

Metilacija RB1 i H19 gena te LINE 1 ponavljajućih sljedova tijekom fetalnog razvoja sjemenika u čovjeka i u štakora

Himmelreich Perić, Marta

Doctoral thesis / Disertacija

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:820020>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-11**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Marta Himmelreich Perić

**Metilacija RB1 i H19 gena te LINE 1
ponavljajućih sljedova tijekom
fetalnog razvoja sjemenika u čovjeka i
u štakora**

DISERTACIJA



Zagreb, 2022.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Marta Himmelreich Perić

**Metilacija RB1 i H19 gena te LINE 1
ponavljajućih sljedova tijekom
fetalnog razvoja sjemenika u čovjeka i
u štakora**

DISERTACIJA

Zagreb, 2022.

Disertacija je izrađena u Zavodu za medicinsku biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u sklopu Znanstvenog centra izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu, Istraživačka jedinica Biomedicinsko istraživanje reprodukcije i razvoja te uz potporu projekta „Reproduktivna i regenerativna medicina - istraživanja novih platformi i potencijala” kojeg sufinancira Europska unija iz Europskog fonda za regionalni razvoj, u okviru Operativnog programa Konkurentnost i kohezija, pod brojem ugovora KK.01.1.1.01.0008.

Voditelj rada: izv. prof. dr. sc. Ana Katušić Bojanac

CERM

Znanstveni centar izvrsnosti za
reproduktivnu i regenerativnu medicinu



ZAHVALE

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Ani Katušić Bojanac i prof. dr. sc. Floriani Bulić-Jakuš na uloženom vremenu, pomoći i savjetima pri izradi doktorske disertacije te tijekom cijelog trajanja projekta. Zahvaljujem se prof. dr. sc. Davoru Ježeku i prof. dr. sc. Gordani Jurić-Lekić na ukazanom povjerenju i podršci tijekom cijelog trajanja studija i sadašnjeg radnog odnosa.

Dragim kolegicama i kolegi zahvaljujem se na pomoći, educiranju i vremenu provedenom zajedno.

Zahvaljujem se svojoj obitelji i prijateljima na pruženoj podršci i razumijevanju tijekom cijelog obrazovanja.

Zahvaljujem se svim suradnicima na projektu što su pomogli unaprijediti rad.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Razvoj sjemenika.....	1
1.1.1. Razvoj primordijalnih spolnih stanica.....	2
1.1.2. Razvoj primordijalnih spolnih stanica u glodavaca.....	3
1.1.3. Razvoj primordijalnih spolnih stanica u čovjeka	4
1.1.4. Smještaj PGC u spolne nabore/žlijezde.....	5
1.1.5. Razvoj somatskih stanica i determinacija spola	7
1.1.6. Razvoj sjemenih tračaka i kanalića	9
1.2. Epigenetske promjene	9
1.2.1. DNA metilacija.....	10
1.2.2. DNA metilacija u razvoju.....	12
1.2.3. Globalna demetilacija genoma PGC	14
1.2.4. Demetilacija PGC u glodavaca.....	15
1.2.5. Demetilacija u ljudskim PGC	15
1.2.6. <i>De novo</i> DNA metilacija	16
1.2.7. Utisnuti geni	17
1.2.8. Modifikacije histona	19
1.2.9. Retrotranspozoni.....	20
1.3. Stanični ciklus i njegova regulacija <i>RB1</i> genom	22
1.3.1. Mitotički i mejotički stanični ciklus	22
1.3.2. Obitelj retinoblastomskih proteina	23
1.3.3. Modifikacije RB1 i njegova uloga u staničnom ciklusu	24
1.3.4. Alternativni modeli staničnog ciklusa	25
1.3.5. Proteinski izražaj RB1 u sjemeniku	26
1.3.6. Uloga RB1 u stanicama sjemenika.....	26
1.4. Povezanost staničnog ciklusa i sazrijevanja stanica sjemenika.....	28

1.4.1. Dinamika staničnog ciklusa i sazrijevanja spolnih stanica.....	28
1.4.2. Regulacija zaustavljanja staničnog ciklusa zametnih stanica.....	29
1.4.3. Prespermatogeneza zametnih stanica glodavaca	30
1.4.4. Prespermatogeneza u ljudi.....	32
2. HIPOTEZA.....	34
3. SVRHA I CILJEVI RADA	35
4. MATERIJAL I METODE.....	36
4.1. Ljudski uzorci.....	36
4.1.1. Fiksacija, uklapanje u parafin i pohrana ljudskih uzoraka	37
4.2. Štakorski uzorci	37
4.2.1. Laboratorijske životinje.....	37
4.2.2. Fiksacija, uklapanje u parafin i pohrana štakorskih uzoraka.....	38
4.3. Osnovna obrada parafinskih blokova	38
4.4. Klasično histološko bojenje hemalaun-eozinom	39
4.5. Imunohistokemijsko bojenje	39
4.6. Analiza obojenih stakala.....	42
4.7. Izolacija genomskog DNA	42
4.8. Mjerenje koncentracije DNA i kontrola kvalitete	43
4.9. Bisulfitna konverzija izoliranog DNA.....	43
4.10. Dizajniranje početnica za PCR i pirosekvenciranje	44
4.11. Lančana reakcija polimerazom nakon bisulfitne konverzije	47
4.12. Gel elektroforeza	49
4.13. Pirosekvenciranje	50
4.14. Analiza rezultata pirosekvenciranja	52
4.15. Statistička obrada podataka	53
5. REZULTATI.....	55
5.1. DNA metilacija u tkivu fetalnih štakorskih sjemenika kroz stadije trudnoće ...	55

5.1.1. Analiza metilacije <i>LINE-1</i> ponavljajućih sljedova.....	55
5.1.2. Analiza metilacije diferencijalno metilirane regije utisnutog gena <i>H19</i>	60
5.1.3. Utjecaj načina pohrane tkiva na rezultate pirosekvenciranja	67
5.2. Izražaj imunohistokemijskih biljega u tkivu fetalnih štakorskih sjemenika kroz stadije trudnoće	70
5.2.1. Histološke karakteristike fetalnog štakorskog sjemenika.....	70
5.2.2. Izraženost Ki-67 biljega u štakorskom sjemeniku kroz stadije trudnoće ...	72
5.2.3. Izraženost RB1 proteina u štakorskom sjemeniku kroz stadije trudnoće ...	76
5.2.4. Izraženost RB1 proteina fosforiliranog na serinu 780 u štakorskom sjemeniku kroz stadije trudnoće	79
5.2.5. Izraženost RB1 proteina fosforiliranog na serinu 795 u štakorskom sjemeniku kroz stadije trudnoće	82
5.2.6. Izraženost Sox9 biljega u štakorskom sjemeniku kroz stadije trudnoće	85
5.3. DNA metilacija u tkivu fetalnih ljudskih sjemenika kroz stadije trudnoće i postnatalno	86
5.3.1. Analiza metilacije <i>LINE-1</i> ponavljajućih sljedova.....	86
5.3.2. Analiza metilacije diferencijalno metilirane regije utisnutog gena <i>H19</i>	98
5.3.3. Analiza metilacije <i>RB1</i> gena	106
5.3.4. Utjecaj načina fiksacije i količine tkiva na rezultate pirosekvenciranja...	115
5.4. Izražaj imunohistokemijskih biljega u tkivu fetalnih ljudskih sjemenika kroz stadije trudnoće	116
5.4.1. Histološke karakteristike fetalnog ljudskog sjemenika	117
5.4.2. Izraženost Ki-67 biljega u ljudskom sjemeniku kroz stadije trudnoće.....	118
5.4.3. Izraženost RB1 proteina u ljudskom sjemeniku kroz stadije trudnoće	125
5.4.4. Izraženost RB1 proteina fosforiliranog na serinu 780 u ljudskom sjemeniku kroz stadije trudnoće	130
5.4.5. Izraženost RB1 proteina fosforiliranog na serinu 795 u ljudskom sjemeniku kroz stadije trudnoće	135

5.4.6. Izraženost SOX9 proteina u ljudskom sjemeniku kroz stadije trudnoće..	140
6. RASPRAVA.....	141
6.1. DNA metilacija u fetalnom tkivu sjemenika štakora	142
6.2. Proliferacija i izražaj RB1 proteina i njegovih fosforiliranih formi proteina u fetalnom tkivu sjemenika štakora.....	144
6.3. DNA metilacija u fetalnom tkivu sjemenika čovjeka.....	147
6.4. Proliferacija i izražaj RB1 proteina i njegovih fosforiliranih formi proteina u fetalnom tkivu sjemenika čovjeka.....	150
6.5. Metodološka usporedba metoda pohrane i količine tkiva	152
6.6. Usporedba analiziranih varijabli između čovjeka i štakora.....	154
7. ZAKLJUČCI	158
8. SAŽETAK.....	160
9. ABSTRACT	161
10. POPIS LITERATURE.....	162
11. ŽIVOTOPIS	181

Popis oznaka i kratica

DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
PGC	primordijalna zametna stanica (engl. <i>primordial germ cell</i>)
mPGC	primordijalna zametna stanica miša (engl. <i>mouse PGC</i>)
hPGC	primordijalna zametna stanica čovjeka (engl. <i>human PGC</i>)
E	embrionalni dan
Tpo	tjedan poslije oplodnje
TF	transkripcijski faktor
WNT	engl. <i>Wingless</i> signalni put
DDX	engl. <i>DEAD-box helicase</i>
BMP	engl. <i>bone morphogenic protein</i>
FUT	fukoziltransferaza
Dnd	engl. <i>dead end protein</i>
Emx2	engl. <i>empty spiracles homeobox 2</i>
IFITM	engl. <i>interferon-induced transmembrane proteins</i>
OCT	engl. <i>octamer-binding transcription factor</i>
SSEA	engl. <i>stage-specific embryonic antigen</i>
DPPA	engl. <i>developmental pluripotency associated</i>
EMT	prijelaz epitela u mezenhim (engl. <i>epithelial-to-mesenchymal transition</i>)
TGFβ	transformirajući faktor rasta beta (engl. <i>transforming growth factor-beta</i>)
Gcna	engl. <i>germ cell nuclear acidic protein</i>
Nr5a/Sf	engl. <i>nuclear receptor subfamily 5 group A member/steroidogenic factor</i>
GCT	tumor zametnih (engl. <i>germ cell</i>) stanica
SCF	engl. <i>stem cell factor</i>
CDH	kadherin
CXCL	motiv ligand kemokina
AMH	protu-Müllerovski hormon
SOX	engl. <i>Sry-type HMG box</i>
ITGB	engl. <i>integrin subunit β</i>
FGF	faktor rasta fibroblasta
WT	gen Wilmsovog tumora
Dazl	engl. <i>deleted in azoospermia</i>
TES	engl. <i>testis-specific enhancer of Sox9</i>
GR	spolni nabor (engl. <i>gonadal ridge</i>)
PTGDS	sintaza prostaglandina D ₂ (engl. <i>prostaglandin D₂ synthase</i>)
DMRT	engl. <i>doublesex and mab-3-related TF</i>
RNA	ribonukleinska kiselina (engl. <i>acid</i>)
TET	engl. <i>ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase enzymes</i>
TSS	početna mjesta transkripcije (engl. <i>transcription start site</i>)

DNMT	DNA (citozin-5) metiltransferaza
5mC	5-metilcitozin
5hmC	5-hidroksimetilcitozin
5cC	5-karboksilcitozin
CGI	CpG otoci (engl. <i>islands</i>)
5fC	5-formilcitozin
CG	citozin-gvanin
TE	transpozoni (engl. <i>transposable elements</i>)
Uhrf	engl. <i>ubiquitin-like with PHD and ring finger domains</i>
ICR	kontrolne regije utiskivanja (engl. <i>imprinting control regions</i>)
DMR	diferencijalno metilirane regije
dpp	dan poslije okota (engl. <i>day post partum</i>)
SUMO	<i>small ubiquitin-related modifier</i>
PIWI	<i>P-element Induced Wlmpy testis</i>
LTR	engl. <i>long terminal repeat</i>
IGF	engl. <i>insulin-like growth factor</i>
RASGRF1	engl. <i>ras protein specific guanine nucleotide releasing factor 1</i>
DLK1	engl. <i>delta like non-canonical Notch ligand 1</i>
ZDBF2	engl. <i>zinc finger DBF-type containing 2</i>
H	histon
piRNA	engl. <i>Piwi-interacting RNA</i>
LINE	dugi raspršeni nuklearni elementi, engl. <i>long interspersed nuclear elements</i>
SINE	kratki raspršeni nuklearni elementi, engl. <i>short interspersed nuclear elements</i>
CTCF	engl. <i>11-zinc finger protein or CCCTC-binding factor</i>
CBS	engl. <i>CCCTC-binding factor binding sequences</i>
GST	tranzicija gonocita u spermatogonije
RET	engl. <i>rearranged during transfection</i>
PLZF	engl. <i>promyelocytic leukemia zinc finger</i>
CCR4-NOT	engl. <i>carbon catabolite repressor 4-negative on TATA</i>
RB1	retinoblastomski gen
CDK	kinaza ovisna o ciklinu
KO	engl. <i>knock-out</i>
E2F	E2 transkripcijski faktor
DHFR	reduktaza dihidrofolata
GFRα	receptor obitelji GDNF α
PGD2	engl. <i>multifunction prostanoid PGD2</i>
Pten	engl. <i>phosphatase and tensin homolog</i>
MAGEA	engl. <i>melanoma-associated antigen</i>
dB	decibel
GLP	engl. <i>good laboratory practice</i>
HE	hemalaun-eozin

IHC	imunohistokemija
dH₂O	destilirana voda
TBS	Tris puferirana fiziološka otopina (engl. <i>Tris-buffered saline</i>)
Tris-EDTA	hidroksimetil aminometan-etilendiamintetraoctena kiselina
BSA	goveđi serumski albumin (engl. <i>bovine serum albumin</i>)
H₂O₂	vodikov peroksid
DAB	3,3-diaminobenzidin tetrahidroklorid
Rpm	okretaji u minuti (engl. <i>revolutions per minute</i>)
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
F	F početnica (engl. <i>forward primer</i>)
R	R početnica (engl. <i>reverse primer</i>)
S	sekvencijska početnica (engl. <i>sequencing primer</i>)
TAE	Tris-acetat-EDTA pufer
UV	ultraljubičasto
Ng	nanogram
dpc	dan poslije oplodnje (engl. <i>day post coitum</i>)

1. UVOD

Muška neplodnost rastući je javnozdravstveni problem koji pogađa jednog od 20 muškaraca u zapadnjačkoj populaciji (1). Iako su naponi uloženi u istraživanje toga problema golemi, velik broj podliježućih uzroka ostaje nepoznat. Mnoge studije usmjerile su se na istraživanje genetskih uzroka koristeći mišji model (2) ili kroz sekvenciranje gena koristeći DNA neplodnih muškaraca (3). Razvitkom tehnologije te uviđanjem da brojna stanja, poput raka, neuroloških i imunoloških poremećaja, pa čak i starenja, imaju podlogu u epigenetskim promjenama (4, 5), pretpostavilo se kako je vjerojatnost da epigenetske promjene utječu na mušku plodnost velika. Spermatogeneza je proces koji zahtijeva preciznu i strogu regulaciju, pa ne iznenađuje da su u regulaciju uključeni epigenetski mehanizmi i da njihovi poremećaji mogu dovesti do neplodnosti. Neki od događaja i procesa koji su vezani za spermatogenezu epigenetskom regulacijom su kondenzacija kromosoma, formiranje XY tijela, utišavanje retrotranspozona i kondenziranje DNA u jezgru spermija. Kako se vrlo važan dio epigenetskih promjena mora odvititi po vremenski i prostorno visoko reguliranom planu tijekom razvoja spolnih stanica (6), može se očekivati da dio uzroka muške neplodnosti korijene ima u poremećajima razvoja tijekom embrionalnog i fetalnog života. Dinamika epigenetičkih promjena, tzv. epigenetičko reprogramiranje, u razvoju zametnih stanica miša djelomično je poznato, dok je u štakora i čovjeka slabije ili vrlo slabo istraženo, uglavnom zbog teško dostupnog ljudskog materijala. Tako DNA demetilacija genoma zametnih stanica prati slične obrasce u glodavaca i ljudi, no ponovno uspostavljanje DNA metilacijskih obrazaca, tzv. *de novo* DNA metilacija odvija se u znatno različitim vremenskim razdobljima te je u neraskidivoj vezi s kontrolom staničnog ciklusa zametnih stanica. Potonji proces relativno je rasvijetljen u miša, dok za štakore i ljude postoji samo nekoliko istraživanja (7-10). Poznavanje normalnog razvoja te razdoblja u kojima se odvijaju epigenetske promjene i promjene staničnog ciklusa muških spolnih stanica rasvijetlile bi razdoblja trudnoće u kojima vanjski utjecaji preko epigenetske regulacije mogu imati najjači učinak na daljnji razvoj muške neplodnosti.

1.1. Razvoj sjemenika

Glavna funkcija sjemenika je produkcija spermija i androgena. Ta funkcija, a time i cjelokupno muško reproduktivno zdravlje ovisi o normalnom razvoju spolnih i somatskih stanica. Spolne žlijezde odraslih, sjemenici i jajnici, počinju razvoj kao spolni nabori, dvije

duguljaste i tanke embrionalne strukture koje se protežu kranio-kaudalno na dorzalnoj strani celomskog epitela preko mezonefrosa (11). Kaskada koja započinje na regiji koja određuje spol (engl. *sex determining region*, SRY) na Y kromosomu dovodi do usmjeravanja nediferenciranih somatskih stanica u Sertolijeve, koje potom kontroliraju daljnji razvoj u smjeru specifičnom za muške jedinke. Na početku aktiviraju diferencijaciju primordijalnih spolnih stanica u fetalne spermatogonije, nazvane još i prospermatogonije (gonocite) koje po svom fenotipu imaju potencijal spermatogeneze, dok u odrasloj dobi Sertolijeve stanice reguliraju to i pružaju punu podršku tijekom spermiogeneze. Razvoj sjemenika ne ovisi o spolnim stanicama te je moguć razvoj fenotipski normalne muške jedinke bez njih (12). S druge strane, razvoj spolnih stanica potpuno je ovisan o somatskim stanicama (13), iako se od njih po mnogočemu razlikuje te je potrebno poznavati te specifičnosti u embrionalnom i fetalnom razdoblju.

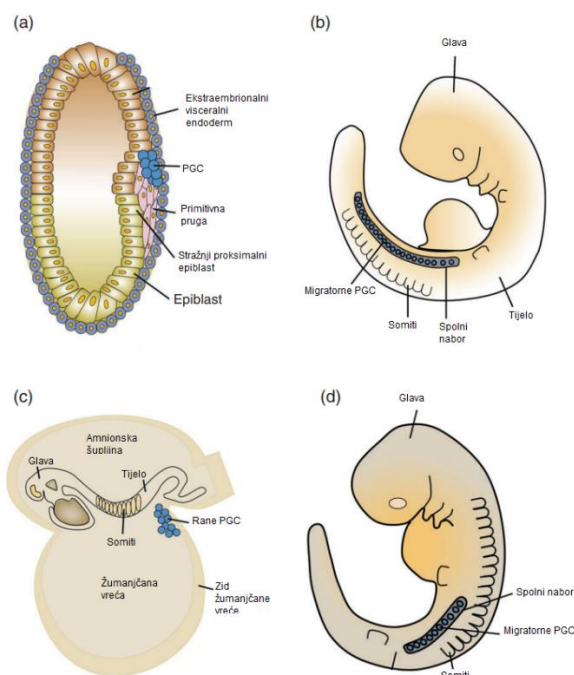
1.1.1. Razvoj primordijalnih spolnih stanica

Embrionalni razvoj zametnih stanica (engl. *germ cells*) započinje pojavom zametnih prastanica, nazvanih još i primordijalne spolne stanice (engl. *primordial germ cell*, PGC). Njihova je specifikacija presudna za nastavak vrste, s obzirom na to da će se ove stanice razviti u zrele gamete, spermije i jajne stanice, prijenosnike genetske informacije. PGC se specificiraju prije gastrulacije tijekom ranog embrionalnog razvoja, u miša embrionalni dan (E) 6 - 7, a u ljudi vjerojatno tijekom drugog tjedna nakon oplodnje (14). Istraživanja ljudskih PGC ograničena su zbog dostupnosti materijala te se većina dosadašnjih znanja skupila analizirajući uzorke Carnegie kolekcije (15). Dodatna prepreka istraživanjima PGC je njihov malen broj među brojem somatskih stanica.

Za diferencijaciju PGC karakteristična je putanja ranog razvoja koja obuhvaća tri različita, no isprepletena događaja: potiskivanje somatskog mezodermalnog puta, ponovno uspostavljanje pluripotentnog izražaja gena te globalno epigenetsko reprogramiranje. Prva dva se spominju u nastavku teksta, a reprogramiranje u sklopu epigenetskih promjena. Većina istraživanja provedena je na mišu te se i u ovoj disertaciji koristi kao osnovni model. Događaji su većinom slični u štakoru, s odgodom događaja za jedan ili dva dana zbog duljeg trajanja trudnoće. Navedeni su mehanizmi zajednički razvoju sjemenika u čovjeka i u glodavaca, a dalje u tekstu navedene su specifičnosti i razlike među tim vrstama.

1.1.2. Razvoj primordijalnih spolnih stanica u glodavaca

PGC se pojavljuju oko 6.5 dpc među stanicama epiblasta unutarnje strane stražnjeg dijela zametnog cilindra. Iz ekstraembrionalnog endoderma potječu koštani morfogenetski proteini (engl. *bone morphogenic protein*, Bmps) Bmp4 i Bmp8b i zajedno s Bmp2 iz stražnjeg visceralnog endoderma utječu na nekolicinu stanica epiblasta kako bi od njih formirali osnovnu populaciju od 30 - 40 mišjih primordijalnih spolnih stanica (engl. *mouse primordial germ cells*, mPGC) na bazi alantoisa u ekstraembrionalnom mezodermu oko 7.5 dpc (16-18) (Slika 1).



Slika 1. Specifikacija PGC. (a) Perigastrulacijski mišji embrij na kojem su označene zametne stanice (PGC) u nastajanju. (b) Mišji embrij 9.5 dpc u kojem migrirajuće PGC koloniziraju spolni nabor. (c) Ljudski embrij star tri tjedna s najranijim PGC u zidu žumanjčane vreće. (d) Ljudski embrij u 5. - 6. tpo s migrirajućim PGC koje naseljuju spolne nabore. (Preuzeto i prilagođeno: *Tan & Tee, Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine, 2021(19)*)

Interesantno, Bmp4 pokreće inicijalnu diferencijaciju spolnih stanica u samo nekoliko njih (oko 6), a od ostalih se stanica tada razlikuju po izražavanju Blimp1 (engl. *B lymphocyte-induced maturation protein-1*) (20, 21). Dodatno, prednji visceralni endoderm izražava faktore koji antagoniziraju Bmp, inhibirajući specifikaciju mPGC. Sve se događa u vrlo strogo vremenski reguliranom razvojnom razdoblju (E5.5 - E6) te je nakon E6.25 inicijalna

diferencijacija znatno otežana. Dodatno, preteče mPGC moraju izražavati Blimp1 u dovoljno visokoj koncentraciji da bi se specificirale (22).

Jedan od poznatijih signalnih puteva, Wnt također ima značajnu ulogu u ranom razvoju mPGC. Nekoliko radova pokazuje kako BMP molekule ne mogu same inducirati ili održati specificaciju mPGC, nego ovise o Wnt3/ β -catenin/T signalizaciji u zadržavanju izražaja Blimp1 (23, 24). Blimp1 je DNA-vezujući protein koji uglavnom utišava, no može i aktivirati genski izražaj (25-29). Blimp1 ne samo da inicijalno potiče specificaciju mPGC nego ima funkciju koordinatora preuzimanja genskog izražaja specifičnog za spolne stanice putem utišavanja somatskog programa te poticanja drugih gena važnih za specificaciju mPGC, kao što su *Prdm14*, transkripcijski faktor (TF) *AP-2 γ* (*Tfap2c*), DND inhibitor represije putem miRNA 1 (*Dnd1*), *Kit*, *Nanos3* (22, 30). Osim Blimp1 proteina, ove stanice jako izražavaju tkivno-nespecifične alkalne fosfataze (Tnap ili *Alpl*), *Ifitm3* (fragilis) i protein vezan uz razvojnu pluripotenciju, *Dppa3* (poznat i kao *Stella* i *PGC7*) te, suprotno somatskim, primjerice mezodermalnim stanicama, jako utišavaju izražaj *Hox* (*Homeobox*) gena (31-33).

1.1.3. Razvoj primordijalnih spolnih stanica u čovjeka

Prve primordijalne zametne stanice čovjeka (engl. *human primordial germ cells*, hPGC) uspostavljaju se između 9. i 16. dana poslije oplodnje (dpo), što čini istraživanja na njima vrlo nepraktičnim. Zbog položaja diskoidnog epiblasta ljudskog postimplantacijskog embrija smatra se da se inicijalne hPGC pojavljuju u hipoblastu ili izlaze iz samog epiblasta, što je bitno drugačije nego u glodavaca (Slika 1). Podaci istraživanja specificacije PGC javanskog makakija (engl. *cynomolgus monkey*; lat. *Macaca fascicularis*) pokazala su da su PGC inducirani prije gastrulacije u dorzalnom amnionu kao odgovor na signale iz samog amniona i ekstraembrionalnog mezenhima (34). Zbog sličnosti embrionalnog razvoja čovjeka i javanskog makakija, smatra se da se i hPGC pojavljuju u amnionu, a ne u stražnjem epiblastu, kao u miša i u štakora.

Daljnji razvoj hPGC prilično je dobro opisan. Mnogi autori se slažu da postoji grupa od 30 - 50 velikih, sferičnih stanica iz endoderma žumanjčane vreće u embriju od tri tjedna (14, 35). U sljedećim danima njihov se broj povećava te doseže oko 1000 premigrirajućih hPGC. Biljezi ranih hPGC (3 - 5 tjedana poslije oplodnje, tpo) uključuju TNAP, NANOG, OCT4, SSEA4 i KIT proteine (36-39).

Biljezi *DAZL*, *DDX4* i fukoziltransferaza 4 (*FUT4*) počinju izražaj ili ga pojačavaju u tjednima koji slijede (6 - 9 tpo). Suprotno mPGC, hPGC ne izražavaju *SOX2* (40), ali izražavaju

SOX17 (41, 42) te je os signalizacije BLIMP-SOX17 ključna u specifikaciji hPGC. Morfološki se ne razlikuju se mnogo od okolnih stanica, ali daljnjim razvojem postaju veće, okrugle ili ovalne i imaju veliku jezgru s jednom ili dvije jezgrice, okruženu svjetlom citoplazmom (43), što je najuočljivije nakon naseljavanja PGC u spolne nabore.

1.1.4. Smještaj PGC u spolne nabore/žlijezde

U ljudi hPGC se nalaze ekstraembrionalno 23. dana nakon oplodnje, a prve hPGC naseljavaju spolne nabore (engl. *gonadal ridge*, GR) tijekom petog tpo (14), što ukazuje da PGC moraju prijeći znatnu udaljenost kako bi pridonijele bipotentnoj spolnoj žlijezdi. Kod sisavaca se premještanje PGC odvija aktivno i pasivno, tj. migracijom i zbog samog rasta embrija (44, 45).

U vrijeme specifikacije PGC, buduće spolne žlijezde naziru se kao zgusnuća celomskog epitela blizu korijena mezenterija u razvoju. Kako bi se stvorila funkcionalna spolna žlijezda, PGC se moraju premjestiti iz endoderma žumanjčane vreće u sami embrij, a preteče somatskih stanica moraju proliferirati i organizirati spolni nabor, osnovu budućeg sjemenika ili jajnika. Otprilike jedan tjedan nakon specifikacije PGC, one se ugrađuju u embrij u vrijeme savijanja embrionalnog diska, čime dio žumanjčane vreće koja sadrži PGC postaje stražnje i srednje crijevo. Posljedično, PGC se tijekom četvrtog tpo mogu naći kao pojedinačne stanice blizu aorte među endodermalnim stanicama epitela primitivnog crijeva. Prilikom dijela seljenja PGC, te stanice moraju prijeći bazalnu laminu endodermalnog epitela, što ukazuje na mogućnost tranzicije epitela u mezenhim (engl. *epithelial-to-mesenchymal transition*, EMT), koje im omogućuje promjenu dobro organiziranih, kompaktnih epitelnih u migrirajuće mezenhimalne stanice. EMT je proces najviše istraživan u razvoju karcinoma, a u oba slučaja uključuje epigenetske promjene koje su visoko regulirane u slučaju embrionalnih stanica, a neorganizirane i slabo regulirane u slučaju razvoja tumora.

Predložena je teorija da živčane niti služe kao vodič za premještanje PGC iz dorzalnog mezenterija stražnjeg crijeva preko preaortnog područja do osnove spolne žlijezde, s obzirom na to da i prve PGC i prvi živčani završeci dosežu spolni nabor tijekom petog tpo (46).

Naseljavanje PGC u spolne nabore/žlijezdu događa se od četvrtog do četrnaestog tpo u ljudi - kad su neke PGC već smještene između tračaka sjemenika, neke su još u epitelu crijeva (39, 43). Zaostale PGC koje se ne uklone na vrijeme apoptozom, nose rizik razvoja tumora zametnih stanica (engl. *germ cell tumor*, GCT). U ljudi se ekstragonadni GCT najčešće nalaze uz središnju liniju i unutar središnjeg živčanog sustava (47), što potvrđuje teoriju da PGC prate

živčane završetke pri migraciji. U mišjem modelu je pokazano da PGC preživljavaju samo unutar unaprijed zadanog puta migracije te ako iz njega izađu, signali koji potiču preživljenje postaju preslabi da održe stanicu te se ona apoptotički uklanja (48). Zanimljivo je da se ne uklanjaju sve zastranjene PGC. Naime, mPGC koje dođu do nadbubrežne žlijezde postanu jajne stanice i ulaze u meozu bez obzira na spol (49), a moguće je da pridonose hematopoetskim stanicama u području aorte, spolne žlijezde i mezonefrosa tijekom embriogeneze (50). To ukazuje na ogroman potencijal PGC te njihovu ovisnost o okolnim signalima koji im mogu promijeniti fenotip promjenom izražaja gena upravo epigenetskim promjenama.

Rana (embrionalna) kontrola aktivne migracije PGC ukazuje na kombinaciju privlačnih i odbijajućih signala. Medijatori kao što je faktor zametnih stanica (engl. *stem cell factor*, SCF) i fibronektin obilno su izraženi na cijeloj putanji PGC, a adhezijske molekule koje proizvode same PGC zadužene su za kontrolu seobe prije petog tpo, dok još nema živčanih niti u tom području (51). Dokazano je da Schwannove stanice izlučuju lizofosfatidičnu kiselinu koja privlači i vodi PGC (52).

Putanja naseljavanja PGC u spolne nabore/žlijezde gotovo je identična u miša, štakora i čovjeka. Migrirajuće PGC pomiču se ameboidno, imaju dinamičnu staničnu morfologiju, slabu prijemčivost te nalikuju migrirajućim imunološkim stanicama (53). Također, PGC koje migriraju u isto vrijeme i proliferiraju, dok se kontrola proliferacije i preživljenja provodi epigenetskim promjenama mnogih gena (54).

Molekularna kontrola migracije PGC okarakterizirana je samo u miša. Iako su mnogi mehanizmi predloženi kao kontrolori migracije, npr. kemotaksija ovisna o gradijentu molekula, dinamička adhezija bliskim PGC i komponentama izvanstaničnog matriksa na putu migracije, odbijanje PGC lipidnim modifikacijama, vođenje živčanim završecima, njihova važnost nije dobro poznata. Ipak, nekoliko istraživanja na miševima govori u korist uključenosti C-X-C motiv ligand kemokina 12 (CXCL12)/C-X-C motiv ligand kemokin receptora 4 (CXCR4), SCF/KIT, kadherina 1 (engl. *cadherin 1*, Cdh1), podjedinice $\beta 1$ integrina (engl. *integrin subunit $\beta 1$* , Itgb1), fibronektina te TGF β i FGF signalnih puteva u migraciju PGC.

Mehanizam zaustavljanja PGC u spolnim naborima nije poznat u detalje, no presudan je pri njihovom naseljavanju. Poznate su značajne promjene transkriptoma migrirajućih PGC nakon dolaska u spolne nabore: izražaj biljega odraslih spolnih stanica, Dazl, Ddx4 i Gcna (engl. *germ cell nuclear acidic protein*) se pojačava, dok se Kit, Tnap, Blimp1 i Ssea1 snižava (55-62).

Slično se odvija u čovjeka te su stotine gena različito izražene u spolnim stanicama prije i poslije naseljavanja spolnih žlijezda (40, 63, 64).

1.1.5. Razvoj somatskih stanica i determinacija spola

Spolni nabori protežu se uzdužno preko mezonefrosa i osnova su buduće spolne žlijezde (11). Postaju morfološki uočljivi tek u petom tpo, kao rezultat započete proliferacije i organizacije celomskog epitela. Naime, stanice celomskog epitela počinju proliferirati u E9.5 u mišu (a već u trećem tpo u čovjeku) što je prvi znak stvaranja buduće spolne žlijezde (sjemenika, odnosno jajnika) (65). Nekoliko transkripcijskih čimbenika ima presudnu ulogu u razvoju spolnog nabora. Jedan od najranije izraženih je gen *Wt1* (engl. *Wilms tumor 1*), prisutan u mokraćno-spolnom naboru miša u E9 (66). Istraživanja na genetski modificiranim miševima pokazala su nezamjenjivu ulogu i *Gata4* (engl. *GATA-binding protein*), *Emx2* (engl. *empty spiracles homeobox 2*), *Lhx9* (engl. *LIM homeobox 9*), i *Sf1* ili *Nr5a1* (engl. *steroidogenic factor 1* ili *nuclear receptor subfamily 5 group A member 1*) (67-71). Slično kao kod mišjeg modela, WT1 i NR5A1 izraženi su rano u ljudskom spolnom naboru te prethode izražaju SRY za oko 10 dana (72, 73).

