezultati su prikazani grafički, a pojedinim MNE vrijednostima pridružene su standardne pogreške aritmetičke sredine (engl. *standard error of the mean*, SEM), koje su izračunate prema formuli:

$$[3] \text{ SEM} = \frac{\text{SD}}{\sqrt{N}},$$

gdje SD predstavlja standardnu devijaciju, a N broj mjerenja (biološki triplikati: N = 3). Za statističku obradu i grafičke prikaze dobivenih rezultata korišteni su *Microsoft Office Excel 2013* i *GraphPad Prism 8*.

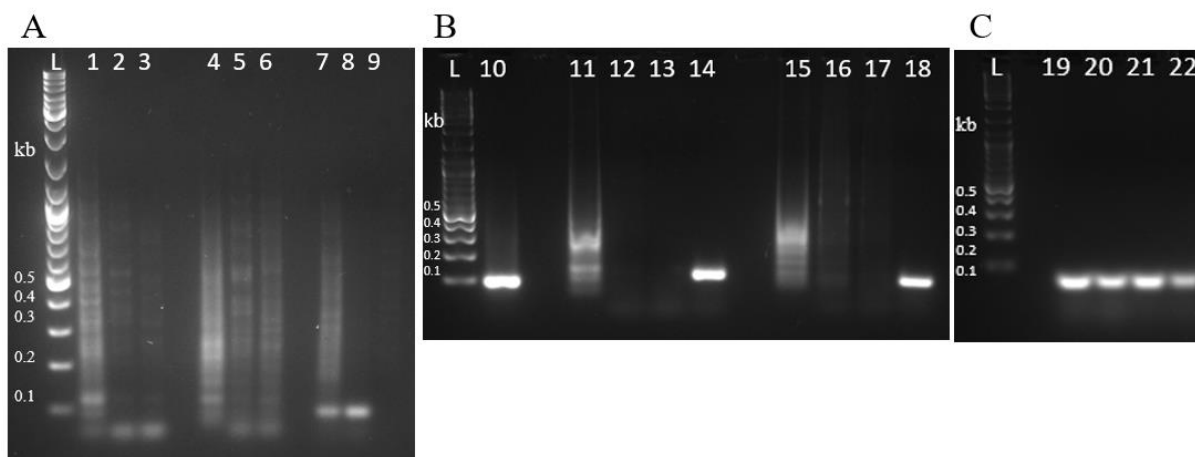
4. REZULTATI I RASPRAVA

Tema ovoga rada jest utvrđivanje razine ekspresije gena *ACRC*, *ZATT* i *XPA* u tkivima domaćeg miša (*Mus musculus*), u ovisnosti o dobi i spolu te usporedba ekspresijskih profila sa čovjekom. U tu svrhu utvrđena je razina ekspresije gena od interesa unutar pet tkiva domaćeg miša, što daje uvid u zastupljenost navedenih faktora DPC popravka, a time i uvid u aktivnost različitih puteva popravka u pojedinom tkivu. Također, usporedbom ekspresije ispitivanih gena u tkivima ženki i mužjaka različite dobi domaćeg miša utvrđeno je jesu li geni ovisni o spolu te da li se njihova ekspresija mijenja tijekom starenja.

U nastavku su prikazani rezultati testiranja početnica dizajniranih za kvantifikaciju ekspresije gena od interesa pomoću qPCR metode kao i rezultati testiranja potencijalnih referentnih gena (engl. *housekeeping gene*, HKG) za relativnu kvantifikaciju ekspresije u domaćeg miša. Također, prikazani su rezultati analize kvalitete RNA izolirane u sklopu ovoga rada, iz mladih i starih jedinki domaćeg miša. Na kraju, navedeni su rezultati ekspresijske analize *ACRC*, *XPA* i *ZATT* gena kod domaćeg miša, kojima je utvrđena: razina ekspresije u jetri, bubregu, mozgu, crijevima i gonadama te spolne i dobne razlike u ekspresiji ovih gena. Također, dobiveni rezultati ekspresije uspoređeni su s ekspresijom istih gena u čovjeka. Rezultati ekspresije kod čovjeka preuzeti su s mrežnih stranica Human Protein Atlas-a (HPA, 2022a).

4.1. TESTIRANJE POČETNICA ZA KVANTITATIVNI PCR

Prije provođenja eksperimenta kvantifikacije u tkivima miša dizajnirane početnice, čije su karakteristike prethodno prikazane u tablici 1 (poglavlje 3.2.1.), potrebno je testirati kako bi se utvrdilo jesu li one specifične za amplifikaciju željenog produkta te kako bi im se odredila efikasnost rada. Prvi korak uključivao je provođenje PCR reakcije te agarozne gel elektroforeze, radi vizualizacije dobivenih amplikona. PCR reakcija provedena je, kako je opisano u poglavlju 3.2.6., za oba para *ACRC* i *ZATT* početnica te za par *XPA* početnica, a kao kalup u tim reakcijama korištena je cDNA koja nije sintetizirana u sklopu ovoga rada, već koja je ranije u LME dobivena reverznom transkripcijom izolirane RNA iz tkiva domaćeg miša. Svi parovi početnica su dizajnirani tako da umnažaju segment cDNA dug otprilike 100 pb, zbog čega je očekivani rezultat PCR reakcije pojava jedne vrpce koja odgovara toj veličini. Takvim rezultatom potvrđuje se da određeni par početnica specifično umnaža samo željeni produkt. Slika 5A-C prikazuje rezultate PCR reakcija za testiranje početnica *ACRC*, *XPA* i *ZATT* gena.



Slika 5. Agarozni 2 %-tni gelovi nakon provedene PCR reakcije i elektroforeze na uzorcima cDNA prethodno dobivenim u LME iz tkiva domaćeg miša (nije dio ovoga rada), koristeći dizajnirane parove početnica za umnažanje *ACRC*, *XPA* i *ZATT* gena. L- marker veličine. Gel A: 1- Jetra (MmAcr F1+R1), 2- Bubrež (MmAcr F1+R1), 3- Crijevo (MmAcr F1+R1), 4- Jetra (MmAcr F2+R2), 5- Bubrež (MmAcr F2+R2), 6- Crijevo (MmAcr F2+R2), 7- Jetra (MmXpa F+R), 8- Bubrež (MmXpa F+R), 9- (MmXpa F+R). Gel B: 10- pozitivna kontrola (Bubrež, MmXpa F+R), 11- Mozak, ženka (MmAcr F1+R1), 12- Mozak, mužjak (MmAcr F1+R1), 13- Jajnik (MmAcr F1+R1), 14- Testis (MmAcr F1+R1), 15- Mozak, ženka (MmAcr F2+R2), 16- Mozak, mužjak (MmAcr F2+R2), 17- Jajnik (MmAcr F2+R2), 18- Testis (MmAcr F2+R2). Gel C: 19- Testis (MmZatt F1+R1), 20- Mozak (MmZatt F1+R1), 21- Testis (MmZatt F2+R2), 22- Mozak (MmZatt F2+R2).

Reakcije za umnažanje PCR produkta *ACRC* gena, prikazane su na A i B gelu slike 5. Na gelu 5A, jažice 1, 2 i 3 prikazuju rezultate za prvi *ACRC* par početnica (MmAcr F1+R1) na uzorcima cDNA iz jetre, bubrega i crijeva. Može se uočiti razmaz u trima ispitivanim tkivima, odnosno nespecifično umnažanje fragmenata upotrijebljenim parom početnica. To može značiti ili da početnice nisu pogodne za umnažanje željenog amplikona ili da je *ACRC* gen vrlo nisko eksprimiran u korištenim tkivima. U oba slučaja, okarakterizirana ili lošim dizajnom početnica ili manjkom kalupa kojeg želimo umnožiti, dolazi do nespecifičnog sparivanja početnica duž kalupa tijekom ciklusa PCR reakcije, što rezultira umnažanjem raznovrsnih fragmenata, kakve je moguće vidjeti na gelu (slika5A). Slični rezultati dobiveni su i za drugi *ACRC* par početnica (MmAcr F2+R2) na cDNA uzorcima iz jetre, bubrega i crijeva, što prikazuju jažice 4, 5 i 6 na slici 5A. Iz tog razloga su provedene dodatne PCR reakcije upotrebom navedena dva para *ACRC* početnica umnažanjem PCR produkta koristeći cDNA preostalih tkiva: mozga, testisa i jajnika (slika 5B). Kod uzoraka mozga i jajnika nije uočljiva željena vrpca, ali uzorci cDNA iz testisa (jažice 14 i 18) jasno pokazuju kako se uz oba para *ACRC* početnica može specifično umnožiti željeni fragment duljine oko 100 pb (slika 5B) te se pretpostavlja kako je ekspresija

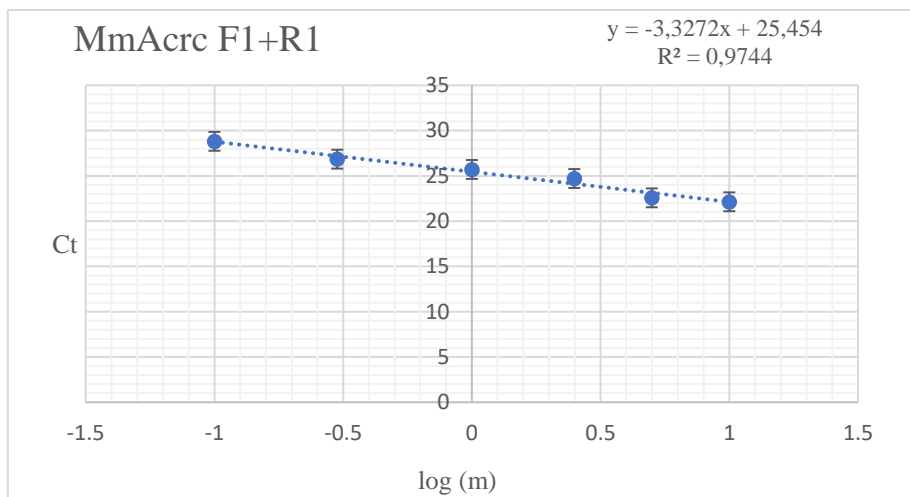
gena *ACRC* u testisu značajno viša u odnosu na ostala tkiva, što je još potrebno dodatno utvrditi kvantificiranjem ekspresije u nastavku rada. Početnice za umnažanje PCR produkta *XPA* gena (MmXpa F+R) daju željenu vrpce za uzorak cDNA iz bubrega (jažica 8), koji se nadalje koristio kao pozitivna kontrola (jažica 10), kao i iz jetre iako je prisutan razmaz (jažica 7) (slika 5A). Iz navedenih rezultata se može zaključiti kako dizajnirane *XPA* početnice specifično umnažaju željeni fragment te da je *XPA* u određenoj mjeri eksprimiran u tkivima jetre i bubrega. Početnice za umnažanje PCR produkta *ZATT* gena (MmZatt F1+R1 i MmZatt F2+R2) daju očekivane vrpce na uzorcima cDNA iz testisa i mozga (jažice 19, 20, 21 i 22) (slika 5C). Time se zaključuje kako se korištenjem oba para dizajniranih *ZATT* početnica može specifično umnožiti željeni produkt te kako je *ZATT* eksprimiran u navedenim tkivima.

Ostali parovi početnica, prikazani u tablici 1, nisu testirani PCR reakcijom. Testiranje para početnica Mm18S F+R ranije je provedeno u LME i nije rađeno u sklopu ovoga rada, a parovi početnica za kvantifikaciju ekspresije *ATPO* (punog naziva *ATP5PO*) i *RPLP0* gena testirani su koristeći qPCR na temelju čega je ujedno određena i efikasnost qPCR reakcije.

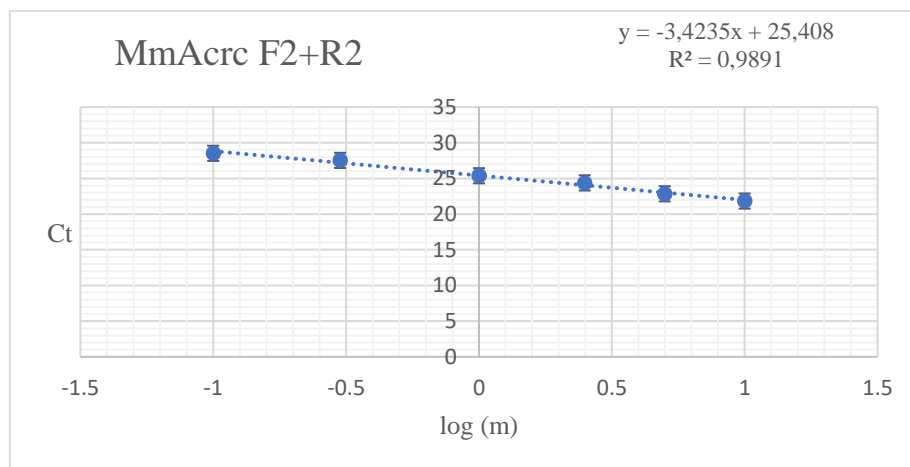
Određivanje efikasnosti drugi je korak testiranja početnica za kvantitativni PCR. Svakom paru naručenih početnica potrebno je odrediti efikasnost umnažanja, u svrhu ispravne interpretacije rezultata. Naime, kod izračuna relativne ekspresije gena *Q-gene* metodom nužno je da su efikasnosti početnica za gen od interesa i za HKG vrlo slične, s obzirom da velika razlika u efikasnosti PCR reakcija utječe na finalni rezultat ekspresije (Muller i sur., 2002). Također, usporedba ekspresije gena između različitih bioloških uzoraka nije primjerena ukoliko se efikasnosti korištenih parova početnica značajno razlikuju (Jozefczuk i Adjaye, 2011).

Ispitivanje efikasnosti temelji se na pripremi niza reakcijskih smjesi za qPCR, u kojima se mjere Ct vrijednosti u ovisnosti o rastućoj koncentraciji kalupa, kako je opisano u poglavlju 3.2.7., te na izradi standardne krivulje. Standardna krivulja jest pravac, čiji nagib se koristi u izračunu efikasnosti (poglavlje 3.2.8.). Efikasnost amplifikacije za par početnica u idealnom slučaju iznosi 100 %, što označava da se broj molekula ciljne sekvence u svakom ciklusu qPCR reakcije udvostruči. U praksi, broj molekula ciljne sekvence može biti manji od dvostrukog po ciklusu reakcije, a razlozi nižoj efikasnosti mogu biti loše dizajnirane početnice ili krivo postavljene koncentracije komponenti reakcije. Također, efikasnost može premašiti 100 %, što je posljedica inhibicije polimeraze. U tom slučaju dolazi do izravnavanja standardnog pravca, zbog čega se koeficijent nagiba smanjuje, a efikasnost se prividno povećava iznad 100 % (Čepin, 2017). Općenito, vrijednosti nagiba između -3.1 i -3.6, odnosno efikasnosti između 90-110 % smatraju se zadovoljavajućima (Rodríguez i sur., 2015).

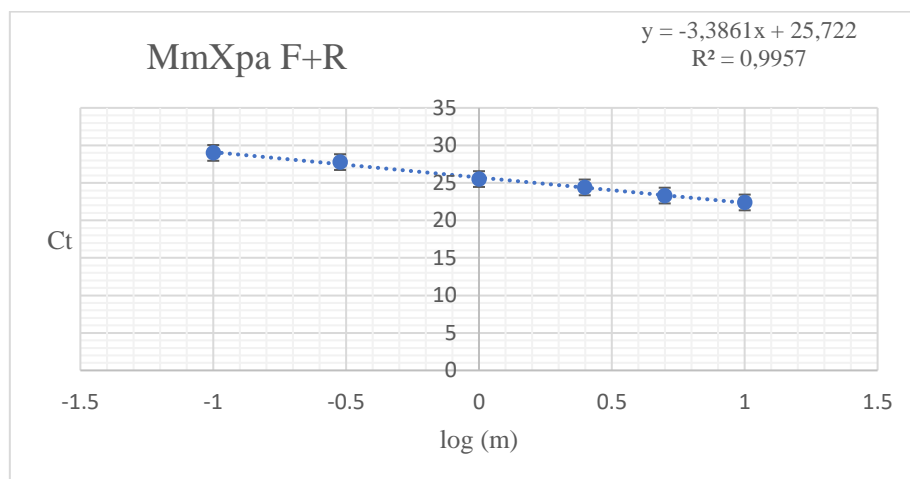
Uzorci cDNA korišteni kao kalupi u qPCR reakciji u svrhu određivanja efikasnosti početnica odabirani su s obzirom na prethodno opisane rezultate testiranja početnica PCR reakcijom. Za oba para ACRC početnica, kao i oba para ZATT početnica korištena je cDNA iz testisa, a za par XPA početnica, korištena je cDNA iz bubrega. S obzirom da su *ATPO* i *RPLP0* geni eksprimirani u svim tkivima, kod određivanja efikasnosti početnica bilo je moguće koristiti bilo koji uzorak cDNA, a ovdje je korištena cDNA iz jetre. Slika 6a-i prikazuje dobivene standardne krivulje efikasnosti svih ispitivanih početnica, dok su u tablici 4 sažete izračunate efikasnosti pojedinih parova početnica (izračun proveden prema formuli, prikazanoj u poglavlju 3.2.8.). Pokazano je da su efikasnosti svih ispitivanih parova početnica zadovoljavajuće, osim efikasnosti za drugi par *Rplp0* početnica. Efikasnosti prvog para ACRC početnica iznosi 99,8 %, drugog para ACRC početnica 95,9 %, a efikasnost XPA početnica 97,4 %. Efikasnost prvog i drugog para ZATT početnica iznose 94,7 % i 101,6 %, dok je za prvi i drugi par *ATPO* početnica karakteristična efikasnost od 96,3 % i 101,6 %. Efikasnost prvog para *RPLP0* početnica iznosi 94,6 %, dok je efikasnost drugog para *RPLP0* početnica bila 86,0 % (tablica 4).



(a)

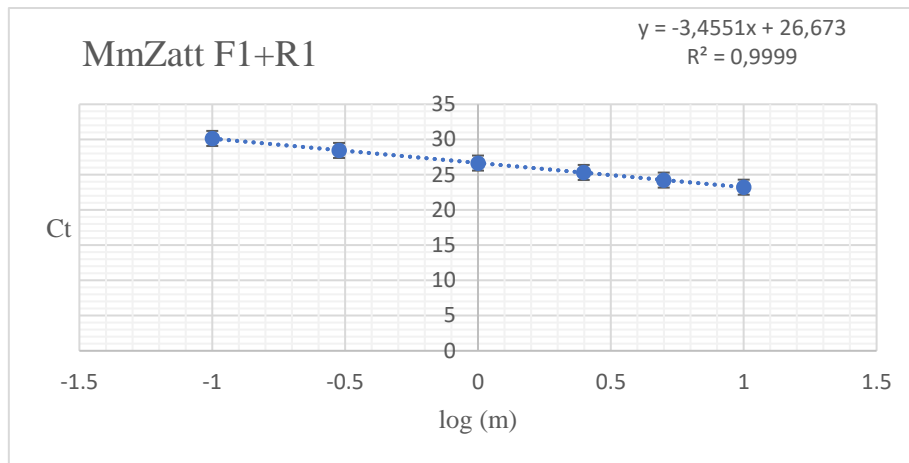


(b)

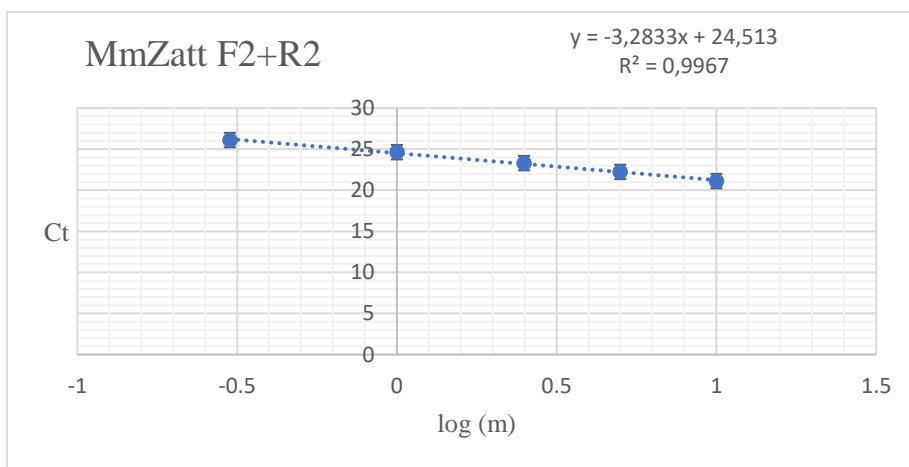


(c)

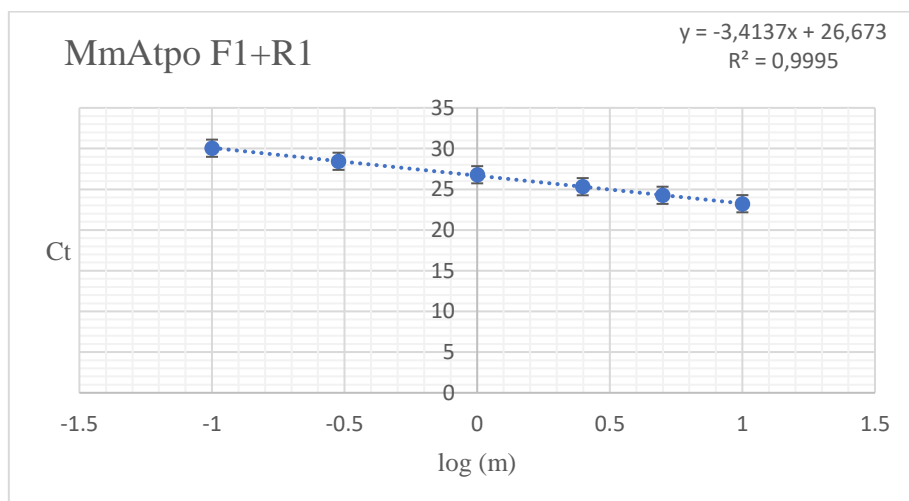
Slika 6. Standardne krivulje efikasnosti početnica testiranih za kvantitativni PCR: (a) MmAcrc F1+R1, (b) MmAcrc F2+R2, (c) MmXpa F+R, (d) MmZatt F1+R1, (e) MmZatt F2+R2, (f) MmAtpo F1+R1, (g) MmAtpo F2+R2, (h) MmRplp0 F1+R1, (i) MmRplp0 F2+R2.



(d)

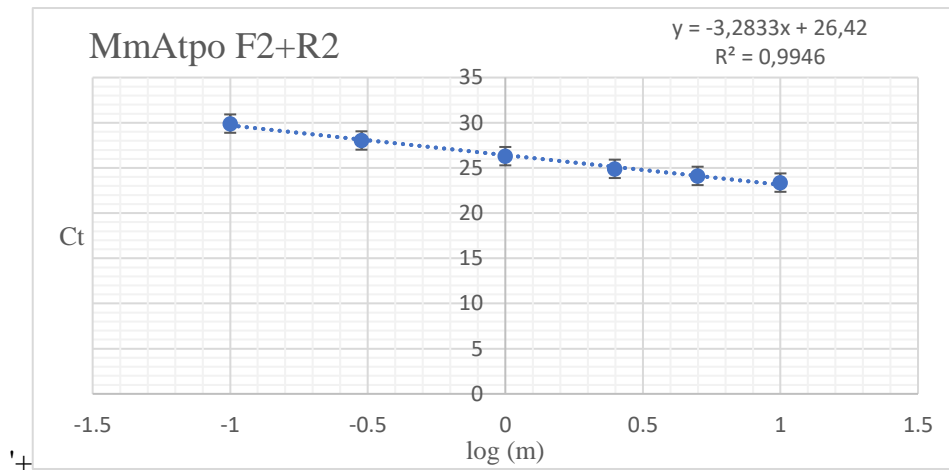


(e)

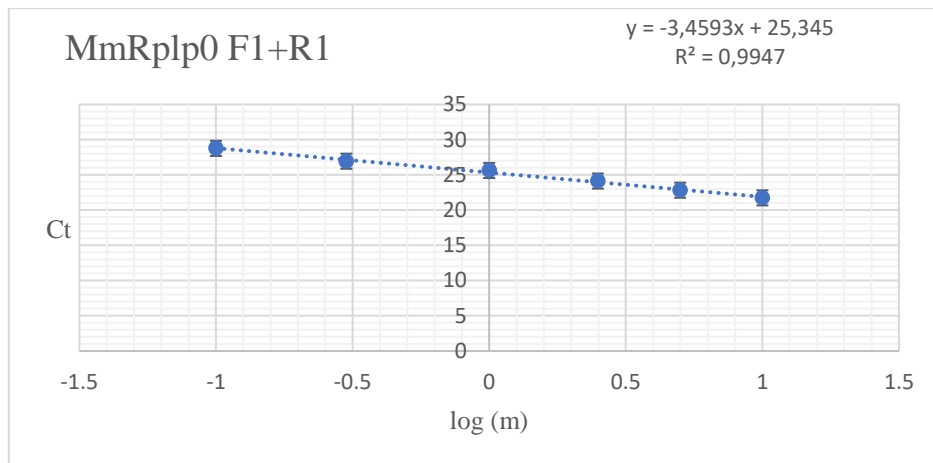


(f)

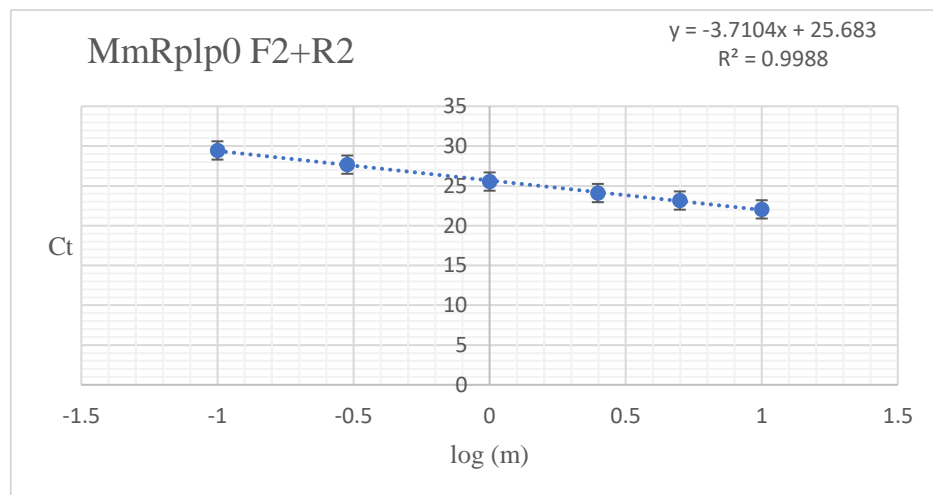
Slika 6. Standardne krivulje efikasnosti početnica testiranih za kvantitativni PCR: (a) MmAcrc F1+R1, (b) MmAcrc F2+R2, (c) MmXpa F+R, (d) MmZatt F1+R1, (e) MmZatt F2+R2, (f) MmAtpo F1+R1, (g) MmAtpo F2+R2, (h) MmRplp0 F1+R1, (i) MmRplp0 F2+R2 - *nastavak*.



(g)



(h)



(i)

Slika 6. Standardne krivulje efikasnosti početnica testiranih za kvantitativni PCR: (a) MmAcrc F1+R1, (b) MmAcrc F2+R2, (c) MmXpa F+R, (d) MmZatt F1+R1, (e) MmZatt F2+R2, (f) MmAtpo F1+R1, (g) MmAtpo F2+R2, (h) MmRplp0 F1+R1, (i) MmRplp0 F2+R2 - *nastavak*.

Tablica 4. Sažeti prikaz izračunatih efikasnosti rada pojedinih parova početnica. Navedene su i vrijednosti nagiba pravca (a), odsječci na y-osi (b) i korelacijski koeficijenti (R^2).

Početnice	a	b	R^2	E	E / %
MmAcr F1+R1	-3,3272	25,454	0,9744	1,9978	99,8
MmAcr F2+R2	-3,4235	25,408	0,9891	1,9593	95,9
MmXpa F+R	-3,3861	25,722	0,9957	1,9739	97,4
MmZatt F1+R1	-3,4551	26,673	0,9999	1,9473	94,7
MmZatt F2+R2	-3,2833	24,513	0,9967	2,0164	101,6
MmAtpo F1+R1	-3,4137	26,673	0,9995	1,9631	96,3
MmAtpo F2+R2	-3,2833	26,420	0,9946	2,0164	101,6
MmRplp0 F1+R1	-3,4593	25,345	0,9947	1,9457	94,6
MmRplp0 F2+R2	-3,7104	25,683	0,9988	1,8599	86,0

Na temelju određenih efikasnosti početnica za daljnje eksperimente odabrane su one sa najvišim efikasnostima: MmAcr F1+R1, MmXpa F+R i MmZatt F2+R2 (tablica 4). Što se tiče početnica za umnažanje HKG-a, na temelju rezultata, za daljnje ispitivanje odabran je drugi par ATPO početnica (MmAtpo F2+R2) te prvi par Rplp0 početnica (MmRplp0 F1+R1).

4.2. ODABIR REFERENTNOG GENA ZA EKSPRESIJSKU ANALIZU KOD MIŠA

Relativna kvantifikacija ekspresije gena temelji se na omjeru ekspresije gena od interesa u odnosu na referentni gen. Referentni geni su tzv. *housekeeping* geni (HKG), koji se konstantno transkribiraju u stanici, jer imaju ulogu u osnovnim staničnim funkcijama, esencijalni su za život stanice te su zato eksprimirani u svim stanicama određenog organizma. Upotreba referentnih gena u relativnoj kvantifikaciji ekspresije gena osigurava usporedbu rezultata dobivenih iz različitih bioloških uzoraka. Glavni kriterij koji referentni gen mora zadovoljiti jest jednaka razina ekspresije u svim ispitivanim uzorcima, bilo da se radi o stabilnosti ekspresije tog gena u različitim razvojnim fazama organizma, tipovima tkiva ili fizičkim stanjima tkiva (povrede ili starenje) (Xu i sur., 2018). Treba napomenuti kako ne postoji idealni gen koji se može koristiti kao referentni u svim eksperimentalnim uvjetima. Primjerice, geni koji se tradicionalno koriste kao referentni kod kvantifikacije ekspresije gena u miša, *18S rRNA*, *ACTB* (β -aktin) i *GAPDH* (glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaza), u različitim eksperimentima

moгу značajno varirati u ekspresiji (Xu i sur., 2018; Lin i sur., 2013). Iz tog razloga, ključno je utvrditi stabilnost ekspresije potencijalnog referentnog gena za set uzoraka od interesa, prije provođenja finalnog eksperimenta kvantifikacije.

U prethodno provedenim ekspresijskim analizama u LME, *18S rRNA* korišten je kao referentni gen za istraživanje ekspresije gena u tkivima miša. Međutim, *18S rRNA* nije idealan referentni gen za istraživanja ekspresije *ACRC*, *ZATT* i *XPA* gena, s obzirom da su razine transkripata gena od interesa u određenim tkivima znatno niže eksprimirane od *18S* transkripata; u nekima od njih razlika u Ct vrijednostima iznosila je oko 20. Velika razlika u Ct vrijednostima između gena od interesa i HKG kod relativne kvantifikacije značajno utječe na vrijednosti ekspresijskih razina, zbog čega dobivene vrijednosti ne mogu biti relevantne (Caradec i sur., 2010). Iz tog razloga, u okviru ovog rada, testirani su drugi potencijalni kandidati za zadovoljavajući HKG u tkivima miša. Kao potencijalni referentni geni odabrani su *ATPO* i *RPLP0*. Gen *ATPO* kodira za podjedinicu O mitohondrijske ATP sintaze, koja provodi sintezu ATP-a na račun energije protonskog gradijenta uspostavljenog kroz membranu mitohondrija, a gen *RPLP0* kodira za 60S ribosomski protein P0, koji je sastavni dio velike podjedinice ribosoma (Akamine i sur., 2007). Nakon dizajniranja početnica za umnažanje *ATPO* i *RPLP0* gena, početnice koje su pokazale zadovoljavajuće efikasnosti korištene su za kvantifikaciju tih gena pri odabiru novog HKG za ekspresijsku analizu.

Rezultati prikazani u tablici 5 prikazuju kvantifikaciju ekspresije *ATPO* i *RPLP0* gena u tkivima stare ženke i starog mužjaka domaćeg miša. Reakcije za svako tkivo provedene su u duplikatu, zbog čega su u tablici prikazane dvije Ct vrijednosti, kojima je izračunata srednja vrijednost, \bar{c}_t , te standardna devijacija i postotak standardne devijacije, koje ukazuju na odstupanja između dobivenih Ct vrijednosti. Vrijednost koja se koristi za utvrđivanje reprezentativnosti dobivenih vrijednosti je postotak standardne devijacije tehničkih duplikata (% SD) jer ukoliko je vrijednost manja od 1 %, ona ukazuje da su Ct vrijednosti dobivene za određeno tkivo vrlo slične.

Tablica 5. Rezultati qPCR-a u svrhu kvantifikacije gena *ATPO*, *RPLP0* i *18S rRNA* u uzorcima cDNA iz tkiva stare ženke 1 i starog mužjaka 1, uz MmAtpo F2+R2, MmRplp F1+R1 i Mm18S F+R početnice.

	<i>ATPO</i>											
	Stara ženka 1						Stari mužjak 1					
Tkivo	NTC	Jetra	Bubreg	Crijevo	Mozak	Jajnik	NTC	Jetra	Bubreg	Crijevo	Mozak	Testis
Ct 1	Undet.	20,83	18,19	20,71	18,42	18,91	Undet.	19,40	18,18	23,57	18,41	17,74
Ct 2	Undet.	20,68	18,16	20,76	18,46	18,78	Undet.	19,43	18,16	23,56	18,27	17,61
\bar{c}_t	/	20,76	18,18	20,74	18,44	18,85	/	19,41	18,17	23,56	18,34	17,68
SD	/	0,11	0,02	0,03	0,03	0,09	/	0,02	0,01	0,01	0,10	0,09
%SD	/	0,52	0,12	0,16	0,14	0,47	/	0,13	0,08	0,03	0,53	0,50

	<i>RPLP0</i>											
	Stara ženka 1						Stari mužjak 1					
Tkivo	NTC	Jetra	Bubreg	Crijevo	Mozak	Jajnik	NTC	Jetra	Bubreg	Crijevo	Mozak	Testis
Ct 1	Undet.	19,46	17,13	19,10	18,24	15,69	Undet.	17,80	16,88	23,37	17,93	14,31
Ct 2	Undet.	19,55	17,14	19,13	18,32	/	Undet.	18,07	17,19	23,52	17,89	15,21
\bar{c}_t	/	19,51	17,14	19,11	18,28	15,69	/	17,94	17,04	23,45	17,91	14,76
SD	/	0,06	0,01	0,02	0,06	/	/	0,19	0,22	0,11	0,03	0,64
%SD	/	0,31	0,05	0,11	0,30	/	/	1,03	1,27	0,46	0,18	4,32

Ct- broj ciklusa pri kojem se dostiže prag granične fluorescencije, \bar{c}_t - srednja vrijednost duplikata/triplikata Ct vrijednosti, SD- standardna devijacija, % SD- postotak standardne devijacije

Rezultati kvantifikacije *ATPO* gena pokazuju degradaciju uzorka iz crijeva mužjaka (Ct=23.56), kao i blagu degradaciju uzoraka iz crijeva i jetre ženke domaćeg miša, zbog čega srednje vrijednosti tih uzoraka nisu uvrštene u izračun medijana ženskih i muških tkiva. Medijan Ct vrijednosti ženskih tkiva za *ATPO* početnice iznosi 18,4, a muških tkiva 18,3, što ukazuje da je ekspresija *ATPO* gena slična u muškim i ženskim tkivima, zbog čega bi *ATPO* mogao poslužiti kao dobar HKG. Povišene Ct vrijednosti u crijevu mužjaka i jetri i crijevu ženke, najvjerojatnije nisu posljedica nižih ekspresija *ATPO* gena, već degradacije uzorka (Warrington i sur., 2000). Nadalje, analizom ekspresije *RPLP0* gena utvrđeni su slični rezultati; vidljiv je određeni stupanj degradacije istih uzoraka, zbog čega te vrijednosti nisu uvrštene u daljnji izračun, a medijani Ct vrijednosti za ženska i muška tkiva iznose 17,1, odnosno 17,0. S obzirom na utvrđenu stabilnu ekspresiju *RPLP0* gena u tkivima stare ženke 1 i starog mužjaka 1, *RPLP0* također može poslužiti kao dobar HKG u ekspresijskoj analizi kod domaćeg miša. S obzirom na prethodno iznesene rezultate, oba ispitivana gena pokazala su dobre karakteristike u ulozi potencijalnih referentnih gena, a za upotrebu u relativnoj kvantifikaciji *ACRC*, *XPA* i *ZATT* gena kod miša, na koncu je odabran *RPLP0* gen.