Do 10.5 dpc u miša i 42 dpo u čovjeka nije moguće morfološki razlikovati XX i XY spolnu žlijezdu, a tada dolazi do trenutka vremenski i prostorno ograničene inicijalne aktivacije *SRY* gena u nekoliko somatskih stanica (preteča Sertolijevih), kojom će se razvoj bipotencijalne gonade i PGC usmjeriti ka muškoj liniji (72). Ovaj proces naziva se spolna determinacija i prethodi nekoliko tjedana spolnoj diferencijaciji koja ovisi o indukciji steroidogenog genskog izražaja i proizvodnji testosterona u razvoju muške jedinke. Aktivacija *SRY* u XY spolnoj žlijezdi dovodi do znatno jače proliferacije stanica i ubrzanog rasta te je pri normalnom razvoju sjemenik redovito veći od jajnika u istom embrionalnom razvojnom razdoblju (74), a regulacija *Sry* provodi se DNA metilacijom (75). Funkcija *SRY* ovisi o drugim genima koje inducira, kao što su *SOX9*, gdje je presudna jačina njegova izražaja kako bi pokrenuo lavinu pojačavanja i utišavanja transkripcijskih faktora i drugih gena (76). *SOX9* je najvažniji izravni cilj *SRY* te, jednom kad se inducira iznad određene razine, utječe na cijeli niz interakcija gena i zadržava izraženost samoregulirajućim mehanizmom (77). Zadužen je za koordinaciju transkripcijske mreže karakteristične za mušku jedinku kako bi se održala diferencijacija Sertolijevih stanica i struktura koje se razvijaju iz Wolffovih kanala te utišao fenotip karakterističan za jajnik i struktura koje se razvijaju uz Müllerovih kanala. *Sox9* se izražava u spolnim naborima miša oko 11 dpc te, kao i u slučaju *Sry*, u smjeru od sredine nabora prema kaudalno i kranijalno (78). U ljudskom 46,XY embriju *SOX9* je aktiviran pod utjecajem *SRY* te doseže najjaču izraženost oko 65 dpo (79) i pokazana je njegova izraženost u devetom tpo (80). Tijekom diferencijacije spola

u ljudi, utjecaj *SOX9* ovisan je o dozi, a njegove su mutacije uzrok nekoliko tipa poremećaja spolnog razvoja (81-85).

Izražaj *Sox9* u glodavaca pod kontrolom je faktora koji se vežu na TES (engl. *testis-specific enhancer of Sox9*) (86). Prije 10.75 dpc na TES se veže i pojačava ga *Nr5a1*, a nakon toga to čini zajedno sa *Sry* i time pojačavaju izražaj *Sox9*. Nakon smanjenja izražaja *Sry*, izražaj *Sox9* održavaju *FGF9*, *Ptgds* (engl. *prostaglandin D₂ synthase*), *Dmrt1* (engl. *doublesex and mab-3-related TF1*) te sam *Sox9* (86, 87). Spomenuti faktori i njihovi signalni putevi u glodavaca su dobro opisani na genetski modificiranim (engl. *knock-out*) modelima. U ljudi je opisan poremećaj razvoja sjemenika koji uključuje FGF9/FGFR2 signalni put (88). Ljudski *SOX9* vjerojatno je reguliran drugom regijom, a ne TES-om (89). *SOX9* je ključan u razvoju sjemenih kanalića, no u daljnjem razvoju njegova se funkcija može zamijeniti sa *SOX8* i *SOX10* (90, 91).

AMH je još jedan od ključnih faktora koji potječe iz Sertolijevih stanica. Pripada obitelji faktora rasta TGF β i prisutan je u sjemeniku do puberteta (92) i zato se smatra biljekom nezrelih Sertolijevih stanica. Presudan je za regresiju Müllerovih kanala, struktura iz kojih bi se u suprotnome razvili jajnici, maternica i gornja trećina vagine u ženskih jedinki (93, 94). Istraživanja su ukazala da AMH nadzire ulazak gonocita u mitotičko mirovanje tijekom fetalnog razvoja, a u istraživanju na mišjem modelu pokazano je da potiče prijelaz gonocita u spermatogonije (63, 95, 96).

Osim utjecaja na zametne stanice, Sertolijeve stanice koordiniraju razvoj svih ostalih stanica sjemenika te orkestriraju i diferencijaciju Leydigovih stanica koje proizvode testosteron i time maskuliniziraju fetus. Kasniji razvoj vanjskih spolnih organa najraniji je znak utjecaja androgena (97). Testosteron sintetiziran u Leydigovim stanicama potreban je i za zadržavanje Wolffovog kanala i pripadajućih struktura.

Kako broj Sertolijevih stanica određuje granicu proizvodnje spermija, važna je njihova normalna diferencijacija i predanost vlastitoj staničnoj liniji (održavanje fenotipa) (13). Podaci o proliferaciji Sertolijevih stanica u štakora ukazuju na povećanje proliferacije do 18.5 dpc, smanjenje do 20.5 dpc te ponovno maksimalno povećanje do kraja postnatalnog razdoblja (7 dpp) uz fluktuacije (98). Prestaju proliferirati nakon okota, u štakora oko 15 dana (99), a u miša oko 12 dana dpp (100). U ljudi broj Sertolijevih stanica raste od fetalnog do postnatalnog razdoblja te ostaje stabilan do oko 10. godine života (101). Razlika se može pripisati preklapanju kraja neonatalnog razdoblja s pubertetom u štakora, pa je maksimalan broj Sertolijevih stanica, karakterističan za odrasle jedinke, u štakora prisutan već na kraju neonatalnog razdoblja (102).

1.1.6. Razvoj sjemenih tračaka i kanalića

Nedugo nakon specifikacije preteča Sertolijevih stanica koje izražavaju *SOX9*, stanice duguljastog i tankog spolnog nabora počinju se reorganizirati. Međusobno nakupljanje preteča Sertolijevih stanica započinje stvaranje sjemenih kanalića, a zametne stanice ostaju okružene unutar njih, dok ostale somatske stanice (koje nisu Sertolijeve) ostaju izvan kanalića i čine intersticij. Za potpuni razvoj sjemenika potrebna je također migracija stanica iz okolnih struktura embrija: endotelnih stanica žila iz susjednog mezonefrosa, makrofaga iz žumanjčane vreće ili fetalnih hematopoetskih matičnih stanica koje se diferenciraju u monocite (103).

Stvaranje sjemenih kanalića razdoblje je značajnih promjena i mijenjanja naziva stanica: preteče Sertolijevih stanica postaju fetalne ili nezrele Sertolijeve stanice koje prelaze iz stanica sličnih mezenhimalnim u polarizirane epitelne stanice, a PGC koje su okružene sjemenim kanalićima postaju gonocite ili prespermatogonije/prospermatogonije u glodavaca.

Dužina spolne žlijezde miša skraćuje se do 13.5 dpc, dok se širina učtvorostručuje od 11.5 do 14.5 dpc (104). Kako Sertolijeve stanice proliferiraju, kanalići se produžuju i proširuju te se počinju zavijati oko 15.5 dpc, što se poklapa sa stvaranjem čvrste tunike albugineje i ograničavanjem prostora organa.

Daljnji razvoj zametnih, budućih spolnih stanica, regulacija njihove proliferacije, mirovanja i diferencijacije opisana je dalje, pod 1.4. Povezanost epigenetskih promjena i staničnog ciklusa zametnih stanica.

1.2. Epigenetske promjene

Epigenetika je znanost o mitotički i mejotički nasljednim promjenama u genskom izražaju ili staničnom fenotipu, koje ne uključuju promjene DNA slijeda (105). Time se omogućuje da organizam koji je nastao od jedne stanice (zigote) i u kojem svaka stanica ima isti genetski kod može sadržavati više staničnih linija, a time i različitih tkiva. U takvom višestaničnom organizmu različiti tipovi stanica imaju različit epigenom. Epigenom se u svakoj pojedinoj stanici mijenja kao odgovor na okolišne čimbenike, tzv. epigenatore, a oni mogu dovesti do rasta, apoptoze, diferencijacije i proliferacije, što su sve načini prilagodbe organizma (106). Epigenetske promjene kao što su metilacija, modifikacije histona i RNA interferencija, osim promjenljivosti tijekom života stanice i organizma, djelomično su stabilne promjene koje se mogu prenijeti na potomstvo, putem epigenetskih promjena u genomu haploidnih stanica ili

njihovih preteča. Svaka vrsta stanica ima tipične epigenetske obrasce koji održavaju njenu „tipičnost“, a tu se spolne stanice tijekom ranog razvoja razlikuju po posebno složenim mehanizmima uspostavljanja, brisanja te ponovnog uspostavljanja epigenetskih obrazaca karakterističnih za zametne stanice.

Mogućnost regulacije kromatinske strukture ključna je eukariotskim organizmima kako bi mogli organizirati golemi sadržaj sekvenci DNA u kompaktni oblik te odrediti dijelove DNA dostupne za transkripciju (107). Kromatin sadrži DNA i histone podložne modifikacijama koje utječu na način njihove interakcije.

Epigenetski mehanizmi reguliraju odnos DNA i histona aktivacijom i inaktivacijom transkripcije gena. Heterokromatin je transkripcijski neaktivan kromatin, tj. geni koje sadrži se ne izražavaju, a njegova kompaktna struktura ključna je tijekom mejoze kako bi se kromosomi pravilno poredali i rekombinirali. Eukromatin je transkripcijski aktivan te sadrži DNA koji je za histone vezan rahlo (108).

Navedeni epigenetski mehanizmi često djeluju udruženo, što objašnjava kompleksnost uzročno-posljedičnih veza epigenetskih učinaka okolišnih čimbenika i njihove regulacije genskog izražaja (109-114).

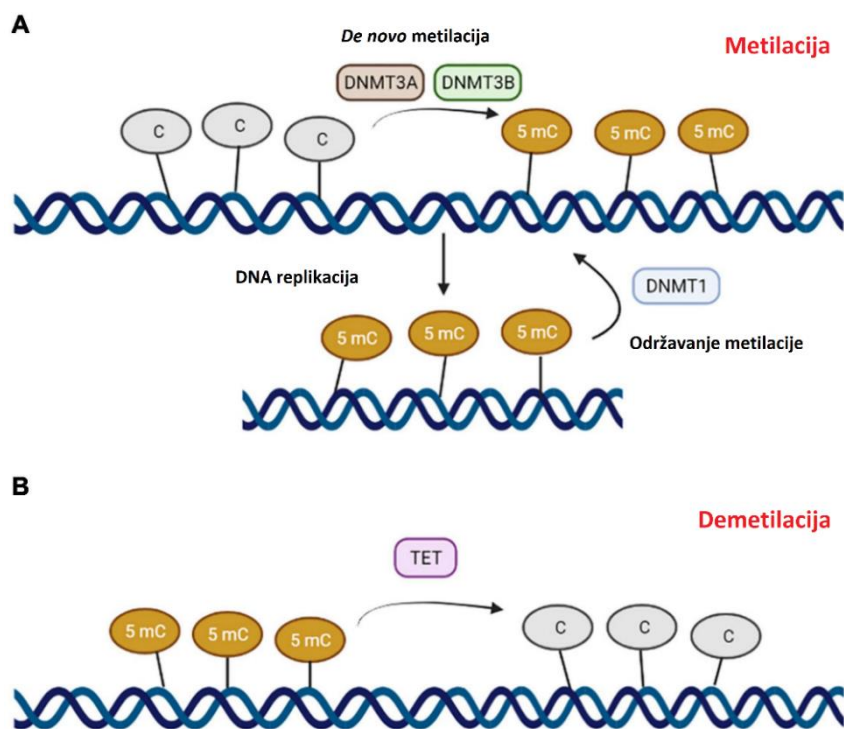
Osim vanjskih utjecaja na odrasli organizam putem hrane, lijekova, toksina i fizikalnih čimbenika, čime se ostvaruju epigenetske promjene (115), sve je veći broj istraživanja epigenetskog utjecaja na plod tijekom trudnoće (116, 117) i poseban je naglasak dan epigenetskim promjenama spolnih stanica tijekom životnog ciklusa, od začeća, embrionalne i fetalne dobi do spolne zrelosti.

1.2.1. DNA metilacija

DNA metilacija najbolje je istražena epigenetska modifikacija, a označava prijenos metilne skupine (-CH₃) na ugljik na poziciju 5 unutar strukture citozina najčešće u CpG dinukleotidu (118, 119). Time nastaje modificirana baza metilcitozin (5mC) (120), a prijenos se provodi pomoću proteina s enzimatskom aktivnošću nazvanih DNA (citozin-5) metiltransferazama (DNMT). U genomu kralježnjaka ima važne uloge u genskoj regulaciji, razvoju i bolestima (121). Odvija se u cijelom genomu te je otprilike 60-90 % svih CpG sekvenci u genomu metilirano. Uglavnom se ne odvija na CpG otocima (engl. *CpG islands*, CGI), dijelovima genoma bogatim CpG-sekvencama, smještenim u promotorima gena, u kojima su nemetilirani CpG dinukleotidi zbijeni i otporni na DNA metilaciju (122), a čine oko 1 % humanog genoma. Na tim mjestima transkripcijski čimbenici sprječavaju i *de novo* DNA

metilaciju (123). CpG otoci dugi oko 1 kb nalaze se u promotorskim regijama više od pola ljudskih gena, točnije, u blizini njihovih početnih mjesta transkripcije (engl. *transcription start site*, TSS), a najčešće su to „housekeeping“ geni, tj. oni koji su nužni za održavanje osnovnih funkcija svih stanica (124), no i neki tkivospecifični te razvojni regulatorni geni (125, 126). DNA metilacija je nužan mehanizam utišavanja retrotranspozona, ponavljajućih sekvenci i utisnutih (engl. *imprinted*) gena u genomu stanice, a njome se regulira i izražaj tkivospecifičnih gena (engl. *tissue-restricted genes*) tijekom diferencijacije i razvoja te se održava takvo stanje cijeli životni vijek stanice.

Postoje četiri vrste metiltransferaza koje metiliraju DNA prema sebi svojstvenim obrascima: DNMT1, DNMT3A, DNMT3B i DNMT3C, od kojih je DNMT3C prisutna samo u glodavaca (127, 128) (Slika 2A). Još jedan član obitelji metiltransferaza, DNMT3L, katalitički je neaktivan, ali potiče aktivnost drugih DNMT3 enzima (129). DNMT1 enzim je bitan za kopiranje metilacijskog obrasca roditeljske DNA na novonastali lanac tijekom srednje i kasne S-faze te se kolokalizira s mjestima pericentričnog kromatina koji se tada repliciraju (130).



Slika 2. DNA metilacija. (a) DNA metiltransferaze 3A (DNMT3A) i 3B (DNMT3B) kataliziraju *de novo* metilaciju citozina na CpG dinukleotidima, stvarajući 5-metilcitozin. DNA metiltransferaza 1 (DNMT1) provodi održavanje DNA metilacijskog obrasca tijekom mitoze. (b) TET enzimi provode DNA demetilaciju. (Preuzeto i prilagođeno: *Rotondo i sur., Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2021(131)*)

DNA metilacija reverzibilan je proces te postoje aktivni demetilacijski mehanizmi uglavnom pod kontrolom TET enzima (engl. *ten-eleven translocation*) (132) (Slika 2B). TET enzimi (TET1, TET2 i TET3) mijenjaju 5mC u 5-hidroksimetilcitozin (5hmC), potom u 5-formilcitozin (5fC), a zatim u 5-karboksilcitozin (5cC). 5fC i 5cC prepoznaju se i uklanjaju te zamjenjuju citozinom (133, 134). TET enzimi mogu uzrokovati i pasivnu demetilaciju, npr. u proliferirajućim stanicama, s obzirom na to da DNMT1 ne prepoznaje 5hmC (135). Dinamika promjena DNA metilacije u smislu demetilacije i remetilacije razlikuje se u somatskim i zametnim stanicama organizma, a u potonjim igra presudnu ulogu u osiguranju buduće funkcije u reprodukciji (136-139).

1.2.2. DNA metilacija u razvoju

Tijekom razvoja nove jedinke (oplođene jajne stanice), nastale od dviju terminalno diferenciranih spolnih stanica (spermija i jajne stanice), epigenetske oznake roditeljskog genoma u embriju moraju biti brzo uklonjene kako bi se ostvarila naivna pluripotencija (sposobnost stvaranja svih obilježja organizma). Kasnije, tijekom embriogeneze i organogeneze, postoji vremenski i prostorno visoko regulirana orkestracija dodavanja novih epigenetskih oznaka. Postepeno se utišavaju pluripotentni geni (geni izraženi u embrionalnim matičnim stanicama) i aktiviraju promotori različitih tkivnospecifičnih gena čime se osigurava stanična diferencijacija (140), nužna za razvoj organa, odnosno organizma (141). Posebno je važno da promotori gena pluripotentnosti budu na vrijeme hipermetilirani/utišani, s obzirom na to da je poznata njihova izraženost u različitim tumorima (142, 143), kao i hipermetilacija gena supresora tumora, koji time gube zaštitnu funkciju tijekom staničnog ciklusa (144, 145).

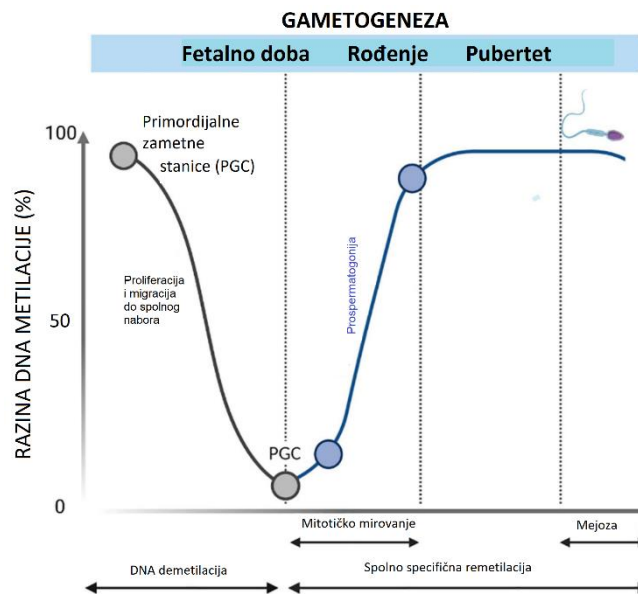
Drugim riječima, epigenetske oznake diferenciranih somatskih stanica sisavaca relativno su stabilne, no da bi nastale, mora doći do opsežnog tzv. epigenetičkog reprogramiranja u genomu stanica preimplantacijskog embrija, kao i u PGC, odnosno budućim spolnim stanicama sisavaca (6, 146). U preimplantacijskom embriju stanice prolaze kroz val demetilacije DNA te je najniža prosječna CpG metilacija svih preimplantacijskih stadija embrija primijećena u unutarnjoj masi stanica mišje blastociste u E3.5 (121). Naravno, to je prolazno stanje te se DNA posljedično i brzo remetilira. Epigenetičko reprogramiranje u razvoju zametnih stanica uključuje također vremenski određene valove DNA demetilacije i *de novo* metilacije (Slika 3) (6, 136). Metilacija DNA spolnih stanica osigurava pravilnu aktivnost ili utišavanje cijelog genoma X kromosoma i nekih njegovih dijelova (147), formiranje pravilno

utisnutih gena (136, 141) i utišavanje evolucijski mladih ponavljajućih retrotranspozonskih sljedova (128).

Genom jajne stanice i spermija različito je metiliran, a te razlike su nužne za pravilan razvoj buduće jedinke (6). Stoga PGC, u svrhu diferencijacije prema određenom spolu, zahtijevaju brisanje epigenetskog „sjećanja“ (engl. *epigenetic memory*) roditelja (između ostalog i spola) putem globalne demetilacije vlastite DNA čime se osigurava i uklanjanje potencijalnih epimutacija iz roditeljskih spolnih stanica (146). Kasnije, u razvoju, doći će do remetilacije, odnosno *de novo* stjecanja epigenetskih oznaka u muškim i ženskim spolnim stanicama, pa i onih spolnospecifičnih (npr. utisnuti geni, vidi 1.2.7), koje će osigurati pravilan razvoj buduće generacije. U muškim zametnim stanicama majčini i očevi utisnuti obrasci brišu se u PGC i ponovno se vraćaju tijekom fetalnog života (148, 149).

DNA metilacija u stanicama novodiferenciranih tkiva najčešće potiskuje transkripciju, čime sprječava izražaj funkcionalno nepotrebnih gena. Slično je i s reproduktivnim tkivom. Mnogi geni, kao što su oni odgovorni za kontrolu mejoze, u genomu pokazuju izražaj specifičan za spolne žlijezde i sudjeluju isključivo u gametogenezi. Sve ostale stanice organizma moraju primijeniti mehanizme, kao što je DNA metilacija, kako bi potpuno utišali izražaj takvih gena izvan zametnih stanica. Bilo kakva nepravilnost i nemogućnost demetilacije DNA koja sadrži takve specifične gene ili njihove regulatorne dijelove (promotore, pojačivače) u zametnim stanicama može ugroziti kasniji izražaj tih gena, a time dovesti do nemogućnosti proizvodnje kvalitetne jajne stanice ili spermija, tj. neplodnosti.

Unatoč globalnoj hipometilaciji genoma, transkripcija u PGC se ne aktivira nasumično (150, 151). Postoje i drugi mehanizmi koji osiguravaju izbjegavanje nekontroliranog prepisivanja DNA, kao u slučaju prijenosnih genetskih elemenata (transpozona, engl. *transposable elements*, TEs). Na primjer, ne brišu se baš sve epigenetske oznake te postoje genske regije koje barem djelomično izmiču globalnom reprogramiranju, čime se potencijalno može ostvariti transgeneracijsko epigenetsko nasljeđivanje.



Slika 3. Epigenetsko reprogramiranje tijekom razvoja muških spolnih stanica. Za vrijeme proliferacije i migracije u spolne nabore, genom PGC se globalno demetilira kako bi se uklonile epigenetske oznake roditelja. Ponovno uspostavljanje obrazaca DNA metilacije (*de novo* metilacija) slijedi tek kasnije, tijekom gametogeneze. *De novo* metilacija u muškim spolnim stanicama odvija se uglavnom u prenatalnoj dobi, prije mejoze u mitotički zaustavljenim gonocitama. (Preuzeto i prilagođeno: *Rotondo i sur., Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2021(131)*)

1.2.3. Globalna demetilacija genoma PGC

U početku njihove specifikacije, DNA metilacija jednaka je u PGC i embrionalnim somatskim stanicama. Tako u miša, dok se mPGC specificiraju iz proksimalnog epiblasta u ranom postimplantacijskom embriju, imaju razinu globalne metilacije DNA sličnu somatskim stanicama koje ih okružuju (152). Nakon specifikacije, tijekom početka naseljavanja PGC iz epiblasta u spolni nabor DNA metilacijske oznake brišu se na većini genoma, do razine značajno niže od one u somatskim stanicama, preciznije na oko pola razine metilacije koja je prisutna u stanicama epiblasta (64, 151, 153). Taj događaj zove se epigenetsko reprogramiranje, a čini ga faza I ili globalna DNA demetilacija, koja je praćena i fazom II, karakteriziranom s DNA demetilacijom specifičnom za genske lokuse, koja u miša započinje s 9.5 i završava s 13.5 dana gestacije. Tada je i razina DNA metilacije zametnih stanica najniža (150). Epigenetsko reprogramiranje PGC ne osigurava samo brisanje DNA metilacijskih oznaka roditeljskog spola, nego i reaktivaciju X-kromosoma i reorganizaciju histonskih modifikacija cjelokupnog genoma (154-157).

Tijekom toga procesa genom PGC demetilira se mehanizmima ovisnim i neovisnim o replikaciji (146). Demetilacija ovisna o replikaciji podrazumijeva prije spomenutu aktivnu konverziju 5-metilcitozina u 5-hidroksimetilcitozine TET enzimima, a ona neovisna o replikaciji, na prvi pogled pasivni mehanizam, uključuje represiju izražaja i time aktivnošću DNA metiltransferaza. Naime, kad se umnožava DNA u PGC, CpG mjesta novonastalog lanca-kćeri nisu metilirana te posljedično svako umnožavanje DNA prepolovljuje ukupan broj metiliranih CG dinukleotida po jedinici DNA (158-160), što se naziva smanjivanjem DNA metilacije ovisnim o replikaciji (Slika 2, 3). Proces reprogramiranja genoma, odnosno demetilacije DNA, sličan je između glodavaca i ljudi.

1.2.4. Demetilacija PGC u glodavaca

U zametnim stanicama glodavaca (npr. miš) smanjivanje razine DNA metilacije ovisno o replikaciji oslanja se na *Blimp1* i *Prdm14*, dva gena u specifikaciji mPGC koji utišavaju izražaj *de novo* DNMT-ova, *Dnmt3a* i *Dnmt3b* te *Uhrf1* (engl. *ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1*) (30, 161). Ipak, DNA metilacija regija koje kontroliraju utiskivanje i promotora gena mejoze očuvana je s *Dnmt1*, što je nužno kako se zametne stanice ne bi prerano diferencirale (162).

Pojačana aktivnost TET1 i TET2 u mPGC u 9.5 dpc praćena je povećanjem razine 5mC koje dosežu vrhunac oko 11 dpc (158, 159). Pad razine 5mC nakon 11.5 dpc najvećim dijelom rezultat je razrjeđenja ovisnog o replikaciji (163, 164). Važnost demetilacije provedene TET1 enzimom nedavno je doveden u pitanje, a s druge strane pretpostavila se uloga TET1 enzima u aktivaciji gena specifičnih za zametne stanice u gonocitama mehanizmom neovisnim o DNA demetilaciji (165). U štakora se demetilacija odvija na 14 - 15 dpc, po rezultatima imunohistokemijskog bojanja 5mC, 5hmC, DNMT1, DNMT3a i DNMT3b (166).

Unatoč gotovo potpunom brisanju metilacije citozina u mPGC i hPGC, neki dijelovi DNA ostaju zaštićeni i zadržavaju relativno visoke razine DNA metilacije (64, 151).

1.2.5. Demetilacija u ljudskim PGC

Općenito, dinamika reprogramiranja genoma ljudskih zametnih stanica (hPGC) (npr. demetilacije DNA) slična je onima u glodavaca, no moraju se naglasiti određene razlike. Utišavanje *Dnmt3a*, *Dnmt3b* i *Uhrf1* povezano je sa smanjivanjem DNA ovisnim o metilaciji, no i *Prdm14* ima presudnu ulogu. Utisnuti geni u ljudi prolaze hidroksimetilaciju TET

enzimima već u migrirajućim hPGC (64, 151, 153, 167). Proces demetilacije ne može se podijeliti u jasno odijeljene faze, kao što se prikazuje u miša. U vrijeme naseljavanja spolnih nabora genom hPGC u 6. tpo već je prilično demetiliran te je globalna metilacija CG dinukleotida oko 20 %. Najniža razina metilacije postiže se oko 11. tpo, kada je demetilirano više od 90 % CpG mjesta genomske DNA (153).

Nakon demetilacije provodi se *de novo* metilacija specifična za zametne stanice koja se razlikuje od one provedene u somatskim stanicama.

1.2.6. *De novo* DNA metilacija

De novo metilacija DNA događaj je kojim se ponovo uspostavljaju metilacijske oznake u ponavljajućim DNA sljedovima, kao što su retrotranspozoni, pa u utisnutim genima, kako bi se uspostavio spolnospecifični metilacijski uzorak zametnih stanica. Bilo kakav propust ostvarenja točne metilacije retrotranspozona ili utisnutih gena ima posljedice u razvoju embrija ili fetusa. *De novo* metilacija DNA ponovo se uspostavlja u vrijeme kada su se zametne stanice diferencirale prema spolu i kada su, nakon razdoblja diobe, u mirovanju, tj. kada im je stanični ciklus zaustavljen. Ulazak fetalnih zametnih stanica u mirovanje (prekid mitoze) praćen je dramatičnim promjenama u transkripciji gena bitnih za proces metilacije DNA, kako u glodavaca, tako i u čovjeka.

De novo metilacija DNA provodi se također enzimima DNMT, gdje su glavne metiltransferaze Dnmt3a i Dnmt3b u miša (124). Dnmt3a, ali ne i Dnmt3b, ključni su za *de novo* DNA metilaciju utisnutih dijelova gena u zametnim stanicama oba spola (168). U ljudi DNMT2 metilira RNA (169). Osim njih, Dnmt3c je enzim bitan za održavanje metilacijskih oznaka na evolucijski mladim transpozonima tijekom života, dok je Dnmt3l kofaktor u procesu *de novo* metilacije DNA. Oba su izražena u spolnim stanicama te njihova inaktivacija dovodi do poremećene DNA metilacije specifične za spolne stanice i posljedično neplodnosti (128, 170). Također, inaktivacija gena *Dnmt1*, *Dnmt3a* ili *Dnmt3b* u miša dovodi do smrti u embrionalnom ili postnatalnom razdoblju, što ukazuje na ključnu ulogu ovih enzima u razvoju (171, 172) (Slika 2, 3).

U muškom fetusu glodavaca *de novo* DNA metilacija događa se prenatalno jer počinje u 13.5 dpc i završava do 17.5 dpc u mišjim zametnim stanicama (150, 173, 174), što je dokazano i pojačanjem izražaja DNMT gena (*Dnmt3a*, *Dnmt3b* i *Dnmt3l*) u fetalnim spermatogonijama, odnosno gonocitama, između 12.5 i 15.5 dpc. Ti se događaji poklapaju s metilacijom promotora gena *Nanog* i *Sox2*, a time i utišavanjem njihove transkripcijske aktivnosti u muškim zametnim

stanicama (170, 175, 176), što ukazuje da se utišavanje gena pluripotentnosti odvija zbog globalne remetilacije genoma gonocita. Uz varijacije, do 16.5 dpc gonocite imaju oko 40 % metiliranih CG dinukleotida. U štakora postoji samo nekoliko istraživanja koja pokazuju da *de novo* metilacija počinje oko 19 - 20 dpc i završava nekoliko dana poslije okota, a dokazana su imunohistokemijski putem izražaja H3K4me2, H3K4me3 i 5mC te DNA metilacije gena *H19* (8, 9). U javanskog makakija analiza DNA metilacije od neonatalnog do odraslog razdoblja putem izražaja 5mC te pirosekvenciranjem utisnutih gena, kao što je *H19*, pokazano je progresivno uspostavljanje *de novo* metilacije postnatalno koje se nastavlja do odraslog razdoblja te ostaje stabilno (177).

Izražaj DNMT3a i 3b prisutan je u nekim fetalnim zametnim stanicama štakora 17.5 i 21.5 dpc, javanskog makakija 98 i 110 dpc te čovjeka 14. i 19. tpo (178), dok su najviše razine DNMT3a i DNMT1 u ljudskom fetalnom sjemeniku nađene su u 22. tpo, dok su visoke između 21. i 23. tpo (179), po čemu možemo pretpostaviti da se baš u to vrijeme DNA prespermatogonija remetilira te se odvija genomsko utiskivanje po očevom obrascu (vidi dalje). Niske razine metilacije muških PGC održavaju se barem do 19. tpo (153). Imunohistokemijsko bojenje 5-metilcitozinom pokazalo je da gonocite ljudskih fetalnih sjemenika između 20. i 40. tjedna trudnoće nisu pozitivne, dok je signal u Sertolijevim stanicama srednje pozitivan (180).

U miša tijekom daljnje spermatogenične diferencijacije DNA zametnih stanica dodatno se metilira te na kraju spermiji imaju oko 80 - 90 % metilacije na CpG mjestima (181). Kod ljudi ne postoji znatna razlika metilacije DNA među spermatogonijalnim matičnim stanicama odraslog muškarca i spermija, ukazujući na to da se metilacijski obrazac većinom formira prije nastupa spermatogeneze (182), kao i kod javanskog makakija (177).

1.2.7. Utisnuti geni

U sisavaca postoji oko 150 utisnutih gena, a većina ih se nalazi u nakupinama (engl. *clusters*) (141). Utisnuti geni pripadaju skupini gena koja prolazi proces tzv. genomske utiskivanja. Genomske utiskivanje (engl. *genomic imprinting*) označava izražaj samo jednog alela naslijeđenog od oca ili majke, dok je prisutno aktivno utišavanje izražaja drugog alela, čime se osigurava monoaleličan izražaj gena ove skupine. Genomske utiskivanje se događa u zametnim stanicama i posebno je važno za njihov razvoj i kasniju funkciju u vidu stvaranja nove jedinke. Utisnuti geni tijekom globalne demetilacije u preimplantacijskom embriju zadržavaju metilne oznake genoma roditelja, čime se održavaju monoalelni obrasci njihova izražaja koji su bili prisutni u genomu roditelja (tj. u spermiju ili oociti). Proces genomske

utiskivanja se u genomu odvija na regulatornim sljedovima utisnutih gena koji se zovu diferencijalno metilirane regije (engl. *differentially methylated region*, DMR), a drugi naziv je kontrolne regije utiskivanja (engl. *imprinting control regions*, ICR) (183), u ljudi još i IC1 (engl. *imprinting control region 1*) (184). U ljudi i miša poznat je velik broj utisnutih gena, kao što su *H19*, *IGF2* (engl. *Insulin-like growth factor 2*), *IGF2R* i dr., dok ih u štakora ima nešto manje (185, 186).

Mišji ICR gena *H19* je regija koja regulira gene na kojoj mjesta vezanja transkripcijskih faktora reguliraju DNA metilacijski status ICR-a (187, 188). Utisnuti geni *Igf2-H19* recipročno se utiskuju, a dijele zajedničkog pojačivača i kontrolne regije utiskivanja uzvodno na DNA slijedu za *H19* i nizvodno za *Igf2* od *H19* gena. U muškim spolnim stanicama, metilacija ICR *H19-Igf2* na kromosomu naslijeđenom od oca, posebice CTCF-vezujućih sljedova (engl. *CCCTC-binding factor binding sequences*, CBSs) u toj regiji, inhibira vezanje CTCF proteina cinkovih prstiju i njegovu funkciju kao izolatora te tako dopušta njegovu interakciju kao pojačivača s *Igf2*, ali ne i s promotorom *H19*, koji se stoga utišava. S druge strane, nemetilirani ICR *H19-Igf2* kromosoma naslijeđenog od majke stupa u interakciju s CCCTC-vezujućim faktorom (CCTF), stvarajući tako izolator koji kroz dugotrajne kromosomske interakcije ometa pristup *Igf2* promotora pojačivačima koji se nalaze nizvodno od *H19*. Ovakav proces rezultira transkripcijskom aktivacijom *H19* i utišavanjem *Igf2* na majčinom kromosomu te aktivacijom *Igf2* i utišavanjem izražaja *H19* na očevom kromosomu (189-191). Sumarno, ICR regija *H19-Igf2* pokazuje recipročan obrazac metilacije specifičan za alel koji je diferencijalno metiliran (metiliran po očevoj liniji i nemetiliran po majčinoj liniji) te regulira transkripciju *Igf2* s očevog alela, a *H19* s majčinog alela (192, 193). Ovaj recipročan metilacijski obrazac u ICR regiji uspostavlja se u zametnim stanicama i održava se i kroz cijeli razvoj poslije oplodnje, čak i poslije implantacije, kada nastupa *de novo* DNA metilacija cijelog genoma (193, 194). Pod normalnim okolnostima, ICR *H19* metiliran je u spermijima i nemetiliran u jajnim stanicama. Drugi geni utisnuti po očevoj liniji slično se reguliraju u spermijima, a neki od njih su *RASGRF1* (engl. *ras protein specific guanine nucleotide releasing factor 1*), *DLK1* (engl. *delta like non-canonical Notch ligand 1*) i *ZDBF2* (engl. *zinc finger DBF-type containing 2*) (195, 196).