4.3. ANALIZA KVALITETE IZOLIRANE RNA

Dobra kvaliteta RNA izolirane iz tkiva, preduvjet je dobivanja pouzdanih i reproducibilnih rezultata ekspresije gena na razini mRNA (Becker i sur., 2010). Kvaliteta se očituje u dobivanju visokog prinosa RNA, bez kontaminacija kao što su proteini, genomska DNA te RNaze, koje uzrokuju degradaciju RNA (Fleige i Pfaffl, 2006). Ukupna RNA izolirana je iz tkiva jedinki domaćeg miša kako je opisano u poglavlju 3.2.2., a kvaliteta je procijenjena mjerenjem koncentracije i čistoće uzoraka RNA, provođenjem agarozne gel elektroforeze i određivanjem ekspresije HKG u uzorcima cDNA iz ispitivanih tkiva. Tablica 6 prikazuje početnu masu tkiva iz koje je provedena izolacija, koncentraciju i pokazatelje čistoće dobivenih otopina RNA, dok slika 7 prikazuje RNA pojedinih uzoraka nakon agarozne gel-elektroforeze.

Prema uputama *Monarch Total RNA Miniprep Kita*, preporučene mase tkiva koje je potrebno izuzeti iz pojedinih organa su do 20 mg za tkiva visokog prinosa te do 50 mg za tkiva niskog prinosa. Prilikom izolacije RNA iz tkiva mladih jedinki uzimala se manja masa tkiva, a za posljedicu su dobivene općenito niže koncentracije RNA. Većina ih je dostatna za provođenje reverzne transkripcije, ali primjerice izolirane otopine RNA iz tkiva mozga mlade ženke i mladog mužjaka značajno su niže od ostalih (tablica 6), zbog čega su izolacije iz tih tkiva naknadno ponovljene te su dobivene više koncentracije nakon povećanja mase uzorka (rezultati nisu prikazani). Koncentracije izolirane RNA iz tkiva starih jedinki općenito su više, zahvaljujući korištenju većih masa tkiva za izolaciju, a jedino tkivo izdvojeno u manjoj masi jest jajnik stare ženke. Naime, unatoč tome što se uzimao cijeli jajnik, kod starih jedinki on je bio manje mase (5-6 g). Čistoća izolirane RNA opisana je omjerom A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230} , pri čemu su poželjne vrijednosti omjera A_{260}/A_{280} oko 2.0-2.1, a omjera A_{260}/A_{230} blizu 2.0. Vrijednosti A_{260}/A_{280} manje od 2.0 ukazuju na onečišćenja proteinima, a prema tablici 5, svi uzorci pokazuju zadovoljavajuće rezultate, uz iznimku jetre mladog mužjaka. Omjer A_{260}/A_{230} je pokazatelj onečišćenja otopina RNA kontaminantima koji apsorbiraju pri 230 nm, a to su primjerice gvanidinijeve soli, neionski detergentsi, fenol, etanol, polisaharidi i dr. (NEB, 2021). Vrijednosti omjera A_{260}/A_{230} prikazane u tablici 6 značajnije variraju među pojedinim uzorcima, a kod nekih od njih vrijednosti iznose 1.5, što upućuje na onečišćenje prethodno navedenim kontaminantima. Naime, sve su to spojevi koji se često nalaze u reagensima korištenim za izolaciju RNA, pa se određeni zaostaci tih spojeva mogu naći u eluiranim otopinama RNA. Usprkos tome, pokazano je kako njihova prisutnost u uzorcima uglavnom ne utječe negativno na primjenu otopina u naknadnim procesima (NEB, 2021).

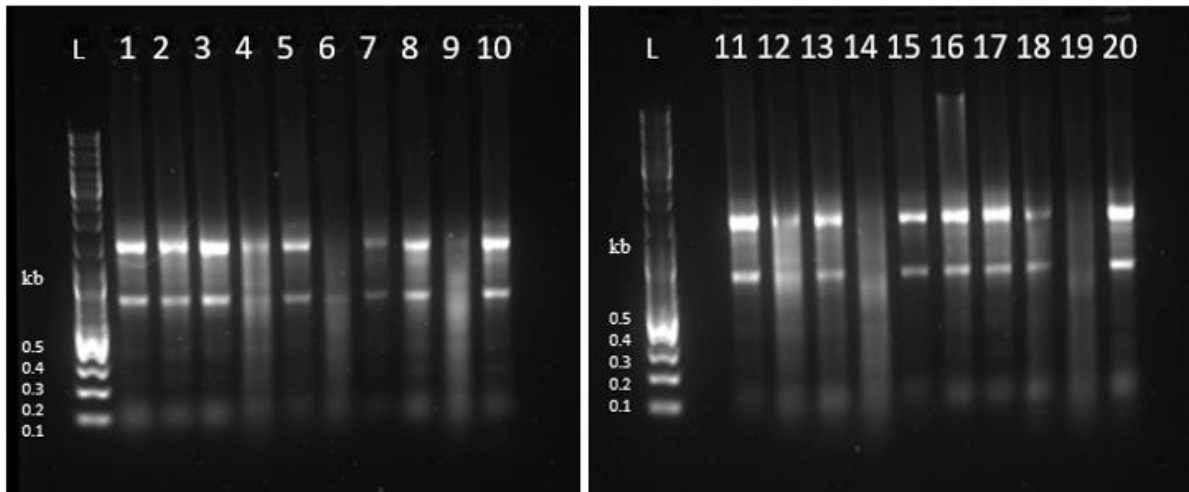
Tablica 6. Mase tkiva uzete za izolaciju ukupne RNA te masena koncentracija i čistoća izolirane RNA za tkiva mlade ženke 2, mladog mužjaka 2, stare ženke 3 i starog mužjaka 1.

Tkivo	Mlada ženka 2				Stara ženka 3			
	Masa tkiva (mg)	Konc. RNA (ng/μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	Masa tkiva (mg)	Konc. RNA (ng/μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
Jetra	18	259	2.1	1.9	34	528	2.1	2.1
Bubreg	14	138	2.1	2.2	48	477	2.1	2.2
Crijevo	17	371	2.1	2.2	58	1077	2.1	2.2
Mozak	23	55	2.1	1.5	48	247	2.1	2.1
Jajnik	13	295	2.1	2.0	6	100	2.0	2.1
Tkivo	Mladi mužjak 2				Stari mužjak 1			
	Masa tkiva (mg)	Konc. RNA (ng/μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	Masa tkiva (mg)	Konc. RNA (ng/μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
Jetra	14	380	1.9	1.5	54	715	2.1	1.9
Bubreg	23	106	2.1	1.5	62	852	2.1	2.2
Crijevo	20	226	2.1	2.1	62	1392	2.1	2.3
Mozak	24	39	2.1	1.5	63	292	2.1	2.0
Testis	18	241	2.1	2.1	46	329	2.1	2.1

Daljnje ispitivanje kvalitete izolirane RNA odnosi se na ispitivanje njezina integriteta. RNA je jako osjetljiva molekula, a rukovanje uzorcima prilikom izolacije vrlo lako dovodi do njene degradacije. Provjera integriteta i vizualizacija izolirane RNA provedena je pomoću agarozne gel elektroforeze. Iz pojedinih uzoraka tkiva miša izolirana je ukupna RNA, a 80-90 % ukupne RNA čini rRNA (ribosomska RNA), točnije 18S, 28S, 5,8S i 5S rRNA, koje grade malu i veliku podjedinicu ribosoma. S obzirom da je rRNA najzastupljenija u uzorku ukupne RNA, vizualizacijom ukupne RNA na gelu, očekuju se dvije vrpce velikog intenziteta u omjeru 2:1, koje predstavljaju 28S i 18S rRNA, dok je kod izrazito visokih prinosa ponekad moguće vidjeti i dodatnu vrpcu manjeg intenziteta koja je 5.8S rRNA. Takav rezultat upućuje na uspješno provedenu izolaciju i na prisutnost intaktne RNA u uzorku. Fragmenti mRNA, koji predstavljaju cilj umnažanja u ekspresijskoj analizi, različitih su duljina te čine do 5 % ukupne RNA, zbog čega ih nije moguće vizualizirati na gelu ovim putem (Tan i Yiap, 2009). Iz tog razloga, procjena kvalitete ukupne RNA omjerom vrpce 28S : 18S može biti pokazatelj kvalitete mRNA izolirane iz uzoraka.

Prema slici 7, koja prikazuje gelove nakon provedene gel elektroforeze uzoraka ukupne RNA prethodno navedenih jedinki miša, kod većine uzoraka mogu se vidjeti vrpce koje odgovaraju

očekivanom rezultatu. Dakle, vidljiv je bend najvećeg intenziteta koji predstavlja 28S rRNA, bend otprilike upola manjeg intenziteta, 18S rRNA te vrpca manjeg intenziteta 5,8S rRNA. S druge strane, kod nekih uzoraka došlo je do pomaka u raspodjeli veličine RNA prema manjim fragmentima, što ukazuje na djelomičnu ili potpunu degradaciju RNA.



Slika 7. Agarozni 1 %-tni gelovi nakon provedene elektroforeze uzoraka ukupne izolirane RNA iz tkiva mlade ženke 2 (mŽ), mladog mužjaka 2 (mM), stare ženke 3 (sŽ) i starog mužjaka 1 (sM). L- marker veličine, 1- mŽ: mozak, 2- mŽ: jetra, 3- mŽ: bubreg, 4- mŽ: crijevo, 5- mŽ: jajnik, 6- mM: mozak, 7- mM: jetra, 8- mM: bubreg, 9- mM: crijevo, 10- mM: testis, 11- sŽ: mozak, 12- sŽ: jetra, 13- sŽ: bubreg, 14- sŽ: crijevo, 15- sŽ: jajnik, 16- sM: mozak, 17- sM: jetra, 18- sM: bubreg, 19- sM: crijevo, 20- sM: testis.

Primjerice, uzorak jažice 6 (RNA iz mozga mladog mužjaka 2) prikazuje potpuno degradiranu RNA, što je uz dobivanje niske koncentracije otopine RNA bio bitan razlog za ponavljanje izolacije, dok je uzorak u jažici 12, odnosno uzorak RNA iz jetre stare ženke 3 primjer djelomične degradacije ukupne RNA. Nadalje, može se primijetiti kako svi uzorci RNA iz crijeva jedinki (jažice 4, 9, 14 i 19) pokazuju određeni stupanj degradacije RNA. Razlog tome je što je sekcija crijeva (nije rađena u sklopu ovoga rada) trajala dulje u odnosu na ostale organe, s obzirom da je crijevo nakon izdvajanja potrebno ispirati fiziološkom otopinom kako bi se odstranio feces. S obzirom da je taj proces trajao dulje od sekcije i pripreme ostalih tkiva, za samo tri (od 10) uzorka crijeva dobivena je RNA prihvatljive kvalitete. Dodatno, treba napomenuti da iako neki uzorak pokazuje određeni stupanj degradacije na gelu, integritet RNA ne mora biti narušen. Naime, do degradacije može doći tek uslijed nanošenja alikvota uzorka na gel, prilikom čega se alikvoti određeno vrijeme drže na sobnoj temperaturi ili uslijed provedbe agarozne gel elektroforeze, kada zbog previsoke voltaže i predugog trajanja elektroforeze može doći do raspada RNA. Također, uzrok raspada mogu biti i RNaze iz okoline

(puferi i gel) tijekom elektroforeze. Konačni pokazatelj kvalitete izolirane RNA je njeno prevođenje u cDNA te provođenje kvantitativnog PCR-a koristeći HKG na tim uzorcima. Bitan parametar koji se može provjeriti na gel elektroforezi je i zagađenje genomskom DNA. Vidljivo je da zagađenje gDNA nije bilo prisutno u uzorcima (slika 7) uz izuzetak jažice 16 (mozak starog mušjaka). GDNA vidljiva je kao razmaz iznad vrpce 28S rRNA. Međutim, čak i takav uzorak moguće je koristiti u svrhu kvantifikacije gena od interesa, jer su početnice dizajnirane tako da ne umnažaju gen sa gDNA, već samo mRNA (poglavlje 3.2.1). Na temelju prethodno navedenog, svi uzorci, osim uzoraka RNA izoliranih iz mozga mlade ženke 2 i mladog mušjaka 2, prevedeni su u cDNA kako je opisano u poglavlju 3.2.5. te je na tim uzorcima proveden kvantitativni PCR koristeći početnice za umnažanje HKG.

Pod pretpostavkom da su geni, koji se koriste kao referentni, približno jednako eksprimirani u svim ispitivanim tkivima, provođenjem kvantifikacije ekspresije HKG u svim uzorcima dobivene cDNA može se utvrditi kvaliteta izolirane RNA, odnosno kvaliteta sintetizirane cDNA. Prema tome, ukoliko se radi o uzorcima cDNA dobivenim iz RNA očuvanog integriteta, Ct vrijednosti uzoraka trebale bi biti slične. Tablica 7 prikazuje rezultate ekspresije HKG-a koji su izraženi kao srednje Ct vrijednosti (\bar{Ct}), za uzorke cDNA dobivene iz tkiva mlade ženke 2, mladog mušjaka 2, stare ženke 3 i starog mušjaka 1 (rezultati ostalih uzoraka cDNA nisu prikazani). Medijan svih \bar{Ct} vrijednosti iznosi 14,540, dok značajno veće vrijednosti od medijana potvrđuju ranije primjećenu degradaciju RNA (slika 7, jažice 9, 14 i 19) uočenu kod uzoraka crijeva mladog mušjaka 2, stare ženke 3 i starog mušjaka 1. Zbog utvrđene degradacije RNA, uzorci cDNA iz crijeva navedenih jedinki se nisu koristila u daljnjoj ekspresijskoj analizi. Daljnjom usporedbom rezultata agarozne gel elektroforeze (slika 7) i rezultata qPCR-a (tablica 7), može se uočiti da neki uzorci RNA kod kojih je utvrđen određeni stupanj degradacije na gelu, ipak pokazuju uspješno provedenu izolaciju RNA i uspješno prevođenje u cDNA, kao primjerice cDNA iz crijeva mlade ženke 2, kao i iz jetre stare ženke 3. Osim toga, Ct vrijednosti za uzorke cDNA iz mozga mlade ženke 2 i mladog mušjaka 2 odnose se na uzorke dobivene naknadnim ponavljanjem izolacije RNA te se ti uzorci koriste u finalnoj kvantifikaciji ekspresije gena od interesa kod miša. Na temelju prethodnoga, može se zaključiti kako je izolacija RNA i njeno prevođenje u cDNA bilo uspješno za sve ovdje analizirane uzorke, osim za tri uzorka iz tkiva crijeva.

Tablica 7. Rezultati provedenog kvantitativnog PCR-a uz Rplp0 početnice (F1+R1) na uzorcima cDNA iz tkiva mlade ženke 2, mladog mušjaka 2, stare ženke 3 i starog mušjaka 1.

Tkivo	Mlada ženka 2					Mladi mušjak 2				
	Jetra	Bubreg	Crijevo	Mozak	Jajnik	Jetra	Bubreg	Crijevo	Mozak	Testis
Ct 1	13,979	13,777	15,565	13,953	13,673	14,500	15,351	16,702	14,472	13,724
Ct 2	14,049	13,873	15,388	14,091	13,856	14,371	15,208	16,448	14,625	13,448
Ct 3	/	/	/	/	/	/	/	17,003	/	/
ct	14,014	13,825	15,476	14,022	13,765	14,435	15,279	16,718	14,549	13,586
SD	0,049	0,068	0,125	0,098	0,130	0,091	0,101	0,278	0,108	0,195
%SD	0,353	0,490	0,808	0,696	0,941	0,632	0,661	1,661	0,744	1,436

Tkivo	Stara ženka 3					Stari mušjak 1				
	Jetra	Bubreg	Crijevo	Mozak	Jajnik	Jetra	Bubreg	Crijevo	Mozak	Testis
Ct 1	14,793	14,418	20,343	14,885	13,594	14,606	14,145	21,829	14,861	14,946
Ct 2	14,988	14,165	20,430	14,717	13,430	14,453	14,290	21,690	14,716	14,991
Ct 3	/	/	/	/	/	/	14,283	/	/	15,081
ct	14,891	14,291	20,386	14,801	13,512	14,530	14,240	21,759	14,789	15,006
SD	0,138	0,179	0,062	0,119	0,116	0,108	0,082	0,098	0,103	0,069
%SD	0,926	1,250	0,305	0,801	0,858	0,747	0,575	0,450	0,695	0,459

Ct- broj ciklusa pri kojem se dostiže prag granične fluorescencije, ct- srednja vrijednost duplikata/triplikata Ct vrijednosti, SD- standardna devijacija, % SD- postotak standardne devijacije

Na temelju svih prikazanih i neprikazanih rezultata analize kvalitete RNA izolirane iz tkiva jedinki domaćeg miša, može se zaključiti kako je izolacija RNA bila uspješna za većinu uzoraka, koji su nakon prevođenja u cDNA bili pogodni za korištenje pri kvantifikaciji gena od interesa u ovome radu. Tkiva iz kojih u većoj mjeri nije uspješno provedena izolacija RNA su tkiva crijeva jedinki miša, zbog čega jedino za crijevo u domaćeg miša u ovome radu nisu dobiveni biološki triplikati. Usprkos tome, po jedan kvalitetan uzorak cDNA iz crijeva dobiven je za sve četiri reprezentativne jedinice - za jednu mladu i jednu staru ženku, te za jednog mladog i jednog starog mušjaka, zbog čega je ipak bilo moguće uspoređivati rezultate ekspresije u crijevu domaćeg miša, prema spolu i dobi.