Poremećena metilacija *H19* gena povezuje se s raznim dijagnozama i uzrocima neplodnosti u muškaraca (197-200). Čak se i u muškaraca s idiopatskom neplodnosti i normalnim parametrima sjemena našao poremećaj metilacije *H19* u spermijima (201). Poremećena metilacija *H19* gena detektirala se u regulatornom slijedu CTCF-vezujućeg mjesta 6 (CTCF6), smještenog u DMR *IGF2-H19*, u spermijima neplodnih muškaraca (200), ukazujući da imaju visok rizik bialelične inaktivacije *IGF2* gena, što bi moglo negativno utjecati

na razvoj embrija, fetusa i ishod trudnoće (198). Slično tome, metilacijski poremećaji *IGF2-H19* nađeni su u tkivu fetusa začetih metodama potpomognute oplodnje (202), a kod rođene djece uzrok je Beckwith-Wiedemann sindroma (203).

Gen *H19* analiziran je pirosekvenciranjem u štakora od 16.5 dpc do 3 dpp te se najveći porast postotka metilacije pokazao postnatalno (9). U odraslih ljudi postoci metilacije CpG mjesta gena *H19* raste tijekom spermiogeneze na razvojnom putu od spermatogonijskih matičnih stanica do spermija sa 100 %-tnom metilacijom u potonjem (204). Što se tiče fetalnog razvoja, Kerjean i sur. pokazali su hipometiliranost DMR regije *H19* u fetalnim spermatogonijama 24. tpo na jednom uzorku te spolnospecifičnu metiliranost u stanicama odraslog sjemenika, ukazujući da se *de novo* metilacija odvija prije ulaska u mejozu (205). Slično je pokazano i u javanskom makakiju, u čijim je neonatalnim sjemenicima DMR regija *H19* nemetilirana te se postepeno metilira kroz razvoj do odrasle jedinke (177), što ukazuje na poslijenatalnu uspostavu spolnospecifične metilacije DMR regije *H19*, iako je broj fetalnih uzoraka jako oskudan.

1.2.8. Modifikacije histona

Mnogi stanični procesi, uključujući mitozu i spermatogenezu, ovise o pravilno provedenim modifikacijama histona, koji stvaraju kondenzirani heterokromatinski ili rahli eukromatinski oblik DNA. Histone tvore većinom pozitivno nabijene aminokiseline, koje im omogućuju vezanje na negativno nabijeni DNA (206). Postoje četiri vrste nukleosomalnih histona: H2A, H2B, H3 i H4, a zaduženi su za namatanje DNA u nukleosome, koji su osnovne građevne jedinice kromatina.

Histone čine globularne domene i amino-terminalni nastavci nazvani histonskim repovima, čiji dijelovi mogu biti posttranslacijski modificirani metilacijom, acetilacijom, fosforilacijom, ubikvitilacijom i sumoilacijom (207, 208). Posttranslacijske modifikacije mijenjaju strukturu kromatina koja dovodi do aktivacije ili inaktivacije gena.

Metilacija je jedna od najčešćih modifikacija histona, a provodi se histonskim metiltransferazama. Metilacija N-terminusa histona s ostacima arginina uključena je i u utišavanje i u pojačanu aktivaciju gena (209). Lizinski ostaci N terminusa aktivno su uključeni u spermatogenezu (207), dok su acetilacija i deacetilacija nekoliko lizinskih ostataka na histonima H3 i H4 značajni pri mejozi u muškom spolnom sustavu. Fosforilacija histona uglavnom je povezana s transkripcijskom aktivacijom, a događa se na nekoliko serinskih ostataka svih poznatih histona. Suprotno tome, fosforilacija histonske varijante H2AX povezuje

se s kromosomskom kondenzacijom i utišavanjem gena tijekom mejoze u muškom spolnom sustavu (210), a isti učinak ima i ubikvitilacija histona H2A (211). Sumoilacija označava kovalentno vezanje malog modifikatora vezanog za ubikvitin (engl. *small ubiquitin-related modifier*, SUMO), a uključuje priključivanje proteina na lizinske ostatke N terminusa histona (212). Od četiri poznata SUMO proteina, samo je SUMO1 uključen u spermatogenezu, pri utišavanju XY tijela tijekom mejoze (213).

U PGC koje prolaze epigenetsko reprogramiranje DNA metilacija i transkripcija moraju biti jasno odvojeni procesi te je potreban dodatan mehanizam neovisan o DNA metilaciji da zaštiti PGC od štetnog djelovanja nekontroliranog genskog izražaja i aktivacije transpozonskih slijedova (149). Taj mehanizam provodi se modifikacijama kromatina te postoji značajna promjena histonskih oznaka u PGC u vrijeme niskih razina 5mC, uz razlike među vrstama. Razina potiskujuće histonske modifikacije, trimetilacije lizina 27 na histonu 3 (H3K27me3) kontinuirano se povećava u migrirajućim mPGC te se zadržava u spolnim naborima/žlijezdi, a smanjuje se kada gonocite ulaze u mirovanje u štakora (7). U miša izražaj H3K27me3 blago raste do 15.5 dpc i ostaje na istoj razini do 17.5 dpc (214). Usporedno postoji gubitak dimetilacije lizina 9 na histonu H3 (H3K9me2) u mPGC (154, 215). H3K9me2 ima sličnu ulogu i izražaj u ljudskim hPGC, a H3K27me3 je samo prolazno pojačan u migrirajućim hPGC stanicama te se njegov izražaj smanjuje kada one dođu do spolnog nabora. H3K27me3 nije izražen u ljudskim zametnim stanicama između 21. i 24. tpo, za razliku od H3K4me3 (180).

Dimetilacija arginina 3 na H2A i H4 (H2A/H4R3me2) također je pojačana u migrirajućim mPGC te smanjena u trenutku naseljavanja embrionalne spolne žlijezde (216). Zanimljivo, za razliku od miša, H2A/H4R3me2 razine ne mijenjaju se tijekom razvoja hPGC (149).

Histonske modifikacije značajan su mehanizam pri *de novo* DNA metilaciji i u štakora. H3K4me2 prolazno pojačava izražaj 18.5 dpc u gonocitama štakora, dok se izražaj H3K4me3 kontinuirano pojačava od 18.5 dpc do iza okota (9). Između 16 i 20 dpc snižava se vrijednost H2AK119Ub i H3K27me3, biljega histonske ubikvitinacije u zametnim stanicama, no nije razjašnjeno točno kojim mehanizmom (7). H2AK119Ub uključen je u transkripcijsko utišavanje velikih kromatinskih regija te je predložen kao važan faktor u specifikacije epigenoma specifičnog za mušku jedinku, potiskujući somatski program (217) te bi mogao biti važan pri mirovanju stanica dok se uspostavlja transkriptom zametnih stanica.

1.2.9. Retrotranspozoni

Retrotranspozoni su vrsta pokretnih genetičkih elemenata koji se transponiraju putem RNA intermedijera, utječu na regulaciju izražaja gena. Dijelimo ih na *LTR* (engl. *long terminal repeat*) retrotranspozone viralnog podrijetla i repliciraju se slično retrovirusima, *LINE* (engl. *long interspersed elements*) i *SINE* (engl. *short interspersed elements*). Zajedno čine gotovo 50% humanog genoma. *LINE* i *SINE* retrotranspozoni repliciraju se „copy and paste“ mehanizmom i za kretanje po genomu trebaju enzime reverznu transkriptazu i endonukleazu. Nedostatak metilacije u retrotranspozonomima mogao bi dovesti do njihovog širenja po cijelom genomu, dovodeći do mutageneze umetanjem u genomski slijed te u nekim slučajevima, muške neplodnosti (218). Kroz mnoge godine evolucije, transpozonski elementi su mutirali te više ne predstavljaju opasnost od nastanka pseudogena, no *LINE-1* (engl. *long interspersed element-1*, L1) i dalje ima aktivnost i proteinske produkte (ORF1p i ORF2p) te njima potencijalno aktivirati druge retrotranspozone i mRNA (219). Kao zaštita genoma jedinke, na ovakvim sekvencama postoji mnogo CpG nukleotida koje se brzo metiliraju čak i kad je ostali dio genoma spolnih stanica hipometiliran (vidi dalje) jer bi prijenos na potomstvo bio fatalan (220).

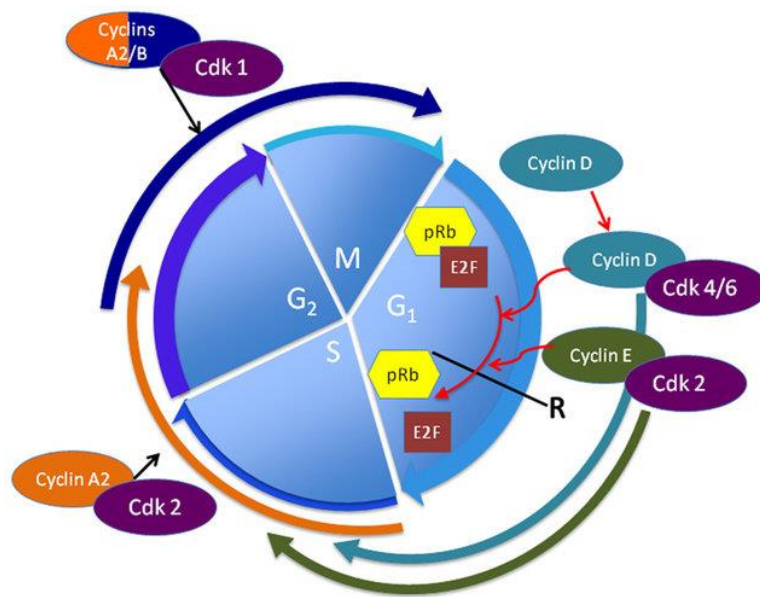
Iako česti, samo je dio *LINE-1* sekvenci (oko 80 - 100 kopija) aktivno u pojedinom čovjeku (221). Zbog mutagenetskog potencijala, većina *LINE-1* sekvenci uglavnom se utišava u somatskim stanicama epigenetskim i posttranskripcijskim (222, 223) mehanizmima, kao što su CpG metilacija *LINE-1* sekvenci, utišavanje potaknuto malim RNA i dr. Istraživanje na transgeničnim životinjama pokazala su da dio *LINE-1* izbjegnu utišavanje i pokazuju aktivnost u zametnim stanicama, ranim stadijima razvoja, nekim dijelovima mozga i u tumorima (218, 224-229).

U zametnim stanicama muškog spola, tijekom *de novo* DNA metilacije, od 12.5 do 18.5 dpc u miša, većina retrotranspozona i satelitskih regija se metilira se DNMT enzimima (173), iako neki evolucijski mlađi *LINE-1* sljedovi izbjegavaju ovaj krug *de novo* metilacije i ugrožavaju genski integritet. Tu se uključuje posebna grupa proteina nazvanih PIWI (engl. *P-element-induced wimpy testis*) koji zajedno s mikroRNA molekulom zvanom piRNA vode proces *de novo* DNA metilacije na sljedovima retrotranspozona (230). Tako se u miša u 12.5 dpc prvi puta uočava izražaj MILI proteina iz člana obitelji PIWI proteina (230). Drugi član, MIWI2 pojavljuje se nekoliko dana kasnije, no prolazno je izražen i zatim utišan nakon 4. dana poslije okota u miša (231). Ipak, izražaj drugih MILI proteina prisutan je i do stadija postmejotičnih stanica, što može upućivati na važnost tih proteina u održavanju utišavanja transpozona tijekom života (232). PIWI-piRNA signalni put rano se aktivira i u hPGC, s obzirom na to da se ključnim sudionicima ovog signalnog puta pojačava izražaj između 7. i 9. tpo te se zadržava na toj razini i u gonocitama i presprmatogonijama (149, 233).

1.3. Stanični ciklus i njegova regulacija *RBI* genom

1.3.1. Mitotički i mejotički stanični ciklus

Jedna od osnovnih funkcija stanice je osiguravanje opstanka jedinke diobom u stanice-kćeri. Kompleksni mehanizmi kontrole staničnog ciklusa stanice osiguravaju umnožavanje DNA i dijeljenje stanice bez oštećenja genetičkog materijala. Tijekom staničnog ciklusa stanica prvo raste i priprema se za diobu u G1 fazi, a odluka o tome hoće li se dioba provesti nastaje u G1/S kontrolnoj točki. Ako su unutar- i izvanstanični uvjeti optimalni te je kontrolna točka “dopustila” nastavak staničnog ciklusa, stanica ulazi u S fazu u kojoj se DNA umnožava. Sljedeća kontrolna točka pojavljuje se nakon umnožavanja DNA i u njoj se provodi provjera točnosti umnožavanja DNA te se ispravljaju potencijalne greške. Pri završetku kontrole, stanica se dijeli mitozom, u kojoj se genetski materijal dijeli u dvije stanice-kćeri. Sila napretka staničnog ciklusa zapravo je aktivacija različitih ciklina i kinaza ovisnih o ciklinima, prisutna u svim fazama staničnog ciklusa (Slika 4). Kontrolne točke staničnog ciklusa uglavnom se orijentiraju na kontrolu aktivnosti i represije ciklina, kinaza ovisnih o ciklinima te na njihove aktivatore i medijatore (234).



Slika 4. Klasični model mitotičkog staničnog ciklusa. G₁ faza započinje vezanjem ciklina D i aktivacijom Cdk4/6 kinaza. Aktivni ciklin D-Cdk4/6 kompleksi fosforiliraju RB1 te p107 i p130. S fosforilacijom se prekida veza s transkripcijskim faktorom E2F te on slobodan stimulira stvaranje ciklina E. Ciklin E veže se za Cdk2 i zajedno s ciklin D-Cdk4/6, pojačavaju fosforilaciju RB1 proteina, oslobađajući dodatne količine E2F, dovoljne za ulazak u S fazu staničnog ciklusa. Ciljevi E2F su i ciklin A2 i mnogi geni specifični za S fazu, koji na kraju vode do nastavka G₁/S faze. Ciklin A2 veže Cdk2 i potiče G₁/S i S/G₂ prijelaz, kao i DNA replikaciju. (Preuzeto i prilagođeno: Wolgemuth i sur., *The International Journal of Developmental Biology*, 2021(235).)

1.3.2. Obitelj retinoblastomskih proteina

Retinoblastomski protein (RB1) prvi je identificirani tumor supresor (236, 237) te je otkriveno da inaktivirajuće mutacije *RB1* gena u spolnim stanicama u ljudi dovode do malignih tumora mrežnice u djece (236). Dva druga proteina (p107 i p130), strukturama slični RB1 proteinu, identificirani su nešto kasnije te zajedno čine obitelj retinoblastomskih proteina (238, 239), a tijekom staničnog ciklusa imaju uloge u apoptozi, samoobnavljanju matičnih stanica i diferencijaciji. RB1 je aktivan tijekom G₀/G₁ faze, a inaktivira se fosforilacijom tijekom tranzicije u S fazu. Obrnuto, p107 je aktivan kada stanica uđe u stanični ciklus, a p130 u mirujućim (engl. *quiescent*) (240). Proteini retinoblastomske obitelji svoju funkciju provode vezujući se na transkripcijske faktore E2F te za njih imaju različite sklonosti vezanja. Zbog strukturalne sličnosti, u nedostatku jednog, drugi članovi RB1 obitelji mogu preuzeti vezanje i time promijeniti smjer staničnog ciklusa (241).

1.3.3. Modifikacije RB1 i njegova uloga u staničnom ciklusu

Gubitak funkcije *RB1* gena u stanicama sisavaca povezuje se s nekontroliranom proliferacijom što znači da je ovaj protein jedan od glavnih (negativnih) regulatora staničnog ciklusa. Prejaki izražaj RB1 proteina dovodi do zaustavljanja staničnog ciklusa u G1 fazi (242), dok gubitak RB1 proteina dovodi do ubrzanog prijelaza kroz G1 fazu i produljenu S fazu (243). Kompleks RB1-E2F čine mehanizam koji vremenski kontrolira izražaj gena zaduženih za staničnu proliferaciju, razvoj, apoptozu i preživljenje (240). Postoji osam članova obitelji E2F transkripcijskih faktora od kojih neki imaju aktivacijsku (E2F1-3a), a neki represijsku ulogu (E2F3b-E2F8) (234) (Slika 4).

Kontrola funkcije RB1 proteina tijekom staničnog ciklusa ostvaruje se opsežnim reverzibilnim posttranslacijskim modifikacijama (244). Klasična teorija kontrole staničnog ciklusa pretpostavlja fosforilaciju RB1 ciklin D/CDK4/6 kompleksima tijekom prijelaza G1/S faze staničnog ciklusa, što dovodi do njegove inaktivacije, odnosno oslobađanja E2F koji aktivira gene nužne za nastavak S-faze, npr. *Dhfr* i *Tk*, *Cdk2*, *Ccn A* i *Ccn E* te E2F (235). Posljedica toga je pojačan izražaj ciklina A i E koji mehanizmom pozitivne povratne sprege kojom dolazi do hiperfosforilacije RB1, aktivacije E2F te transkripcije DNA polimeraze, koja je potrebna za S-fazu, stvaraju stanje stanice u kojem je ona usmjerena za diobu, čak i ako početnog signala za mitozu više nema (245, 246).

RB1 sadrži 16 potencijalnih mjesta fosforilacije CDK-om te su poznata tri mjesta koje ciklin D/CDK preferira: serin 780, 795 i treonin 826 (247). RB1 se fosforilira ciklin D/Cdk4/6 kompleksima na serinu 249, 807, 811 i treoninu 356 i 826 u ranoj G1 fazi. Kako stanični ciklus napreduje, druge CDK preuzimaju fosforilaciju RB1 proteina: ciklin E/CDK2 fosforilira RB1 na serinu 612 i treoninu 821 u kasnoj G1/ranoj S fazi, a inaktivacija RB1 proteina do kraja staničnog ciklusa održava se ciklinom A/CDK2 (245). Kad stanica izlazi iz ciklusa u stanje mirovanja, protein fosfataza 1 reaktivira RB1 defosforilacijom (248). Detalji o vremenskoj (de)fosforilaciji tijekom staničnog ciklusa svakog pojedinog mjesta fosforilacije mogu se naći u Rubin i sur. (249).

RB1 također zaustavlja stanični ciklus neovisno o E2F stabilizirajući CDK-inhibitor p27Kip1 (250), u signalnom putu p38/p27/RB1 koji se aktivira u slučaju oštećenja DNA. Fosforilacija RB1 na serinu 567 od strane p38, nedavno je pokazana kao dio proapoptotičnog signala. Naime ova modifikacija dovodi do interakcije RB1 s E3 ubikvitin ligazom Mdm2 što

dovodi do njegove proteosomalne degradacije, gubitka represije E2F, kao i ekspresije proapoptotičnih gena (251-253).

Stariji radovi na populacijama stanica zaključili su kako nefosforilirani RB1 može zaustaviti stanični ciklus do određene točke u G1 i da se to poklapa s restrikcijском točkom R te da je fosforilacija RB1 molekularni mehanizam prolaska kroz točku R (246). Studija na pojedinačnim stanicama pokazala je kako se fosforilacija RB1 na serinu 780 i 795 odvija nakon restrikcijske točke. U ranim postmitotičkim stanicama razine fosforiliranog RB1 su niske, a nefosforiliranog visoke, a nakon što prođu restrikcijску točku, razine se obrnu. Kinetika fosforilacije na serinu 780 i 795 koje oba preferira ciklin D/CDK vrlo je slična te ima obrnute razine od hipofosforiliranog RB1. Također, redosljed događaja u prolasku kroz restrikcijску točku prije fosforilacije na serinu 795 jednak je u stanicama koje ulaze u stanični ciklus iz G0 kao i u kontinuirano proliferirajućim stanicama (247). Istraživanje na staničnim linijama raka prostate pokazalo je povećanje fosforilacije RB1 proteina na serinu 780 pod utjecajem androgena (254). Također, eksperimentalno je pokazano da SCF (engl. *stem cell factor*) u spermatogonijama pojačava izraženost ciklina D3 i fosforilira RB1 na serinu 780 putem fosfoinozimid 3-kinaza/p70 S6 kinaza signalnog puta i time regulira spermatogonijalnu staničnu proliferaciju (255). S druge strane, pokazano je i da Aurora B može direktno fosforilirati RB1 na serinu 780 što se pokazalo ključnim signalom u prevenciji endoreduplikacije u postmitotičkom razdoblju (postmitotička kontrola) (256).

Postoje i druge posttranslacijske modifikacije RB1 proteina. Acetilacija RB1 inhibira fosforilaciju provođenu CDK proteinima i povezuje se s diferencijacijom više staničnih tipova (257, 258). Metilacija RB1 za vrijeme kontrole oštećenja DNA i trajnog mitotičkog mirovanja stanica tijekom diferencijacije pokreće utišavanje gena kromatinskim promjenama (244). Ubikvitinacija i sumoilacija imaju ulogu u posttranslacijskoj kontroli RB1 protein (259, 260).

1.3.4. Alternativni modeli staničnog ciklusa

Studije asinkronih dijeljenja stanica u *in vitro* uvjetima ukazale su da dijeljenjem mogu nastati stanice s niskom aktivnošću CDK i normalnom osjetljivošću na mitogene faktore i one za većom razinom CDK koja se gotovo odmah nastavlja dijeliti i niskom osjetljivošću na mitogene (261). Dodatno, pokazano je da se razina CDK2 pri nastanku stanica-kćeri poslije dijeljenja određuje za vrijeme G2 faze stanice-majke. Ako postoji stresor tijekom DNA replikacije, to će se odraziti na stanice-kćeri u vidu smanjenja aktivnosti CDK2, za što je odgovoran p21, inhibitor CDK2 (262-266). Za razliku od kanoničkog modela, alternativni

model ukazuje da u kratkom vremenskom razdoblju odmah nakon dijeljenja, stanice-kćeri mogu postati jedna od dvije opisanih subpopulacija, ovisno o kvaliteti mitogena i roditeljskih stresnih signala koje nakupljaju. Stanice-kćeri koje imaju optimalne uvjete imaju hiperfosforilirani RB1, umjerenu aktivnost CDK2, neosjetljive su na mitogene i sklone su odmah nastaviti mitozu, a one stanice-kćeri čije su roditeljske stanice u G2 fazi povećale razinu p21, nastaju s hipofosforiliranim RB1, niskom aktivnošću CDK2 te ostaju osjetljive na mitogene, slično onima u klasičnom modelu. Ova prva subpopulacija sklona proliferaciji ne ukida točku restrikcije, a subpopulacija s niskom aktivnošću CDK2 nakon mitoze ulazi u fazu G1 restrikcijske točke koja se smatra fazom mirovanja, prolaznim G0. One proliferaciju mogu nastaviti isključivo povećanjem aktivnosti CDK2 i hiperfosforilacijom RB1, kako bi prošle kroz restrikcijsku točku (267).

1.3.5. Proteinski izražaj RB1 u sjemeniku

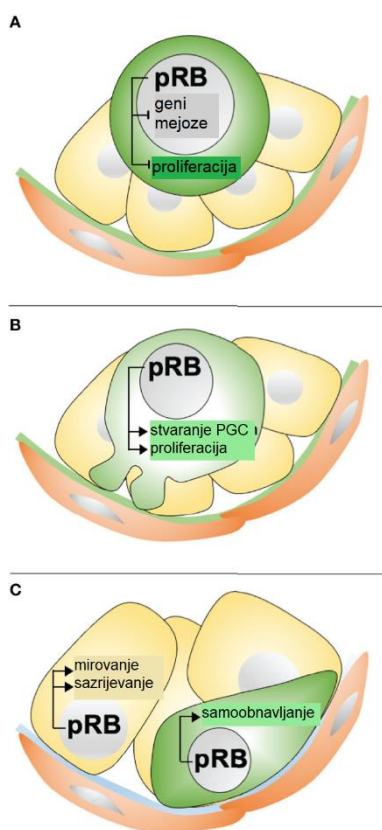
U mišjem i štakorskom sjemeniku RB1 se nalazi u Sertolijevim stanicama, gonocitama i spermatogonijama (268-271). U ljudi, RB1 detektiran je u fetalnim Sertolijevim stanicama i prospermatogonijama unutar sjemenih kanalića (272), što je slično izražaju u odraslom sjemeniku, gdje je nađen u spermatogonijama i Sertolijevim stanicama (273, 274). Studija na izražaju RB1 fosforiliranom na serinu 795 na uzorcima tumora zametnih stanica sjemenika potvrdila je njihovo porijeklo iz fetalnih gonocita, a fosforilacija na serinu 795 pokazuje aktivnost kinaza ovisnih o ciklinu D, koje neutraliziraju RB1 u spermatogonijama i u tumorima zametnih stanica koji izražavaju RB1 (274). Tijekom spermatogeneze, fosforilacija na serinu 795 uočena je u dijelu spermatogonija (275, 276), no samo dio fetalnih (28. tpo) i neonatalnih gonocita izražava RB1 te su rijetko bile obojene protutijelom protiv RB1 fosforiliranog na serinu 795 (274). Zbog toga se u ovoj disertaciji pretpostavilo da iste fosforilacije mogu imati ulogu u kontroli staničnog ciklusa i njegovog mirovanja tijekom ranijih faza fetalnog života.

1.3.6. Uloga RB1 u stanicama sjemenika

S obzirom na to da *RBI*-null miševi ugibaju u embrionalno ili rano postnatalno doba (277, 278) istraživanja tkivnospecifičnih utjecaja RB1 proteina usmjerila su se na kondicionalne mutirane miševe s izostankom RB1 u specifičnim stanicama (269, 270, 275, 279, 280) i *ex vivo* kulturi (281).

S obzirom na svoju ulogu kao čuvara G1/S tranzicije, tj. mirovanja ili proliferacije, RB1 je logično presudan regulator ciklusa stanica sjemenika, gdje je ključan za zaustavljanje i ponovo pokretanje njihovog samoobnavljanja, no i za sazrijevanje (Slika 5). Što se tiče uloge u zametnim stanicama, mehanizmi toga dodatno su razjašnjeni mišjim modelima u kojima je RB1 kondicionalno izbrisan iz zametnih stanica u raznim razvojnim stadijima: prenatalno iz PGC (*RB1-KO^{Blimp1}*) (279) ili 15.5 - 17 dpc gonocita (*RB1-KO^{Ddx4}*) (275, 280) te postnatalno iz spermatogonija (*RB1-KO^{Stra8}*, *RB1-KO^{Ngn3}*) (280). Suprotno svojoj ulozi u somatskim stanicama, u kojima inaktivacija članova RB1 obitelji dovodi do pretjeranog rasta matičnih stanica, pojačane apoptoze, poremećaja diferencijacije i kancerogeneze (234), zametne stanice lišene RB1-a gube sposobnost samoobnavljanja, što je mogući razlog zašto se nisu našli tumori zametnih stanica pri gubitku RB1-a (275, 280).

Sertolijeve pak stanice odraslog miša ne proliferiraju, iako se to može potaknuti u *in vitro* uvjetima (282, 283). Ipak, kao većina somatskih stanica, no ne i zametnih, Sertolijeve stanice ne mogu ostvariti zrelo i mitotički mirno stanje ako nemaju RB1 (Slika 5). Miševi u kojima samo Sertolijeve stanice nemaju RB1 brzo razvijaju atrofiju sjemenih kanalića i neplodnost (269, 270, 275). U miša kojem je kondicionalno neaktivan RB1 u Sertolijevim stanicama između 10. i 14. tjedna života dolazi do poremećaja Sertolijevih stanica u vidu proliferacije, propusnosti barijere između krvi i sjemenika, poremećene komunikacije Sertolijevih i zametnih stanica te neplodnosti, ukazujući na ključnu ulogu *RB1*-a u krajnjoj diferencijaciji Sertolijevih stanica (269).



Slika 5. Uloge RB1 proteina (pRB) u razvoju sjemenika miša. (a) U gonocitama 14.5-16.5 dpc RB1 je potreban pri zaustavljanju proliferacije i ulazak u mitotičko mirovanje. RB1 vjerojatno smanjuje izražaj gena mejoze. (b) U sjemeniku oko okota RB1 regulira ponovni ulazak u stanični ciklus i stvaranje zalihe zametnih stanica. (c) U sjemeniku pubertalne i odrasle jedinke RB1 je nužan za sazrijevanje Sertolijevih stanica, njihovo mitotičko mirovanje te samoobnavljanje matičnih stanica. (Preuzeto i prilagođeno: *Mäkelä i sur., Frontiers In Endocrinology, 2022 (234).*)

1.4. Povezanost staničnog ciklusa i sazrijevanja stanica sjemenika

1.4.1. Dinamika staničnog ciklusa i sazrijevanja spolnih stanica

Za razliku od mišjih, ljudske spolne stanice u prenatalnom razvoju, mogu se podijeliti u tri razvojne kategorije, kronološki, PGC (koje migriraju i proliferiraju), gonocite i prespermatogonije, gdje dvije potonje skupine pokazuju put sazrijevanja ka budućim spermatogonijama. Razlike među njima uključuju opsežne promjene transkripcijske aktivnosti gena, što je pokazano na spolnim stanicama izoliranim iz ljudskih fetusa od 4. do 25. tpo (63).

Postoje znatne razlike u dinamici razvojnih promjena zametnih stanica glodavaca: gonocite se prvo aktivno dijele povećavajući eksponencijalno broj do 13.5 dpc (284), zatim

ulaze u fazu mitotičkog mirovanja (engl. *mitotic quiescence*) između 12.5 i 16.5 dpc ovisno o soju (285), a u štakora stanje mirovanja nastupa s 18.5 dpc (286).

Nastavak aktivnog dijeljenja pokretanjem staničnog ciklusa poklapa se s njihovom tranzicijom, odnosno diferencijacijom u spermatogonije (285, 287, 288). Tranzicija gonocita u spermatogonije uključuje znatne promjene genskog izražaja, staničnog oblika, veličine i lokalizacije u sjemenim kanalićima (13, 289) što se u glodavaca događa tek u infantilnom razdoblju.

Što se tiče dinamike ciklusa zametnih stanica u ljudskom fetalnom sjemeniku, pretpostavlja se da njihov broj raste od oko 1000 u 5. tpo do oko 150 000 u 9. tpo (35). Broj im se udvostručuje između 5. i 9. tpo, od 10. do 15. tpo uz dvostruko sporiji, a od 16. do 19. tpo uz četverostruko sporiji rast broja stanica (290). Broj zametnih stanica pozitivnih na Ki-67 kontinuirano pada prema kraju trudnoće, ali se po tom biljevu ne može odrediti točno razdoblje mirovanja ili jako usporenog staničnog ciklusa, vjerojatno zbog asinkronosti ulaska gonocita u mirovanje i njihov asinkroni prijelaz u prespermatogonije od oko 20. do 25. tpo (291). Do 9. tpo rast broj somatskih stanica u sjemeniku sličan je broju zametnih stanica, no tada se usporava. Po transkripcijskom/translacijskom profilu, somatske stanice fetalnog sjemenika ukupno su izražavale manje gena vezanih uz stanični ciklus nego spolne stanice i samo oko 10 % somatskih stanica proliferira (10, 63).

U ljudi, diferencijacija gonocita prema spermatogonijama započinje već u fetalnom razdoblju. Stoga je izrazito asinkrona te se u spolnoj žlijezdi u jednom razvojnom stadiju mogu naći barem dva tipa stanica na putu razvoja spolnih stanica (63).

1.4.2. Regulacija zaustavljanja staničnog ciklusa zametnih stanica

Osim izbjegavanja ulaska u mejozu, rane gonocite moraju prestati proliferirati u određenom razdoblju. TGF β signalni put i Aktivin pokazuju antagonistički učinak na proliferaciju te baš oni međusobno surađuju kako bi pokrenuli mitotičko zaustavljanje gonocita (292-296). TGF β signalni put i kasnije FGF9 pomažu preživljenje mirujućih gonocita te T1 gonocite rijetko odumiru apoptozom (297).

Defosforilacija retinoblastomskog proteina (RB1) provedena inhibitorom ciklina p27 vjerojatna je meta TGF β signalizaciji pri zaustavljanju staničnog ciklusa (281, 295). Smatra se da sličan utjecaj ima PGD2 (engl. *multifunction prostanoid PGD2*) putem pojačavanja jezgrenog izražaja CDK inhibitora p21, uz njegov utjecaj na indukciju *Nanos2* (298).

Androgeni također zaustavljaju proliferaciju gonocita te degradacija RA ima ulogu u zaustavljanju staničnog ciklusa (299, 300).

Ukoliko se ciklus ne zaustavi, što može biti zbog nepravilnog izražaja proteina regulatora, doći će do poremećaja u razvoju sjemenika. Tako gubitak *Pten*-a (engl. *phosphatase and tensin homolog*), *Dmrt1* i *Dnd1* dovode do razvoja teratoma sjemenika zbog nemogućnosti zaustavljanja staničnog ciklusa gonocita (301-303).

Pri analizi transkriptoma ljudskih zametnih stanica, uočena je aktivnost gena karakterističnih za proliferaciju u više od 25% svih zametnih stanica između 8. i 10. tpo, paralelno sa značajnim povećanjem njihovog ukupnog broja u tom razdoblju. Prve gonocite s genskim izražajem karakterističnim za mitotičko mirovanje pojavile su se u 10. tpo, a u 23. tpo činile su veliku većinu zametnih stanica sjemenika, čak 68.1% (10).

1.4.3. Prespermatogeneza zametnih stanica glodavaca

Kao što je prije spomenuto, mPGC stižu u spolni nabor oko 10 dpc, a većina se naseli do 11.5 dpc (304). Nakon indukcije *Sry* PGC u spolnim žlijezdama okružuju se sjemenim tračcima oko 12 dpc te se tada nazivaju gonocitama ili prospermatogonijama (104, 305), dok prespermatogeneza označava razdoblje koji uključuje sazrijevanje, odnosno razvoj gonocita (306). Populacija gonocita ima funkcionalne razlike, pa se dijele u određene skupine, prikazane u Tablici 1.

Tablica 1. Inicijalni nazivi zametnih stanica glodavaca i njihove karakteristike, bazirani na histološkim karakteristikama.

naziv	M - gonocita	T1 - gonocita	T2 -gonocita
istoznačnica /alternativni naziv	M - prospermatogonija	T1 -prospermatogonija	T2 -prospermatogonija
karakteristike	mitotički aktivne rane gonocite	nisu mitotički aktivne; miruju ali prolaze epigenetsko reprogramiranje cijelog genoma	proliferiraju i migriraju unutar kanalića neposredne preteče spermatogonija
objašnjenje oznake	M po engl. <i>multiplying</i>	T po engl. <i>transitional</i>	

Ovakvo nazivlje donekle je zbunjujuće, a nastalo je u vrijeme kada opsežne transkripcijske analize još nisu bile dostupne većoj skupini istraživača, niti optimizirane. Naime, gonocite se ne diferenciraju sinkrono, pa se u vrijeme prespermatogeneze javljaju barem

dvije podvrste spolnih stanica u isto vrijeme. Također, ne postoji jasna razlika između T2 - gonocita i spermatogonija. Gonocite koje ne proliferiraju dobivaju karakteristike spermatogonija po svom molekularnom profilu, kontaktu s bazalnom laminom sjemenih tračaka i ponovnom aktivacijom mitoze izrazito asinkrono i kroz duži vremenski raspon (285, 287, 307). Zbog izostanka jedinstvenog biljega gonocita, također je teško odrediti kada proliferacija gonocita postaje spermatogonijalno samoobnavljanje.