4.4. EKSPRESIJA GENA *ACRC*, *XPA* i *ZATT* U TKIVIMA DOMAĆEG MIŠA

Raznolikost DPC oštećenja ukazuje na postojanje čitavog niza mehanizama kojima stanica može popraviti oštećenje. Kako je pokazano, aktivacija pojedinog puta ovisi o vrsti DPC oštećenja, fazi staničnog ciklusa te tipu stanice, odnosno tkiva (Kühbacher i Duxin, 2020). U višestaničnom eukariotskom organizmu, različiti organi imaju različiti stupanj proliferacije. Primjerice, gonade, jetra i crijevo predstavljaju organe visokog stupnja proliferacije, dok su bubreg i mozak primjeri organa s nižim stupnjem proliferacije stanica (Pressly i Park., 2017; Cheng i sur., 1999). Od početnih otkrića popravka DPC oštećenja, u kojima je prvotno prijavljen nepoznati proteolitički put stimuliran DNA replikacijom uključen u eliminaciju oštećenja, preko otkrića prve DPC proteaze Wss1 u kvascu te potvrde aktivnosti Sprtn-a u svezi s replikacijom u degradaciji DPC-a, istraživanja potvrđuju replikaciju kao ključni mehanizam prilikom kojeg se prepoznaju i uklanjaju štetni DPC-evi (Fielden i sur., 2018). Time, DPC popravak okarakteriziran je u replikativnim stanicama, odnosno proliferativnim tkivima. Do danas, okarakteriziran je određen broj mehanizama DPC popravka, koji ne ovise o S fazi staničnog ciklusa te koji su time važni za uklanjanje oštećenja nastalih nakon replikacije, a čija aktivnost sprječava ugrožavanje mitoze i općenito stanične diobe (Kühbacher i Duxin, 2020). Navedeni mehanizmi, s obzirom da ne ovise o replisomu, mogu biti važni i u popravku DPC oštećenja u nereplikativnim stanicama, primjerice u neuronima, s obzirom da akumulacija DPC oštećenja ugrožava ne samo replikaciju, već i transkripciju.

U ekspresiji gena od interesa, analizirane su dvije mlade odrasle ženke i dva mužjaka (4 mjeseca stari), te tri stare ženke i tri mužjaka (12 mjeseci stari). Osim navedenog, prethodno su u LME pripremljeni uzorci cDNA iz tkiva ženki i mužjaka domaćeg miša starosti 4 mjeseca koji su također korišteni u ovome radu u svrhu dobivanja bioloških triplicata. Prosječni životni vijek laboratorijskih miševa je oko 24 mjeseca, a spolnu zrelost postižu prosječno s 10 tjedana (70 dana). Čovjek u prosjeku živi 80 godina, a spolnu zrelost postiže s otprilike 11,5 godina (4.198 dana) (Dutta i Sengupta, 2016). Prema tome, kada govorimo o spolnoj zrelosti jedinki, 59,97 ljudskih dana odgovara jednom mišjem danu, odnosno 6,09 mišjih dana odgovara jednoj ljudskoj godini. Ukoliko ovim omjerom procijenimo dob miševa korištenih u ovome radu u odnosu na čovjeka, miševi 4 mjeseca stari imaju otprilike 20 ljudskih godina, dok miševi stari 12 mjeseci imaju otprilike 59 ljudskih godina. Nadalje, proučavana je ekspresija u pet tkiva: jetri, bubregu, crijevu, mozgu i gonadama. Pripremljeni uzorci tkiva korišteni su za utvrđivanje razine ekspresije gena od interesa na razini mRNA pomoću izolacije RNA, reverzne transkripcije i kvantitativnog PCR-a (engl. *quantitative PCR*, qPCR).

Kada govorimo o *ACRC* genu, prethodna istraživanja pokazuju kako je eksprimiran isključivo u zametnim stanicama i stanicama embrija u ranoj fazi razvoja, kod velikog broja modelnih organizama (Carmell i sur., 2016; Bhargava i sur., 2020). S obzirom da germinativne stanice, u odnosu na somatske, karakterizira općenito veće opterećenje DPC oštećenjima (Bhargava i sur., 2020), postoji mogućnost da je zahtjev za alternativnim mehanizmima popravka u navedenim tkivima veći. Međutim, razlog specifičnosti *Acrc*-a isključivo za germinativna tkiva, još je potrebno utvrditi. Iako je aktivnost *Acrc*-a visoko specifična za tkivo, popravak uz *Acrc* nije specifičan za samo jednu vrstu DPC oštećenja, već za više njih. A štoviše, postoje naznake kako DPC-ovi koji su SUMOilirani predstavljaju supstrat za *Acrc* (Borgermann i sur., 2019). Nadalje, prema Dokshin i sur. (2020), utvrđeno je da je aktivnost *Acrc*-a regulirana fazom staničnog ciklusa. Nagada se da *Acrc* i *Sprtn* paralelno djeluju u zaštiti genoma od DPC oštećenja, s obzirom da je *Sprtn* primarno aktivan u S fazi staničnog ciklusa, dok je *Acrc* aktivan tijekom mitoze, čime se osigurava uklanjanje DPC oštećenja prije završetka staničnog ciklusa germinativnih stanica (Dokshin i sur., 2020).

Rezultati relativne kvantifikacije ekspresije *ACRC*, *XPA* i *ZATT* gena u tkivima domaćeg miša prikazani su na slici 8. Gen *ACRC* je u većini tkiva vrlo nisko eksprimiran, uz izuzetak tkiva testisa (slika 8a), što je u skladu s literaturnim podacima. Vrijednosti $MNE \cdot 10^6$ *ACRC* gena za gotovo sva ženka tkiva ne razlikuju se bitno od nule. Od svih tkiva odrasle ženke, *ACRC* je najviše eksprimiran u tkivu mozga (slika 8a, $MNE \cdot 10^6 = 30,9 \pm 11,8$). Nakon mozga, ekspresija *ACRC*-a najviša je u jetri ženke, što čini 4,3 puta manju ekspresiju nego u mozgu, a potom slijedi tkivo bubrega, u kojem je ekspresija 5,2 puta manja nego u tkivu mozga. Razine ekspresije *ACRC*-a u crijevu i jajniku odrasle ženke vrlo su niske, bliske nuli, zbog čega je razina ekspresije u crijevu 38,8 puta manja, a u jajniku čak 310 puta manja od razine ekspresije *ACRC*-a u mozgu ženke. Prema rezultatima dobivenim za staru ženku, najviša ekspresija *ACRC*-a u toj jedinci karakteristična je za tkivo crijeva ($MNE \cdot 10^6 = 8,7$), a odmah zatim za mozak ($MNE \cdot 10^6 = 8,3 \pm 4,7$) (slika 8a). Zatim slijede jetra, pa bubreg, u kojima su razine ekspresije 9,7 puta, odnosno 10,9 puta manje u odnosu na crijevo. Za kraj, kao i u slučaju mlade ženke, najniža razina ekspresije karakteristična je za tkivo jajnika stare ženke, u kojemu je razina ekspresije čak 290 puta manja u odnosu na tkivo crijeva ($MNE \cdot 10^6 = 0,03 \pm 0,02$).

Nadalje, ekspresija *ACRC*-a kod odraslog mužjaka daleko je najviša u tkivu testisa (slika 8a, $MNE \cdot 10^6 = 6.778 \pm 942$). Time je tkivo testisa odraslog mužjaka općenito tkivo s najvišom razinom ekspresije *ACRC* gena. U tom tkivu *ACRC* je eksprimiran čak 176 puta više nego u crijevu, koje predstavlja drugo tkivo po razini ekspresije ($MNE \cdot 10^6 = 38,6$). Nakon crijeva

slijede tkivo mozga, u kojemu je 2,8 puta manja ekspresija u odnosu na crijevo, zatim tkivo jetre, u kojoj je 5,2 puta manja ekspresija u odnosu na crijevo te tkivo bubrega, u kojemu je *ACRC* najmanje eksprimiran (42,9 puta manje nego u tkivu crijeva) (slika 8a). Rezultati dobiveni za starog mušjaka također pokazuju kako je najviša ekspresija *ACRC*-a u tkivu testisa ($MNE \cdot 10^6 = 4.994 \pm 761$), i to 37,3 puta veća nego u mozgu starog mušjaka, koje predstavlja drugo tkivo po razini ekspresije *ACRC* gena (slika 8a). Zatim slijede crijevo (4,3 puta manja ekspresija u odnosu na mozak), te kao i kod mladog mušjaka, jetra (13,7 puta manja ekspresija u odnosu na mozak) i bubreg (83,6 puta manja ekspresija u odnosu na mozak).

Nedostatak *AcrC*-a u somatskim tkivima ukazuje na prisutnost drugih mehanizama, kojima se popravljaju DPC oštećenja u njima, poput NER puta te mehanizma koji uključuje gen *ZATT*. Što se tiče *Zatt*-a, njegova funkcija u popravku DPC-a potvrđena je za Top2 zarobljene na DNA (Schellenberg i sur., 2017). Aktivnost Top2 ključna je u procesima transkripcije, replikacije i rekombinacije (Riccio i sur., 2020). Također, pokazano je da su Top2 u većoj mjeri zastupljene u germinativnim tkivima, s obzirom da su ondje ključne za procese kondenzacije kromosoma, crossovera, separacije rekombiniranih kromosoma te zamjeni histona (Dokshin i sur., 2020). Time, iako nije utvrđeno u kojim tkivima *Zatt* ima glavnu ulogu u popravku Top2-DPC-a, može se nagađati kako je važan u očuvanju stabilnosti genoma germinativnih stanica. Nadalje, s obzirom da je poznato kako je funkcija *Tdp2* enzima važna za popravak Top2-DPC oštećenja u neuronima te kako je aktivnost proteina *Tdp2* krucijalna u pravilnom funkcioniranju moždanog tkiva (Sun i sur., 2020a; McKinnon, 2017), može se pretpostaviti da *Zatt* svoju funkciju ispoljava upravo u moždanom tkivu. O uvjetima, u kojima stanica koristi mehanizam koji uključuje *Zatt* za popravak Top2-DPC oštećenja, malo je poznato. U budućim istraživanjima potrebno je utvrditi je li mehanizam reguliran fazom staničnog ciklusa, s obzirom da G2 i M faze staničnog ciklusa zahtijevaju visoku ekspresiju Top2 (Dokshin i sur., 2020) te s obzirom da se pokazalo kako su Top2 tijekom mitoze u većoj mjeri kovalentno modificirane uz SUMO (Zagnoli-Vieira i Caldecott, 2017).

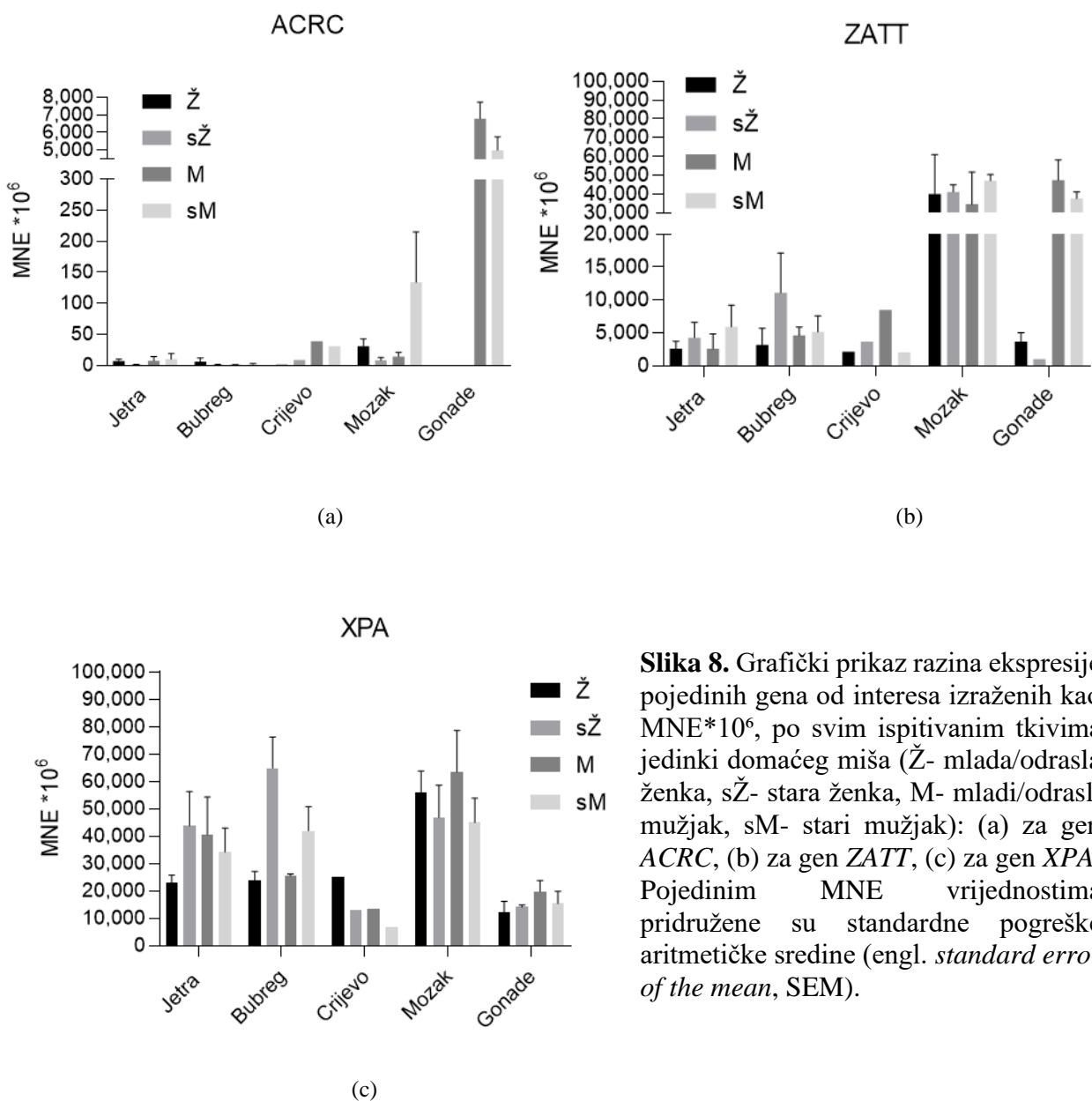
XPA i *ZATT* pokazuju znatno više razine ekspresije u tkivima miša u odnosu na *ACRC* gen. Primjerice, u testisu mladog mušjaka, koji predstavlja tkivo s najvišom razinom ekspresije *ACRC* gena (slika 8a, $MNE \cdot 10^6 = 6.778 \pm 942$), vrijednost $MNE \cdot 10^6$ za *XPA* iznosi 19.863 ± 2.317 (slika 8c), a za *ZATT* čak 47.310 ± 6.241 (slika 8b).

Što se tiče tkiva odrasle ženke, *ZATT* je najviše eksprimiran u tkivu mozga (slika 8b, $MNE \cdot 10^6 = 40.065 \pm 14.785$). U ostalim tkivima odrasle ženke *ZATT* je otprilike podjednako eksprimiran i to u razinama značajnije manjima od razine ekspresije u mozgu. U tkivu jajnika mlade ženke

ZATT je eksprimiran 10,9 puta manje u odnosu na mozak ($MNE*10^6 = 3.669 \pm 960$, slika 8b) te jajnik predstavlja drugo tkivo po razini ekspresije. Zatim slijedi bubreg, u kojemu je ekspresija niža 1,2 puta u odnosu na jajnik, potom jetra s razinom ekspresije 1,4 puta manjom od one u tkivu jajnika, a na zadnjem mjestu prema razini ekspresije nalazi se tkivo crijeva (1,7 puta manja ekspresija u odnosu za tkivo jajnika). Kao i kod odrasle ženke, za tkivo mozga stare ženke karakteristična je najviša razina ekspresije *ZATT* gena ($MNE*10^6 = 41.143 \pm 2.589$, slika 8b). Drugo mjesto po razini ekspresije zauzima tkivo bubrega, u kojemu je 3,7 puta manja ekspresija *ZATT*-a u odnosu na mozak. Zatim slijede tkiva jetre i crijeva, u kojima je ekspresija 2,6, odnosno 3,0 puta niža u odnosu na tkivo bubrega, a najniža razina ekspresije prisutna je u tkivu jajnika (slika 8b, $MNE*10^6 = 991 \pm 7$), čak 11,2 puta niža u odnosu na tkivo bubrega.

Prema slici 8b, najviše razine ekspresije *ZATT* gena kod odraslog i starog mužjaka karakteristične su za tkiva testisa i mozga, a u ostalim tkivima ekspresija gena je znatno niža. Kod odraslog mužjaka, *ZATT* je najviše eksprimiran u testisu ($MNE*10^6 = 47.310 \pm 6.241$), a zatim u mozgu ($MNE*10^6 = 34.589 \pm 9.869$). Potom slijede tkiva nižih razina ekspresije: crijevo (u kojemu je *ZATT* 4,1 puta niže eksprimiran u odnosu na mozak), bubreg (u kojemu je ekspresija niža za 7,5 puta u odnosu na mozak) te tkivo jetre, s 13,3 puta manjom ekspresijom u odnosu na mozak ($MNE*10^6 = 2.592 \pm 1.304$). Najviša razina ekspresije kod starog mužjaka karakteristična je za tkivo mozga ($MNE*10^6 = 47.050 \pm 2.356$), a zatim slijedi tkivo testisa ($MNE*10^6 = 37.646 \pm 2.360$) (slika 8b). U odnosu na tkivo testisa, u jetri starog mužjaka ekspresija je niža za 6,4 puta, a u bubregu starog mužjaka za 7,3 puta. Najniža ekspresija *ZATT*-a je u tkivu crijeva starog mužjaka ($MNE*10^6 = 2.053$), gdje je ekspresija niža 18,3 puta u odnosu na tkivo testisa.

Kada govorimo o doprinosu NER-a u popravku DPC oštećenja, veličina DPC-a predstavlja kriterij pri odabiru tog puta popravka, s obzirom da se uz NER uspješno uklanjaju samo adukti manjih masa (do 12-14 kDa) (Zhang i sur., 2020). Stoga se pretpostavlja kako NER uklanja manja DPC oštećenja tijekom cijelog staničnog ciklusa, a osim toga ima ulogu u uklanjanju peptidnih ostataka na DNA, zaostalih nakon proteolize DPC oštećenja (Kühbacher i Duxin, 2020). S obzirom da je NER jedan od osnovnih mehanizama zaštite integriteta genoma stanice, radi mogućnosti eliminacije širokog spektra oštećenja koji uzrokuju distorziju uzvojnice DNA (Cheng i sur., 1999), za pretpostaviti je kako će određena razina ekspresije *XPA* gena biti prisutna u svim ispitivanim tkivima miša. U narednim istraživanjima, potrebno je utvrditi sudjeluje li NER u popravku DPC oštećenja u svim tkivima u jednakoj mjeri ili postoje određene razlike među tkivima.



Slika 8. Grafički prikaz razina ekspresije pojedinih gena od interesa izraženih kao $MNE \cdot 10^6$, po svim ispitivanim tkivima jedinki domaćeg miša (Ž- mlada/odrasla ženka, sŽ- stara ženka, M- mladi/odrasli mužjak, sM- stari mužjak): (a) za gen *ACRC*, (b) za gen *ZATT*, (c) za gen *XPA*. Pojedininim MNE vrijednostima pridružene su standardne pogreške aritmetičke sredine (engl. *standard error of the mean*, SEM).

Slika 8c prikazuje razine ekspresije gena *XPA* u svim tkivima analiziranim u ovome radu. Može se uočiti kako su razine u svim tkivima značajne, kao i kod gena *ZATT*, a osim toga, u određenim tkivima razine ekspresije gena *XPA* znatno su više od razina *ZATT*-a. Najviša razina ekspresije *XPA* gena kod odrasle ženke prisutna je u tkivu mozga ($MNE \cdot 10^6 = 56.018 \pm 7.877$). Nakon mozga, po razini ekspresije slijede tkiva crijeva, bubreĝa i jetre, u kojima su razine ekspresije *XPA*-a vrlo slične. U crijevu je ekspresija 2,2 puta manja, a u bubreĝu i jetri 2,4 puta manja u odnosu na mozak odrasle ženke. *XPA* je najniže ekspimiran u jajniku odrasle ženke ($MNE \cdot 10^6 = 12.359 \pm 3.967$), što je otprilike 4,5 puta manja ekspresija u odnosu na tkivo mozga.

S druge strane, najviša razina ekspresije u tkivima stare ženke pripisuje se tkivu bubrega ($MNE \cdot 10^6 = 64.990 \pm 11.279$). Nadalje, 1,4 puta manja ekspresija prisutna je u tkivu mozga stare ženke ($MNE \cdot 10^6 = 46.866 \pm 11.803$), a zatim slijedi tkivo jetre ($MNE \cdot 10^6 = 43.872 \pm 12.522$), u kojemu je 1,5 puta niža ekspresija u odnosu na tkivo bubrega. Preostala dva tkiva sadržavaju znatno niže razine ekspresije u odnosu na treće rangirano tkivo jetre; u jajniku ekspresija *XPA*-a je 3,1 puta niža u odnosu na jetru, a u crijevu 3,3 puta niža u odnosu na jetru.

Kod mladog mužjaka domaćeg miša, prema slici 8c, *XPA* ima najvišu razinu ekspresije u tkivu mozga ($MNE \cdot 10^6 = 63.557 \pm 10.728$). Nakon mozga, prema razini ekspresije, slijedi jetra, gdje je gen eksprimiran 1,6 puta manje, a potom bubreg, gdje je gen eksprimiran 2,5 puta manje u odnosu na mozak. U testisu mladog mužjaka gen je eksprimiran 3,2 puta manje, a u crijevu kojeg krasi najniža razina ekspresije, gen je eksprimiran 4,7 puta manje u odnosu na mozak ($MNE \cdot 10^6 = 13.421$). Kao i kod mladog mužjaka, u tkivu mozga starog mužjaka *XPA* je najviše eksprimiran ($MNE \cdot 10^6 = 45.013 \pm 8.985$). Drugo mjesto zauzima tkivo bubrega te potom slijedi jetra, u kojima je svega 1,1 puta odnosno 1,3 puta niža ekspresija gena u odnosu na mozak. Preostalo četvrto i peto mjesto prema razinama ekspresije, kao i kod mladog mužjaka, zauzimaju tkiva testisa i crijeva. U testisu starog mužjaka *XPA* je eksprimiran 2,9 puta manje u odnosu na mozak ($MNE \cdot 10^6 = 15.447 \pm 4.411$), a u crijevu starog mužjaka 6,6 puta manje u odnosu na mozak ($MNE \cdot 10^6 = 6828$).

Na temelju dobivenih vrijednosti, razine ekspresije su postavljene kako slijedi (Lončar i sur., 2016):

- i) **gen je nisko eksprimiran** ako je $MNE \cdot 10^6$ manja ili jednaka 124 (što odgovara Ct vrijednosti ≥ 27),
- ii) **gen je umjereno eksprimiran** ako je $MNE \cdot 10^6$ između 125 i 995 (što odgovara Ct vrijednosti između 24 i 26, uključujući 24 i 26),
- iii) **gen je umjereno visoko eksprimiran** ukoliko je $MNE \cdot 10^6$ između 996 i 7831 (što odgovara Ct vrijednosti između 21 i 23, uključujući 21 i 23),
- iv) **gen je visoko eksprimiran** ako je $MNE \cdot 10^6$ između 7832 i 31 202 (što odgovara Ct vrijednosti između 19 i 20, uključujući 19 i 20),
- v) **gen je jako visoko eksprimiran** ako je $MNE \cdot 10^6$ veća ili jednaka 31 203 (što odgovara Ct vrijednosti ≤ 18).

ACRC je nisko eksprimiran u jetri, bubregu, crijevu i jajniku svih jedinki te u mozgu ženki i mladog mužjaka, dok je umjereno eksprimiran u mozgu starog mužjaka te umjereno visoko u

testisima (slika 8a, tablica 8). *XPA* i *ZATT* su značajno više eksprimirani u odnosu na *ACRC*. *XPA* je umjereno visoko eksprimiran u crijevu starog mušjaka, visoko eksprimiran u jetri mlade ženke, bubregu mladih jedinki, crijevu ženki i mladog mušjaka te u gonadama, a jako visoko eksprimiran u jetri stare ženke i mladog te starog mušjaka, bubregu starih ženki te mozgu svih jedinki (slika 8c, tablica 8). *ZATT* je umjereno eksprimiran u jajniku stare ženke, umjereno visoko eksprimiran u jajniku mlade ženke, crijevu ženki i mladog mušjaka, bubregu mušjaka i mlade ženke te u jetri svih jedinki, visoko eksprimiran u bubregu stare ženke i crijevu mladog mušjaka, a jako visoka ekspresija *ZATT*-a prisutna je u mozgu i testisima (slika 8b, tablica 8).

Tablica 8. Razmjeri ekspresije gena od interesa u tkivima mlade ženke (Ž), stare ženke (sŽ), mladog mušjaka (M) i starog mušjaka (sM) domaćeg miša: N- niska ekspresija, U- umjerena ekspresija, UV- umjereno visoka ekspresija, V- visoka ekspresija, JV- jako visoka ekspresija.

	ACRC				XPA				ZATT			
	Ž	sŽ	M	sM	Ž	sŽ	M	sM	Ž	sŽ	M	sM
Jetra	N	N	N	N	V	JV	JV	JV	UV	UV	UV	UV
Bubreg	N	N	N	N	V	JV	V	JV	UV	V	UV	UV
Crijevo	N	N	N	N	V	V	V	UV	UV	UV	V	UV
Mozak	N	N	N	U	JV	JV	JV	JV	JV	JV	JV	JV
Jajnik	N	N			V	V			UV	U		
Testis			UV	UV			V	V			JV	JV

U nastavku slijede detaljne usporedbe razina ekspresija gena od interesa između odraslih i starih jedinki domaćeg miša, usporedbe ekspresije u odnosu na spol, kao i međusobna usporedba ekspresije gena od interesa, po tkivima jedinki domaćeg miša.

4.4.1. Usporedba ekspresije gena od interesa između odraslih i starih jedinki

4.4.1.1. Usporedba ekspresije ACRC gena između odraslih i starih jedinki

Kako je prethodno istaknuto, *ACRC* je, uz iznimku testisa, u većini tkiva vrlo nisko ekspimiran. Ali usprkos tome, određene razlike u ekspresiji između jedinki ipak su vidljive. Usporedbom razina ekspresije *ACRC*-a u pojedinim tkivima mlade i stare ženke domaćeg miša dobiveni su slijedeći rezultati (slika 8a): za tkivo crijeva je pokazana najveća razlika u razini ekspresije u odnosu na dob ženke; 10,9 puta je ekspresija *ACRC*-a veća kod stare ženke u odnosu na mladu ($MNE \cdot 10^6$ stare ženke = 0,8; $MNE \cdot 10^6$ mlade ženke = 8,7). Za razliku od crijeva, kod ostalih tkiva je uočena manja razina ekspresije gena kod stare jedinke u odnosu na mladu; u jetri je 8 puta manja ($MNE \cdot 10^6$ mlade ženke = $7,2 \pm 2,9$; $MNE \cdot 10^6$ stare ženke = $0,9 \pm 0,7$), u bubregu 7,5 puta manja ($MNE \cdot 10^6$ mlade ženke = $6,0 \pm 5,7$; $MNE \cdot 10^6$ stare ženke = $0,8 \pm 0,7$), u mozgu 3,7 puta manja ($MNE \cdot 10^6$ mlade ženke = $30,9 \pm 11,8$; $MNE \cdot 10^6$ stare ženke = $8,3 \pm 4,7$), a u jajniku 3,3 puta manja ekspresija gena *ACRC* u staroj u odnosu na mladu ženku ($MNE \cdot 10^6$ mlade ženke = $0,1 \pm 0,04$; $MNE \cdot 10^6$ stare ženke = $0,03 \pm 0,02$). Radi malog broja bioloških uzoraka u ovome radu, ne može se utvrditi jesu li dobivene razlike značajne, zbog čega je potrebno u budućim istraživanjima povećati broj jedinki. Međutim, s obzirom na zadovoljavajuće SEM vrijednosti dobivene za tkiva jetre, mozga i jajnika, može se zaključiti da su razlike u navedenim tkivima među ženskim jedinkama značajne. Također, prema rezultatima za crijevo, postoji značajna razlika u ekspresiji *ACRC* gena, ali navedeno je potrebno utvrditi povećanjem broja jedinki, s obzirom na prisutnost monoplikata za ženska tkiva.

Najveća razlika u ekspresiji *ACRC* gena između mladog i starog mužjaka uočena je u tkivu mozga; stari mužjak ima 9,4 puta višu razinu ekspresije (slika 8a, $MNE \cdot 10^6$ starog mužjaka = $133,8 \pm 81,0$; $MNE \cdot 10^6$ mladog mužjaka = $14,2 \pm 6,7$). Ali, prema navedenim SEM vrijednostima, koje značajno variraju među biološkim triplikatima, za utvrđivanje razlika u ekspresiji *ACRC*-a u mozgu, potrebno je uključiti veći broj jedinki. U tkivima jetre (slika 8a, $MNE \cdot 10^6$ starog mužjaka = $9,8 \pm 9,0$; $MNE \cdot 10^6$ mladog mužjaka = $7,4 \pm 7,0$) i bubrega (slika 8a, $MNE \cdot 10^6$ starog mužjaka = $1,6 \pm 1,1$; $MNE \cdot 10^6$ mladog mužjaka = $0,9 \pm 0,4$) razlika u ekspresiji *ACRC*-a nije velika, a prema dobivenim SEM vrijednostima, koje se poklapaju, nije ni značajna. Monoplikati crijeva (slika 8a, $MNE \cdot 10^6$ mladog mužjaka = 38,6; $MNE \cdot 10^6$ starog mužjaka = 30,9) ne pokazuje veliku razliku u ekspresiji *ACRC*-a. U testisu, u kojemu je razina *ACRC*-a najviša kod obje jedinke, razina ekspresije gena je veća 1,4 puta kod mlade jedinke u odnosu na staru ($MNE \cdot 10^6$ mladog mužjaka = 6.778 ± 942 ; $MNE \cdot 10^6$ starog mužjaka = 4.994 ± 761). Na temelju SEM vrijednosti, postoji mala razlika u ekspresiji *ACRC*-a u testisu.

Prema prethodno iznesenim rezultatima, razina ekspresije *ACRC* gena značajno se smanjuje sa starenjem u ženskim tkivima jetre (8 puta), mozga (3,7 puta) i ovarija (3,3 puta), dok se povećava sa starenjem u crijevu (10,9 puta). S druge strane, kod mužjaka bitne razlike u ekspresiji *ACRC*-a starenjem uočene su samo u testisu (blago smanjenje starenjem 1,4 puta) (slika 8a, tablica 8).

4.4.1.2. Usporedba ekspresije gena *ZATT* između odraslih i starih jedinki

Rezultati dobivenih razina ekspresije gena *ZATT*, u tkivima mladih i starih ženki i mužjaka domaćeg miša, prikazani su na slici 8b. Na grafičkom prikazu, vidljivo je kako je *ZATT* općenito značajnije eksprimiran u korištenim tkivima, u odnosu na *ACRC*, zbog čega se i lakše uočavaju razlike u ekspresiji između mladih i starih jedinki.

Usporedbom ekspresije gena *ZATT* u ženskim tkivima prema dobi, može se zaključiti kako su u tkivu jajnika i tkivu bubrega najviše razlike u razinama ekspresije između mlade i stare ženke. Dakle, u tkivu jajnika stare ženke 3,7 puta je manja ekspresija *ZATT*-a u odnosu na odraslu ženku ($MNE \cdot 10^6$ stare ženke = 991 ± 7 ; $MNE \cdot 10^6$ mlade ženke = 3.669 ± 960), a u tkivu bubrega stare ženke 3,5 puta je veća ekspresija *ZATT*-a u odnosu na odraslu ženku ($MNE \cdot 10^6$ stare ženke = 11.066 ± 4.283 ; $MNE \cdot 10^6$ mlade ženke = 3.174 ± 1.448). Prema zadovoljavajućim SEM vrijednostima za tkivo jajnika i bubrega, navedene razlike u ekspresiji *ZATT*-a su značajne. Nadalje, u tkivima jetre i crijeva pokazana je nešto veća razina ekspresije kod stare ženke u odnosu na mladu, ali u oba slučaja 1,7 puta (u jetri, $MNE \cdot 10^6$ za staru ženku = 4.272 ± 1.354 ; $MNE \cdot 10^6$ za mladu ženku = 2.563 ± 679 , a u crijevu $MNE \cdot 10^6$ za staru ženku = 3.675 ; $MNE \cdot 10^6$ za mladu ženku = 2.149). Razine ekspresije *ZATT*-a u tkivima mozga odrasle i stare ženke približno su jednake, s obzirom na preklapanje dobivenih SEM vrijednosti ($MNE \cdot 10^6$ mlade ženke = 40.065 ± 14.785 ; $MNE \cdot 10^6$ stare ženke = 41.143 ± 2.589).

Najveća razlika u ekspresiji gena *ZATT* između odraslog i starog mužjaka vidljiva je u tkivu crijeva, gdje je ekspresija 4,1 puta veća u mladom u odnosu na starog mužjaka ($MNE \cdot 10^6$ mladog mužjaka = 8.490 ; $MNE \cdot 10^6$ starog mužjaka = 2.053). U testisu, kao i u crijevu, veća razina ekspresije prisutna je kod mladog mužjaka, ali samo 1,3 puta ($MNE \cdot 10^6$ mladog mužjaka = 47.310 ± 6.241 ; $MNE \cdot 10^6$ starog mužjaka = 37.646 ± 2.360). Iako su SEM vrijednosti zadovoljavajuće, razlika u ekspresiji od 1,3 puta nije značajna. U jetri je prisutna značajnija razlika u ekspresiji *ZATT*-a, gdje je kod starog mužjaka 2,3 puta viša ekspresija ($MNE \cdot 10^6$ starog mužjaka = 5.916 ± 1.895 ; $MNE \cdot 10^6$ mladog mužjaka = 2.592 ± 1.304), dok su u bubregu ($MNE \cdot 10^6$ starog mužjaka = 5.136 ± 1.413 ; $MNE \cdot 10^6$ mladog mužjaka = 4.591 ± 745) i mozgu

(MNE*10⁶ starog mužjaka= 47.050±2.356; MNE*10⁶ mladog mužjaka= 34.589±9.869) razine ekspresije otprilike jednake kod mlade i stare jedinke.

Na temelju rezultata ženskih tkiva (slika 8b, tablica 8), ekspresija *ZATT*-a u tkivima mozga, jetre i crijeva približno je jednaka kod mladih i starih ženki, dok se ekspresija *ZATT* gena starenjem, u jajniku vidljivo smanjenje (3,7 puta), a u bubregu povećava (3,5 puta). Ekspresija *ZATT*-a u tkivima testisa, bubrega i mozga približno je jednaka kod mladih i starih mužjaka, dok se u crijevu ekspresija značajno smanjuje (4,1 puta), a u jetri značajno povećava starenjem (2,3 puta) (slika 8b, tablica 8).