Ponovna aktivacija mitoze, događa se ovisno o soju oko jednog dana poslije okota u miša i tri dana poslije okota u štakora te se poklapa s prijelazom gonocita u populaciju matičnih spermatogonija (engl. *gonocytes-to-spermatogonia transition*, GST) (286, 287), a potpuna je do 3.5 dpp u miša i 6 dpp u štakora (289). GST karakteriziraju promjene u obliku stanica, položaju unutar sjemenog kanalića te transkriptoma i translatoma. Gonocita je velika, sferična stanica s naznačenom jezgri, a nalazi se u sredini kanalića, dok su spermatogonije polukružne stanice na rubu kanalića. Usporedno sa spomenutim promjenama, perinatalne zametne stanice počinju izražavati biljege karakteristične za izražaj u odraslim spermatogonijalnim matičnim stanicama (engl. *spermatogonial stem cells*, SSC), kao što su *Ret* (engl. *rearranged during transfection*), *Zbtb16* (engl. *promyelocytic leukemia zinc finger*, PLZF) i *Gfra1* (engl. *GDNF family receptor α 1*) (307). *Nanos2* gen, koji je izražen u ranim gonocitama miša (12.5 dpc) i poznat je kao antagonist mejoze, ponovo je aktiviran u ovom stadiju (308). *Nanos2* je RNA-vezujući protein koji izravno utječe na kompleks deadenilaza CCR4-NOT (engl. *carbon catabolite repressor 4-negative on TATA*), degradirajući određene RNA. Na mišjem modelu pokazano je da baš *Nanos2* može djelovati kao čuvar prijelaza gonocita u spermatogonije i utišati izražaj biljega spermatogonija ovisno o razvojnem stadiju (309). U ljudi, indukcija *NANOS2* poklapa se s ulaskom gonocita u mirovanje staničnog ciklusa (63). Također je ovo razdoblje uspostavljanja *de novo* metilacijskih obrazaca (vidi: 1.2.6. *De novo* DNA metilacija).

Gonocite koje ne prođu GST i se ne premjeste na rub sjemenog kanalića (položaj SSC) do 3.5 dpp u miša uklonit će se apoptozom (310). Apoptoza zametnih stanica normalna je u ranom razvoju sjemenika glodavaca, pa je ukupan broj zametnih stanica prepolovljen između 2.5 i 5.5 dpp u miša te 0 i 6 dpp u štakora, bez obzira na mitotičku aktivnost (287, 311)

Način na koji zametne stanice izbjegavaju prerani ulazak u mejozu nije do kraja istražen. Položaj gonocita štiti ih od retinoične kiseline, koja je važna za pokretanje spermatogeneze, a potiče iz stanica mezonefrosa. PGC koje se ne nađu unutar sjemenih kanalića ulaze u mejozu, postaju maligne ili nestaju (49, 312, 313).

1.4.4. Prespermatogeneza u ljudi

Više od 20 definiranih transkripcijskih faktora ima ulogu u kontroli genskog izražaja u ljudskim PGC i/ili gonocitama te u njihovom prijelazu iz migrirajućih u sesilne mitotički aktivne do mirujuće faze bez mitozu (63). Iako postoje znatne sličnosti između glodavaca i ljudi, u vidu istih gena s istim krajnjim utjecajem, najveća razlika je u dinamici promjena te asinkronosti promjena u ljudi (314).

Prve gonocite pomiču se do bazalne lamine sjemenih kanalića oko 13. tpo kako bi se tamo kasnije diferencirale u zametne stanice koje zovemo prespermatogonije (315). Važno je ne pomiješati ih s prospermatogonijama glodavaca, što je samo drugi naziv za gonocite. Taj se događaj poklapa sa smanjivanjem izražaja faktora pluripotentnosti. Iako su gotovo sve zametne stanice pozitivne na OCT4 u prvom tromjesečju, njegov izražaj u nekima od njih izrazito pada tijekom drugog tromjesečja trudnoće (316). Paralelno se pojačava izražaj NANOS2 proteina, ukazujući na evolucijski održanu funkciju u glodavaca i ljudi (317). DDX4 izražaj postepeno se pojačava od najranijih faza razvoja prema sredini trudnoće (63, 318), suprotno izražaju OCT4. Do 24. tpo Ki-67 uglavnom je izražen u OCT4-pozitivnim gonocitama. Smatra se da su prespermatogonije te koje pojačavaju izražaj DDX4, smanjuju izražaj OCT4, ulaze u mirovanje, ponovo proliferiraju krajem drugog i početkom trećeg tromjesečja, a dalje miruju do rođenja. Pojedinačne OCT4-pozitivne stanice u ljudskom se sjemeniku mogu naći u 3. - 4. mjesecu poslije rođenja u sredini sjemenih kanalića, a vjerojatno označavaju zaostale gonocite. To je značajno različito od glodavaca, u kojih se izražaj OCT4 ne može više detektirati u prospermatogonijama nakon 15.5 dpc u mišu i 19.5 dpc u štakoru (uniformno mirujuće zametne stanice) te dodatno naglašava asinkronost razvoja zametnih stanica ljudi (314, 316). Izražaj NANOG-a uglavnom prati izražaj OCT4 te je prisutan u gotovo svim zametnim stanicama rano u drugom tromjesečju (319).

Detaljna analiza transkriptoma fetalnog ljudskog sjemenika pokazala je da dolaskom hPGC u spolne nabore do kraja prvog tromjesečja, samo su mitotski aktivne (SOX17+ TFAP2C+ PDPN+ POU5F1+ KIT+ NANOG+ ALPL+) hPGC prisutne u spolnoj žlijezdi. Kako napreduje trudnoća, utišava se izražaj pluripotentnih gena, a pojačava se izražaj gena specifičnih za muške PGC, uključujući DDX4 i DAZL (40, 63, 320). Tijekom drugog tromjesečja u fetalnom sjemeniku se nalaze muške zametne stanice različitih kombinacija izražaja (POU5F1+ MAGEA3- DDX4± koje mogu biti proliferirajuće, Ki-67+ ili ne, Ki-67-; POU5F1- MAGEA3- DDX4± i POU5F1- MAGEA3+ DDX4+ koje nisu u mitozu, Ki-67-)

nalaze se jedne pored drugih u sjemenim kanalicima (321). Navedeno dodatno naglašava asinkronost razvoja stanica u sjemenicima ljudi (322).

Razvoj spermatogonija završava se nakon rođenja, ulaskom u mini-pubertet, između 1. i 4./6. mjeseca života, kada se naglo pojača koncentracija gonadotropina i spolnih hormona u krvi, kako bi se regulirao razvoj spolnih žlijezdi (323-326) (327).

U svjetlu navedenih spoznaja uočio se izostanak detaljnog razjašnjenja tijekom metilacijskih promjena u ljudskim fetalnim sjemenicima i njihove povezanosti sa staničnim ciklusom te regulacija ciklusa u stanicama sjemenika. Točan vremenski okvir ulaska zametnih stanica u mitotičko mirovanje i *de novo* metilacijske promjene i njihova međusobna koordinacija zahtijevaju razjašnjenje jer bi se time odredilo razdoblje trudnoće najosjetljivije na utjecaje okoliša putem epigenetskih mehanizama. Iste promjene, iako djelomično poznate u glodavaca, većinom su ispitane na mišjem modelu, dok su za štakora i čovjeka daleko manje poznate.

2. HIPOTEZA

Metilacija DNA i izraženost regulatora staničnog ciklusa RB1 u razvoju sjemenika sisavaca ovise o vrsti i stadiju razvoja.

3. SVRHA I CILJEVI RADA

OPĆI CILJ:

Istražiti dinamiku metilacije te epigenetičke promjene i proteinsku izraženost regulatora staničnog ciklusa *RB1* gena u razvoju fetalnog sjemenika čovjeka i štakora.

SPECIFIČNI CILJEVI:

- odrediti razinu globalne metilacije (*LINE-1*) i metilacije utisnutog gena *H19* u uzorcima fetalnog sjemenika čovjeka različitih starosti i odgovarajućih razvojnih stadija u štakora
- odrediti razinu metilacije promotorske regije gena *RB1* u uzorcima fetalnog sjemenika čovjeka
- odrediti razinu izraženosti RB1 proteina i njegovih dvaju fosforiliranih formi u uzorcima fetalnog sjemenika čovjeka i štakora različitih stadija trudnoće te proliferacijsku aktivnost stanica u fetalnom sjemeniku

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Ljudski uzorci

40 ljudskih fetalnih sjemenika dobiveno je iz Zbirke arhivskih ljudskih histoloških preparata istraživačkog tima voditelja projekta prof. dr. sc. Davora Ježeka. Ovo retrospektivno istraživanje uključilo je uzorke ljudskih fetalnih sjemenika u dobi od 11. do 38. tjedna trudnoće te po 1 u dobi od 8 mjeseci, 2 godine i 12 godina, bez prisutnih patoloških stanja. Zbog isključivanja nekih uzoraka iz istraživanja nakon uvida u šifrirani obdukcijski nalaz i razlog završetka trudnoće (Tablica 2), ukupni broj obrađenih uzoraka bio je 25. Pod završetkom trudnoće smatrao se spontani ili medicinski indiciran pobačaj. Zaštita podataka provedena je tako što istraživači imali uvid u dob fetusa pri uzorkovanju, godinu uzorkovanja te šifru uzorka. Istraživanje je odobreno od Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu po prihvaćanju prijedloga doktorskog rada (klasa odobrenja 643-03-01-22-01/1 od 25. siječnja 2022).

Tablica 2. Karakteristike ljudskih fetalnih sjemenika.

dob uzorka (tjedni)	broj uzoraka	isključni kriterij
11/12	2	
13/14	2	
14/15	3	
15/16	2	
17/18	3	
18/19	4	1 maceriran 2 Downov sindrom
19	2	
19/20	3	1 Downov sindrom
20/21	3	
22/23	3	1 Potterov sindrom
23	5	
24/25	4	1 Potterov sindrom
25/26	1	
28	1	
33	1	
38/39	1	
1 g	1	
2 g	1	
12 g	1	

4.1.1. Fiksacija, uklapanje u parafin i pohrana ljudskih uzoraka

Odmah po zaprimanju uzorci sjemenika bili su obrađeni standardnom histološkom metodom koja uključuje fiksaciju u 10 %-tnom formalinu (Formalin FC10, BioGnost, Hrvatska) tijekom 24 sata, ispiranje formalina vodovodnom vodom 48 sati te dehidraciju u etanolu rastućih koncentracija (70 %, 80 %, 96 % i 100 %, svaki po 1 sat). Sjemenici su zatim prebačeni u ksilol (Bioclear BC, BioGnost, Hrvatska) dva puta po 30 minuta te prožeti tekućim parafinom (8002-74-2, Kemika, Zagreb, Hrvatska) zagrijanim na 60 °C. Slijedilo je hlađenje na sobnoj temperaturi u kalupima, kako bi se dobio parafinski blok. Uzorci su čuvani u prostoru za arhivsku pohranu.

4.2. Štakorski uzorci

4.2.1. Laboratorijske životinje

Za uzorkovanje fetalnih sjemenika štakora korišteni su laboratorijski albino štakori soja Fischer, u dobi od 3 mjeseca iz vlastitog uzgoja nastambe za laboratorijske životinje Zavoda za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (HR-POK-010), u skladu sa Zakonom o zaštiti životinja (NN 135/06, NN 37/13 i NN 55/13, NN 102/17, 32/19, 2010/63/EU, NN 55/13, 39/17), s dozvolom za uzorkovanje (klasa 641-01/14-04/1, ur.broj 380-59-10101-14-675) Ministarstva poljoprivrede RH. Ukupno je korišteno 50 ženki. Vlastiti uzgoj podrazumijeva održavanje odgovarajućih mikroklimatskih uvjeta: nivo buke do 60 dB, ciklus svjetla tame 12/12 sati, relativna vlažnost 40 - 70 % i temperatura 20 - 24 °C, uz vođenje evidencije o navedenim parametrima. Hrana i voda davane su *ad libitum*, a stelja se mijenjala po protokolu. Hrana i stelja posjeduju GLP (engl. *good laboratory practice*) certifikat.

Odrasli mužjaci i ženke stavljeni su na parenje preko noći, a sljedeći dan smatrao se 0.5-im danom trudnoće, temeljem nalaza vaginalnog čepa. Skotne ženke bile su eutanazirane intraperitonealnom injekcijom letalne doze anestetika ksilazina (48 mg/kg težine, Xylapan; Vetoquinol) sa sedativnim, miorelaksirajućim i analgetskim djelovanjem te ketamina (300 mg/kg težine, Narketan; Vetoquinol, Bern, Switzerland) s narkotičkim djelovanjem. Nakon provjere da je životinja mrtva, koža životinje premazana je 70 %-tnim alkoholom u trbušnom dijelu. U donjem dijelu abdomena, horizontalnim rezom otvorena je trbušna šupljina. Uz pridržavanje rogova maternice pincetom se pristupilo rogovima i odvojio mezometriji. Oba roga

maternice izvađena su iz trbušne šupljine i isprana fiziološkom otopinom natrijevog klorida (0.9 % NaCl) u staklenoj čaši. Izbočenja na rogovima maternice jasno su prikazivala fetuse, različite veličine, ovisno o stadiju razvoja. Pojedinačni fetusi su se pažljivo izolirali iz maternice, očistili te dalje hidrirali fiziološkom otopinom. Iz muških fetusa starosti 16.5, 17.5, 18.5, 19.5 i 20.5 dana trudnoće (5 stadija), nakon provjere spola, izolirali su se sjemenici. Naknadno je uključena skupina od tik pred okot, 21.5 dpc. Ukupan broj potrebnih zametaka definiran je prema zbroju predviđenog minimalnog broja uzoraka za analitičke metode (prema “power” analizi). Broj uzoraka ujednačen je po skupinama, a broj potrebnih ženki izračunat je korištenjem metode Breeding performance efficiency index 6. Prema preliminarnim rezultatima (korišteno je 10 ženki), za snagu testa od 80 % i razinu značajnosti od 5 %, za svaki razvojni stadij potrebno je minimalno 6 uzoraka. Po svakom stadiju, uzimali su se fetusi iz 8 različitih ženki te je ukupno izolirano oko 300 parova fetalnih sjemenika.

4.2.2. Fiksacija, uklapanje u parafin i pohrana štakorskih uzoraka

Čim su izolirani, fetalni sjemenici su pohranjeni: lijevi na -80 °C za molekularne, a desni za histološke metode do daljnje analize, u tubicama (0030124707, Eppendorf, Hamburg, Njemačka). Histološka fiksacija štakorskih uzoraka provela se fiksacijom u Sainte-Marie fiksativu (96 %-tni etanol s 1 % ledene octene kiseline, CH₃COOH) 24 sata, dehidracijom u etanolu rastućih koncentracija (70 %, 80 %, 96 % i 100 %, svaki po 1 sat) te ksilolu dva puta po 30 minuta te naposljetku prožimanjem parafinom rastaljenim na 60 °C. Uzorci su se ohladili na sobnoj temperaturi u kalupima, a dobiveni parafinski blok se do daljnje obrade čuvao na +4 °C.

4.3. Osnovna obrada parafinskih blokova

Ljudski i štakorski sjemenici uklopljeni u parafinske blokove dalje su se obrađivali na isti način. Prije rezanja na ručnom rotacijskom mikrotomu (Leica Biosystems, RM2235, Švicarska) koji koristi nisko profilne jednokratne britvice (Leica Biosystems 819,, Švicarska), blokovi su ohlađeni na 4 °C. Za bojenje hemalaun-eozinom (HE) i imunohistokemijskom (IHC) metodom blokovi su rezani na rezove debljine 4 µm te stavljeni na pozitivno nabijena, silanizirana stakla (VitroGnost Plus Ultra adhesive slide, 103001A72, BioGnost, Hrvatska), a za izolaciju DNA, rezani su na 10 µm i stavljeni na obična histološka stakalca (VitroGnost

Standard Grade microscope slides, 10217102, BioGnost, Hrvatska). Stakla su stavljena 24 sata u termostat (Tehnika, Ljubljana, Slovenija) na 37 °C.

4.4. Klasično histološko bojenje hemalaun-eozinom

Kako bi ih obojili hemalaun-eozinom (HE), stakla s rezovima debljine 4 µm ljudskih i štakorskih sjemenika stavljena su jedan sat na 56 °C u termostat te potom deparafinizirana u ksilolu dva puta po 10 minuta, nakon čega su rehidrirana u padajućem nizu koncentracije etanola (100 %, 96 %, 80 % i 70 %, svaki po tri minute). Nakon prebacivanja u destiliranu vodu (dH₂O), stakla su inkubirana u otopini hemalauna (HEMM-OT, BioGnost, Hrvatska) na 50 sekundi, isprana s dH₂O te s mlazom vodovodne vode kroz 7 minuta, kako bi se dobilo plavo obojenje. Stakla su potom uronjena u dH₂O te inkubirana u otopini eozina (EOYK-OT, BioGnost, Hrvatska) 40 sekundi. Nakon toga uzorci su dehidrirani u otopinama rastuće koncentracije alkohola (70 %, 80 % i 96 % 2x 100 %, po 5 minuta). Slijedilo je bistrenje tkiva uranjanjem stakala u ksilol dva puta po 10 minuta te pokrivanje korištenjem sintetičkog medija za uklapanje (Biomount DPX low, BML, BioGnost, Hrvatska) i pokrovnog stakalca veličine primjerene uzorku (VitroGnost cover glass, 10212450C, BioGnost, Hrvatska).

4.5. Imunohistokemijsko bojenje

Bojenje uzoraka imunohistokemijskom metodom provelo se kako bi se dobila histološka lokacija izraženih proteina. Kod protokola za imunohistokemijsko bojenje deparafinizacija uzoraka provela se kao i kod HE bojenja. Nakon uklanjanja parafina, stakla su isprana u dH₂O te stavljena u citratni pufer (pH 6, S2369, Dako, Agilent Technologies, Njemačka) ili hidroksimetil aminometan-etilendiamintetraoctenu kiselinu (pH 9, Tris-EDTA pufer, sastav prikazan u Tablici 3) kako bi se kuhanjem u parnoj kupelji (VS400136, Tefal Vitacuisine, Écully, Francuska) kroz jedan sat demaskirali antigenski epitopi (engl. *antigen retrieval*) (Tablica 3). Nakon kuhanja uzorci se hlade u istom puferu 30 minuta, pa ispiru u Tris-puferiranoj fiziološkoj otopini (TBS) (engl. *Tris-buffered saline*, sastav prikazan u Tablici 3).

Tablica 3. Nekomercijalni puferi korišteni pri analizi uzoraka.

	Imunohistokemija		Izolacija DNA
pufer	Tris-EDTA	TBS	TES
	10 mM Trizma ¹	50 mM Trizma ¹	50 mM Trizma ¹ - HCl ⁶
	1 mM EDTA ²	150 mM NaCl ⁵	100 mM EDTA ²
	0.05 % Tween 20 ³		100 mM NaCl ⁵
			1 % SDS ⁷
pH	9	7.5	8
baza/kiselina*	1 M NaOH ⁴	36 % HCl ⁶	1 M NaOH ⁴
razrjeđenje	1:10	1:10	-

1 C₄H₁₁NO₃, 4855.2, Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka

2 C₁₀H₁₆N₂O₈, 8040.3, Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka

3 H5151, Promega, Wisconsin, SAD

4 1310-73-2, Kemika, Zagreb, Hrvatska

5 7647-14-5, Kemika, Zagreb, Hrvatska

6 7647-01-0, Kemika, Zagreb, Hrvatska

7 CH₃(CH₂)₁₁OSO₃Na, 4360, Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka

* baza ili kiselina kojom se prilagođava pH otopine

Za to vrijeme pripremljen je 5 %-tni goveđi serumski albumin (engl. *bovine serum albumin*, BSA, albumin fraction 8076.3, Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka; razrijeđen u TBS-u) koji se nanio na rezove okružene hidrofobnim markerom (PAP pen, ab2601, Abcam, Velika Britanija) radi zadržavanja tekućina na mjestu od interesa i inkubirao 20 minuta. BSA služi za blokiranje nespecifičnog vezanja antigena pri daljnjim koracima imunohistokemije. Uklonjen je bez ispiranja te su se nanijela primarna protutijela u optimiziranim koncentracijama (Tablica 4), razrijeđena u TBS-u s 0.1 % Tween-a 20 i 1 % BSA. Tako pripremljena stakla ostavljena su preko noći na 4 °C u prilagođenoj „vlažnoj komori“ za imunohistokemiju. Kao negativna kontrola korištena je otopina 0.1 % Tween-a 20 i 1 % BSA bez primarnog protutijela koja je nanjena istodobno. Pozitivnu kontrolu činila su stakla s tkivom preporučenim od proizvođača pojedinog protutijela na koji je nanjena otopina primarnog protutijela (Tablica 4).

Idući dan uzorci su ispirani na treskalici (IKA KS 260 basic, Staufen, Njemačka) 3 puta po 5 minuta u TBS-u. Otopina 3 % H₂O₂ (7722-84-1, Kemika, Zagreb, Hrvatska) korištena je za inaktivaciju endogenih peroksidaza nanošenjem na uzorke i inkubacijom kroz 20 minuta. Ponovljeno je ispiranje u TBS-u 3 puta po 5 minuta, pa je slijedilo nanošenje odgovarajućih sekundarnih protutijela, konjugiranih s peroksidazom iz hrena. Ovisno vrsti (miš ili zec) u kojoj

je primarno protutijelo pripremljeno, koristilo se sekundarno protutijelo iz kože specifično za zečje imunoglobuline (ab90751, Abcam, Velika Britanija) ili iz magarca specifično za mišje imunoglobuline (ab6820, Abcam, Velika Britanija), razrijeđeno u 1%BSA/TBS 45 ili 60 minuta. Rezovi su ponovo isprani 3 puta po 5 minuta u TBS-u. Signal (reakcija antigen - protutijelo) je vizualiziran inkubacijom rezova s otopinom kromogena 3,3-diaminobenzidin tetrahidroklorida (DAB) i supstrata za peroksidazu (K3468, DAKO/Agilent, Glostrup, Danska) kroz 3 minute. Zaustavljanje reakcije provodilo se uranjanjem u dH₂O. Kancerogenost DAB-a umanjila se dodavanjem natrijevog hipoklorita (7681-52-9, Kemika, Zagreb, Hrvatska) u vodu u kojoj su stakla isprana. Zatim su se rezovi kontrastirali hemalaunom, uranjanjem kroz jednu minutu. Slijedilo je ispiranje u dH₂O, pa tekućoj vodovodnoj vodi 5 minuta, a nakon uranjanja u dH₂O još jednom, učinjena je dehidracija rezova uranjanjem u posudice s otopinama rastuće koncentracije etanola (od 70 do 100%, po 3 minute). Nakon toga stakla su uronjena u otopinu ksilola 2 puta po 10 minuta te pokrivena pokrovnicom pomoću sintetičkog medija za uklapanje (Biomount). Stakla su ostavljena na sušenju na sobnoj temperaturi barem 24 sata.

Tablica 4. Protutijela korištena u imunohistokemijskom bojenju.

Primarno protutijelo	Serijski broj i proizvođač	Podrijetlo i klonalnost	Razrjeđenje	pH vrijednost otopine kod demaskiranja antigena	Pozitivna kontrola
Anti-Ki-67	MA5-14520, Thermo Fischer	zec, monoklonalno	1:150	pH 6	karcinom dojke
Anti- RB1	PA5-99502, Thermo Fischer	zec, poliklonalno	1:100	pH 9	karcinom dojke
Anti - RB1Ser780	ab47763, Abcam	zec, poliklonalno	1:100	pH 6	karcinom dojke
Anti - RB1Ser795	ab47474, Abcam	zec, poliklonalno	1:50	pH 9	karcinom dojke
SOX9	AMAb90795, Atlas Antibodies	miš, monoklonalno	1:500	pH 9	sjemenik - odrasli

4.6. Analiza obojenih stakala

Preparati obojeni HE i IHC metodom analizirani su pomoću binokularnog Nikon svjetlosnog mikroskopa (TE300, Beč, Austria). Uzorci obojeni HE metodom analizirani su se deskriptivno kroz trajanje trudnoće te su korišteni za mjerenje promjera sjemenih kanalića.

Preparati su slikani pomoću svjetlosnog mikroskopa marke Olympus, model BX51 (Tokijo, Japan), spojenim s digitalnim fotoaparatom. Pozitivnom reakcijom je smatrano obojenje stanica smeđom bojom, a ono je analizirano unutar formiranih kanalića fetalnog sjemenika, u minimalno 10 slučajno odabranih, poprečno presječenih kanalića na povećanju od x 400. Proteinski izražaj izražen je na 2 načina: semikvantitativno kao broj pozitivno obojenih stanica u kanaliću te normalizirano na ukupan broj stanica unutar kanalića i njegov i promjer.

4.7. Izolacija genomske DNA

Za potrebe izolacije DNA ljudski materijal je zbog pristupačnosti samo arhivskim parafinskim uzorcima bio narezan rotacijskim mikrotomom na debljinu od 10 μm i stavljen na nesilanizirana histološka stakalca. Ukupni DNA izolirana je iz 5 rezova parafinskih blokova fetalnih sjemenika, a jedan uzorak je korišten kao kontrola kvalitete, ovisno o broju rezova koji se ujedinijuju (engl. *pooling*). U tom se uzorku usporedila količina i kvaliteta DNA od dva do deset rezova.

U nekim od parafinskih blokova postoje i druga fetalna tkiva te okolno, prateće tkivo oko sjemenika. Na rezovima obojenim HE označeno je mjesto gdje se nalazi samo sjemenik, pa se prema tim oznakama jednokratnom oštricom za skalpel (Scalpel Aesculap, XC15.1, B.Braun, Germany) tkivo sjemenika sastrugalo s po 10 rezova u epruvete s puferom za izolaciju DNA. Već su se tijekom prijašnjih istraživanja usporedili komercijalno dostupni setovi (tzv. kitovi) za izolaciju DNA, no, u usporedbi s njima, kućni protokol optimiziran za izolaciju DNA iz parafinskih uzoraka pokazao je daleko bolje rezultate po kvaliteti i količini dobivenog DNA (328). Nakon već opisane deparafinizacije i rehidracije u svježe promijenjenom nizu ksilola i padajućem nizu koncentracije etanola, uzorci su isprani dH_2O te ostavljeni 72 sata u TBS-u, kako bi se potpuno rehidrirali. Tkivo sjemenika se sterilnim skalpelom sastrugalo u tubice s 500 μL TES pufera (Tablica 3), pa je dodano po 50 μL proteinaze K (10 mg/mL). Enzimatska digestija napravljena je stavljanjem uzoraka preko noći u termoblok (Eppendorf ThermoMixer F1.5, Hamburg, Njemačka) na 56 °C, a u tubicama gdje se tkivo vidljivo nije razgradilo,

ponovilo se dodavanje proteinaze K i ostavilo u termobloku na dodatna tri sata na 56 °C uz treskanje na 300 rpm. Kada je došlo do golim okom vidljive razgradnje tkiva, u uzorke je dodano 200 µL prezasićenog natrijevog klorida (6 M NaCl) radi isoljavanja DNA, na čemu se protokol temelji. Uzorci su 5 minuta treskani, pa centrifugirani na 13 000 rpm 10 minuta u centrifugi (2326K, Hermle Labortechnik, Wehingen, Njemačka). Oko 700 µL supernatanta prebačeno je u čistu tubicu u koju je dodano 500 µL izopropanola te je tubica stavljena na treskanje dvije minute. Slijedilo je centrifugiranje na 13 000 rpm 15 minuta, a dobiven je vidljivo odvojen supernatant od taloga DNA. Supernatant je odbačen, a talog DNA ispran s 500 µL 70 %-tnog etanola i lupkanjem po dnu tubice. Ponovljeno je 15 minuta centrifugiranja na 13 000 rpm, pa se etanol pažljivo dekantirao kako bi se talog DNA zadržao u tubici. Tubica je ostavljena da se osuši s otvorenim čepom 45 minuta u termobloku na 56 °C, kako bi sav etanol ispario. U uzorak je dodano 50 µL TES pufera te su uzorci vraćeni u termoblok kroz jedan san na 40 °C kako bi se talog DNA otopio. Uzorci su nakon toga smrznuti na -80 °C.

Iz štakorskih svježe smrznutih uzoraka izolacija DNA provela se dodavanjem po 500 µL TES pufera i 50 µL proteinaze K po uzorku te inkubacijom na 56 °C u termobloku preko noći. Sljedeći dan se provjerilo jesu li uzorci otopljeni, a ako nisu, dodalo se još proteinaze K i vratilo u termoblok na 56 °C tri sata uz treskanje na 300 rpm. U ovom protokolu isoljavanje DNA se nije radilo te su pripremljeni uzorci smrznuti su na -80 °C.

Za usporedbu ponovljivosti rezultata, kvalitete bisulfitne konverzije i pirosekvenciranja, po tri uzorka štakorskih sjemenika od dva stadija uklopljena u parafin korištena su za izolaciju DNA po protokolu opisanom za ljudske uzorke iz parafinskih blokova.

4.8. Mjerenje koncentracije DNA i kontrola kvalitete

Kako bi izmjerili koncentraciju DNA, uzorci su otopljeni i resuspendirani kako bi otopina s DNA bila homogena. Po 1 µL izolata DNA korišteno je za mjerenje apsorbancije te određivanje koncentracije i čistoće pojedinog uzorka. Mjerenje se provelo na spektrofotometru Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, SAD) u triplikatima pri 260 nm, tj. omjera apsorbancija pri 260 nm i 280 nm. TES pufer bez DNA se koristio kao negativna kontrola i medij za čišćenje optičkog čitača. Izračun se pohranio te su se izračunale srednje vrijednosti mjerenja u triplikatima, što je potrebno za daljnje korake.

4.9. Bisulfitna konverzija izoliranog DNA

Bisulfitna konverzija nužan je korak pri pirosekvenciranju, jer je ono moguće samo na bisulfitno konvertiranom DNA. Komercijalni kit EpiTect® Bisulfite Kit (59124, Qiagen, Njemačka) korišten je za konverziju nemetiliranih citozina u uracile. Konverzija je selektivna, jer u DNA metilirani citozini ostaju nepromijenjeni, pa se time omogućava pirosekvenceru očitavanje količine konvertiranih mjesta. Pratite su se upute proizvođača, a prvo se pristupilo čišćenju radne površine i pribora razrijeđenom otopinom natrijevog hipoklorita (1:10) kroz 15 minuta, ispiranjem dH₂O te špricanjem 70 %-tnim etanolom sa sušenjem kroz 30 minuta.

Proizvođač seta kemikalija ima jasne upute po kojima su se kemikalije pripremile. DNA uzoraka je otopljen i resuspendiran pipetom. U dovoljan broj PCR tubica dodao se uvijek isti volumen DNA zaštitnog pufera (engl. *DNA protect buffer*), koji služi i kao indikator pH i bisulfitne smjese (sa natrijevim bisulfitom) te varijabilni omjeri vode pročišćene od RNAza (engl. *RNAse free water*) i otopljenog DNA, ovisno o dobivenoj količini DNA u ukupno istom volumenu. Tubice su se miješale i kratko centrifugirale, pa su stavljene u CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Njemačka) uređaj. Protokol PCR reakcije uključivao je izmjenu denaturacije pri 95 °C tijekom 5 min i inkubacije pri 60 °C prvi put 25 min, drugi 85 min i treći 175 min te inkubiranje uzoraka na 20 °C do vađenja. Za to vrijeme pripremljen je odgovarajući broj sterilnih tubica od 1,5 mL u koje je potom prebačen sadržaj svake tubice nakon bisulfitne konverzije i dodan BL pufer (za vezanje konvertiranog jednolančanog DNA za membranu na koloni) pomiješan s RNA nosačem (engl. *carrier RNA*) koji poboljšava vezanje malih količina DNA za kolonu). Dodan je i 100 %-tni etanol, pa se sadržaj pomiješao i prebacio na MinElute DNA spin kolone u kolekcijskim tubicama. Uzorci su centrifugirani jednu minutu na 20 000 g, pa je filtrat bačen, a kolona isprana ponovnim centrifugiranjem na 20 000 g s BW puferom koji uklanja ostatke natrijevog bisulfitna. Nakon ponovnog uklanjanja filtrata, u kolone je dodan BD pufer koji uklanja sulfite i stvara uracile u reakciji tijekom inkubacije na sobnoj temperaturi kroz 15 minuta. Uslijedilo je centrifugiranje i ispiranje s BW puferom još dva puta. Zatim je dodan 100 %-tni etanol na kolone, centrifugiran je te su kolone prebačene u čiste kolekcijske tubice. U dva navrata je dodano je 25 µL EB elucijskog pufera prije centrifugiranja na 15 000 g, kako bi se bisulfitno konvertirani DNA spustio na dno tubice, otopljen u puferu. Uzorci su spremljeni na -20 °C do sljedeće analize.

4.10. Dizajniranje početnica za PCR i pirosekvenciranje

Kako bi sa sigurnošću odredili optimalnu lokaciju za analizu na genomu, PyroMark® Assay Design Software 2.0 (Qiagen, Njemačka) računalni program korišten je za dizajniranje

početnica željenih fragmenata gena *RBI*, *H19* i *LINE-1* repetitivnih sekvenci za čovjeka te gena *H19* i *LINE-1* repetitivnih sekvenci za štakora. Sekvence gena odabrane su u genomskom pregledniku UCSC Genome Bioinformatics (329), po uzoru na podatke iz literature (Tablica 5 i 6), a baza podataka RefSeq služila se za preuzimanje sekvenci od interesa. Početnice svih navedenih sekvenci sadrže minimalno 3 CpG otoka.

DNA sekvence preuzete iz baze podataka prilagođene su u računalnom programu za dizajn početnica kako bi se početnice mogle dizajnirati za bisulfitno konvertirani DNA. Prilagođavanje podrazumijeva pretpostavku da su svi nemetilirani citozini konvertirani u uracile i da će nakon PCR reakcije biti zamijenjeni za timine te je slijed baza po tome promijenjen. S obzirom na to da su od interesa CpG nukleotidi i njihovi potencijalno metilirani citozini označeni s Y (pirimidinska baza), ostale citozinske baze označavaju se kao timini. Citozini s oznakom Y nakon bisulfitne konverzije mogu biti ili C ili T. Ukupno je za umnažanje željenog fragmenta PCR reakcijom potrebno dizajnirati par početnica: F (engl. *forward primer*, F) početnica za produljivanje jednog lanca i R početnica (engl. *reverse primer*, R) za produljivanje drugog lanca. Za pirosekvenciranje potrebna je sekvencijska početnica (engl. *sequencing primer*, S), a kako je za spomenutu metodu nužno da je jedna početnica biotinizirana, proizvođaču se napomenulo da F ili R početnica ima kovalentno vezani biotin (Tablica 5 i Tablica 6). Početnice su proizvedene i dopremljene od tvrtke Kemomed, Hrvatska.