4.4.1.3. Usporedba ekspresije gena *XPA* između odraslih i starih jedinki

Usporedbom ekspresija *XPA* gena između mlade i stare ženke (slika 8c, tablica 8), vidljivo je da je najveća razlika u ekspresiji karakteristična za tkivo bubrega, u kojemu je ekspresija 2,7 puta veća kod stare u odnosu na mladu ženku (MNE*10⁶ stare ženke= 64.990±11.279; MNE*10⁶ mlade ženke= 23.832±3.413). Približno dvostruka razlika u ekspresiji između mlade i stare ženke karakteristična je za tkiva jetre i crijeva; u jetri *XPA* je 1,9 puta više eksprimiran u staroj jedinci (MNE*10⁶ stare jedinke= 43.872±12.522; MNE*10⁶ mlade jedinke= 22.972±2.928), dok je u crijevu 1,9 puta viša ekspresija prisutna u tkivu mlade jedinke (MNE*10⁶ stare jedinke= 13.231; MNE*10⁶ mlade jedinke= 25.179). Zadovoljavajuće SEM vrijednosti, ukazuju na značajnost prethodno navedenih razlika u ekspresiji. U tkivu mozga gen je eksprimiran 1,2 puta više kod mlade ženke (MNE*10⁶ mlade ženke= 56.018±7.877; MNE*10⁶ stare ženke= 46.866±11.803), dok je u tkivu jajnika gen eksprimiran 1,2 puta manje kod mlade u odnosu na staru ženku (MNE*10⁶ mlade ženke= 12.359±3.967; MNE*10⁶ stare ženke= 14.221±683). Zbog međusobnog preklapanja SEM vrijednosti, može se zaključiti kako starenjem ne dolazi do promjene razine *XPA* gena u tkivu mozga i jajnika ženke.

Usporedbom vrijednosti MNE*10⁶ za pojedina tkiva mladog i starog mužjaka, najveća razlika u ekspresiji gena *XPA*, karakteristična je za tkivo crijeva, gdje je razina ekspresije gena duplo veća kod mladog u odnosu na starog mužjaka (MNE*10⁶ mladog mužjaka= 13.421; MNE*10⁶ starog mužjaka= 6.828). U svrhu potvrde rezultata dobivenih za crijevo, potrebno je u budućim eksperimentima uvrstiti veći broj jedinki. U tkivima jetre, testisa i mozga, također je ekspresija veća kod mladog mužjaka u odnosu na starog, ali u nižoj mjeri: u jetri 1,2 puta (MNE*10⁶ mladog mužjaka= 40.607±7.936; MNE*10⁶ starog mužjaka= 34.327±8.756), u testisu 1,3 puta (MNE*10⁶ mladog mužjaka= 19.863±2.317; MNE*10⁶ starog mužjaka= 15.447±4.411), a u mozgu 1,4 puta (MNE*10⁶ mladog mužjaka= 63.557±10.728; MNE*10⁶ starog mužjaka= 45.013±8.985). Zbog preklapanja SEM vrijednosti, razlike u ekspresiji *XPA*-a prema dobi u

jetri, testisu i mozgu mužjaka nisu značajne. Za tkivo bubrega pokazano je da je ekspresija gena veća kod starog mužjaka u odnosu na mladog, za otprilike 1,6 puta ($MNE \cdot 10^6$ starog mužjaka = 42.055 ± 8.838 ; $MNE \cdot 10^6$ mladog mužjaka = 25.622 ± 372).

Rezultati ekspresije *XPA*-a kod ženki ukazuju na značajno povećanje ekspresije gena sa starenjem u bubregu (2,7 puta) i u jetri (1,9 puta), dok se ekspresija gena starenjem u crijevu smanjuje (1,9 puta) (slika 8c, tablica 8). U mozgu i jajniku ženke ekspresija gena *XPA* ne mijenja se s povećanjem dobi. Kod muških tkiva zabilježeno je smanjenje ekspresije gena *XPA* u crijevu (2,0 puta) te povećanje ekspresije *XPA*-a u bubregu (1,6 puta), s povećanjem dobi. U jetri, mozgu i testisu mužjaka gen je jednako eksprimiran kod mladih i starih jedinki (slika 8c, tablica 8).

4.4.2. Usporedba ekspresije gena od interesa između mužjaka i ženki

Razlike u ekspresiji gena prema spolu prikazane su na slici 8 i tablici 8. Unatoč tome što je *ACRC* nisko eksprimiran u svim tkivima, osim u mozgu starog mužjaka (umjereno) i testisima (umjereno visoko), mogu se uočiti određene spolne razlike u ekspresiji. Najveća razlika u ekspresiji gena karakteristična je za tkivo gonada. U testisu mladog mužjaka *ACRC* je 67.780 puta više eksprimiran u odnosu na jajnik mlade ženke ($MNE \cdot 10^6$ mladog mužjaka = 6.778 ± 942 ; $MNE \cdot 10^6$ mlade ženke = $0,1 \pm 0,04$), dok je u testisu starog mužjaka *ACRC* čak 166.466 puta više eksprimiran u odnosu na jajnik stare ženke ($MNE \cdot 10^6$ mladog mužjaka = 4.994 ± 761 ; $MNE \cdot 10^6$ mlade ženke = $0,03 \pm 0,02$), što predstavlja i najveću razliku u ekspresiji po spolu uopće u ovome radu. U crijevu mladog mužjaka, *ACRC* je 48,3 puta više eksprimiran u odnosu na mladu ženku ($MNE \cdot 10^6$ mladog mužjaka = 38,6; $MNE \cdot 10^6$ mlade ženke = 0,8). U tkivima bubrega ($MNE \cdot 10^6$ mlade ženke = $6,0 \pm 5,7$; $MNE \cdot 10^6$ mladog mužjaka = $0,9 \pm 0,4$) i mozga ($MNE \cdot 10^6$ mlade ženke = $30,9 \pm 11,8$; $MNE \cdot 10^6$ mladog mužjaka = $14,2 \pm 6,7$) gen je više eksprimiran kod mlade ženke, ali s obzirom na velike varijacije u SEM vrijednostima, razlike nisu pouzdane. Razine ekspresije *ACRC*-a u jetri mladog mužjaka i ženke približno su jednake (slika 8a). Nadalje, rezultati za ostatak tkiva starih ženki i mužjaka pokazuju da su razine *ACRC*-a u bubregu jedinki približno jednake, a da je u crijevu viša ekspresija karakteristična za starog mužjaka ($MNE \cdot 10^6$ starog mužjaka = 30,9; $MNE \cdot 10^6$ stare ženke = 8,7). U jetri starih jedinki prisutne su znatne varijacije u dobivenim vrijednostima ($MNE \cdot 10^6$ stare ženke = $0,9 \pm 0,7$; $MNE \cdot 10^6$ starog mužjaka = $9,8 \pm 9,0$), zbog čega se pretpostavlja kako razlika u ekspresiji nije značajna. Tkivo mozga također obilježavaju znatne varijacije kod starih jedinki ($MNE \cdot 10^6$

stare ženke= $8,3 \pm 4,7$; $MNE \cdot 10^6$ starog mušjaka= $133,8 \pm 81,0$), ali viša razina ekspresije gena vidljiva je u tkivu starog mušjaka.

Za razliku od *ACRC*-a, *ZATT* je umjereno visoko do jako visoko eksprimiran u većini tkiva (slika 8b, tablica 8). U jetri, bubregu i mozgu, *ZATT* je otprilike jednako eksprimiran kod mladog mušjaka i mlade ženke (tablica 8, slika 8b), a u preostala dva tkiva, pokazana je viša ekspresija kod mladog mušjaka, u odnosu na mladu ženku: u crijevu 4,0 puta ($MNE \cdot 10^6$ mladog mušjaka= 8.490; $MNE \cdot 10^6$ mlade ženke= 2.149), a u gonadama čak 12,9 puta ($MNE \cdot 10^6$ mladog mušjaka= 47.310 ± 6.241 ; $MNE \cdot 10^6$ mlade ženke= 3.669 ± 960) (slika 8b). Najveća razlika u ekspresiji *ZATT*-a između stare ženke i mušjaka također je karakteristična za gonade; stari mušjak ima čak 38,0 puta višu ekspresiju u odnosu na staru ženku ($MNE \cdot 10^6$ starog mušjaka= 37.646 ± 2.360 ; $MNE \cdot 10^6$ stare ženke= 991 ± 7). Također, u bubregu je prisutna značajna razlika u ekspresiji gena kod stare ženke i mušjaka; 2,2 puta viša je ekspresija u tkivu ženke ($MNE \cdot 10^6$ stare ženke= 11.066 ± 4.283 ; $MNE \cdot 10^6$ starog mušjaka= 5.136 ± 1.413). U mozgu, jetri i crijevu starih jedinki ekspresija *ZATT*-a nije ovisna o spolu (slika 8b, tablica 8).

Gen *XPA* je u većini tkiva eksprimiran visoko do jako visoko, a u svim tkivima između mladih ženki i mušjaka te između starih ženki i mušjaka nisu primijećene velike razlike u ekspresiji gena (slika 8c, tablica 8). Najveća razlika u ekspresiji *XPA* gena između mladog mušjaka i ženke domaćeg miša prisutna je u crijevu; gen je 1,9 puta više eksprimiran kod ženke ($MNE \cdot 10^6$ mlade ženke= 25.179; $MNE \cdot 10^6$ mladog mušjaka= 13.421). U tkivima jetre i gonada, gen je u većoj mjeri eksprimiran kod mladog mušjaka u odnosu na ženku; u jetri 1,8 puta više, u gonadama 1,6 puta više (slika 8c). Na kraju, *XPA* je jednako eksprimiran kod mlade ženke i mušjaka u tkivima mozga i bubrega (slika 8c). Što se tiče starih jedinki, gen *XPA* jednako je eksprimiran u tkivima gonada, mozga i jetre (slika 8c, tablica 8). U crijevu i bubregu vidljiva je viša razina ekspresije *XPA*-a kod stare ženke u odnosu na starog mušjaka: u crijevu 1,9 puta ($MNE \cdot 10^6$ stare ženke= 13.231; $MNE \cdot 10^6$ starog mušjaka= 6.828), a u bubregu 1,5 puta ($MNE \cdot 10^6$ stare ženke= 64.990 ± 11.279 ; $MNE \cdot 10^6$ starog mušjaka= 42.055 ± 8.838).

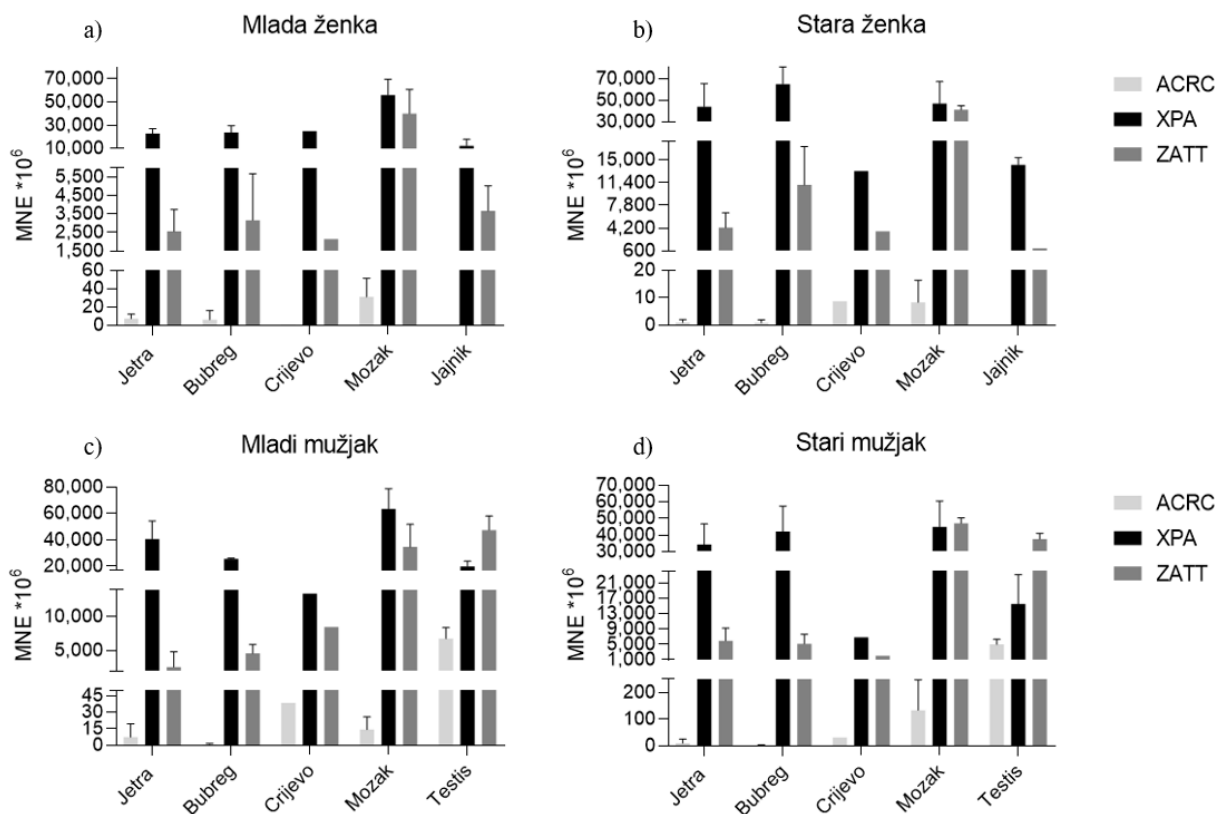
4.4.3. Usporedba ekspresije gena *ACRC*, *ZATT* i *XPA* u tkivima jedinki miša

Kako je prethodno istaknuto, razine ekspresije triju gena od interesa vidljivo se razlikuju po promatranim tkivima. Primjerice, ekspresija *ACRC*-a zamjetno je niža od ekspresije *ZATT* i *XPA* gena (tablica 8). Iz tog razloga, u svrhu kvantifikacije razlika u ekspresiji triju gena od

interesa, u nastavku su prikazane razine ekspresije gena *ACRC*, *ZATT* i *XPA* po tkivima jedinki domaćeg miša; mlade ženke, stare ženke te mladog mužjaka i starog mužjaka (slika 9a-d).

Kod mlade ženke miša, u jetri, bubregu, crijevu i jajniku, ekspresija *XPA* gena je visoka, a ekspresija *ZATT*-a umjereno visoka (tablica 8). Ekspresija *ACRC*-a je niska u svim tkivima mlade ženke (slika 9a, tablica 8). Ekspresija *XPA*-a je u crijevu 11,7 puta veća od *ZATT*-a, u jetri 9 puta veća, a u bubregu 7,5 puta veća od *ZATT* gena. *ACRC* u istim tkivima ima najnižu razinu ekspresije: u crijevu čak 2686 puta nižu od *ZATT*-a, u bubregu 529 puta nižu te u jetri 356 puta nižu od *ZATT*-a, (slika 9a). U jajniku *XPA* je 3,4 puta više ekspimiran u odnosu na *ZATT*, dok je razina *ACRC*-a gotovo jednaka nuli (slika 9a, tablica 8). U mozgu sva tri gena imaju najvišu razinu ekspresije kod mlade ženke. Usprkos tome, *ACRC* je čak 1292 puta niže ekspimiran u usporedbi sa *ZATT*-om, dok su *ZATT* i *XPA* približno jednako i vrlo visoko ekspimirani (slika 9a, tablica 8).

Ekspresijski profili stare ženke miša slični su rezultatima dobivenim za mladu ženku. *ACRC* je u svim tkivima stare ženke nisko ekspimiran, s vrlo niskim $MNE \cdot 10^6$ vrijednostima u svim tkivima, dok *ZATT* i *XPA* pokazuju umjereno visoke do jako visoke razine ekspresije (tablica 8). U tkivu mozga stare ženke, *XPA* i *ZATT* geni približno su jednako, jako visoko ekspimirani (slika 9b, tablica 8). U crijevu, *ZATT* je umjereno visoko, a *XPA* visoko ekspimiran, s razlikom od 3,6 puta (slika 9b, tablica 8). U bubregu stare ženke razlika u ekspresiji jako visoko ekspimiranog *XPA* i visoko ekspimiranog *ZATT*-a iznosi 5,9 puta, dok su u jetri *XPA* i *ZATT* jako visoko i umjereno visoko ekspimirani, uz razliku od 10,3 puta (slika 9b, tablica 8). Najveća razlika u ekspresiji visoko ekspimiranog *XPA*-a i umjereno ekspimiranog *ZATT*-a kod stare ženke vidljiva je u jajniku te iznosi 14,4 puta (slika 9b, tablica 8).



Slika 9. Međusobna usporedba ekspresije gena *ACRC*, *XPA* i *ZATT* po tkivima pojedinih jedinki domaćeg miša: a) mlada ženka, b) stara ženka, c) mladi mužjak, d) stari mužjak.

Kod mladoga mužjaka najveća razlika u ekspresiji *XPA* i *ZATT* gena zabilježena je u jetri, gdje jako visoko ekspimirani *XPA* ima 15,7 puta višu ekspresiju od umjereno visoko ekspimiranog *ZATT*-a. U istome tkivu, *ACRC* je nisko ekspimiran, 350 puta niže od *ZATT* gena (slika 9c, tablica 8). U bubrežju je razina ekspresije *ZATT*-a također umjereno visoka, 5,6 puta niža od visoko ekspimiranog *XPA*-a te čak 5101 puta viša u odnosu na nisku razinu ekspresije *ACRC*-a (slika 9c, tablica 8). U crijevu su *XPA* i *ZATT* približno jednako ekspimirani (slika 9c), s visokom razinom ekspresije (tablica 8), dok je *ACRC* 220-348 puta niže ekspimiran od *XPA* i *ZATT* gena (slika 9c). U mozgu mladog mužjaka, *XPA* i *ZATT* su također približno jednako ekspimirani, ovoga puta s jako visokom razinom ekspresije, dok je *ACRC* ponovno nisko ekspimiran (tablica 8). Tkivo testisa jedino je tkivo mladog mužjaka u kojemu *XPA* nije na prvome mjestu po ekspresiji (slika 9c). U testisu je *ZATT* jako visoko ekspimiran te u muškim tkivima općenito ima najvišu razinu ekspresije, čak 2,4 puta veću od *XPA*-a koji je visoko ekspimiran (slika 9c, tablica 8). *ACRC* ima umjereno visoku razinu ekspresije u testisu mladog mužjaka zbog čega je 7 puta niže ekspimiran od *ZATT*-a, a samo 2,9 puta niže ekspimiran u odnosu na *XPA*, što čini najmanju razliku u ekspresiji tih dvaju gena (slika 9c).