Tablica 5. Početnice korištene za umnažanje PCR reakcijom i analizu metilacije ljudskog gena *RBI*, *H19* CTCF 6 regije i *LINE-1* ponavljajućih sekvenci i njihove karakteristike.

Gen	Početnica	Sequencia	Analizirana sequencia	Broj CpG mjesta	Referencia
<i>RBI</i>	F	5'-GGTGGGGTTAGGGTTTGA-3'	3'- TTYGGAGGTTAGAGGGTYGT TGYGAGYGTATTAGAYGT AAAAAATGAAAAATAAAAA TATAA-5'	5	(329)
	R	CTCTCCACACAACACACCATTTTAT AT-3'			
	S	5'-GTAGTTTTTTTTTGTGAGG-3'			
<i>H19</i> CTCF 6	F	5'- TGGGTATTTTTGGAAGTTTTTT- 3'	3'- AATYGGAAAGTGGTYGYGYG GYGGTAGTGTAGGTTTATAT ATTATAGT-5'	3	(331)
	R	biotin 5'- ATAAATATCCTATTCCCAAATAA- 3'			
	S	5'-TTTATAGTTTGGATGG-3'			
<i>LINE-1</i>	F	5'-biotin- TAGGGAGTGTTAGATAGTGG-3'	3'- RCCCTACTTCRACCTCRCA CRATACRCACACACTAAC CTAC-5**	6	(330)
	R	5'-AACTCCCTAACCCCTTAC-3'			
	S	5'-CAAATAAAACAATACCCTC-3'			

*R označava purinsku bazu

Tablica 6. Početnice korištene za umnažanje PCR reakcijom i analizu metilacije štakorskog gena *HI9* ICR 1 regije i *LINE-1* ponavljajućih sekvenci i njihove karakteristike.

Gen	Počelnica	Sekvenca	Analizirana sekvenca	Broj CpG mjesta	Referenca
<i>HI9</i> ICR 1	F	5'- AGTTATTAAAGAGGTATGAGGA TTATGT-3' biotin-	3'- ATACRAAAACTCRAAAAAATT AAAAAATTTTTTTTAAATTTA ACRCAAATAATTTTACTAC CACCACRRCRACAACCTCCRC RTATAAACCCACACACAAAA TTCAAC-5'*	7	(333)
	R	5'- ACCCACAAATATTACCCTTATATAA ATTCC-3'	5'- ACAATATTACCCTTATATAAAATTC CA-3'		
<i>LINE-1</i>	F	5'-TTGGTGAGTTTGGGATAT-3'	3'- YGGGTAYGTTTTTGTGTTTAT	3	(332)
	R	biotin -5'- AAATCTAAAAAACAAAAAACTACT AC-3'	YGGAAGTTTATA -5'		
	S	5'-TAGGAATTTTTTTAGGAT-3'			

* R označava purinsku bazu

4.11. Lančana reakcija polimerazom nakon bisulfitne konverzije

Za umnažanje bisulfitno konvertiranih fragmenata DNA koristio se komercijalni set kemikalija PyroMark® PCR Kit (Qiagen, Njemačka), prema uputama proizvođača. Nakon

temeljito čišćenja radne površine radi sprječavanja kontaminacija stranim DNA, pripremile su se PCR tubice u koju se stavljalo po 12,5 μL Master Mix-a, 2,5 μL koncentrata CoralLoad-a, 0,5 μL 10 μM F početnica, 0,5 μL 10 μM R početnica te vode i uzorka bisulfitno konvertiranog DNA (ukupno 9 μL) te 1 μL uzorka koncentracije bisulfitno konvertiranog DNA u koncentraciji od 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Svaki put se umjesto prvog i zadnjeg uzorka u reakcijsku smjesu dodavao 1 μL miliQ vode kao negativna kontrola, za dokaz odsutnosti stranog DNA. Također, komercijalno dostupne pozitivne kontrole bisulfitno konvertiranog ljudskog i štakorskog metiliranog i nementiliranog DNA (EpiTect PCR Control DNA Set, Qiagen, Njemačka) prošle su iste postupke kao i uzorci, a potrebni su za kontrolu kvalitete pirosekvenciranja. CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Njemačka) uređaj korišten je za umnažanje PCR reakcijom pri uvjetima navedenim u Tablici 7. Uzorci su pohranjeni na +4 °C do daljnje analize po završetku PCR reakcije.

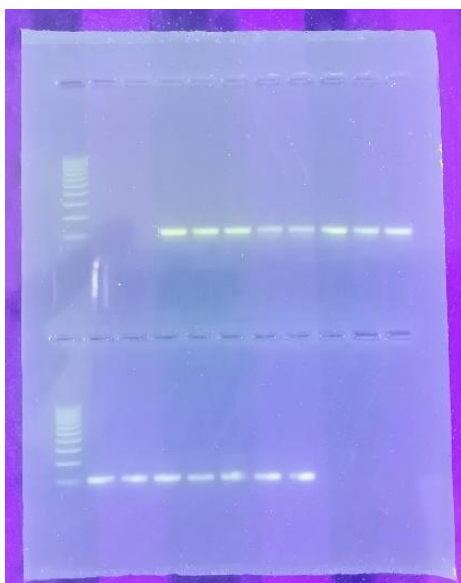
Tablica 7. Uvjeti umnažanja bisulfitno konvertiranog DNA lančanom reakcijom polimerazom za pojedini gen

Gen	Početa denaturacija (temperatura i trajanje)	Denaturacija (temperatura i trajanje)	Vezanje početnica (temperatura i trajanje)	Sinteza lanca (temperatura i trajanje)	Broj ciklusa	Završna elongacija
Čovjek						
<i>RBI</i>	95 °C 15 min	94 °C 30 s	53 °C 30 s	72 °C 30 s	45	72 °C 10 min
<i>H19</i>	95 °C 15 min	94 °C 30 s	45 °C 30 s	72 °C 30 s	50	72 °C 10 min
<i>LINE-1</i>	95 °C 15 min	94 °C 30 s	58 °C 30 s	72 °C 30 s	50	72 °C 10 min
Štakor						
<i>H19</i>	95 °C 15 min	94 °C 30 s	50 °C 30 s	72 °C 30 s	50	72 °C 10 min
<i>LINE-1</i>	95 °C 15 min	94 °C 30 s	53.7 °C 30 s	72 °C 30 s	50	72 °C 10 min

4.12. Gel elektroforeza

Gel elektroforeza na 2 %-tnom agaroznom gelu u 1 x TAE puferu (Tris-acetat-EDTA) služi kao provjera uspješnosti umnožavanja fragmenata gena *RBI*, *H19* i *LINE-1* repetitivnih sekvenci iz parafinskih i svježe smrznutih uzoraka pomoću dizajniranih početnica PCR reakcijom, a radi se nakon PCR umnožavanja bisulfitno konvertiranog DNA. U jažice pripremljene u gelu nanosilo se 4 µL pojedinog PCR produkta te je elektroforeza provedena u trajanju od 10 min na 80 V, a zatim 20-30 min na 120 V. Gel se pripremao s 2 % agaroze

(A9539, Sigma Aldrich, MA, USA) u TAE puferu s fluorescentnom bojom koja se veže na DNA (GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain, Lonza, Švicarska). Umnoženi DNA fragmenti koji su pomoću istosmjernje struje prošli kroz gel vizualizirali su se pomoću UV-transiluminatora (Slika 6), a njihova očekivana veličina uspoređena s DNA standardom (SimplyLoad™ 100 bp DNA Ladder, Lonza, Švicarska) koji sadrži fragmente DNA poznatih veličina. Voda slobodna od RNAza (engl. *RNAse free water*; Qiagen, Njemačka) korištena je kao negativna kontrola odsutnosti kontaminacije stranim DNA molekulama još u koraku postavljanja PCR reakcije te na gelu nema prisutne vrpce u pripadajućoj koloni. Također, tijekom optimizacije, koristile su se različite koncentracije DNA koje bi dale jasno vidljivu vrpcu na gelu, tj. dovoljnu količinu DNA za pirosekvenciranje - 10, 5 i 2.5 ng DNA te je količina od 5 ng po uzorku pokazala optimalnom.



Slika 6. Primjer gela nakon elektroforeze: ljudske *LINE-1* ponavljajuće sekvence. Na prvoj koloni nalazi se DNA standard, u prvom redu dvije negativne kontrole, a zatim uspješno umnoženi PCR produkti.

4.13. Pirosekvenciranje

Pirosekvencer Pyromark Q24 Advanced (Qiagen, Njemačka) s odgovarajućim kemikalijama PyroMark Q24 Advanced CpG Reagents (Qiagen, Njemačka) korišteni su za pirosekvenciranje bisulfitno konvertiranog DNA. Dizajn eseja za pirosekvenciranje napravljen je za svaki gen u PyroMark Q24 Advanced Software (Qiagen) računalnom programu. Njime se utvrđuje redoslijed kojim se nukleotidi dodaju u reakcijsku smjesu, a esej se pohranjuje na pamtidbeni prutić (engl. *USB stick*). Pirosekvencer se upalio 30 minuta prije početka rada, kako

bi se osiguralo paljenje svih osnovnih funkcija, unutarnje baždarenje uređaja i postizanje radne temperature. Za to vrijeme se radna površina očistila 70 %-tnim etanolom te se pripremila PyroMark® Q24 Vacuum Workstation radna postaja - postolje s posudicama koje se se punile 70 %-tnim etanolom, dH₂O te denaturacijskom otopinom proizvođača (engl. *denaturation buffer*) i puferom za ispiranje (engl. *wash buffer*). Tada se provjeravala valjanost vakuumske pumpe te umetnula USB memorijska kartica, a kemikalije se zagrijavale na sobnu temperaturu. Biotinilirani PCR produkti moraju se vezati za sefrozne kuglice obložene streptavidinom (Streptavidin Sepharose® High Performance, GE Healthcare, Švedska), pa se pripremila njihova reakcijska smjesa. 60 µL smjese dodala se na PCR ploču, u svaku od 24 jažice, a u sljedećem koraku su se dodali po 20 µL uzorka, pozitivni metilirani i negativni nemetilirani kontrolni DNA iz odgovarajućeg organizma (čovjeka, 59695, Qiagen, Njemačka ili štakora, S7860, Sigma Aldrich, MA, USA). Ostavila se jedna ili dvije jažice bez uzorka, u koje se dodaje dH₂O slobodna od RNA-za, kao kontrola zagađenja reakcije pirosekvenciranja. PCR ploča s gornje strane se zatvorila snažnom ljepljivom folijom te se stavila na treskalicu, pri 1400 *rpm* kroz 15 min. To je omogućilo vezanje sefroznih kuglica i PCR produkata. Za to vrijeme pripremila se smjesa za vezanje biotiniliranih PCR produkata, prema Tablici 8 i PyroMark Q24 ploča za pirosekvenciranje u koju je stavljeno po 20 µL reakcijske smjese u svaku od 24 jažice.

Tablica 8. Reakcijske smjese korištene pri pirosekvenciranju po uzorku.

	Komponenta	Volumen (µL)
PCR ploča	sefrozne kuglice	2
	PyroMark pufer za vezanje (engl. <i>binding buffer</i>)	40
	miliQ dH ₂ O	18
	PCR produkt	20
PyroMark Q24 ploča	PyroMark pufer za prijanjanje (engl. <i>annealing buffer</i>)	19,25
	početnica za sekvenciranje	0,75

U spremnik za pirosekvenciranje (PyroMark® Q24 Cartridge, Qiagen, Njemačka) dodali su se preporučeni volumeni smjese enzima, supstrata i nukleotida, koji se određuju računalno, pri planiranju eseja za pirosekvenciranje te se spremnik (engl. *cartridge*) umetnuo u pirosekvencer. Enzimi koji se dodaju DNA polimeraza, ATP sulfurilaza, luciferaza i apiraza, a supstrati su adozin 5' fosfosulfat i luciferin. Kada je završeno preporučeno vrijeme treskanja, PCR ploča brzo se prebacila na radnu postaju, u jažice se pažljivo spustio nosač s nastavcima

koji na sebi nose filtere, a sam nosač je spojen na vakuumsku pumpu. Potrebno je oko 15 s da se sefrozne kuglice koje nose biotinizirani PCR produkt vežu na filtere te se zatim nosač s filtrima uronio redom kroz ostale pripremljene tekućine. Nakon toga slijede koraci opisani u Tablici 9.

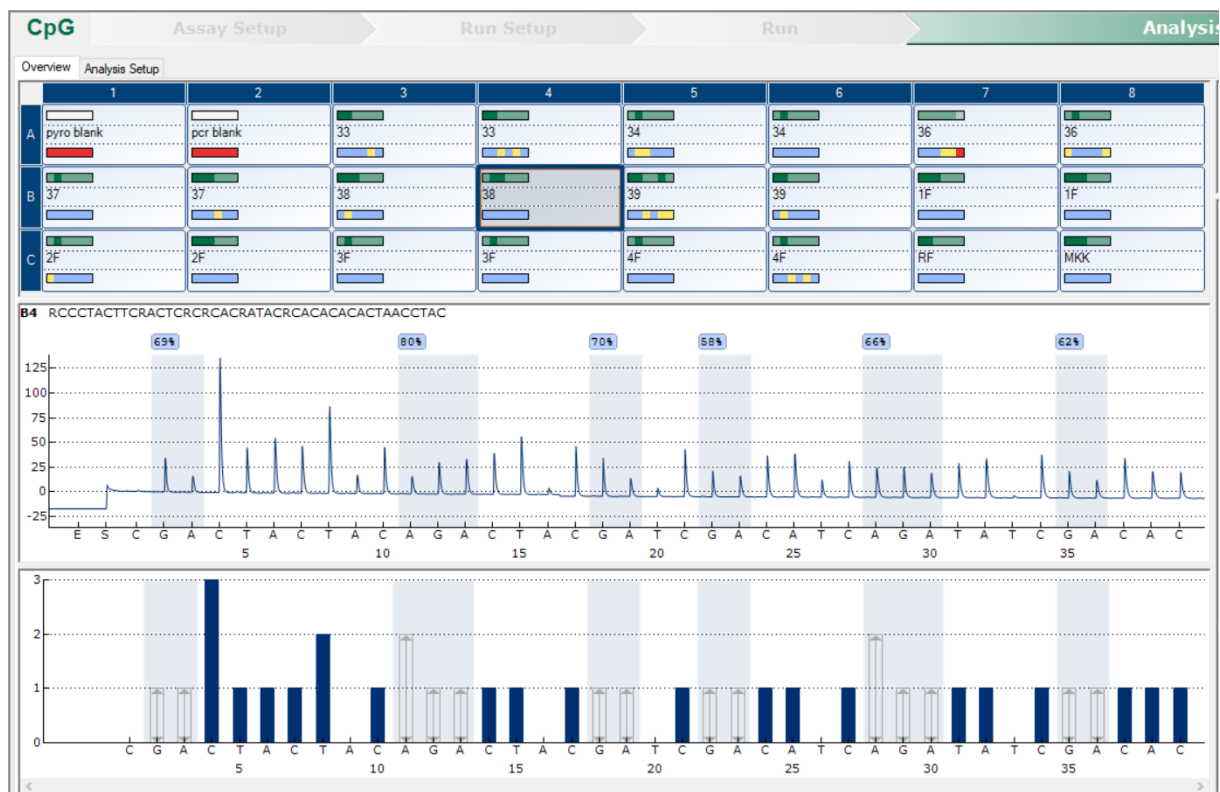
Tablica 9. Koraci prijenosa PCR produkata vezanih na sefrozne kuglice.

Korak	Učinak
1. 15 s vakuum	prijenos PCR produkata sa sefroznim kuglicama na nosač
2. ispiranje 70 %-tni etanolom 5 s	ispiranje nevezanih DNA molekula koje nisu biotinizirane
3. ispiranje denaturacijskim puferom 5 s	razdvajanje lanaca DNA kako bi se zadržao samo biotinizirani lanac
4. pufer za ispiranje 10 s	
5. isključivanje vakuuma iznad PyroMark Q24 ploče i ručno treskanje 30 s	pad sefroznih kuglica s PCR produktom u ploču

Kada se vizualno provjerilo sadrže li unaprijed pripremljene PyroMark ploče s puferom za prijanjanje i početnicama sefrozne kuglice (zamućenje) osim tamo gdje su kontrole zagađenja (bistro), ploča se stavila 5 minuta na toplu ploču na 80 °C. Nakon toga je na pirosekvencer pripremljen program s esejem te se unutar 15 s PyroMark ploča postavila u uređaj i pokrenulo pirosekvenciranje.

4.14. Analiza rezultata pirosekvenciranja

Na kraju pirosekvenciranja, čija dužina ovisi o esejju, na USB sticku je pohranjen pirogram (Slika 7). Taj grafički prikaz zasebno analizira svako CpG mjest dajući rezultat u obliku postotka metilacije. Sadrži i podatke o određenim kontrolnim točkama, kao što je uspješnost bisulfitne konverzije te intenzitet referentnih „pikova“, stvorenim računalno, kao teoretski pikogram iz sekvence zadane u esejju. Uz analizu uzoraka, analiziraju se i pozitivna i negativna kontrola te kontrola metiliranog i nemetiliranog DNA. Ako neka od tih vrijednosti nije zadovoljila, analiza se ponovila ili se nije uključila u statističku obradu.



Slika 7. Primjer pirograma za uzorak dobre kvalitete. Prva dva mjestaja zauzimaju negativne kontrole, a dalje su analizirane *LINE-1* sekvence na uzorcima ljudskih fetalnih sjemenika. Posljednje mjesto zauzima metilirana (pozitivna) kontrola.

4.15. Statistička obrada podataka

Obrada statističkih podataka napravljena je korištenjem statističkog programa GraphPad Prism v5.00 program (GraphPad software, San Diego, USA) uz Windows operativni sustav (broj licence: GPW6-278912-RLMU966F4).

Za prikupljene podatke korištena je opisna statistika. Kvantitativni podaci postotka metilacije i broja imunohistokemijski pozitivnih stanica grafički su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom za ljudske uzorke, odnosno aritmetičkom sredinom i standardnim devijacijama za štakorske uzorke. Normalnost raspodjele testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Kategorijske vrijednosti prikazane su omjerima. Analiza podataka između više skupina, odnosno stadija trudnoće čovjeka i štakora napravljena je pomoću Kruskal-Wallis testa s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Usporedba parova uzoraka pri evaluaciji tehničke karakteristike metode analizirana je ANOVA testom. Sve p-vrijednosti manje od 0.05 smatrane su statistički značajnima.

5. REZULTATI

5.1. DNA metilacija u tkivu fetalnih štakorskih sjemenika kroz stadije trudnoće

Kako bi se utvrdilo utječe li razvoj štakorskog sjemenika na dinamiku promjene metilacije *LINE-1* ponavljajućih sljedova i genomski utisnutog *H19* gena, pirosekvenciranjem su se obradili uzorci svježe smrznutih fetalnih sjemenika. Pirosekvenciranje točno analizira metilaciju svakog pojedinog CpG dinukleotida u definiranoj sekvenci nakon bisulfitne konverzije, a podaci su se grafički obradili kao postotak metilacije svake pojedine CpG točke te njihovog prosjeka. Dodatno su se usporedili uzorci istog stadija, ovisno o tome jesu li bili smrznuti na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ili fiksirani, uklopljeni u parafin te spremljeni na $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Analiza je obuhvatila stadije štakorske trudnoće od 16.5 do 21.5 dpc (engl. *days post coitum*), gdje je 21.5 dpc tik pred okot.

5.1.1. Analiza metilacije *LINE-1* ponavljajućih sljedova

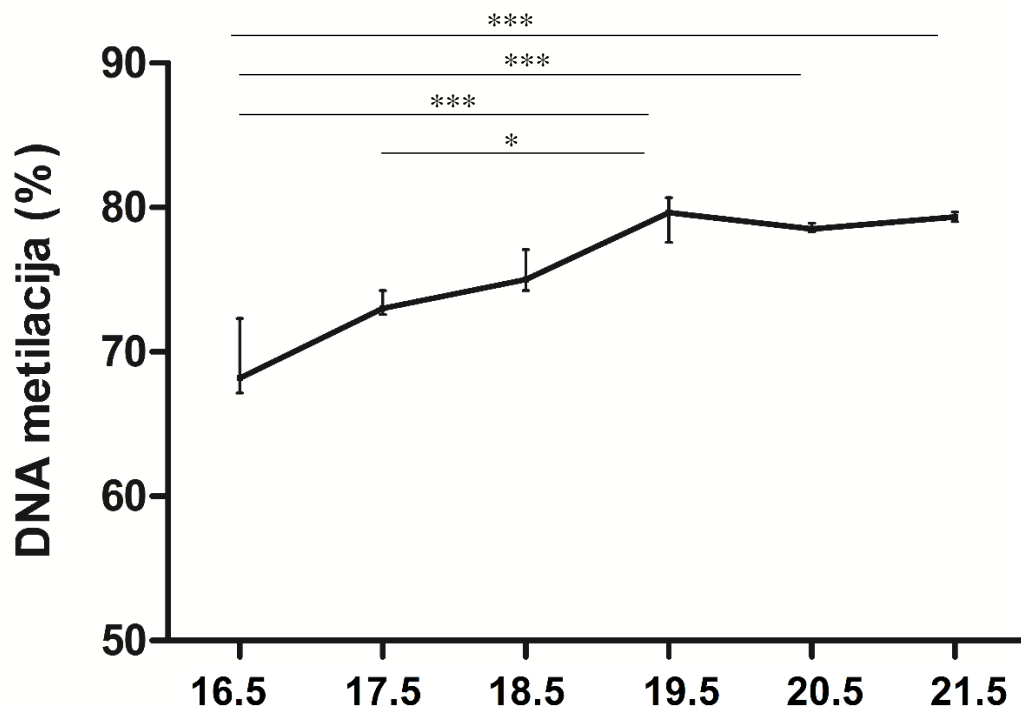
Određen je postotak DNA metilacije tri CpG mjesta unutar CpG otoka svakog uzorka fetalnog štakorskog sjemenika, kako bi se usporedila eventualna promjena tijekom razvoja. Postotak DNA metilacije *LINE-1* ponavljajućih sljedova prikazan je kao prosjek metilacije tri CpG mjesta, linearnim grafičkim prikazom po stadijima trudnoće. Dodatno su prikazani pojedinačna CpG mjesta, tj. njihov postotak metilacije te uspoređen između stadija.

Tablica 10. Numerički izražene srednje vrijednosti postotka metilacije gDNA *LINE-1* ponavljajućih sljedova i standardne devijacije po stadijima trudnoće za pojedino CpG mjesto i prosjek vrijednosti. Rezultati su dobiveni Kruskal-Wallis testom s Dunnovim testom višestrukih usporedbi, a prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Statistički značajna p-vrijednost smatrana je ona manja od 0,05.

	Prosjek					
dpc	16.5	17.5	18.5	19.5	20.5	21.5
N	10	6	6	6	8	6
\bar{X} (%)	69,53	73,33	75,44	79,28	78,58	79,34
SD	2,972	1,011	1,456	1,468	0,427	0,387
	CpG 1					
\bar{X} (%)	61,70	65,33	67,00	68,00	70,13	70,50
SD	2,584	0,817	1,265	0,633	0,641	0,577
	CpG 2					
\bar{X} (%)	68,10	71,83	74,00	79,00	77,00	77,75
SD	3,071	1,329	1,673	2,757	0,535	0,500
	CpG 3					
\bar{X} (%)	78,70	83,00	85,33	85,83	88,63	89,75
SD	3,433	1,414	1,506	1,602	0,518	0,500

dpc - dan poslije oplodnje; N - broj uzoraka; \bar{X} - aritmetička sredina; SD - standardna devijacija

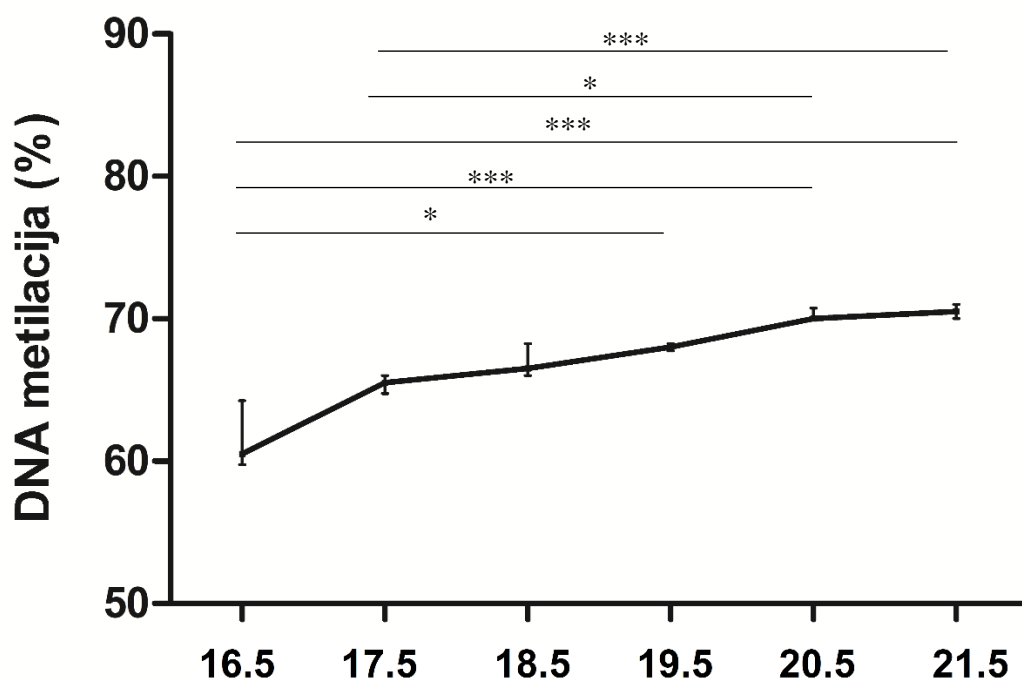
Analizom prosječne metilacije *LINE-1* ponavljajućih sljedova u fetalnim štakorskim sjemenicima tijekom razvoja pokazala je statistički značajnu razliku između 17.5 (73,33 ± 1,011 %) i 19.5 dpc (79,28 ± 1,468 %) ($p < 0,05$) (Slika 8 i Tablica 10). Srednja vrijednost postotka metilacije DNA u tkivu fetalnog sjemenika štakora ukupno je rasla od 69,53 ± 2,972 % u 16.5 dpc do 79,34 ± 0,387 % na dan okota, 21.5 dpc.



Slika 8. Prosjek postotka metilacije *LINE-1* ponavljajućih sljedova iz svježe smrznutih uzoraka štakorskih fetalnih sjemenika od 16.5 do 21.5 dpc. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Broj uzoraka je minimalno 6 po skupini. Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,05 označena je jednom (*), ona manja od 0,001 s tri zvjezdice (***)

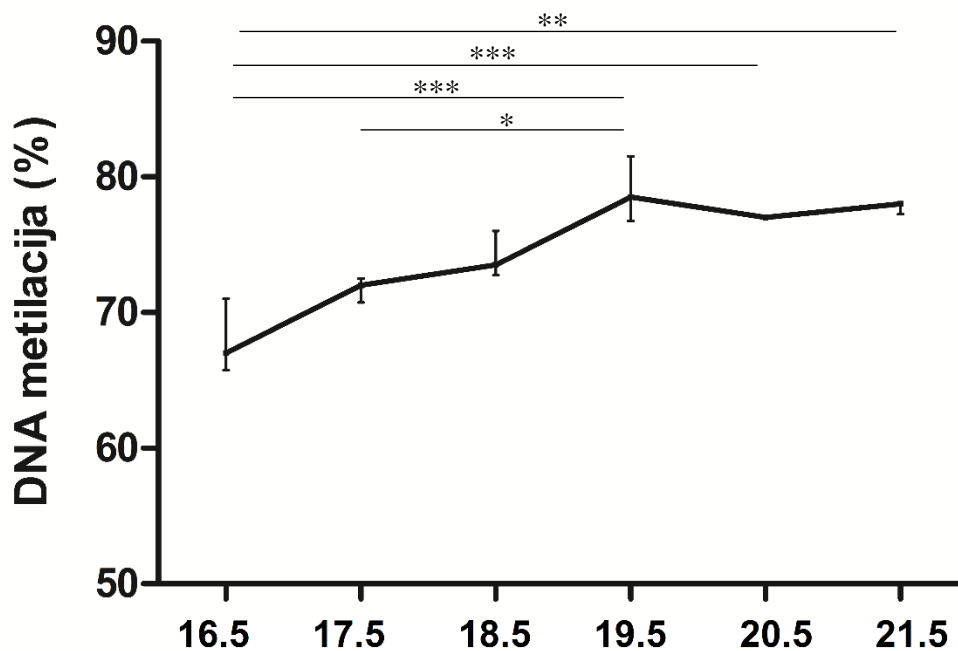
Statistička analiza metilacije *LINE-1* ponavljajućih sljedova u pojedinom CpG mjestu pokazala je da u svakom pojedinom analiziranom CpG mjestu postoji statistički značajna razlika u metilaciji DNA u tkivu fetalnog sjemenika (Slika 9 - 11, Tablica 10).

Analizom metilacije *LINE-1* ponavljajućih sljedova na CpG1 mjestu u fetalnim štakorskim sjemenicima tijekom razvoja pokazala je statistički značajnu razliku na prijelazu od 16.5 do 19.5 ($p < 0,05$) i 17.5 do 20.5 dpc ($p < 0,05$) (Slika 9 i Tablica 10). Srednja vrijednost postotka metilacije DNA u tkivu fetalnog sjemenika štakora kretala se od 61,70 ± 2,584 % sa 16.5 dpc do 70,50 ± 0,577 % na kraju trudnoće, 21.5 dpc.



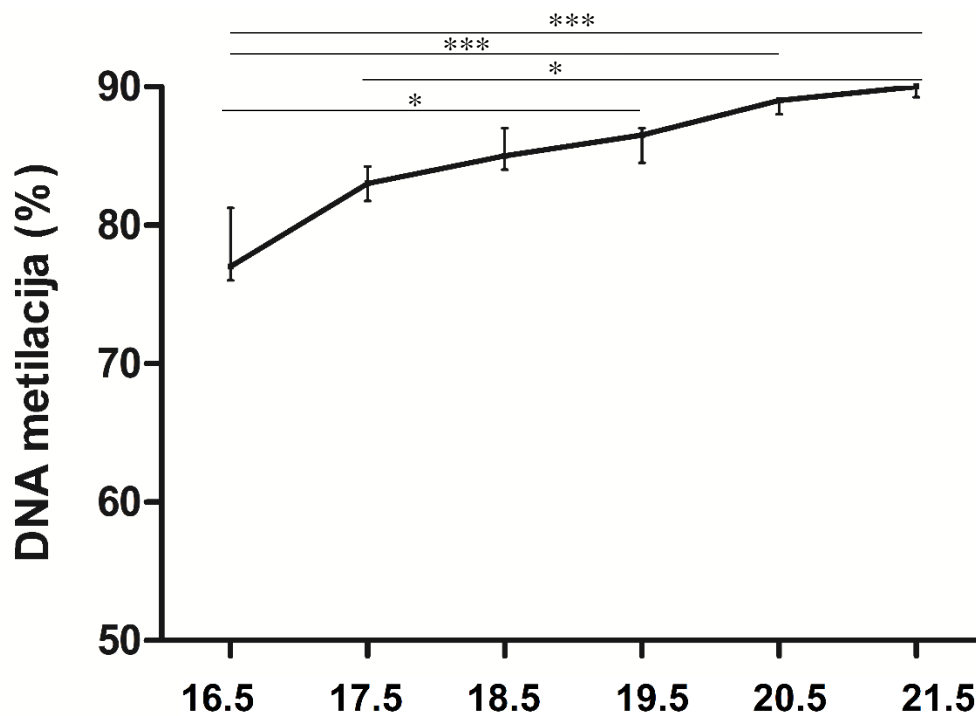
Slika 9. Postotak metilacije *LINE-1* ponavljajućih sljedova na CpG1 mjestu iz svježe smrznutih uzoraka štakorskih fetalnih sjemenika od 16.5 do 21.5 dpc. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Broj uzoraka je minimalno 6 po skupini. Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,05 označena je jednom (*), ona manja od 0,001 s tri zvjezdice (***)

Postotak metilacije *LINE-1* ponavljajućih sljedova na CpG2 mjestu statistički je bio značajan između 17.5 i 19.5 dpc ($p < 0,05$) (Slika 10. i Tablica 10). Srednja vrijednost postotka metilacije rasla je od $68,10 \pm 3,071$ % sa 16.5 dpc i $77,75 \pm 0,50$ % na 21,5 dpc ($p < 0,01$).



Slika 10. Postotak metilacije *LINE-1* ponavljajućih sljedova na CpG2 mjestu iz svježe smrznutih uzoraka štakorskih fetalnih sjemenika od 16.5 do 21.5 dpc. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Broj uzoraka je minimalno 6 po skupini. Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,05 označena je jednom (*), manja od 0,01 s dvije (**), a ona manja od 0,001 s tri zvjezdice (***).

Metilacija *LINE-1* ponavljajućih sljedova na CpG3 mjestu izražena u postocima bila je statistički značajna između stadija od 17.5 i 20.5 dpc ($p < 0,05$) (Slika 11. i Tablica 10). Srednja vrijednost metilacije DNA bila je između $78,70 \pm 3,433$ % sa 16.5 dpc i $89,75 \pm 0,50$ % na 21.5 dpc ($p < 0,001$), vrijednosti više nego za mjesto CpG1 i 2.