U jetri i bubregu starog mužjaka miša, *XPA* ima jako visoku, *ZATT* umjereno visoku, a *ACRC* nisku razinu ekspresije (tablica 8). *XPA* je u bubregu 8,2 puta, u jetri 5,8 puta, a u crijevu 3,3 puta veće ekspresije od *ZATT*-a. *ACRC* je u tim tkivima 3210, 604, odnosno 66 puta niže eksprimiran od *ZATT*-a (slika 9d). U mozgu starog mužjaka, *ZATT* i *XPA* imaju približno jednaku, jako visoku razinu ekspresije, dok je *ACRC* umjereno eksprimiran (tablica 8) i to 336 puta niže od druga dva gena (slika 9d). U testisu *ZATT* ima jako visoku, a *XPA* visoku razinu ekspresije, dok je *ACRC*, kao i kod mladog mužjaka, umjereno visoko eksprimiran (tablica 8). Zahvaljujući relativno visokoj ekspresiji *ACRC*-a u testisu starog mužjaka, *ZATT* je u testisu eksprimiran 7,5 puta više od *ACRC*-a te 2,4 puta više od *XPA*-a (slika 9d).

4.5. USPOREDBA EKSPRESIJE GENA *ACRC*, *ZATT* I *XPA* IZMEĐU MIŠA I ČOVJEKA

Utvrđene razine ekspresije gena *ACRC*, *ZATT* i *XPA* kod domaćeg miša, uspoređene su s razinama ekspresije istih gena u tkivima čovjeka. Ekspresijski profil čovjeka može se pronaći na internetskim stranicama *Human Protein Atlas* (HPA, 2022a), gdje su prikazane sažete ekspresijske razine gena dobivene kombinacijom triju skupa podataka: HPA, *The Genotype-Tissue Expression* (GTEx) i *Functional Annotation of the Mammalian genome* (FANTOM5). Navedeni skupovi podataka rezultat su različitih analiza ekspresije gena u čovjeka, a vrijednosti razina ekspresije izražene su kao TPM (engl. *transcript per kilobase million*). Kako bi se rezultati mogli uspoređivati, vrijednosti ekspresije su normalizirane, a kombinacijom rezultata različitih skupova podataka, dobivene su normalizirane nTPM (engl. *normalised transcript per kilobase million*) vrijednosti, istaknute za svako tkivo. Ekspresija humanih gena nije provedena posebno za ženska i posebno za muška tkiva, zbog čega je onemogućena usporedba ekspresije u odnosu na spol, kao i u odnosu na dob. Također, s obzirom da se metode utvrđivanja razina ekspresije gena u čovjeka razlikuju u odnosu na metode korištene u ovome radu, ekspresija gena od interesa ne može se izravno uspoređivati između čovjeka i domaćeg miša, ali se mogu usporediti relativni odnosi ekspresije između pojedinih tkiva.

Najviša ekspresija *ACRC* gena kod čovjeka karakteristična je za tkivo testisa (HPA, 2022b). Nakon testisa slijedi mozak s 1,3 puta nižom ekspresijom u odnosu na testis, a potom tkiva jetre, crijeva i bubrega, u kojima su razine ekspresije 4,3 puta, 4,6 puta i 5,0 puta niže u odnosu na tkivo testisa. Jajnik je kod čovjeka tkivo s najnižom razinom ekspresije *ACRC*-a, gdje je 6,2 puta niže eksprimiran u odnosu na testis. Time, poredak tkiva prema razini ekspresije *ACRC*-a u čovjeka pokazuje kako testis ima najvišu razinu ekspresije, nakon kojeg slijedi mozak, a

potom jetra, crijevo, bubreg te na kraju jajnik. Prema rezultatima dobivenim u ovome radu, razine ekspresije *ACRC*-a u tkivima miša, od najviše, prema najnižoj, su (tkivo mužjaka/tkivo ženke): testis/mozak, crijevo/jetra, mozak/bubreg, jetra/crijevo, bubreg/jajnik. Time, postoje sličnosti u ekspresijskim profilima *ACRC* gena kod čovjeka i miša, s obzirom na najvišu razinu ekspresije gena u testisu, a najmanjom u jajniku. Međutim, treba naglasiti kako rezultati dobiveni za miša pokazuju znatno veće razlike u ekspresiji *ACRC*-a u testisu i ostalim tkivima. Primjerice, razlika u ekspresiji *ACRC* gena između testisa i mozga mladog mužjaka iznosi 477 puta.

Gen *ZATT* u čovjeka, kao i *ACRC* ima najvišu razinu ekspresije u tkivu testisa (HPA, 2022c), što je u skladu s rezultatima dobivenim za miša. Po razini ekspresije zatim slijede: mozak gdje je *ZATT* 1,6 puta manje ekspimiran nego u testisima, jetra gdje je *ZATT* 2,3 puta manje ekspimiran, jajnik gdje je gen 2,4 puta manje ekspimiran, te bubreg s 2,6 puta manjom ekspresijom u odnosu na testis. Najniža razina ekspresije *ZATT* gena prisutna je u tkivu crijeva, gdje je gen 3,1 puta niže ekspimiran u odnosu na testis. Zaključno, najviša razina ekspresije u čovjeka utvrđena je u testisu, nakon kojeg slijede mozak, jetra, jajnik, bubreg i crijevo. U miša, razine ekspresije gena *ZATT*, od najviše prema najnižoj su (tkivo mužjaka/tkivo ženke): testis/mozak, mozak/jajnik, crijevo/bubreg, bubreg/jetra te jetra/crijevo. Treba podsjetiti kako je ekspresija *ZATT*-a u mozgu i ženke i mužjaka mladog miša, kao i u testisu jako visoka, dok je u ostalim tkivima mladih jedinki ekspresija većinom umjereno visoka (tablica 8). Iz tog razloga, može se zaključiti da čovjek i miš imaju sličan ekspresijski profil *ZATT* gena, s najvišim razinama ekspresije u testisu i mozgu.

Gen *XPA* kod čovjeka ima najvišu razinu ekspresije u tkivu jetre i bubrega (HPA, 2022d). Nakon toga slijedi ekspresija gena u mozgu, potom crijevu i jajniku, gdje su razine ekspresije *XPA* gena 1,2 puta, 1,4 puta te 1,5 puta niže u odnosu na tkivo jetre. Najniža razina ekspresije *XPA*-a kod čovjeka pronađena je u tkivu testisa, 3,7 puta niža u odnosu na tkivo jetre. Kod miša, razine ekspresije *XPA*-a, od najviše prema najnižoj su (tkivo mužjaka/tkivo ženke): mozak/mozak, jetra/crijevo, bubreg/bubreg, testis/jetra te crijevo/jajnik. U mišjim tkivima mladih jedinki, ekspresija *XPA*-a je daleko najviša u mozgu, što nije u skladu s rezultatima dobivenim za čovjeka. Također, kod miša *XPA* ima 1,6 puta višu razinu ekspresije u testisu u odnosu na jajnik, dok je kod čovjeka razina ekspresije gena za 2,5 puta viša u jajniku u odnosu na testis. Ali, postoje određene sličnosti u rezultatima između dviju vrsta. Primjerice, ekspresija *XPA*-a u jetri mladog mužjaka samo je 1,6 puta niža u odnosu na najvišu razinu ekspresije mozga, zbog čega jetra i u miša predstavlja tkivo s višom razinom ekspresije u odnosu na ostala

tkiva. Također, razine ekspresije gena u gonadama niže su u odnosu na ostala tkiva. Kod čovjeka, u testisu je 3,7 puta niža ekspresija u odnosu na jetru (1. tkivo po razini ekspresije kod čovjeka), a kod miša u jajniku je 4,5 puta niža ekspresije *XPA*-a u odnosu na mozak (1. tkivo po razini ekspresije kod miša).

Usporedbom ekspresije gena *ACRC*, *ZATT* i *XPA* u tkivima čovjeka, može se uočiti kako u tkivima jetre, bubrega i crijeva, *XPA* ima najvišu razinu ekspresije, nakon kojeg slijedi *ZATT*, te zatim *ACRC*, što odgovara rezultatim dobivenim za većinu mišjih tkiva. U jetri je *XPA* 5 puta više eksprimiran u odnosu na *ACRC*, a 1,5 puta više eksprimiran u odnosu na *ZATT*. U bubregu, razlika u ekspresiji između *XPA* i *ACRC* iznosi 5,1 puta, a između *XPA* i *ZATT* 1,7 puta. U crijevu, *ZATT* i *XPA* su približno jednako eksprimirani, dok je *ACRC* 4 puta manje eksprimiran u odnosu na *XPA*. Također, dok su u jajniku *ZATT* i *XPA* jednako eksprimirani, *ACRC* je 7,3 puta manje eksprimiran od *XPA*-a. U tkivu mozga čovjeka, najvišu razinu ekspresije ima *ZATT*, odmah nakon kojeg slijedi gen *XPA*, a potom *ACRC* s 2,1 puta nižom razinom ekspresije u odnosu na *ZATT*. Ukoliko razlike u ekspresiji *ZATT* i *XPA* gena kod čovjeka (neznatno viša ekspresija *ZATT*-a) usporedimo s rezultatima dobivenim za miša (1,8 puta viša ekspresija *XPA*-a), dobivene razlike ukazuju na približno jednaku ekspresiju dvaju gena i kod čovjeka i kod miša. Tkivo testisa čovjeka, jedino je tkivo u kojemu najniža razina ekspresije nije karakteristična za *ACRC* gen. Naime, u čovjeka najnižu razinu ekspresije u testisu ima gen *XPA*, koji je 5,6 puta niže ekspresije od *ACRC*-a, a potom slijedi *ACRC*, koji je 2,6 puta niže ekspresije, u odnosu na najviše eksprimirani gen *ZATT*. Iako *ACRC* u miša ima najvišu razinu ekspresije uopće u mišjim tkivima, ipak u testisu zauzima mjesto najniže ekspresije, nakon čega slijede geni *XPA*, pa *ZATT*.

5. ZAKLJUČCI

1. *ACRC* je nisko eksprimiran u svim proučavanim tkivima miša, osim u testisima gdje je razina ekspresije umjereno visoka i u mozgu starog mužjaka gdje je razina ekspresije umjerena.
2. *ZATT* je jako visoko eksprimiran u mozgu i testisu, visoko je eksprimiran u bubregu stare ženke i u crijevu mladog mužjaka, umjereno visoko u većini tkiva jetre, bubrega, crijeva i jajnika te je umjereno eksprimiran u jajniku stare ženke miša.
3. *XPA* je u tkivima miša većinom visoko i jako visoko eksprimiran. Gen je jako visoko eksprimiran u mozgu, u jetri mladog mužjaka, jetri i bubregu starih jedinki. Visoka ekspresija prisutna je u gonadama, jetri mlade ženke, bubregu mladih jedinki te crijevu ženki i mladog mužjaka. U crijevu starog mužjaka prisutna je umjereno visoka ekspresija.
4. Iako postoje određene razlike u ekspresiji *ACRC* gena u miša tijekom starenja, u svim tkivima osim testisa, tijekom starenja, razina ekspresije se ne mijenja i ostaje niska. U tkivu s najvišom ekspresijom *ACRC*-a, testisu, tijekom starenja dolazi do blagog smanjenja ekspresije.
5. Ekspresija *ZATT* gena tijekom starenja se smanjuje u crijevu mužjaka i to s visoke na umjereno visoku razinu. Smanjenje ekspresije *ZATT*-a tijekom starenja vidljivo je i u jajniku, dok se u bubregu ženke i jetri mužjaka ekspresija gena tijekom starenja povećava.
6. Ekspresija *XPA*-a tijekom starenja se u jetri i bubregu ženke te u bubregu mužjaka povećava, s visoke na jako visoku razinu ekspresije, dok se u crijevu mužjaka razina smanjuje s visoke na umjereno visoku.
7. Najznačajnije spolne razlike u ekspresiji *ACRC*-a i *ZATT*-a prisutne su u gonadama, gdje su oba gena u znatno većoj mjeri eksprimirana kod mužjaka u odnosu na ženke miša. *XPA* ne pokazuje značajne spolne razlike u ekspresiji.
8. U većini tkiva miša, *XPA* ima najvišu razinu ekspresije (visoko do jako visoka razina), zatim slijedi *ZATT* sa umjerenom do jako visokom ekspresijom te na kraju *ACRC* sa niskom ekspresijom uz izuzetak testisa (umjereno visoka ekspresija). Izuzetak je testis gdje *ZATT* ima višu razinu ekspresije od *XPA* gena i mozak gdje je ekspresija *XPA*-a i *ZATT*-a približno jednaka.
9. Ekspresijski profili *ACRC* i *ZATT* gena kod miša i čovjeka su vrlo slični, dok su ekspresijski profili *XPA*-a između vrsti djelomično slični. *ACRC* je kod obje vrste najviše eksprimiran u testisu i najmanje u jajniku, a *ZATT* u oba organizma ima najvišu ekspresiju u mozgu i testisu. *XPA* je kod miša najviše eksprimiran u mozgu, a kod čovjeka u jetri i bubregu,

međutim i kod miša je jetra tkivo s višom razinom ekspresije u odnosu na ostala tkiva. Dok je u čovjeka ekspresija *XPA*-a viša u jajniku u odnosu na testis, kod miša je obrnuto, međutim kod obje vrste razine ekspresije gena u gonadama niže su u odnosu na ostala tkiva.

10. Ekspresijski profili triju gena u većini tkiva miša i čovjeka su usklađeni te pokazuju najvišu razinu ekspresije *XPA*-a, potom *ZATT*-a i na kraju *ACRC*-a, a u mozgu je i kod miša i kod čovjeka ekspresija *XPA*-a i *ZATT*-a približno jednaka. U testisu su vidljive razlike u ekspresijskim profilima triju gena, s obzirom da kod čovjeka zadnje mjesto po ekspresiji ne zauzima *ACRC*, već *XPA*.

6. LITERATURA

- Akamine R, Yamamoto T, Watanabe M, Yamazaki N, Kataoka M, Ishikawa M, i sur. (2007) Usefulness of the 5' region of the cDNA encoding acidic ribosomal phosphoprotein P0 conserved among rats, mice, and humans as a standard probe for gene expression analysis in different tissues and animal species. *J Biochem Biophys Methods* **70**, 481–486. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2006.11.008>
- Álvarez-Quilón A, Wojtaszek JL, Mathieu MC, Patel T, Appel CD, Hustedt N, i sur. (2020) Endogenous DNA 3' Blocks Are Vulnerabilities for BRCA1 and BRCA2 Deficiency and Are Reversed by the APE2 Nuclease. *Mol Cell* **78**, 1152-1165.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.05.021>
- Aparicio T, Baer R, Gottesman M, Gautier J (2016) MRN, CtIP, and BRCA1 mediate repair of topoisomerase II-DNA adducts. *Int J Cell Biol* **212**, 399–408. <https://doi.org/10.1083/jcb.201504005>
- Balmain A, Harris CC (2000) Carcinogenesis in mouse and human cells: parallels and paradoxes. *J Carcinog* **21**, 371–377.
- Becker C, Hammerle-Fickinger A, Riedmaier I, Pfaffl MW (2010) mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods* **50**, 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.010>
- Bhargava V, Goldstein CD, Russell L, Xu L, Ahmed M, Li W, i sur. (2020) GCNA Preserves Genome Integrity and Fertility Across Species. *Dev Cell* **52**, 38-52.e10. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.11.007>
- Čepin U (2017) Understanding qPCR efficiency and why it can exceed 100 % - Biosistemika. <https://biosistemika.com/blog/qpcr-efficiency-over-100/>. Pristupljeno 11. studenog 2021.
- Borgermann N, Ackermann L, Schwertman P, Hendriks IA, Thijssen K, Liu JC, i sur. (2019) SUMOylation promotes protective responses to DNA-protein crosslinks. *EMBO J* **38**, e101496. <https://doi.org/10.15252/embj.2019101496>
- Cappadocia L, Pichler A, Lima CD (2015) Structural basis for catalytic activation by the human ZNF451 SUMO E3 ligase. *Nat Struct Mol Biol* **22**, 968–975. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3116>
- Caradec J, Sirab N, Keumeugni C, Revaud D, Loric S (2010) 18S is an appropriate housekeeping gene for in vitro hypoxia experiments. *Br J Cancer* **103**, 591 – 592. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605755>
- Carmell MA, Dokshin GA, Skaletsky H, Hu YC, van Wolfswinkel JC, Igarashi KJ, i sur. (2016) A widely employed germ cell marker is an ancient disordered protein with reproductive functions in diverse eukaryotes. *eLife*, **5**, e19993. <https://doi.org/10.7554/eLife.19993.001>
- Carusillo A, Mussolino C (2020) DNA Damage: From Threat to Treatment. *Cells* **9**, 1665. <https://doi.org/10.3390/cells9071665>

- Chapman JR, Waldenström J (2015) With reference to reference genes: A systematic review of endogenous controls in gene expression studies. *PLoS ONE* **10**, e0141853. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141853>
- Chatterjee N, Walker GC (2017) Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen*, **58**, 235-263. <https://doi.org/10.1002/em.22087>
- Chen HJC, Hsieh CJ, Shen LC, Chang CM (2007) Characterization of DNA-protein cross-links induced by oxanine: Cellular damage derived from nitric oxide and nitrous acid. *Biochem J* **46**, 3952–3965. <https://doi.org/10.1021/bi0620398>
- Cheng L, Guan Y, Li L, Legerski RJ, Einspahr J, Bangert J, i sur. (1999) Expression in Normal Human Tissues of Five Nucleotide Excision Repair Genes Measured Simultaneously by Multiplex Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *Cancer epidemiol biomark prev* **8**, 801–807.
- Cortes Ledesma F, el Khamisy SF, Zuma MC, Osborn K, Caldecott KW (2009) A human 5'-tyrosyl DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase-mediated DNA damage. *Nature* **461**, 674–678. <https://doi.org/10.1038/nature08444>
- Davies DR, Interthal H, Champoux JJ, Hol WGJ (2002) The Crystal Structure of Human Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase. *Structure* **10**, 237-248. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(02\)00707-4](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(02)00707-4).
- de Graaf B, Clore A, McCullough AK (2009) Cellular pathways for DNA repair and damage tolerance of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks. *DNA Repair* **8**, 1207–1214. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.06.007>
- Dokshin GA, Davis GM, Sawle AD, Eldridge MD, Nicholls PK, Gourley TE, i sur. (2020) GCNA Interacts with Spartan and Topoisomerase II to Regulate Genome Stability. *Dev Cell* **52**, 53-68.e6. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.11.006>
- Dutta S, Sengupta P (2016) Men and mice: Relating their ages. *Life Sci* **152**, 244-248. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.10.025>
- Duxin JP, Dewar JM, Yardimci H, Walter JC (2014) Repair of a DNA-protein crosslink by replication-coupled proteolysis. *Cell* **159**, 346–357. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.024>
- Fielden J, Ruggiano A, Popović M, Ramadan K (2018) DNA protein crosslink proteolysis repair: From yeast to premature ageing and cancer in humans. *DNA Repair* **71**, 198-204. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.08.025>
- Fleige S, Pfaffl MW (2006) RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Asp Med* **27**, 126-139. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.003>
- Gao R, Huang SYN, Marchand C, Pommier Y (2012) Biochemical characterization of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2 (TDP2/TTRAP): A Mg²⁺/Mn²⁺-dependent phosphodiesterase specific for the repair of topoisomerase cleavage complexes. *J Biol Chem* **287**, 30842–30852. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.393983>

- Groehler A, Degner A, Tretyakova NY (2017) Mass Spectrometry-Based Tools to Characterize DNA–Protein Cross-Linking by Bis-Electrophiles. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **121**, 63–77. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12751>
- Haddad F, Baldwin KM (2010) Reverse transcription of the ribonucleic acid: the first step in RT-PCR assay. *Methods mol biol* **630**, 261–270. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-629-0_17
- Halder S, Torrecilla I, Burkhalter MD, Popović M, Fielden J, Vaz B, i sur. (2019) SPRTN protease and checkpoint kinase 1 cross-activation loop safeguards DNA replication. *Nat Commun* **10**, 3142. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11095-y>
- Hall AM, Roberson ED (2012) Mouse models of Alzheimer’s disease. *Brain Res Bull* **88**, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.11.017>
- Hartsuiker E, Mizuno K, Molnar M, Kohli J, Ohta K, Carr AM (2009) Ctp1 CtIP and Rad32 Mre11 Nuclease Activity Are Required for Rec12 Spo11 Removal, but Rec12 Spo11 Removal Is Dispensable for Other MRN-Dependent Meiotic Functions. *Mol Cell Biol* **29**, 1671–1681. <https://doi.org/10.1128/mcb.01182-08>.
- Hoa NN, Shimizu T, Zhou ZW, Wang ZQ, Deshpande RA, Paull TT, i sur. (2016) Mre11 Is Essential for the Removal of Lethal Topoisomerase 2 Covalent Cleavage Complexes. *Mol Cell* **64**, 580–592. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.10.011>
- HPA (2022a) HPA- The Human Protein Atlas, <https://www.proteinatlas.org/>. Pristupljeno 1. veljače 2022.
- HPA (2022b) GCNA. HPA- The Human Protein Atlas, <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000147174-GCNA>. Pristupljeno 5. veljače 2022.
- HPA (2022c) ZNF451. HPA- The Human Protein Atlas, <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000112200-ZNF451>. Pristupljeno 5. veljače 2022.
- HPA (2022d) XPA. HPA- The Human Protein Atlas, <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000136936-XPA>. Pristupljeno 5. veljače 2022.
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A (2005) Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* **6**, 279–284. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364190>
- Jackson SP, Bartek J (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* **461**, 1071–1078. <https://doi.org/10.1038/nature08467>
- Johnson MTJ, Carpenter EJ, Tian Z, Bruskiwich R, Burris JN, Carrigan CT, i sur. (2012) Evaluating Methods for Isolating Total RNA and Predicting the Success of Sequencing Phylogenetically Diverse Plant Transcriptomes. *PLoS One* **7**, e50226. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050226>
- Jozefczuk J, Adjaye J (2011) Quantitative real-time PCR-based analysis of gene expression. *Methods Enzymol* **500**, 99–109. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385118-5.00006-2>.
- Kiianitsa K, Maizels N (2020) The “adductome”: A limited repertoire of adducted proteins in human cells. *DNA Repair* **89**, 102825. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102825>

- Kikuchi K, Narita T, Pham VT, Iijima J, Hirota K, Keka IS, i sur. (2013) Structure-specific endonucleases Xpf and Mus81 play overlapping but essential roles in DNA repair by homologous recombination. *Cancer Res* **73**, 4362–4371. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3154>
- Kojima Y, Machida Y, Palani S, Caulfield TR, Radisky ES, Kaufmann SH, i sur. (2020) FAM111A protects replication forks from protein obstacles via its trypsin-like domain. *Nat Commun* **11**, 1318. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15170-7>
- Kojima Y, Machida YJ (2020) DNA–protein crosslinks from environmental exposure: Mechanisms of formation and repair. *Environ Mol Mutagen* **61**, 716-729. <https://doi.org/10.1002/em.22381>
- Kottemann MC, Conti BA, Lach FP, Smogorzewska A (2018) Removal of RTF2 from Stalled Replisomes Promotes Maintenance of Genome Integrity. *Mol Cell* **69**, 24-35.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.11.035>
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, i sur. (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* **27**, 95-125. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>
- Kühbacher U, Duxin JP (2020) How to fix DNA-protein crosslinks. *DNA Repair* **94**, 102924. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102924>
- Lal D, Som S, Friedman S (1988) Survival and mutagenic effects of 5-azacytidine in Escherichia coli. *Mutat Res* **193**, 229-236. [https://doi.org/10.1016/0167-8817\(88\)90033-8](https://doi.org/10.1016/0167-8817(88)90033-8).
- Larsen NB, Gao AO, Sparks JL, Gallina I, Wu RA, Mann M, i sur. (2019) Replication-Coupled DNA-Protein Crosslink Repair by SPRTN and the Proteasome in Xenopus Egg Extracts. *Mol Cell* **73**, 574-588.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.11.024>
- Lehmann J, Seebode C, Smolorz S, Schubert S, Emmert S (2017) XPF knockout via CRISPR/Cas9 reveals that ERCC1 is retained in the cytoplasm without its heterodimer partner XPF. *Cell Mol Life Sci* **74**, 2081–2094. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2455-7>
- Lessel D, Vaz B, Halder S, Lockhart PJ, Marinovic-Terzic I, Lopez-Mosqueda J, i sur. (2014) Mutations in SPRTN cause early onset hepatocellular carcinoma, genomic instability and progeroid features. *Nat Genet* **46**, 1239–1244. <https://doi.org/10.1038/ng.3103>
- Lin PF, Lan XL, Chen FL, Yang YZ, Jin YP, Wang AH (2013) Reference Gene Selection for Real-Time Quantitative PCR Analysis of the Mouse Uterus in the Peri-Implantation Period. *PLoS One* **8**, e62462. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062462>
- Lindahl T (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**, 709-715.
- Lončar J, Popović M, Krznar P, Zaja R, Smital T (2016) The first characterization of multidrug and toxin extrusion (MATE/SLC47) proteins in zebrafish (*Danio rerio*). *Sci Rep* **6**, 28937. <https://doi.org/10.1038/srep28937>

- Lopez-Mosqueda J, Maddi K, Prgomet S, Kalayil S, Marinovic-Terzic I, Terzic J, i sur.(2016) SPRTN is a mammalian DNA-binding metalloprotease that resolves DNA-protein crosslinks. *Elife* **5**, e21491. <https://doi.org/10.7554/eLife.21491.001>
- Mao Y, Desai SD, Ting CY, Hwang J, Liu LF (2001) 26 S Proteasome-mediated Degradation of Topoisomerase II Cleavable Complexes. *J Biol Chem* **276**, 40652–40658. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104009200>
- Maskey RS, Kim MS, Baker DJ, Childs B, Malureanu LA, Jeganathan KB, i sur. (2014) Spartan deficiency causes genomic instability and progeroid phenotypes. *Nat Commun* **5**, 5744. <https://doi.org/10.1038/ncomms6744>
- Maskey RS, Flatten KS, Sieben CJ, Peterson KL, Baker DJ, Nam HJ, i sur. (2017) Spartan deficiency causes accumulation of Topoisomerase 1 cleavage complexes and tumorigenesis. *Nucleic Acids Res* **45**, 4564–4576. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx107>
- McKinnon PJ (2017) Genome integrity and disease prevention in the nervous system. *Genes Dev* **31**, 1180-1194. <https://doi.org/10.1101/gad.301325>
- Milman N, Higuchi E, Smith GR (2009) Meiotic DNA Double-Strand Break Repair Requires Two Nucleases, MRN and Ctp1, To Produce a Single Size Class of Rec12 (Spo11)-Oligonucleotide Complexes. *Mol Cell Biol* **29**, 5998–6005. <https://doi.org/10.1128/mcb.01127-09>
- Muller PY, Janovjak H, Miserez AR, Dobbie Z (2002) Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *Biotechniques* **32**, 1372-1379.
- Nakano T, Morishita S, Katafuchi A, Matsubara M, Horikawa Y, Terato H, i sur. (2007) Nucleotide Excision Repair and Homologous Recombination Systems Commit Differentially to the Repair of DNA-Protein Crosslinks. *Mol Cell* **28**, 147–158. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.07.029>
- NCBI (2021) Primer Blast. NCBI- National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Pristupljeno 29. listopada 2021.
- Neale MJ, Pan J, Keeney S (2005) Endonucleolytic processing of covalent protein-linked DNA double-strand breaks. *Nature* **436**, 1053–1057. <https://doi.org/10.1038/nature03872>
- NEB (2021) A practical guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers. NEB- New England BioLabs, https://www.neb.com/-/media/nebus/files/application-notes/technote_mv_analysis_of_nucleic_acid_concentration_and_purity.pdf?rev=c24cea043416420d84fb6bf7b554dbbb. Pristupljeno 10. studenog 2021.
- Oleinick NL, Chiu SM, Ramakrishnan N, Xue LY (1987) The formation, identification, and significance of DNA-protein cross-links in mammalian cells. *Br J Cancer* **55**, 135-140.
- Petruseva IO, Evdokimov AN, Lavrik OI (2014) Molecular Mechanism of Global Genome Nucleotide Excision Repair. *Acta Naturae* **6**, 23-34.
- Pouliot JJ, Yao KC, Robertson CA, Nash HA (1999) Yeast Gene for a Tyr-DNA Phosphodiesterase that Repairs Topoisomerase I Complexes. *Science* **286**, 552-555. <https://doi.org/10.1126/science.286.5439.552>

- Prasad R, Horton JK, Dai DP, Wilson SH (2019) Repair pathway for PARP-1 DNA-protein crosslinks. *DNA Repair* **73**, 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.11.004>
- Pressly JD, Park F (2017) DNA repair in ischemic acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* **312**, 551–555. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00492.2016>.-Ischemia-reperfusion
- Rashid I, Hammel M, Sverzhinsky A, Tsai MS, Pascal JM, Tainer JA, i sur. (2021) Direct interaction of DNA repair protein tyrosyl DNA phosphodiesterase 1 and the DNA ligase III catalytic domain is regulated by phosphorylation of its flexible N-terminus. *J Biol Chem* **297**, 100921. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100921>
- Reardon JT, Cheng Y, Sancar A (2006) Repair of DNA-protein cross-links in mammalian cells. *Cell Cycle* **5**, 1366-1370. <https://doi.org/10.4161/cc.5.13.2892>
- Riccio AA, Schellenberg MJ, Williams RS (2020) Molecular mechanisms of topoisomerase 2 DNA–protein crosslink resolution. *Cell Mol Life Sci* **77**, 81–91. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03367-z>
- Rodríguez A, Rodríguez M, Córdoba JJ, Andrade MJ (2015) Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. *Methods Mol Biol* **1275**, 31–56. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_3
- Ruggiano A, Ramadan K (2021) DNA–protein crosslink proteases in genome stability. *Commun Biol* **4**, 11. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01539-3>
- Sale JE, Lehmann AR, Woodgate R (2012) Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 141-152. <https://doi.org/10.1038/nrm3289>
- Sandhu KS, Acharya KK (2005) ExPrimer: To design primers from exon-exon junctions. *Bioinformatics* **21**, 2091–2092. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti304>
- Schärer OD (2013) Nucleotide excision repair in Eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a012609. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012609>
- Schellenberg, M. J., Lieberman, J. A., Herrero-Ruiz, A., Butler, L. R., Williams, J. G., Muñoz-Cabello, i sur. (2017) ZATT (ZNF451)-mediated resolution of topoisomerase 2 DNA-protein cross-links. *Science* **357**, 1412–1416. <https://doi.org/10.1126/science.aam6468>
- Sczepanski JT, Wong RS, McKnight JN, Bowman GD, Greenberg MM (2010) Rapid DNA-protein cross-linking and strand scission by an abasic site in a nucleosome core particle. *P Natl Acad Sci USA* **107**, 22475–22480. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012860108>
- San Segundo-Val I, Sanz-Lozano CS (2016) Introduction to the Gene Expression Analysis. U: Isidoro García M. (ured.) *Molecular Genetics of Asthma*, Humana Press, New York, NY, str. 29-43.
- Stingele J, Schwarz MS, Bloemeke N, Wolf PG, Jentsch S (2014) A DNA-dependent protease involved in DNA-protein crosslink repair. *Cell* **158**, 327–338. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.053>

- Stingele, J., Habermann, B., Jentsch, S. (2015) DNA-protein crosslink repair: Proteases as DNA repair enzymes. *Trends Biochem Sci* **40**, 67-71. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.10.012>
- Stingele J, Bellelli R, Alte F, Hewitt G, Sarek G, Maslen SL, i sur. (2016) Mechanism and Regulation of DNA-Protein Crosslink Repair by the DNA-Dependent Metalloprotease SPRTN. *Mol Cell* **64**, 688–703. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.031>
- Sun Y, Saha LK, Saha S, Jo U, Pommier Y (2020a). Debulking of topoisomerase DNA-protein crosslinks (TOP-DPC) by the proteasome, non-proteasomal and non-proteolytic pathways. *DNA Repair* **94**, 102926. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102926>
- Sun Y, Saha S, Wang W, Saha LK, Huang SYN, Pommier Y (2020b) Excision repair of topoisomerase DNA-protein crosslinks (TOP-DPC). *DNA Repair* **89**, 102837. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102837>
- Takahashi K, Morita T, Kawazoe Y (1985) Mutagenic characteristics of formaldehyde on bacterial systems. *Mutat Res* **156**, 153–161.
- Tan SC, Yiap BC (2009) DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present. *J biotechnol biomed* **2009**, 574398. <https://doi.org/10.1155/2009/574398>
- Terpe K (2013) Overview of thermostable DNA polymerases for classical PCR applications: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**, 10243-10254. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5290-2>
- Thornton B, Basu C (2015) Rapid and simple method of qPCR primer design. *Methods Mol Biol* **1275**, 173–179. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_13
- Tretyakova NY, Groehler A, Ji S (2015) DNA-Protein Cross-Links: Formation, Structural Identities, and Biological Outcomes. *Acc Chem Res* **48**, 1631–1644. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00056>
- van Steeg H, de Vries A, van Oostrom CTM, van Benthem J, Beems RB, van Kreijl CF (2001) DNA Repair-Deficient Xpa and Xpa/p53 Knock-Out Mice: Nature of the Models, *Toxicol Pathol* **29**, 109-116. <https://doi.org/10.1080/019262301753178519>
- Vanhooren V, Libert C (2013) The mouse as a model organism in aging research: Usefulness, pitfalls and possibilities. *Ageing Res Rev* **12**, 8-21. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.03.010>
- Vannier JB, Depeiges A, White C, Gallego ME (2009) ERCC1/XPF protects short telomeres from homologous recombination in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* **5**, e1000380. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000380>
- Vaz B, Popovic M, Newman JA, Fielden J, Aitkenhead H, Halder S, i sur. (2016) Metalloprotease SPRTN/DVC1 Orchestrates Replication-Coupled DNA-Protein Crosslink Repair. *Mol Cell* **64**, 704–719. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.032>
- Vaz B, Popovic M, Ramadan K (2017) DNA-Protein Crosslink Proteolysis Repair. *Trends Biochem Sci* **42**, 483-495. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.03.005>

- Warrington JA, Nair A, Mahadevappa M, Tsyganskaya M (2000) Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes. *Physiol Genomics* **2**, 143-147. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.2000.2.3.143>.
- Wei X, Peng Y, Bryan C, Yang K (2021) Mechanisms of DNA–protein cross-link formation and repair. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* **1869**, 140669. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2021.140669>
- Wilson KA, Kellie JL, Wetmore SD (2014) DNA-protein π -interactions in nature: Abundance, structure, composition and strength of contacts between aromatic amino acids and DNA nucleobases or deoxyribose sugar. *Nucleic Acids Res* **42**, 6726–6741. <https://doi.org/10.1093/nar/gku269>
- Xu D, Liu A, Wang X, Zhang M, Zhang Z, Tan Z, i sur. (2018) Identifying suitable reference genes for developing and injured mouse CNS tissues. *Dev Neurobiol* **78**, 39–50. <https://doi.org/10.1002/dneu.22558>
- Yang SW, Burgin AB, Huizenga BN, Robertson CA, Yao KC, Nash HA (1996) A eukaryotic enzyme that can disjoin dead-end covalent complexes between DNA and type I topoisomerases. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 11534–11539. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.21.11534>
- Your Genome (2022) Why use mouse in research? Your Genome. <https://www.yourgenome.org/facts/why-use-the-mouse-in-research> Pristupljeno 14. veljače 2022.
- Zagnoli-Vieira G, Caldecott KW (2017) TDP2, TOP2, and SUMO: What is ZATT about? *Cell Res* **27**, 1405-1406. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.147>
- Zeng Z, Cortés-Ledesma F, el Khamisy SF, Caldecott KW (2011) TDP2/TTRAP is the major 5'-tyrosyl DNA phosphodiesterase activity in vertebrate cells and is critical for cellular resistance to topoisomerase II-induced DNA damage. *J Biol Chem* **286**, 403–409. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.181016>
- Zhang L, Zhang K, Prändl R, Schöffl F (2004) Detecting DNA-binding of proteins in vivo by UV-crosslinking and immunoprecipitation. *Biochem Biophys Res Commun* **322**, 705–711. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.07.202>
- Zhang H, Xiong Y, Chen J (2020) DNA-protein cross-link repair: What do we know now? *Cell Biosci* **10**, 3. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0366-z>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Vanna Medved izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vanna Medved

Vlastoručni potpis