Slika 11. Postotak metilacije *LINE-1* ponavljajućih sljedova na CpG3 mjestu iz svježe smrznutih uzoraka štakorskih fetalnih sjemenika od 16.5 do 21.5 dpc. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Broj uzoraka je minimalno 6 po skupini. Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,05 označena je jednom (*), ona manja od 0,001 s tri zvjezdice (***)

5.1.2. Analiza metilacije diferencijalno metilirane regije utisnutog gena *H19*

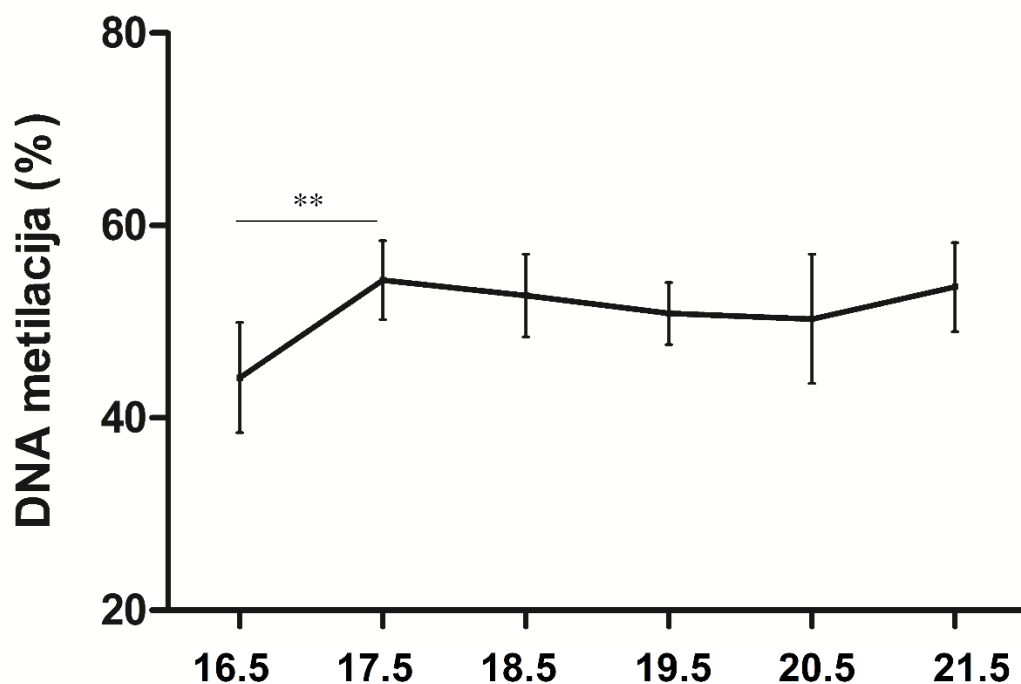
Da bi se odredio vremenski tijek utišavanja ekspresije utisnutih gena tijekom fetalnog razvoja, pirosekvenciranjem je analizirana promjena postotka DNA metilacije sedam CpG mjesta unutar slijeda diferencijalno metilirane regije (DMR) gena *H19* na uzorcima fetalnih štakorskih sjemenika. Graf postotka DNA metilacije po stadijima prikazuje metilaciju sedam CpG mjesta te njihov prosjek (Slike 12 - 17, Tablica 11).

Tablica 11. Numerički izražene srednje vrijednosti postotka metilacije DNA diferencijalno metilirane regije gena *H19* i standardne devijacije po stadijima trudnoće za pojedino CpG mjesto i prosjek vrijednosti. Rezultati su dobiveni Kruskal-Wallis testom s Dunnovim testom višestrukih usporedbi, a prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Statistički značajna p-vrijednost smatrana je ona manja od 0,05.

	Prosjek					
dpc	16.5	17.5	18.5	19.5	20.5	21.5
N	10	6	6	6	8	6
\bar{X} (%)	44,20	54,32	52,72	50,86	50,29	53,61
SD	5,744	4,113	4,289	3,213	6,711	4,624
	CpG 1					
\bar{X} (%)	50,00	61,60	63,33	61,33	62,83	66,67
SD	8,869	4,600	5,888	6,593	5,492	4,412
	CpG 2					
\bar{X} (%)	46,50	63,00	64,33	63,50	63,83	63,00
SD	5,477	2,211	5,715	6,716	6,401	4,980
	CpG 3					
\bar{X} (%)	42,80	46,50	47,50	44,00	46,50	47,00
SD	7,613	4,440	3,507	6,512	6,348	3,578
	CpG 4					
\bar{X} (%)	40,00	44,33	45,40	43,80	45,75	46,00
SD	8,315	3,141	6,518	6,680	6,819	0,0
	CpG 5					
\bar{X} (%)	34,25	43,00	45,00	43,20	43,67	43,00
SD	9,051	5,292	4,050	7,642	4,633	1,155
	CpG 6					
\bar{X} (%)	43,00	52,00	55,80	52,00	52,33	48,00
SD	10,22	4,660	4,392	8,667	7,312	1,155
	CpG 7					
\bar{X} (%)	37,25	35,67	41,00	40,00	37,75	37,00
SD	8,294	5,391	4,0	2,0	4,234	0,0

dpc - dan poslije oplodnje; N - broj uzoraka; \bar{X} - aritmetička sredina; SD - standardna devijacija

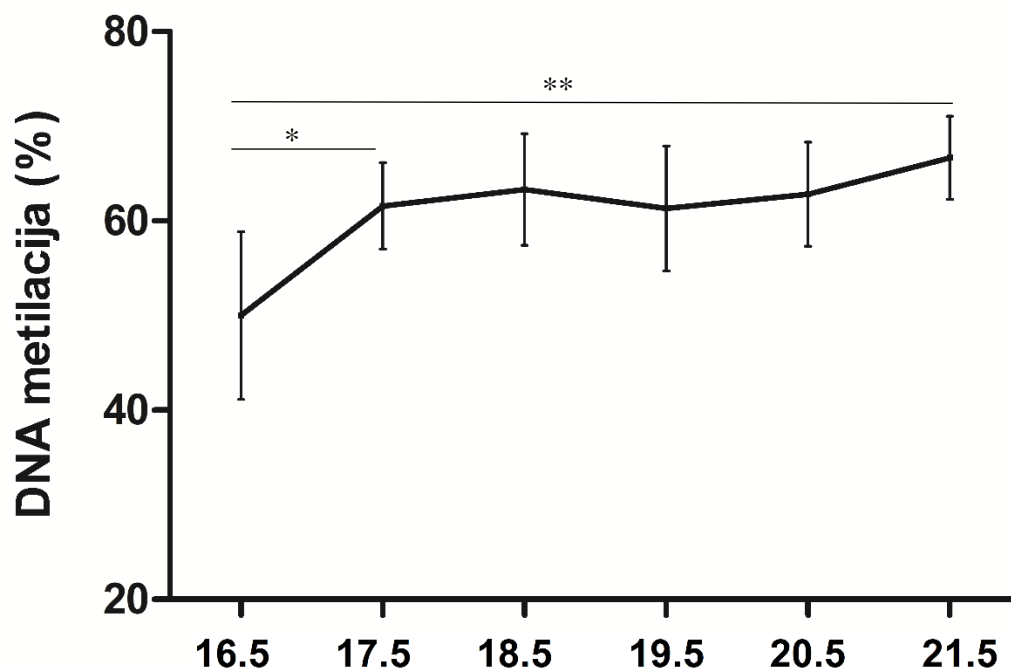
Prosječna metilacije DMR regije gena *H19* u fetalnim štakorskim sjemenicima tijekom razvoja pokazala je statistički značajnu razliku između 16.5 i 17.5 dpc ($p < 0,01$) (Slika 12 i Tablica 11). Srednja vrijednost postotka metilacije DNA u tkivu fetalnog sjemenika štakora kretala se od $44,20 \pm 5,744$ % u 16.5 dpc do $53,61 \pm 4,624$ % u 21.5 dpc.



Slika 12. Prosjek postotka metilacije gena *H19* iz svježe smrznutih uzoraka štakorskih fetalnih sjemenika od 16.5 do 21.5 dpc. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Broj uzoraka je minimalno 6 po skupini. Statistički značajna p-vrijednost manja je od 0,01, a označena je dvjema zvjezdicama (**).

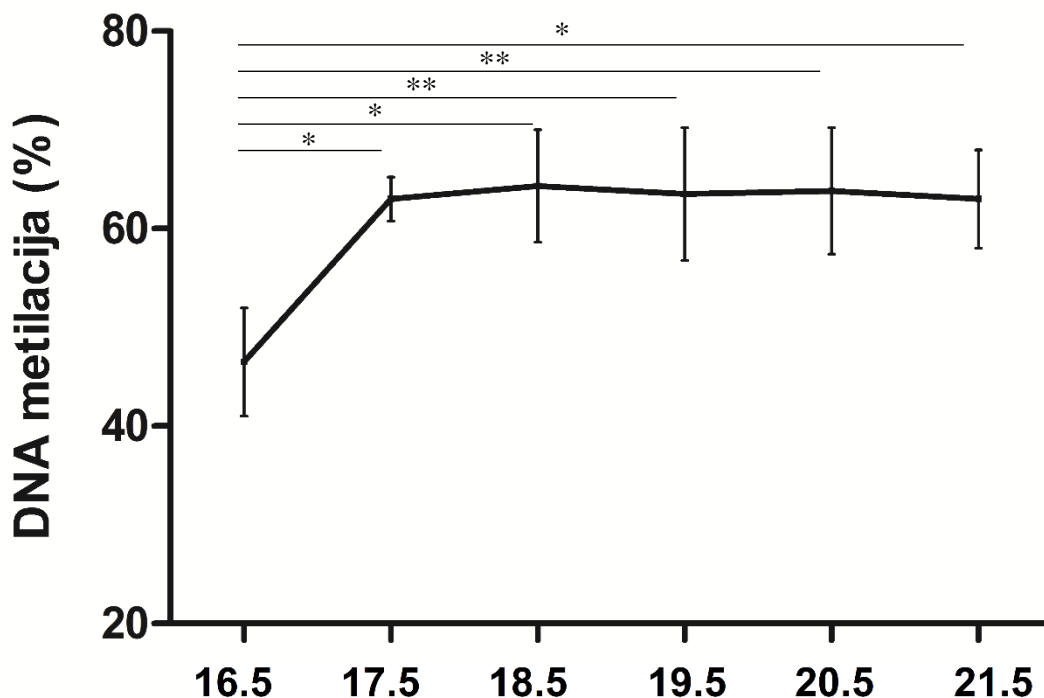
Metilacija DMR regije gena *H19* po pojedinom CpG mjestu, od 1 do 7, samo je u nekima pokazala statistički značajnu razliku u metilaciji DNA (Slika 13 - 17, Tablica 11).

Analizom DNA metilacije utisnutog gena *H19* na CpG1 mjestu u fetalnim štakorskim sjemenicima tijekom razvoja pokazala je statistički značajnu razliku na prijelazu od 16.5 dpc ($50,00 \pm 8,869$ %) do 17.5 ($61,60 \pm 4,6$ %) ($p < 0,05$) i do 21.5 dpc ($66,67 \pm 4,412$ %) ($p < 0,01$) (Slika 13 i Tablica 11).



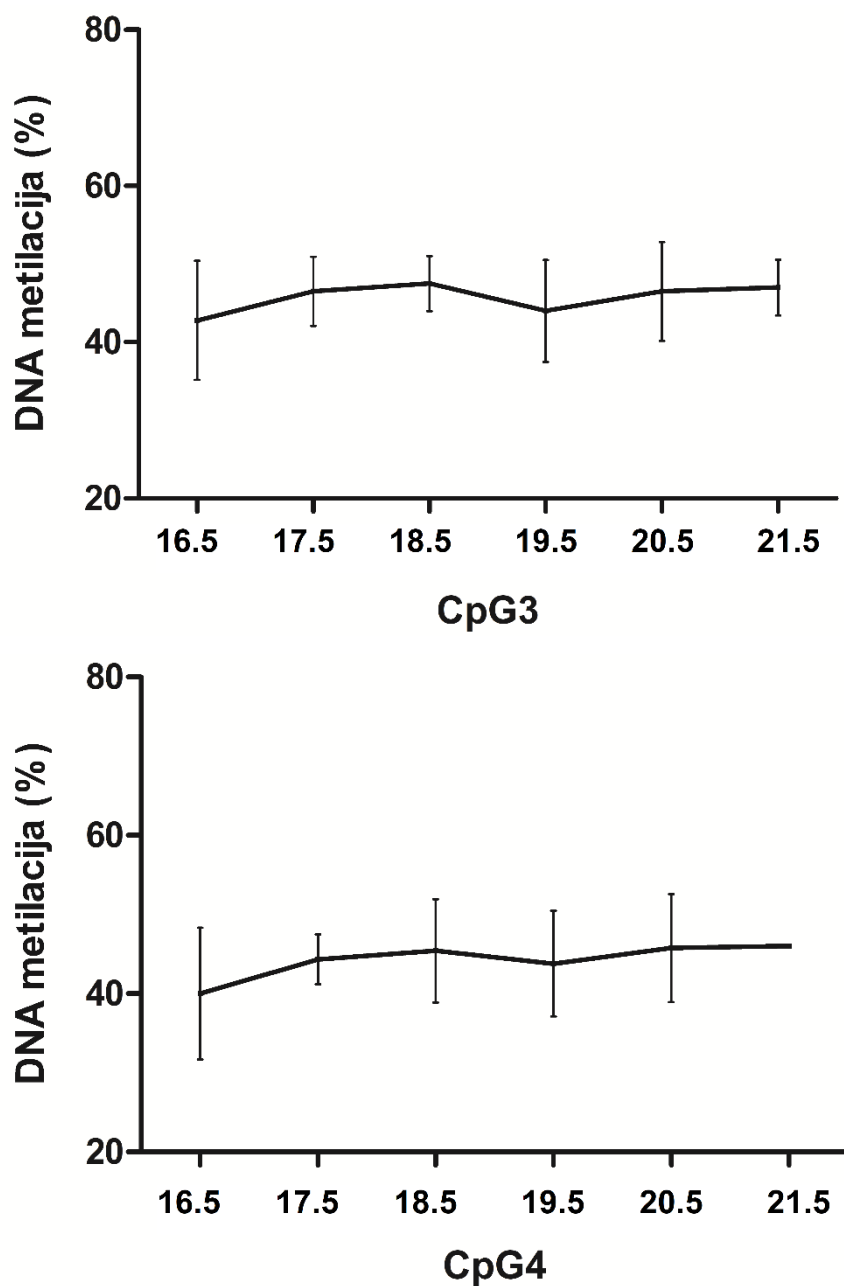
Slika 13. Postotak metilacije gena *H19* na CpG1 mjestu iz svježe smrznutih uzoraka štakorskih fetalnih sjemenika od 16.5 do 21.5 dpc. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Broj uzoraka je minimalno 6 po skupini. Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,05 označena je jednom (*), ona manja od 0,01 s dvije zvjezdice (**).

CpG2 mjesto odabranog slijeda DMR regije gena *H19* imalo je statistički značajan porast postotak metilacije od 16.5 dpc ($46,5 \pm 5,477$ %) do svih narednih stadija, završno s 21.5 dpc ($63,0 \pm 4,98$ %) (Slika 14 i Tablica 11).



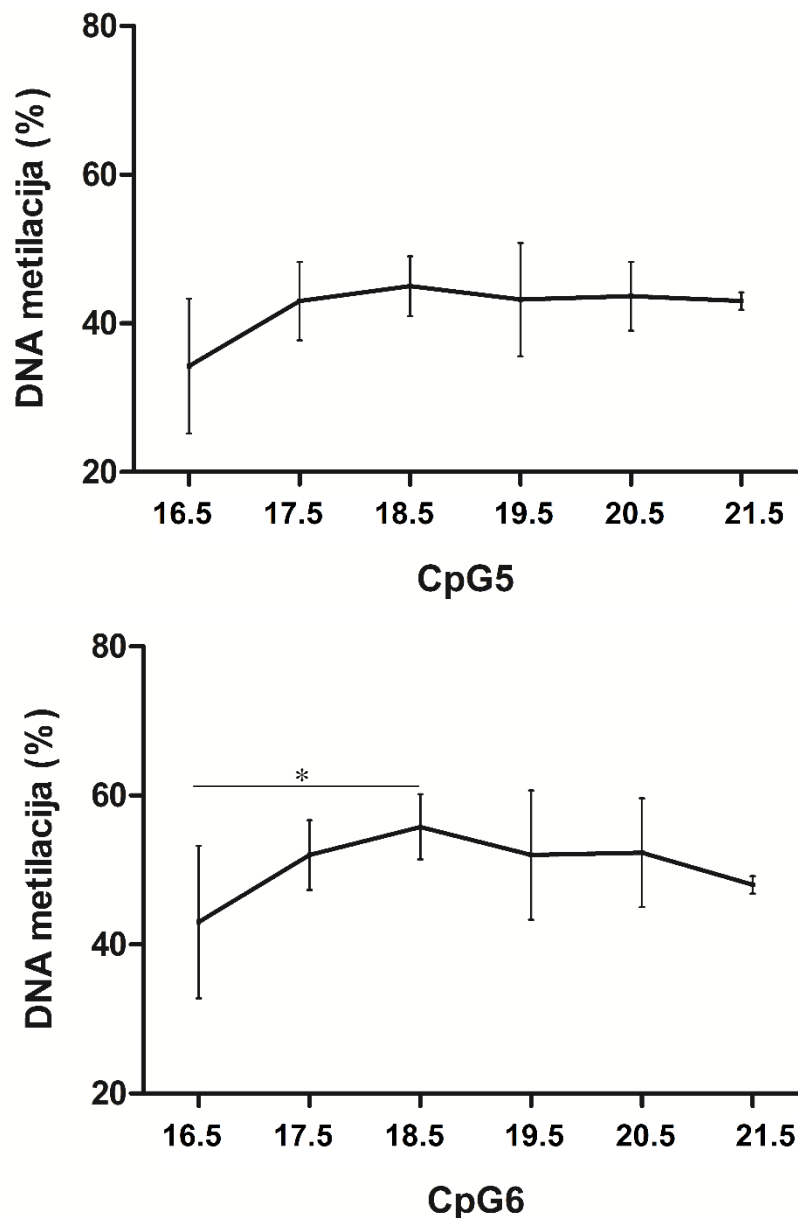
Slika 14. Postotak metilacije gena *H19* na CpG2 mjestu iz svježe smrznutih uzoraka štakorskih fetalnih sjemenika od 16.5 do 21.5 dpc. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Broj uzoraka je minimalno 6 po skupini. Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,05 označena je jednom (*), ona manja od 0,01 s dvije zvjezdice (**).

Metilacija DMR regije *H19* gena nije pokazala statističku značajnost na CpG3 ($p=0,5926$) i CpG4 ($p=0,7580$) mjestu (Slika 15 i Tablica 11). Srednja vrijednost metilacije DNA bila je između $42,80 \pm 7,613$ % u 16.5 dpc i $47,0 \pm 3,578$ % 21.5 dpc za CpG3 mjesto, a $40,00 \pm 8,315$ % u 16.5 dpc i $46,0 \pm 0,0$ % 21.5 dpc za CpG4 mjesto.



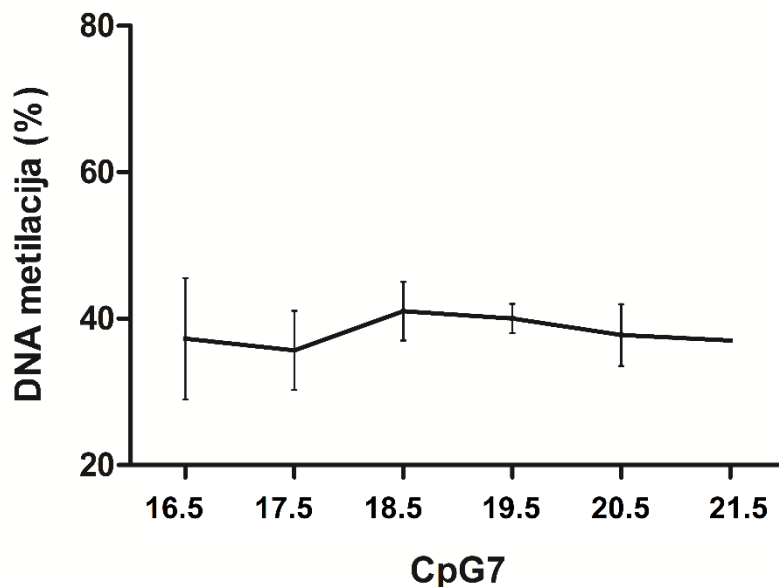
Slika 15. Postotak metilacije gena *H19* na CpG3 (gore) i CpG4 (dolje) mjestu iz svježe smrznutih uzoraka štakorskih fetalnih sjemenika od 16.5 do 21.5 dpc. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Broj uzoraka je minimalno 6 po skupini. Nema statistički značajne vrijednosti.

Analizom DNA metilacije utisnutog gena *H19* na CpG5 mjestu u fetalnim štakorskim sjemenicima tijekom razvoja nije pokazala statistički značajnu razliku ($p=0,1302$) (Slika 16 i Tablica 11). Vrijednosti postotka metilacije kretale su se između $34,25 \pm 9,051$ % u 16.5 dpc i $43,0 \pm 1,155$ % 21.5 dpc. Metilacija DNA DMR regije *H19* na CpG6 mjestu izražena u postocima bila je statistički značajna između stadija od 16.5 ($43,0 \pm 10,22$ %) i 18.5 dpc ($55,80 \pm 4,392$ %) ($p<0,05$) (Slika 16 i Tablica 11).



Slika 16. Postotak metilacije gena *H19* na CpG5 i CpG6 mjestu iz svježe smrznutih uzoraka štakorskih fetalnih sjemenika od 16.5 do 21.5 dpc. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Broj uzoraka je minimalno 6 po skupini. Statistički značajna p-vrijednost manja je od 0,05, a označena je zvjezdicom (*).

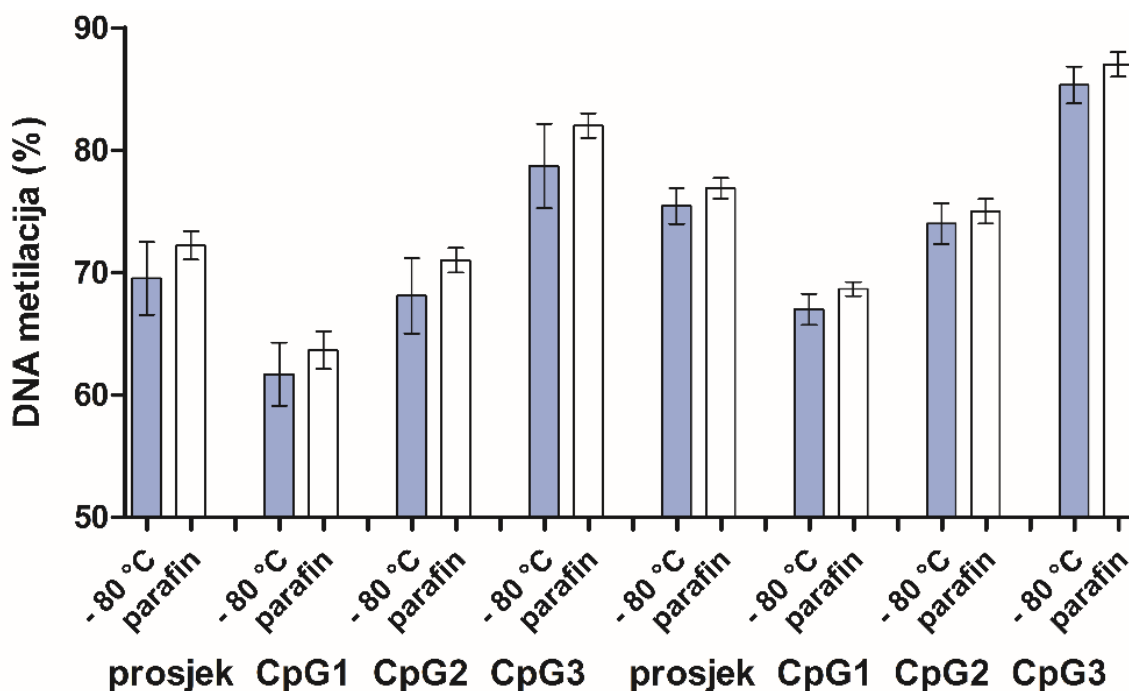
Metilacija DMR regije *H19* gena na CpG7 mjestu nije pokazala statističku značajnost, $p=0,1772$ (Slika 17 i Tablica 11). Srednja vrijednost metilacije DNA bila je između $37,25 \pm 8,294 \%$ u 16.5 dpc i $37,0 \pm 0,0 \%$ 21.5 dpc.



Slika 17. Postotak metilacije gena *H19* na CpG7 mjestu iz svježe smrznutih uzoraka štakorskih fetalnih sjemenika od 16.5 do 21.5 dpc. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Broj uzoraka je minimalno 6 po skupini.

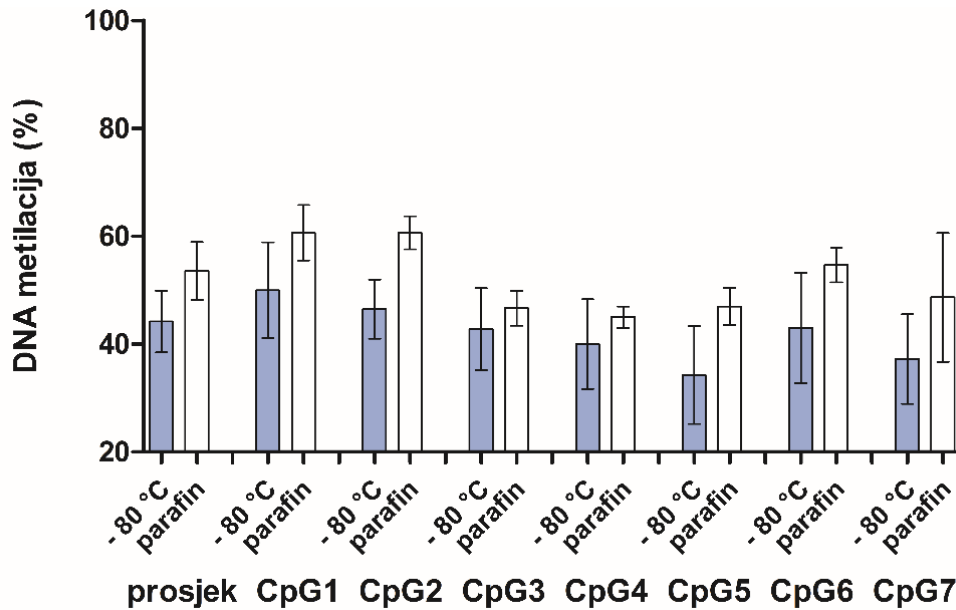
5.1.3. Utjecaj načina pohrane tkiva na rezultate pirosekvenciranja

Kako bi usporedili kvalitetu DNA i kako se odražava na pirosekvenciranje, dio uzoraka 16. i 18. dana trudnoće fiksirani su i uklopljeni u parafin, kao za rutinsku histopatološku analizu. Iz njih se prilagođenim protokolom izolirao DNA te su se uzorci podvrgnuli pirosekvenciranju u isto vrijeme kao i njihovi parovi koji su bili pohranjeni metodom smrzavanja na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Statistička analiza pokazala je razlike između uparenih uzoraka koje nisu bile statistički značajne. Uglavnom su vrijednosti postotka metilacije iz svježe smrznutih uzoraka bile nešto niže od vrijednosti njihovih parova uzoraka uklopljenih u parafin (Slika 18 - 20).

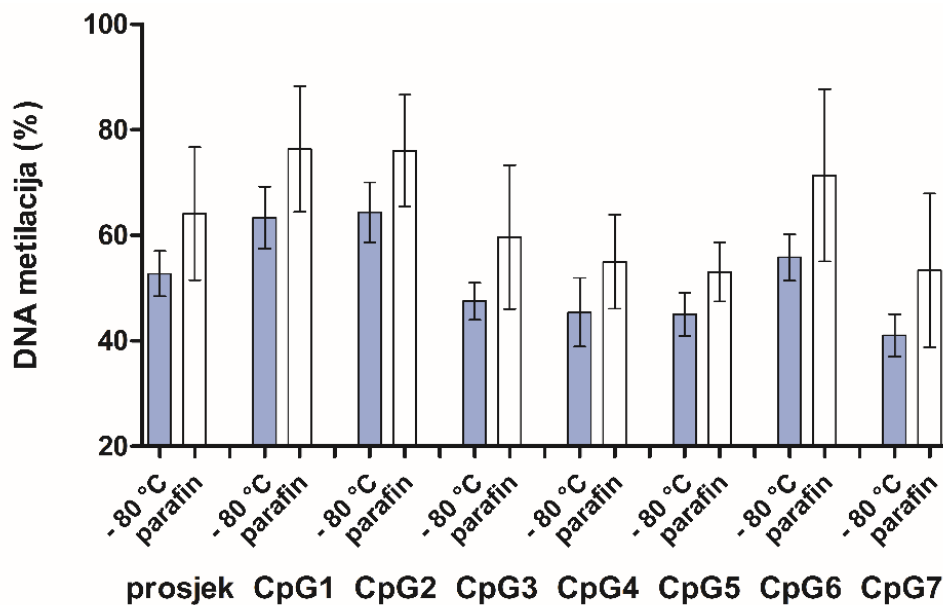


Slika 18. Postotak metilacije *LINE-1* ponavljajućih sljedova u prosjeku te za svako pojedino CpG mjesto za 16. i 18. dan trudnoće. Svježe smrznuti uzorci prikazani su plavo, a oni pohranjeni u parafinu bijelo. ANOVA test, rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Broj uzoraka je minimalno 6 po skupini. Nema statistički značajne razlike.

Analiza metilacije parova svježe smrznutih i uzoraka uklopljenih u parafin za gen *H19* podijeljena je u dva prikaza zbog većeg broja analiziranih CpG mjesta. I ovi rezultati su pokazali nižu vrijednost iste analize kod uzoraka pohranjenih na -80 °C. Također, vidljive su razlike u vrijednostima na grafovima (Slika 19 i 20), no ona nije bila statistički značajna. Primjetne su veće oscilacije vrijednosti pri analizi gena *H19*, nego pri analizi *LINE-1* ponavljajućih sljedova.



Slika 19. Postotak metilacije gena *H19* u prosjeku te za svako pojedino CpG mjesto za 16. dan trudnoće. Svježe smrznuti uzorci prikazani su plavo, a oni pohranjeni u parafinu bijelo. ANOVA test, rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Broj uzoraka je minimalno 6 po skupini. Nema statistički značajne razlike.



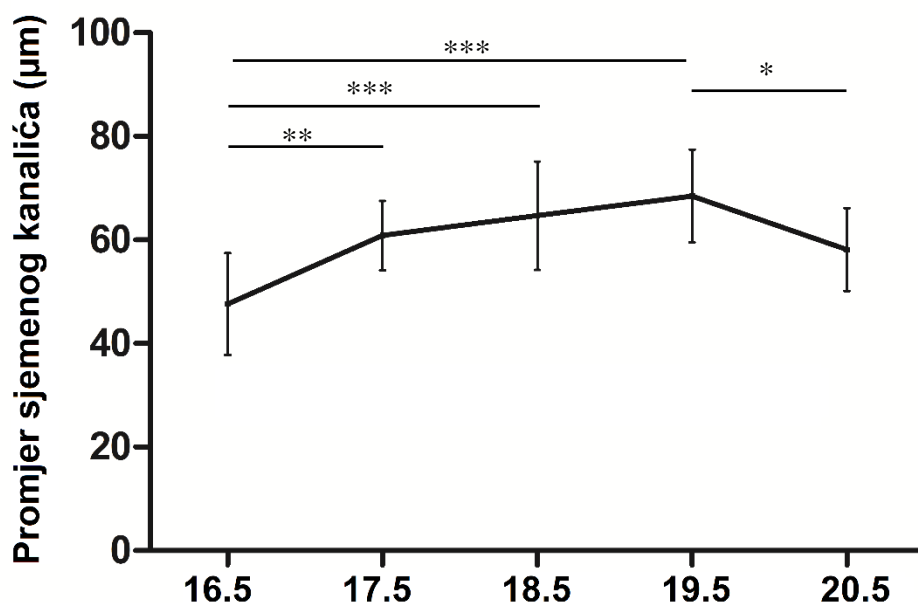
Slika 20. Postotak metilacije gena *H19* u prosjeku te za svako pojedino CpG mjesto za 18. dan trudnoće. Svježe smrznuti uzorci prikazani su plavo, a oni pohranjeni u parafinu bijelo. ANOVA test, rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Broj uzoraka je minimalno 6 po skupini. Nema statistički značajne razlike.

5.2. Izražaj imunohistokemijskih biljega u tkivu fetalnih štakorskih sjemenika kroz stadije trudnoće

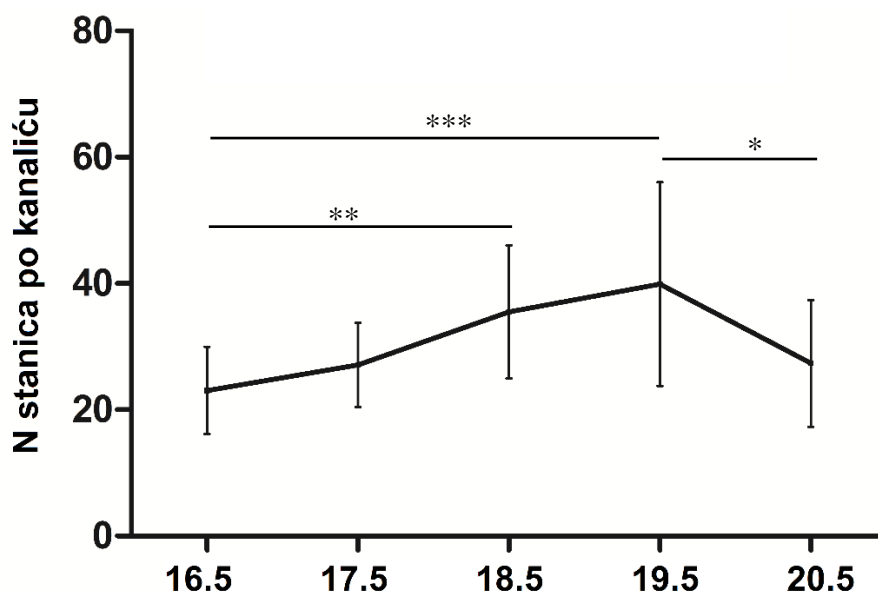
Pri analizi histoloških karakteristika fetalnih sjemenika na početku se pristupilo rezovima obojenima hemalaun-eozinom. Na njima se najbolje mogu opisati histološke karakteristike stanica i tkiva. Imunohistokemijska analiza na biljeg proliferacije Ki-67, protein tumorsupresorskog gena *RBI*, njegove forme fosforilirane na serinu 780 i 795 te biljeg Sertolijevih stanica SOX9 provela se brojanjem smeđe obojenih stanica u minimalno 10 poprečno presječenih sjemenskih kanalića (tubula). U grafičkom prikazu rezultata koristila su se još dva parametra za normalizaciju rezultata. Kako bi se izbjegle varijacije zbog promjene ukupnog broja stanica u sjemenom kanaliću te njegovom promjeru, vrijednosti su se dodatno izrazile kao broj pozitivnih stanica po ukupnom broju stanica te po promjeru pomnožen sa 100 (334, 335).

5.2.1. Histološke karakteristike fetalnog štakorskog sjemenika

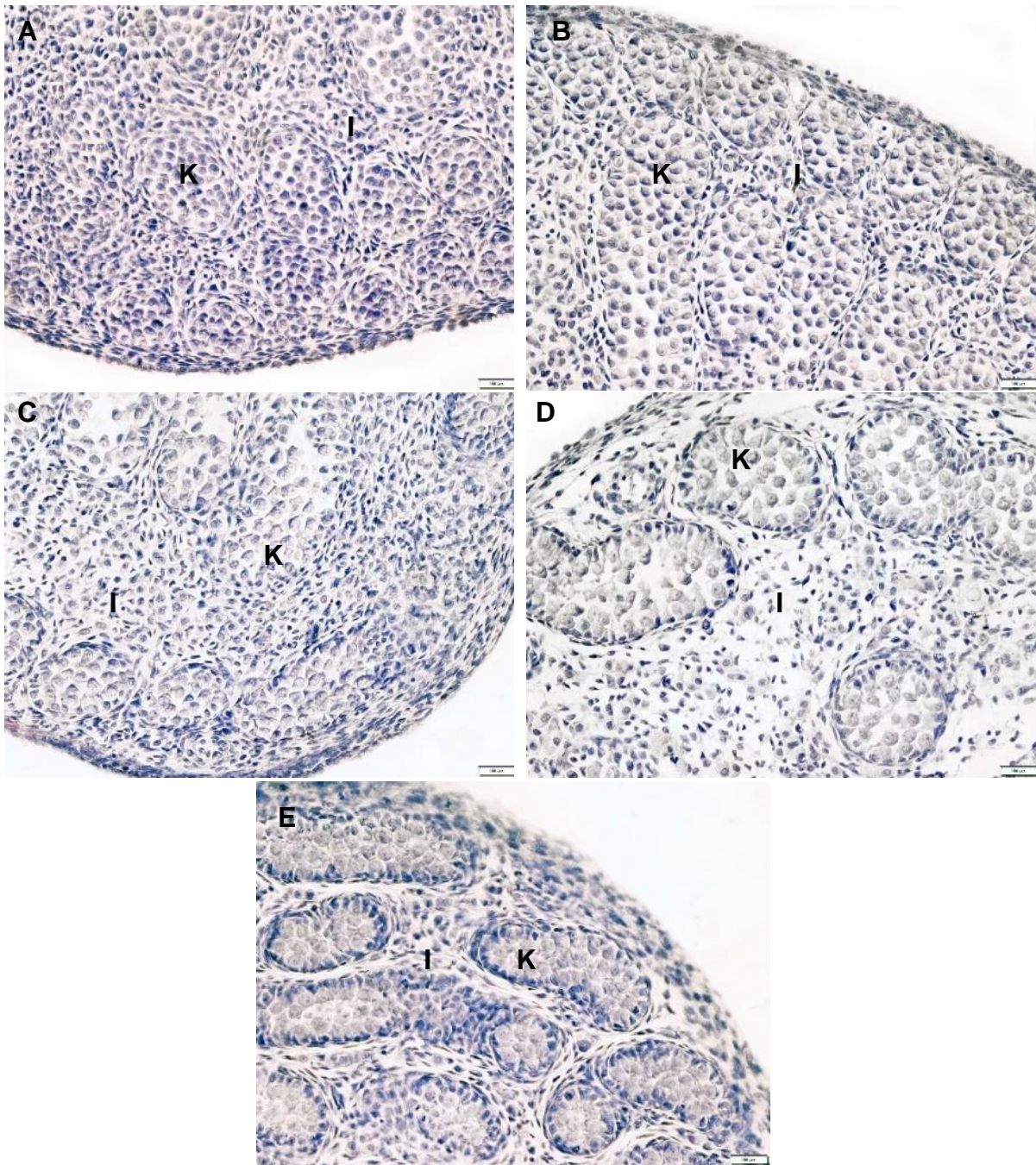
Slika 23 prikazuje histološke promjene štakorskog sjemenika od 16.5 do 20.5 dpc. Od sredine (16.5 dpc) do kraja trudnoće (20.5 dpc) uočava se zadebljanje tunike albugineje, relativno povećanje površine intersticija, a do 19.5 dpc povećanje promjera sjemenih kanalića (Slika 21) te ukupnog broja stanica po kanaliću (Slika 22) s blagim padom obje vrijednosti do 20.5 dpc. Spolne stanice (gonocite) u svim stadijima su velike, većinu stanice zauzima jezgra, koja prema kraju trudnoće ima sve rahliji kromatin (svjetlija). Smještene su u sredini sjemenih kanalića, okružene Sertolijevim stanicama. U većini stanica jedan pol je tamnije obojan, što je ultrastrukturno najčešće mitohondrij (336). Sertolijeve stanice smještene su uz rubove sjemenih kanalića te se od 16. 5 do 20.5 dpc njihove jezgre kondenziraju (tamne), stanice postaju trokutaste, a ne plosnate. Već i u 16.5 dpc pružaju citoplazmatske izdanke između spolnih stanica. Leydigove stanice prisutne su u intersticiju od 14.5 dpc mijenjaju veličinu, no ne i broj do 20.5 dpc.



Slika 21. Promjer sjemenih kanalića u istraživanim stadijima štakorske trudnoće izražen u mikrometrima. Prosječni promjer raste do 19.5 dpc te zatim neznatno pada. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Broj uzoraka je minimalno 6 po skupini. Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,05 označena je jednom (*), ona manja od 0,01 s dvije (**), a ona manja od 0,001 s tri zvjezdice (***).



Slika 22. Ukupni broj stanica (N) po sjemenom kanaliću u istraživanim stadijima štakorske trudnoće. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Broj uzoraka je minimalno 6 po skupini. Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,05 označena je jednom (*), ona manja od 0,01 s dvije (**), a ona manja od 0,001 s tri zvjezdice (***).



Slika 23. Histološke karakteristike štakorskih sjemenika kroz stadije trudnoće, vizualizacija svjetlosnim mikroskopom. A) 16.5, (B) 17.5, (C) 18.5, (D) 19.5, (E) 20.5 dpc. K - kanalić, I - intersticij. Bojenje hemalaun-eozinom. Povećanje x 400, skala pokazuje 20 µm.

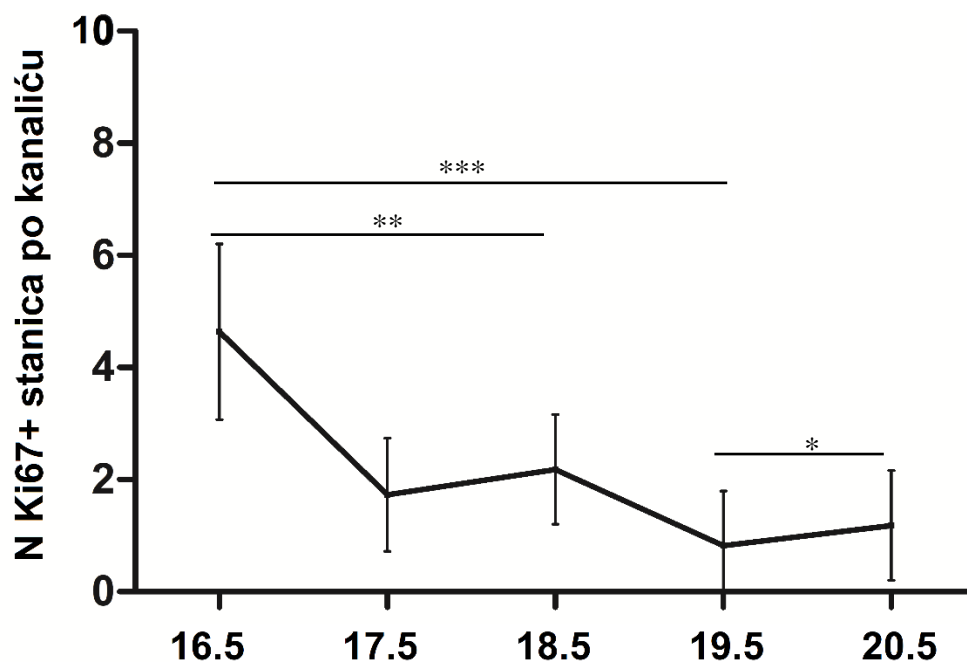
5.2.2. Izraženost Ki-67 biljega u štakorskom sjemeniku kroz stadije trudnoće

Biljeg proliferacije Ki-67 klasični je biljeg stanica u S-fazi staničnog ciklusa. Analiziran je kako bi se procijenila dinamika promjene njegovog izražaja kroz stadije štakorske trudnoće te za usporedbu s ostalim korištenim biljezima staničnog ciklusa. Jednostavno brojanje na velikom povećanju (x 400) u minimalno 10 poprečno presječenih sjemenih kanalića, odnosno tubula (Slika 24, Tablica 12) korigiralo se s ukupnim brojem stanica i promjerom sjemenog kanalića (Slika 25). U oba slučaja, pokazano je da stanice u 16.5 dpc još proliferiraju, no taj broj značajno pada u 17.5 dpc te je izrazito nizak u 18.5 dpc. Na slici 26 može se uočiti kako je najveći dio pada broja stanica upravo zbog prekida proliferacije zametnih stanica, odnosno gonocita od 17.5 dpc. Iako se u kanaliću može naći i nekoliko proliferirajućih stanica u 16.5 dpc, već u 17.5 dpc broj se svodi na pokoju bazalno položenu pozitivnu stanicu (uglavnom Sertolijeve). U svim stadijima radi se o malom ukupnom broju stanica (od 0 do najviše 7).

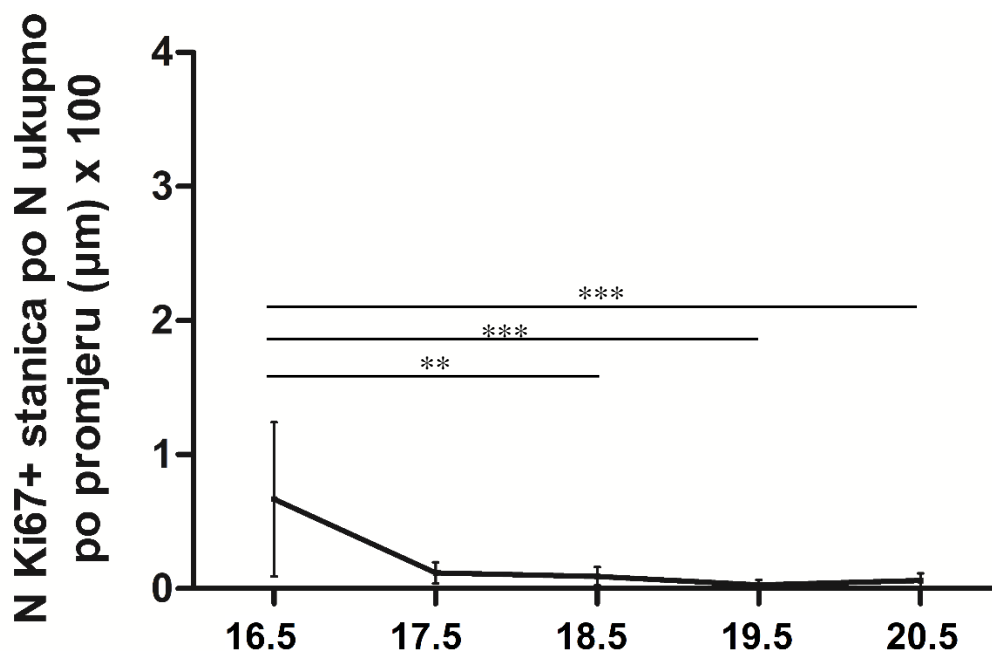
Tablica 12. Numerički izražene srednje vrijednosti izraženosti biljega proliferacije Ki-67 i standardne devijacije po stadijima trudnoće štakora.

Broj Ki-67+ stanica po sjemenom kanaliću					
dpc	16.5	17.5	18.5	19.5	20.5
N	11	11	11	11	11
\bar{X} (%)	4,636	1,727	2,182	0,8182	1,182
SD	1,567	1,009	0,9816	0,9816	0,9816
Broj Ki-67+ stanica po ukupnom broju stanica i po promjeru sjemenog kanalića					
\bar{X} (%)	0,6668	0,1173	0,09302	0,02777	0,06307
SD	0,5752	0,07940	0,06893	0,03592	0,05243

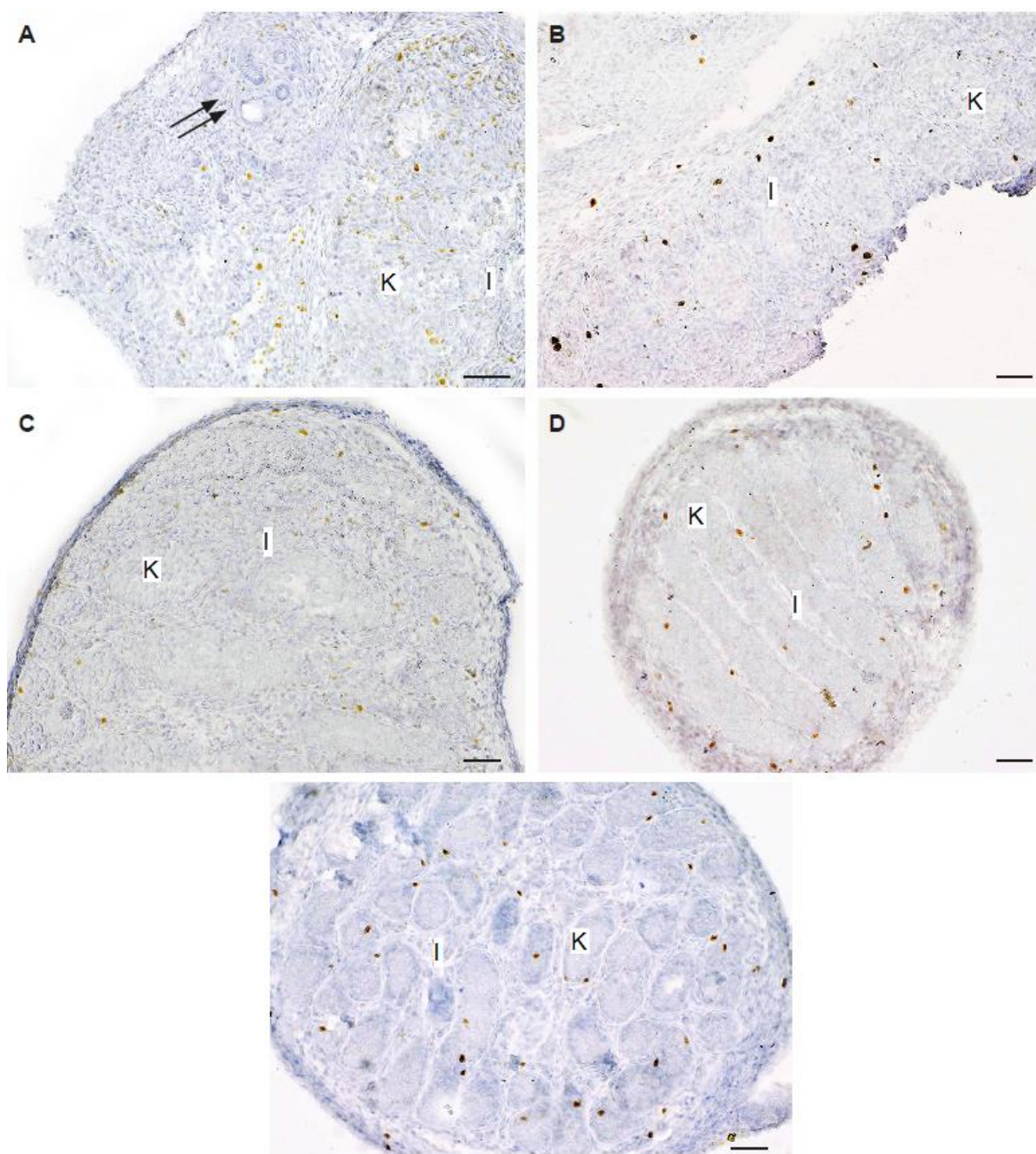
dpc - dan poslije oplodnje; N - broj uzoraka; \bar{X} - aritmetička sredina; SD - standardna devijacija



Slika 24. Broj stanica (N) pozitivnih na biljeg proliferacije Ki-67 po poprečno presječenom kanaliću. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Broj uzoraka je minimalno 6 po skupini. Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,05 označena je jednom (*), ona manja od 0,01 s dvije (**), a ona manja od 0,001 s tri zvjezdice (***).



Slika 25. Broj stanica (N) pozitivnih na biljeg proliferacije Ki-67 po poprečno presječenom kanaliću normaliziran na ukupni broj stanica u kanaliću i njegov promjer. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Broj uzoraka je minimalno 6 po skupini. Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,01 označena je dvjema (**), ona manja od 0,001 s tri zvjezdice (***).



Slika 26. Izraženost proteina Ki-67, biljega proliferacije u štakorskim sjemenicima kroz stadije trudnoće, vizualizacija svjetlosnim mikroskopom. (A) 16.5, (B) 17.5, (C) 18.5, (D) 19.5, (E) 20.5 dpc. K - kanalić, I - intersticij, dvostruka strjelica - ductuli efferentes. Nakon 17.5 dpc, u kanalićima se više gotovo ne uočava izraženost biljega Ki-67. Bojenje DAB-om, kontrastiranje hemalaun-eozinom. Povećanje x 200, skala pokazuje 50 μ m.

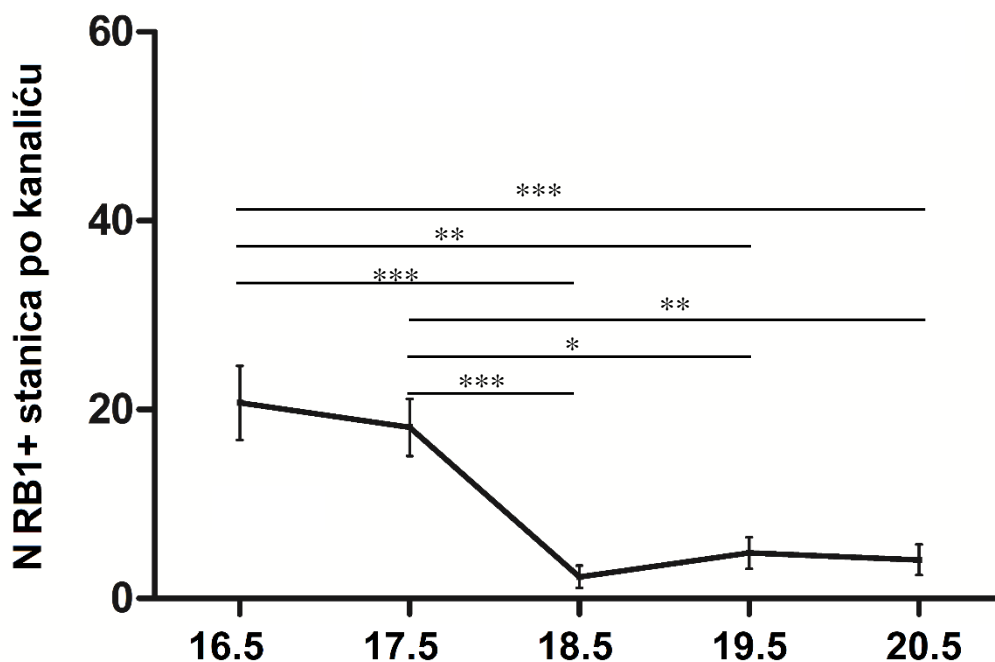
5.2.3. Izraženost RB1 proteina u štakorskom sjemeniku kroz stadije trudnoće

Proteinski produkt tumor supresora RB1 u svom aktivnom obliku analizirao se na isti način kao i biljeg proliferacije. Rezultati su pokazali pad RB1-pozitivnih stanica od 16.5 do 18.5 dpc do gotovo potpunog izostanka signala u kanalićima s vrlo blagim rastom na kraju trudnoće (Slika 27 i 28, Tablica 13). Slika 29 pokazuje tu promjenu, iako u svim stadijima postoji pozitivan signal u Leydigovim stanicama. Također, postoji razlika u intenzitetu obojenosti pojedinih RB1-pozitivnih stanica. S obzirom na to da je većina pozitivnih stanica obojena srednjim intenzitetom, a samo rijetke stanice vrlo jako, sve su analizirane istovjetno.

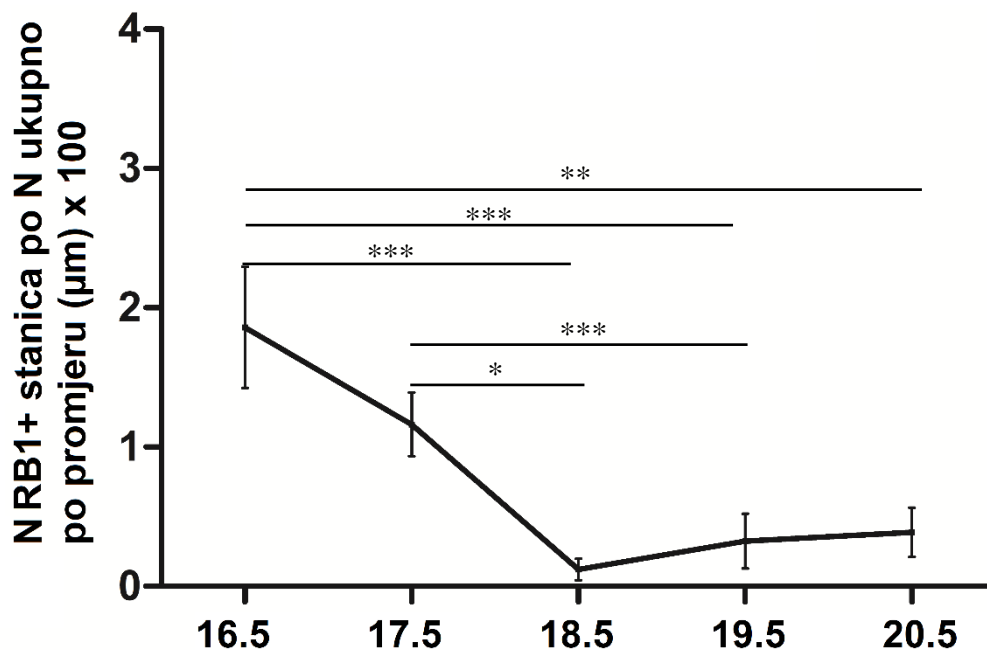
Tablica 13. Numerički izražene srednje vrijednosti izraženosti proteinskog produkta tumor supresorskog gena *RB1* i standardne devijacije po stadijima trudnoće štakora.

Broj RB1+ stanica po sjemenom kanaliću					
dpc	16.5	17.5	18.5	19.5	20.5
N	11	11	11	11	11
\bar{X} (%)	20,70	18,10	2,300	4,800	4,091
SD	3,945	3,035	1,160	1,687	1,640
Broj RB1+ stanica po ukupnom broju stanica i po promjeru sjemenog kanalića					
\bar{X} (%)	1,859	1,163	0,1224	0,3250	0,3868
SD	0,4345	0,2269	0,07751	0,1973	0,1766

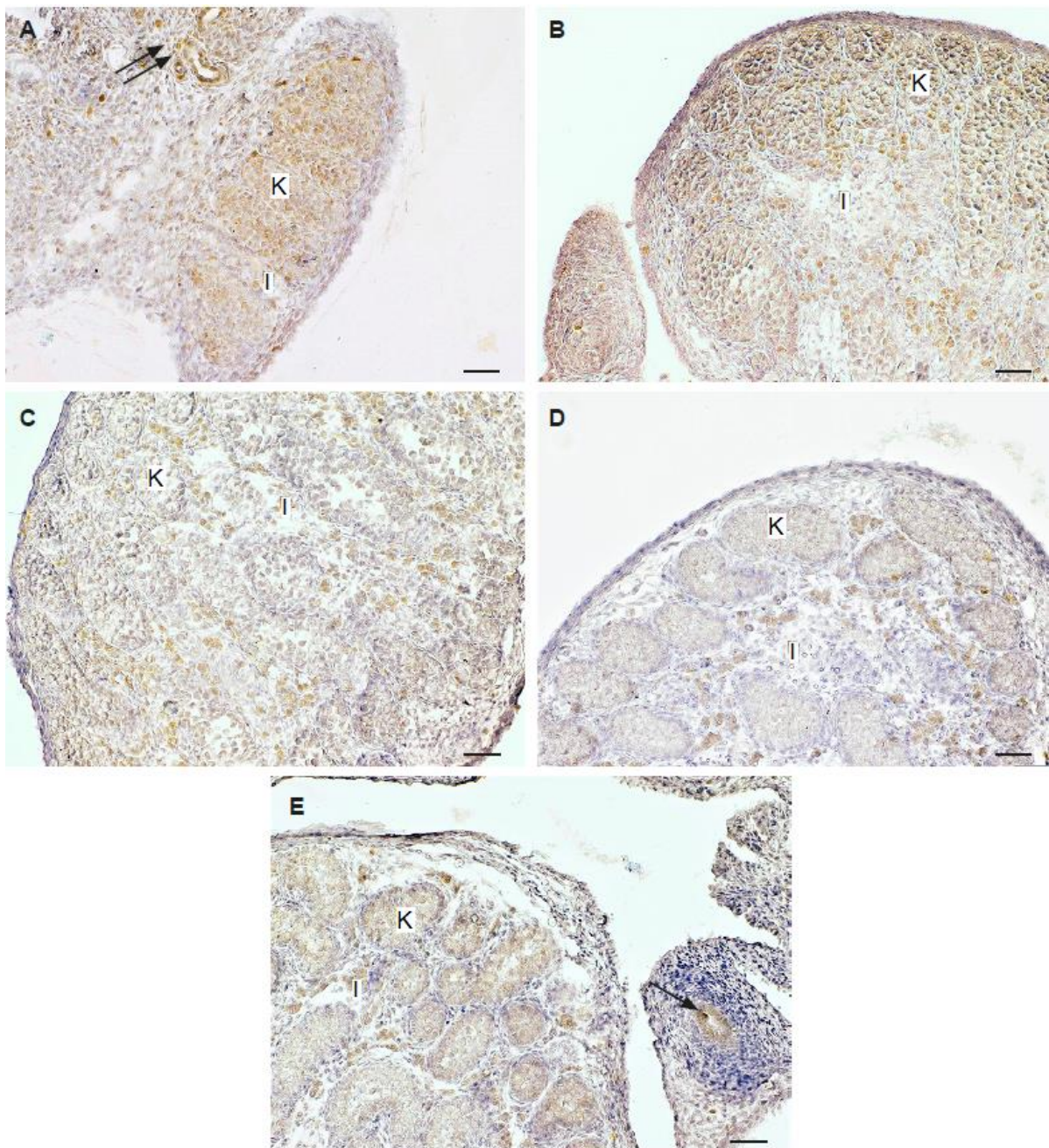
dpc - dan poslije oplodnje; N - broj uzoraka; \bar{X} - aritmetička sredina; SD - standardna devijacija



Slika 27. Broj stanica (N) pozitivnih na RB1 po poprečno presječenom kanaliću. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Broj uzoraka je minimalno 6 po skupini. Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,05 označena je jednom (*), ona manja od 0,01 s dvije (**), a ona manja od 0,001 s tri zvjezdice (***)



Slika 28. Broj stanica (N) pozitivnih na RB1 po poprečno presječenom kanaliću normaliziran na ukupni broj stanica u kanaliću i njegov promjer. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Broj uzoraka je minimalno 6 po skupini. Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,05 označena je jednom (*), ona manja od 0,01 s dvije (**), a ona manja od 0,001 s tri zvjezdice (***)



Slika 29. Izraženost proteinskog produkta tumor supresorskog gena **RB1** u štakorskim sjemenicima kroz stadije trudnoće, vizualizacija svjetlosnim mikroskopom. (A) 16.5, (B) 17.5, (C) 18.5, (D) 19.5, (E) 20.5 dpc. K - kanalić, I - intersticij, jednostruka strjelica - dvostruka strjelica - ductuli efferentes. Bojenje je homogeno, unutar cijele stanice. Nakon 17.5 dpc, u kanalićima je vidljivo manje stanica pozitivnih na RB1. Bojenje DAB-om, kontrastiranje hemalaun-eozinom. Povećanje x 200, skala pokazuje 50 μ m.

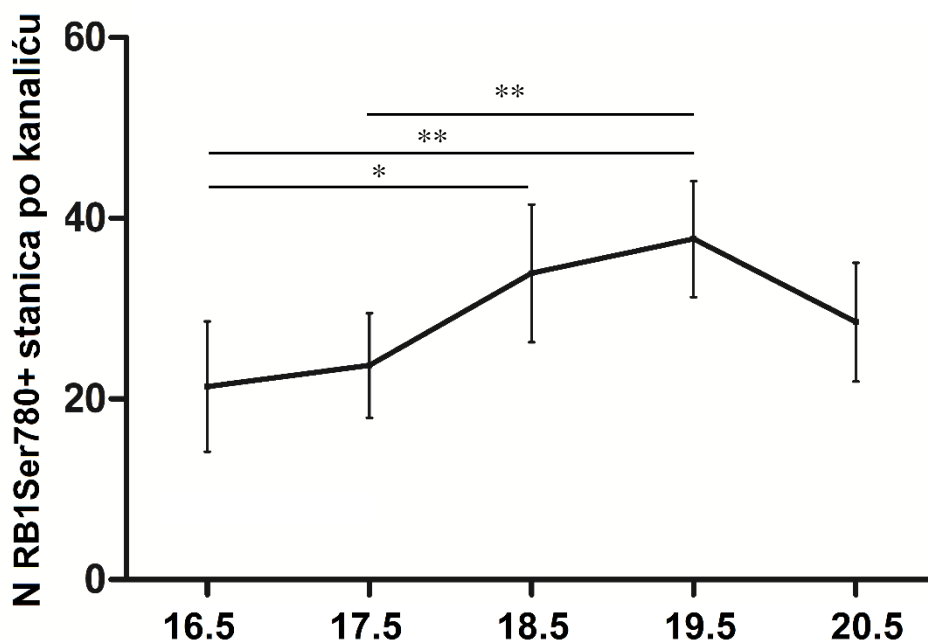
5.2.4. Izraženost RB1 proteina fosforiliranog na serinu 780 u štakorskom sjemeniku kroz stadije trudnoće

Broj stanica pozitivnih na RB1 fosforiliran na serinu 780 po sjemenom kanaliću povećavao se od 16.5 do 19.5, a zatim pokazao blagi pad (Slika 30 i 31, Tablica 14). Korigirana vrijednost broja pozitivnih stanica po ukupnom broju stanica i promjeru kanaliće pokazala je ukupno veći broj pozitivnih stanica u odnosu na broj pozitivnih na od RB1, no ipak blagi pad do 19.5 dpc. Kvalitativna analiza (Slike 32) pokazuje kako u broju RB1Ser780-pozitivnih stanica od 16.5 do 19.5 sudjeluju i gonocite i Sertolijeve stanice, a 20.5 dpc većina signala nalazi se samo u Sertolijevim stanicama. Na 19.5 dpc pojavljuju se neke intenzivno obojene stanice između srednje obojenim, što od 16.5 do 19.5 dpc nije slučaj.

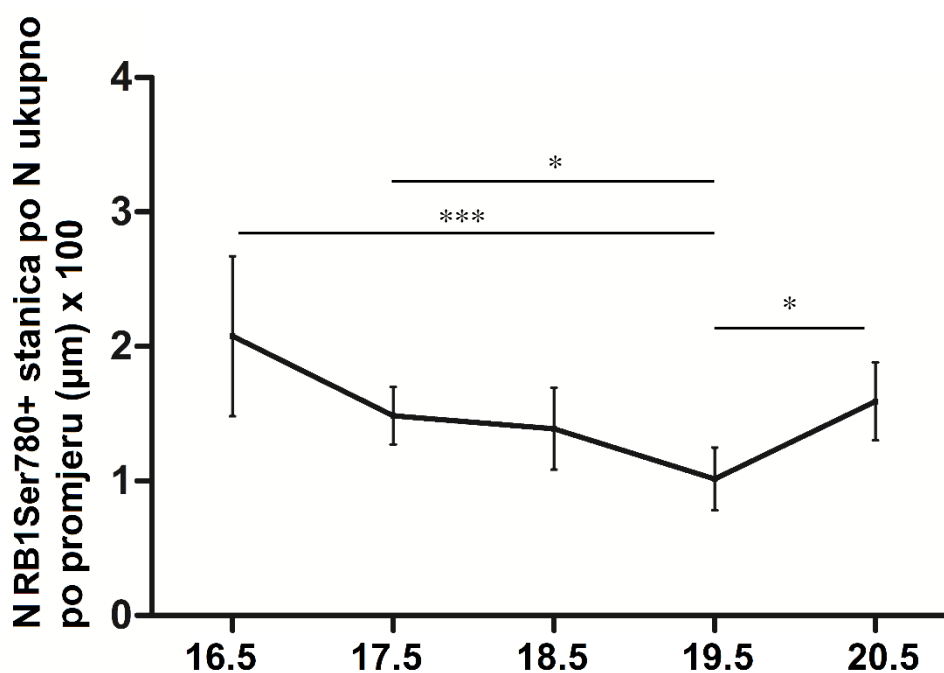
Tablica 14. Numerički izražene srednje vrijednosti izraženosti RB1 fosforiliranog na serinu 780 i standardne devijacije po stadijima trudnoće štakora.

Broj RB1Ser780+ stanica po sjemenom kanaliću					
dpc	16.5	17.5	18.5	19.5	20.5
N	8	10	10	10	10
\bar{X} (%)	21,38	23,70	33,90	37,70	28,50
SD	7,210	5,755	7,608	6,430	6,587
Broj RB1Ser780+ stanica po ukupnom broju stanica i po promjeru sjemenog kanalića					
\bar{X} (%)	2,078	1,484	1,389	1,015	1,591
SD	0,5948	0,2130	0,3053	0,2327	0,2902

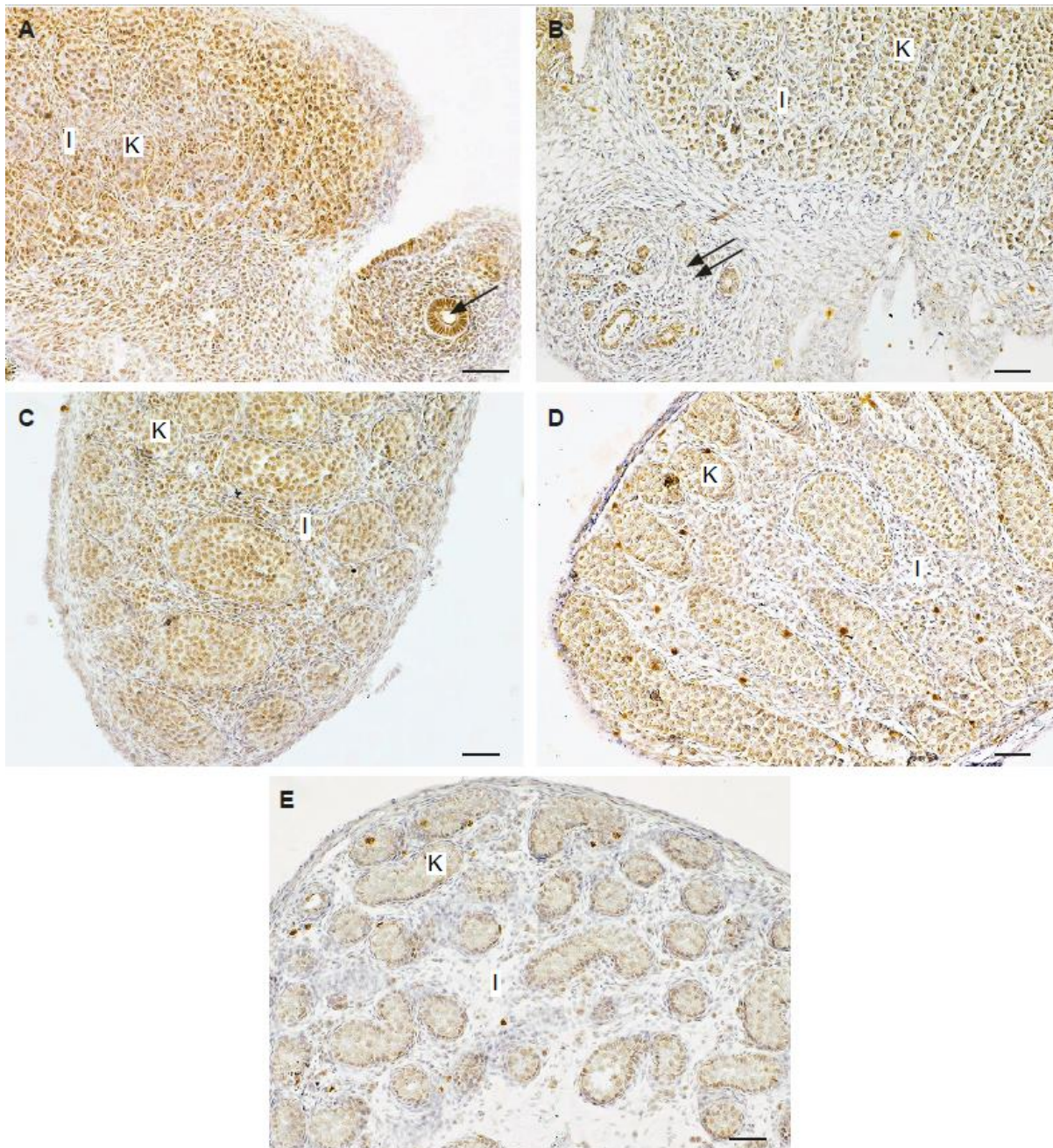
dpc - dan poslije oplodnje; N - broj uzoraka; \bar{X} - aritmetička sredina; SD - standardna devijacija



Slika 30. Broj stanica (N) pozitivnih na RB1Ser780 po poprečno presječenom kanaliću. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Broj uzoraka je minimalno 6 po skupini. Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,05 označena je jednom (*), ona manja od 0,01 s dvije zvjezdice (**).



Slika 31. Broj stanica (N) pozitivnih na RB1Ser780 po poprečno presječenom kanaliću normaliziran na ukupni broj stanica u kanaliću i njegov promjer (μ). Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Broj uzoraka je minimalno 6 po skupini. Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,05 označena je jednom (*), ona manja od 0,001 s tri zvjezdice (***)



Slika 32. Izraženost proteina RB1 fosforiliranog na serinu 780 u štakorskim sjemenicima kroz stadije trudnoće, vizualizacija svjetlosnim mikroskopom. (A) 16.5, (B) 17.5, (C) 18.5, (D) 19.5, (E) 20.5 dpc. K - kanalić, I - intersticij, jednostruka strjelica - dvostruka strjelica - ductuli efferentes. RB1Ser780 pozitivan je u gotovo svim stanicama unutar kanalića između 17.5 i 20.5 dpc. Bojenje je jezgreno te postoje stanice s vrlo jakim izraženošću. Razlika u intenzitetu smeđeg bojanja rezultat je rasta stanica unutar kanalića i stupnju kondenzacije kromatina unutar jezgre. Bojenje DAB-om, kontrastiranje hemalaun-eozinom. Povećanje x 200, skala pokazuje 50 μ m.

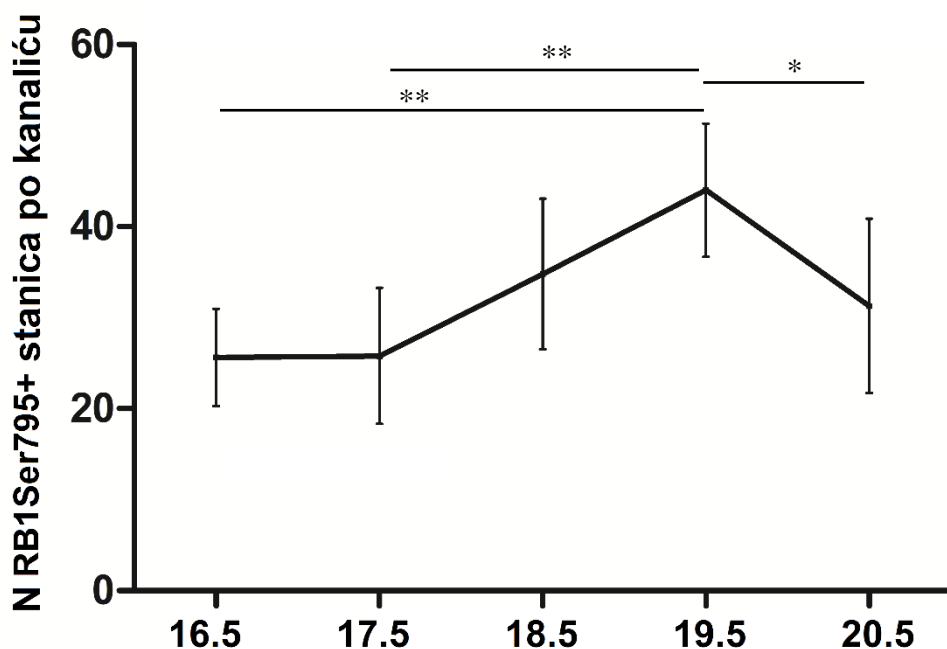
5.2.5. Izraženos RB1 proteina fosforiliranog na serinu 795 u štakorskom sjemeniku kroz stadije trudnoće

Pozitivitet stanica obojenih na RB1 fosforiliran na serinu 795 po sjemenom kanaliću povećavao se od 16.5 do 19.5 dpc, a zatim pokazao blagi pad (Slika 33 i 34, Tablica 15), slično kao RB1Ser780, no s nešto većim ukupnim vrijednostima. Kvalitativnom analizom (Slike 35) uočio se specifičan izražaj RB1Ser795, smješten u jezgri te izrazito zrnate obojenosti u spolnim stanicama, odnosno gonocitama. U broju pozitivnih stanica sudjeluju i Sertolijeve stanice, a nakon 18.5 dpc uočava se heterogenost u izražaju među kanalićima: oni smješteni uz površinu imaju jaču, a oni dublje u tkivu sjemenika slabiju obojenosti.

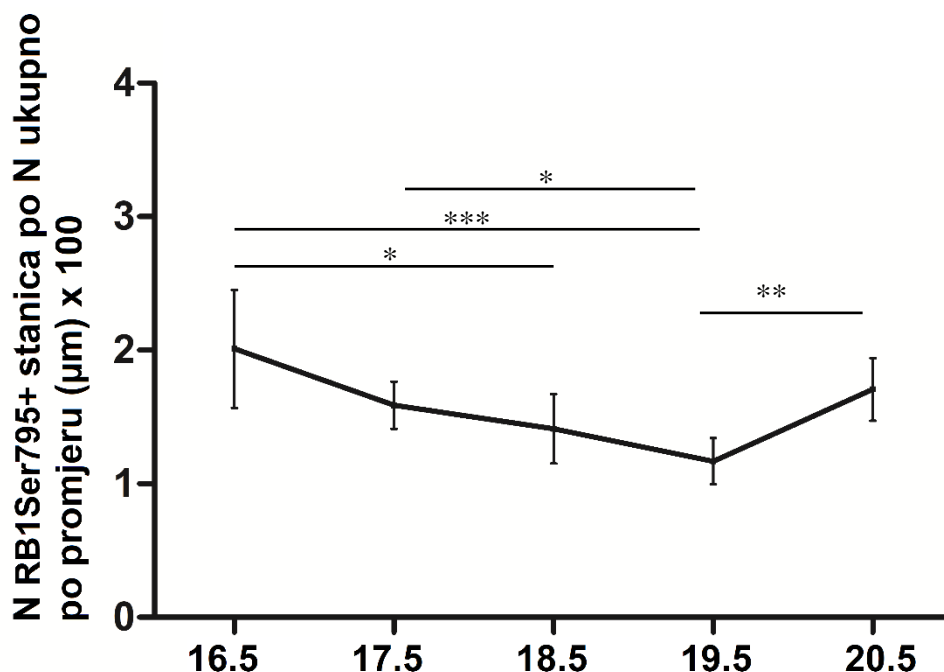
Tablica 15. Numerički izražene srednje vrijednosti izraženos RB1 fosforiliranog na serinu 795 i standardne devijacije po stadijima trudnoće štakora.

Broj RB1Ser795+ stanica po sjemenom kanaliću					
dpc	16.5	17.5	18.5	19.5	20.5
N	8	10	10	10	10
\bar{X} (%)	25,80	34,80	44,00	31,30	25,80
SD	7,465	8,270	7,348	9,569	7,465
Broj RB1Ser795+ stanica po ukupnom broju stanica i po promjeru sjemenog kanalića					
\bar{X} (%)	2,010	1,589	1,412	1,168	1,707
SD	0,4402	0,1766	0,2600	0,1740	0,2358

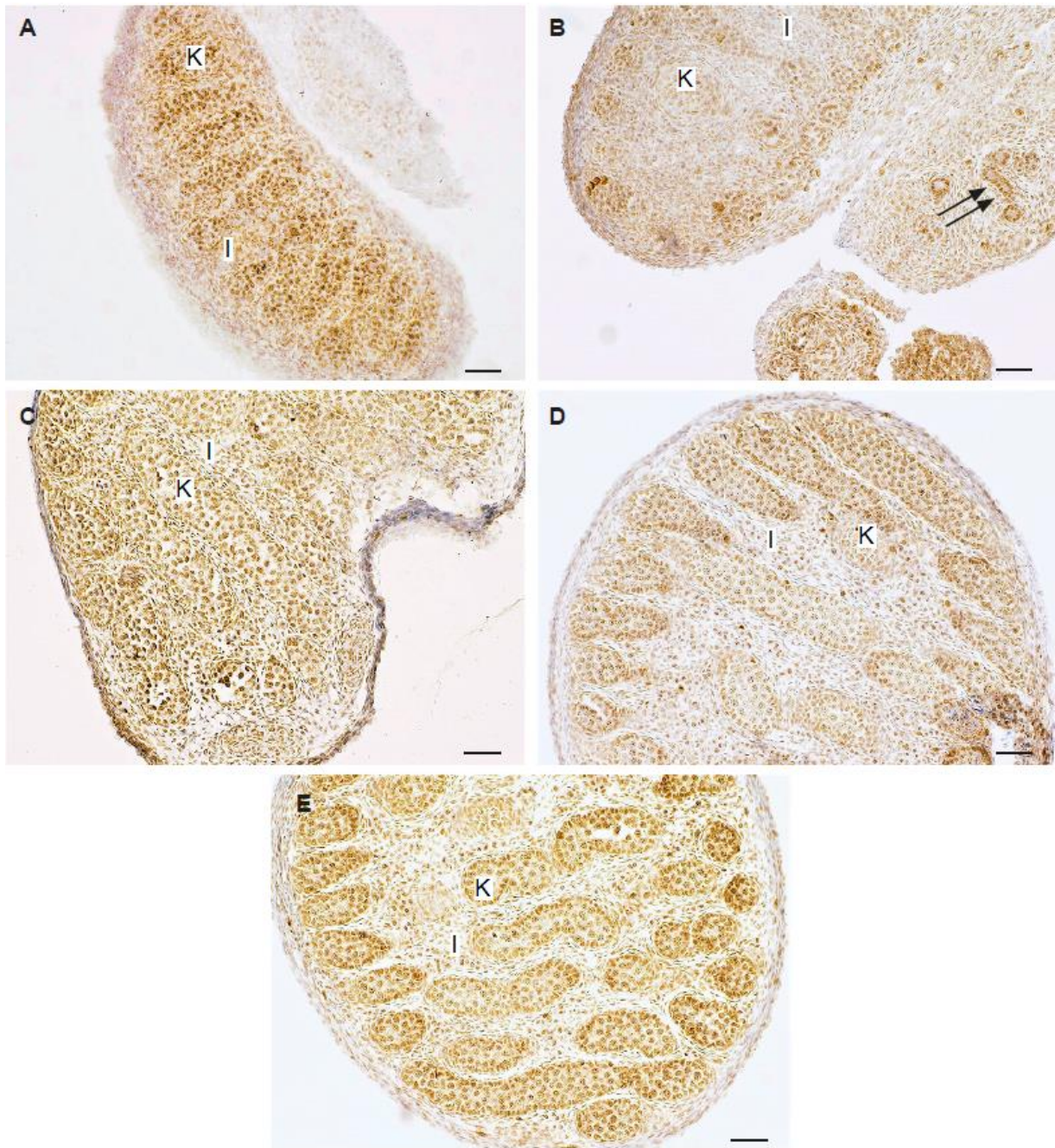
dpc - dan poslije oplodnje; N - broj uzoraka; \bar{X} - aritmetička sredina; SD - standardna devijacija



Slika 33. Broj stanica (N) pozitivnih na RB1Ser795 po poprečno presječenom kanaliću. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Broj uzoraka je minimalno 6 po skupini. Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,05 označena je jednom (*), ona manja od 0,01 s dvije zvjezdice (**).



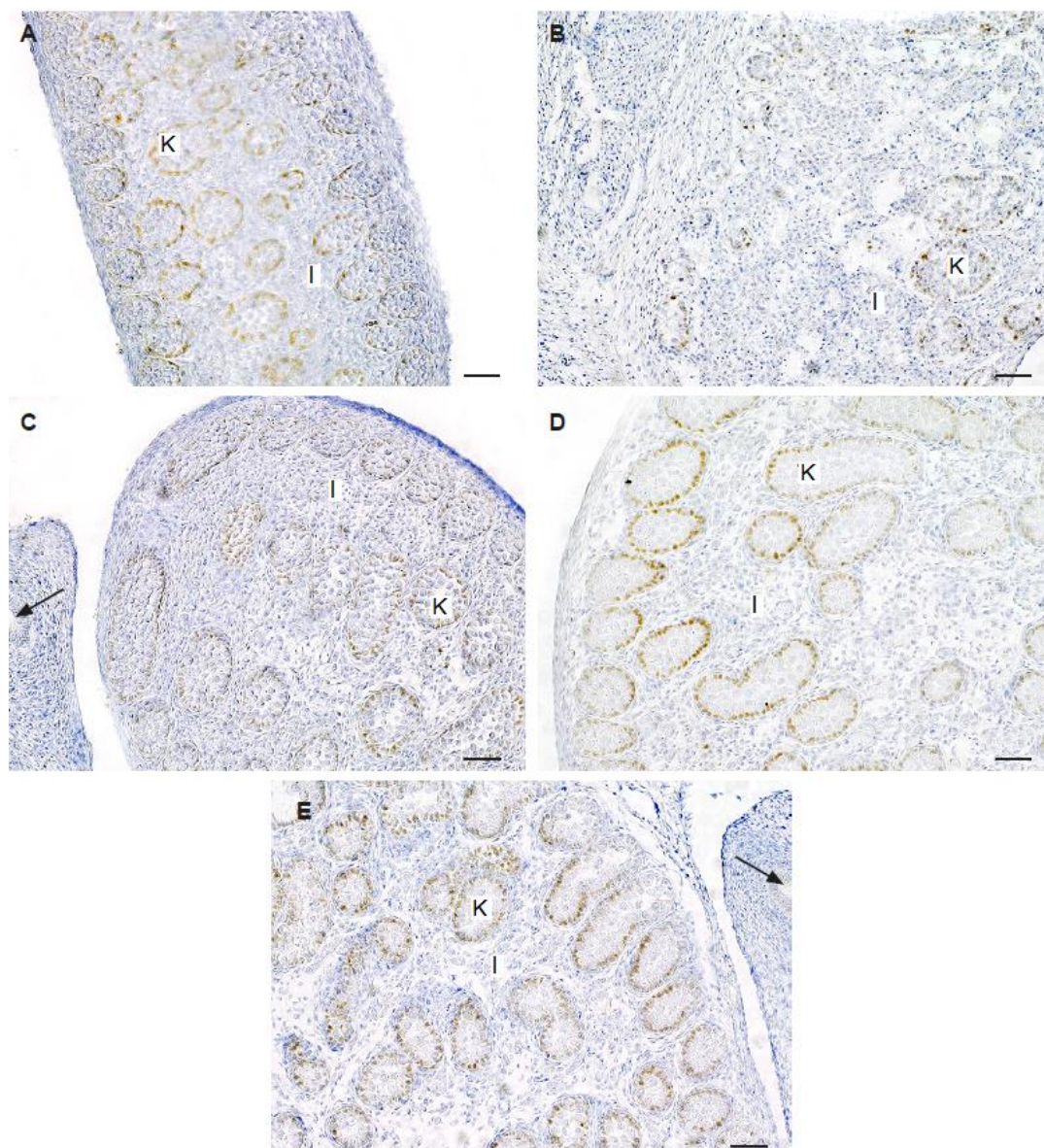
Slika 34. Broj stanica (N) pozitivnih na RB1Ser795 po poprečno presječenom kanaliću normaliziran na ukupni broj stanica u kanaliću i njegov promjer. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Broj uzoraka je minimalno 6 po skupini. Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,05 označena je jednom (*), ona manja od 0,01 s dvije zvjezdice (**), a ona manja od 0,001 s tri zvjezdice (***)



Slika 35. Izraženost proteina RB1 fosforiliranog na serinu 795 u štakorskim sjemenicima kroz stadije trudnoće, vizualizacija svjetlosnim mikroskopom. (A) 16.5, (B) 17.5, (C) 18.5, (D) 19.5, (E) 20.5 dpc. K - kanalić, I - intersticij, dvostruka strjelica - ductuli efferentes. RB1Ser795 pozitivan je u gotovo svim stanicama unutar kanalića između 16.5 i 20.5 dpc. Bojenje je zrnato, unutar jezgre pozitivnih stanica. Razlika u intenzitetu smeđeg bojanja rezultat je rasta stanica unutar kanalića i stupnju kondenzacije kromatina unutar jezgre. Bojenje DAB-om, kontrastiranje hemalaun-eozinom. Povećanje x 200, skala pokazuje 50 μ m.

5.2.6. Izraženost Sox9 biljega u štakorskom sjemeniku kroz stadije trudnoće

Sox9 protutijelo karakteristično za Sertolijeve stanice koristilo se za potvrdu smještaja Sertolijevih stanica u štakorskom sjemeniku. Od 16.5 do 20.5 dpc Sertolijeve stanice nalaze se bazalno, uz rub kanalića te u tom razdoblju od spljoštenih stanica mijenjaju u trokutaste koje pružaju citoplazmatske nastavke među zametne stanice (Slika 36).



Slika 36. Izražavanje proteina Sox9, biljega karakteristično izraženog samo u Sertolijevim stanicama u štakorskim sjemenicima kroz stadije trudnoće, vizualizacija svjetlosnim mikroskopom. (A) 16.5, (B) 17.5, (C) 18.5, (D) 19.5, (E) 20.5 dpc. K - kanalić, I - intersticij, jednostruka strjelica - ductus efferentes. U svim stadijima trudnoće prepoznatljiv je smještaj i izgled Sertolijevih stanica te se lako razlikuju od gonocita. Bojenje DAB-om, kontrastiranje hemalaun-eozinom. Povećanje x 200, skala pokazuje 50 µm.

5.3. DNA metilacija u tkivu fetalnih ljudskih sjemenika kroz stadije trudnoće i postnatalno

Za utvrđivanje povezanosti stadija ljudske trudnoće s promjenama postotaka metilacije *LINE-1* ponavljajućih sljedova, genomski utisnutog *H19* gena te *RBI* gena, analizirali su se uzorci ljudskih fetalnih sjemenika te postnatalni i juvenilni uzorci. Podaci su prikazani po tromjesečjima, a dodatno i po tjednima fetalnog razvoja. Grafovi prikazuju razlike između tromjesečja ili tjedana te su zasebno prikazani podaci za prosječnu metilaciju i za svako pojedino CpG mjesto. Dodatno su se usporedili uzorci istog stadija, ovisno o tome jesu li bili fiksirani u Bouinovoj otopini ili u 10 %-tnom formalinu, a usporedio se i broj rezova iz koje se radila izolacija gDNA kao parametar kvalitete pirosekvenciranja.

Analiza je obuhvatila stadije ljudske trudnoće od 14. do 35. tjedna, a u prikaz metilacije po tjednima dodani su arhivski uzorci ljudskih sjemenika iz postnatalnog (1 godina) i juvenilnog/pretpubertalnog razdoblja (12 godina).

5.3.1. Analiza metilacije *LINE-1* ponavljajućih sljedova

Određen je postotak DNA metilacije šest CpG mjesta unutar CpG otoka svakog uzorka fetalnog ljudskog sjemenika, kako bi se uočila promjena tijekom razvoja. Postotak DNA metilacije *LINE-1* ponavljajućih sljedova prikazan je kao prosjek metilacije šest CpG mjesta i po zasebnim CpG mjestima po tromjesečjima trudnoće. Zatim su se isti statistički podaci prikazali po tjednima razvoja, bez grupiranja uzoraka po tromjesečjima.

Tablica 16. Postotak metilacije DNA *LINE-1* ponavljajućih sljedova izražen kao medijan, interkvartilni raspon te minimalna i maksimalna vrijednost po tromjesečjima trudnoće za pojedino CpG mjesto i prosjek vrijednosti.

	PROSJEK METILACIJE			CpG1			CpG2		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
tromjesečje									
broj mjerenja	36	266	36	6	51	6	6	50	6
minimalna vrijednost	53,00	26,00	41,00	69,00	47,00	66,00	83,00	70,00	79,00
25 % percentila	62,00	62,00	57,00	70,00	69,00	69,00	83,00	80,00	79,75
medijan	69,00	69,00	64,00	73,50	71,00	70,00	83,50	83,00	82,00
75 % percentila	74,00	78,00	73,00	74,00	74,00	73,75	84,00	84,25	89,75
maksimalna vrijednost	84,00	99,00	95,00	74,00	99,00	76,00	84,00	99,00	95,00
p vrijednost	0,1227			0,6288			0,6321		
	CpG3			CpG4			CpG5		
tromjesečje									
broj mjerenja	6	49	6	6	40	6	6	41	6
minimalna vrijednost	68,00	40,00	57,00	53,00	26,00	48,00	60,00	29,00	41,00
25 % percentila	68,50	66,50	58,00	53,00	50,00	49,50	60,00	62,00	56,00
medijan	70,50	69,00	64,00	53,00	52,50	51,50	65,00	65,00	62,00
75 % percentila	71,00	71,00	71,00	53,75	54,00	53,25	66,00	68,00	64,25
maksimalna vrijednost	71,00	97,00	74,00	54,00	95,00	57,00	66,00	98,00	65,00
p vrijednost	0,2024			0,4343			0,1643		

	CpG6		
tromjesečje	1	2	3
broj mjerenja	6	36	6
minimalna vrijednost	64,00	57,00	55,00
25 % percentila	64,00	61,00	57,25
medijan	64,00	63,00	60,50
75 % percentila	64,00	66,00	65,50
maksimalna vrijednost	64,00	98,00	73,00
p vrijednost	0,2003		

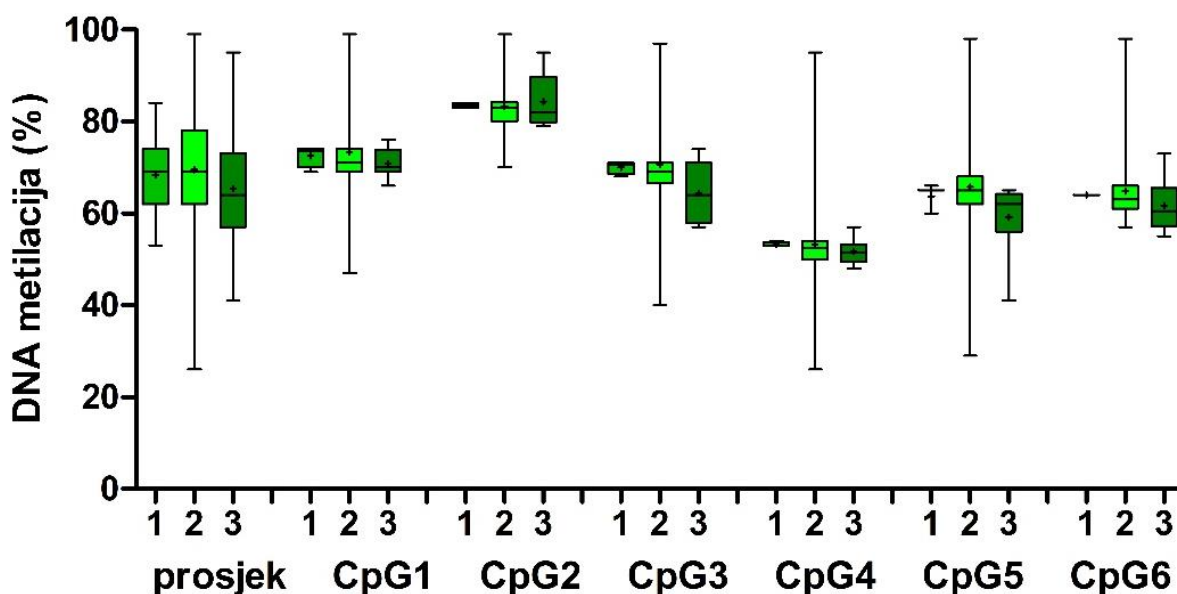
Tablica 17. Postotak metilacije DNA *LINE-1* ponavljajućih sljedova izražen kao medijan i interkvartilni raspon po tjednima trudnoće i postnatalno za pojedino CpG mjesto i prosjek vrijednosti.

PROSJEK METILACIJE					CpG1			
tjedan	broj mjerenja	25 % perc.	medijan	75 % perc.	broj mjerenja	25 % perc.	medijan	75 % perc.
14	21	62,00	69,00	74,00	8	70,00	73,50	74,00
16	26	62,00	68,00	78,00	10	67,25	69,00	77,00
18	18	63,00	69,00	75,00	8	70,25	71,50	73,50
19	21	59,00	69,00	72,50	8	69,50	71,50	72,75
20	43	64,00	73,00	86,00	16	71,25	76,50	88,75
21	43	62,00	68,00	73,00	16	68,75	72,00	73,00
23	53	62,50	67,00	78,00	20	68,00	70,00	71,00
24	50	59,75	69,00	79,00	20	70,00	72,50	73,00
25	12	63,25	67,50	76,50	4	75,00	76,00	77,00
28	12	57,50	63,00	70,00	4	70,00	70,00	70,00
35	23	57,00	64,00	74,00	8	67,00	71,50	72,25
1 g	12	63,00	65,00	72,75	4	72,00	72,50	73,00
12 g	12	51,50	57,50	64,50	4	58,00	62,00	66,00

CpG2					CpG3			
tjedan	broj mjerjenja	25 % perc.	medijan	75 % perc.	broj mjerjenja	25 % perc.	medijan	75 % perc.
14	8	83,00	83,50	84,00	8	68,50	70,50	71,00
16	10	77,50	78,00	84,00	10	64,75	67,00	75,25
18	8	78,50	81,00	82,75	8	66,25	67,50	70,25
19	8	83,00	83,00	83,75	8	69,25	70,00	70,00
20	14	76,00	82,00	89,00	14	70,00	75,00	86,00
21	16	83,00	84,00	84,00	16	65,25	70,00	71,00
23	20	80,00	82,00	83,00	20	64,00	67,00	71,00
24	20	80,00	84,50	89,00	18	66,75	68,00	72,50
25	4	82,00	83,50	85,00	4	68,00	69,50	71,00
28	4	79,00	80,50	82,00	4	57,00	62,50	68,00
35	8	80,00	85,00	93,25	6	59,00	64,00	74,00
1 g	4	81,00	81,00	81,00	4	63,00	65,00	67,00
12 g	4	75,00	75,50	76,00	4	53,00	56,50	60,00
CpG4					CpG5			
tjedan	broj mjerjenja	25 % perc.	medijan	75 % perc.	broj mjerjenja	25 % perc.	medijan	75 % perc.
14	8	53,00	53,00	53,75	6	60,00	65,00	66,00
16	8	49,50	51,00	66,00	8	59,00	64,00	72,00
18	4	53,00	53,00	53,00	4	64,00	65,00	66,00
19	8	52,00	52,00	52,75	6	55,00	65,00	67,00
20	14	53,00	54,00	64,00	14	65,00	73,00	88,00
21	12	52,00	52,50	57,00	14	59,00	65,00	69,00
23	16	45,25	51,00	59,75	16	61,25	64,00	64,75
24	14	37,00	50,00	54,00	16	51,00	65,00	70,75
25	4	53,00	53,50	54,00	4	66,00	66,50	67,00
28	4	48,00	49,50	51,00	4	61,00	62,50	64,00
35	8	50,50	52,00	55,75	8	46,25	62,00	65,00
1 g	4	53,00	53,00	53,00	4	65,00	65,00	65,00
12 g	4	35,00	41,50	48,00	4	53,00	55,50	58,00

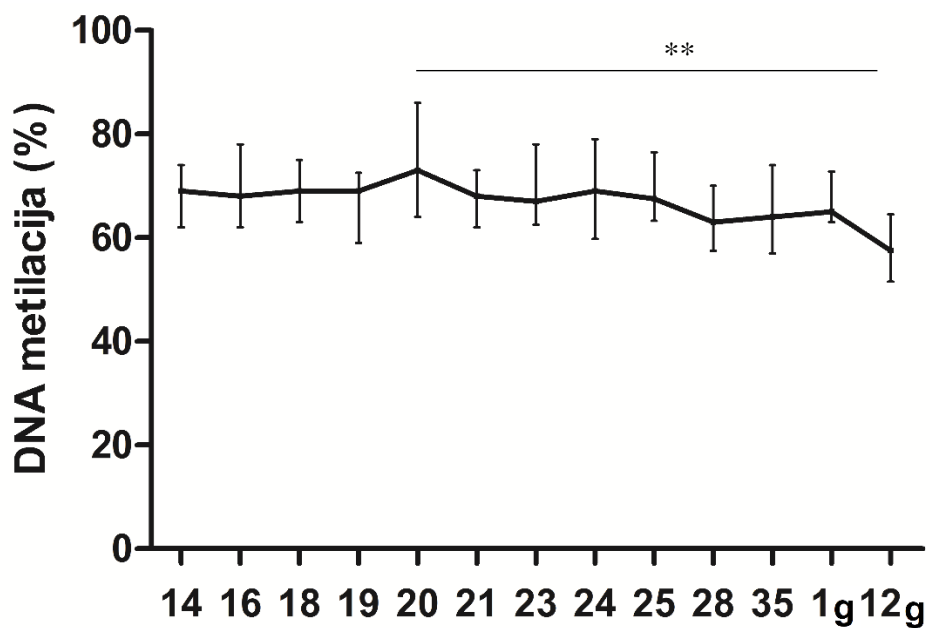
CpG6				
tjedan	broj mjerjenja	25 % perc.	medijan	75 % perc.
14	4	64,00	64,00	64,00
16	6	62,00	62,00	77,00
18	4	59,00	59,50	60,00
19	4	63,00	63,00	63,00
20	14	61,00	66,00	75,00
21	12	60,00	62,00	63,00
23	16	61,00	63,00	68,00
24	12	59,00	62,50	66,00
25	4	63,00	63,50	64,00
28	4	59,00	60,50	62,00
35	8	55,75	60,50	70,50
1 g	4	63,00	63,00	63,00
12 g	4	51,00	54,00	57,00

Statistička analiza metilacije *LINE-1* ponavljajućih sljedova prikazana kao prosjek ili u pojedinom CpG mjestu pokazala je da u niti jednom pojedinom analiziranom CpG mjestu ne postoji statistički značajna razlika u metilaciji DNA u tkivu fetalnog sjemenika, analizirana zbirno, po tromjesečjima (Slika 37, Tablica 16), no da je statistički značajna razlika prisutna kada se analiza provodi po tjednima trudnoće (Slike 38 - 44, Tablica 17).



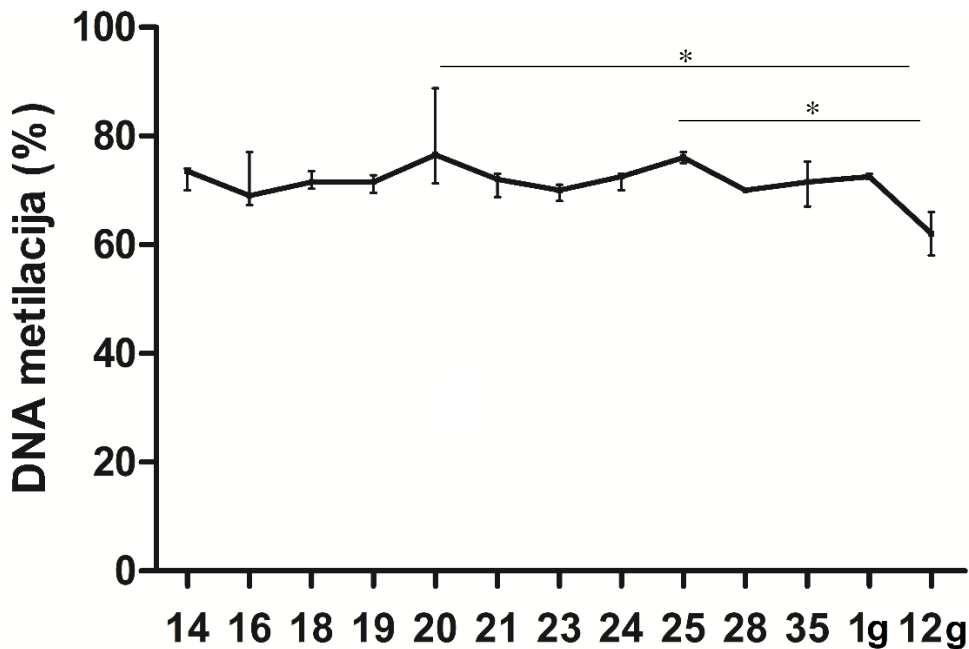
Slika 37. Postotak metilacije *LINE-1* ponavljajućih sljedova iz uzoraka ljudskih fetalnih sjemenika po tromjesečjima označenima s 1 (prvo), 2 (drugo) i 3 (treće tromjesečje). Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani medijanom (+), interkvartilnim rasponom (gornji i donji rub kvadrata) te minimalnom i maksimalnom vrijednosti (T-oznake). Nema statistički značajne razlike među skupinama.

Zbog uočene veće razlike između minimalne i maksimalne vrijednosti u drugom tromjesečju, pristupilo se analizi po tjednima. Između 20. tjedna trudnoće (73 %) i 12 godina života (57,50 %) dobila se statistički značajna razlika u prosječnom postotku metilacije *LINE-1* ponavljajućih sekvenci (Slika 38, Tablica 17).



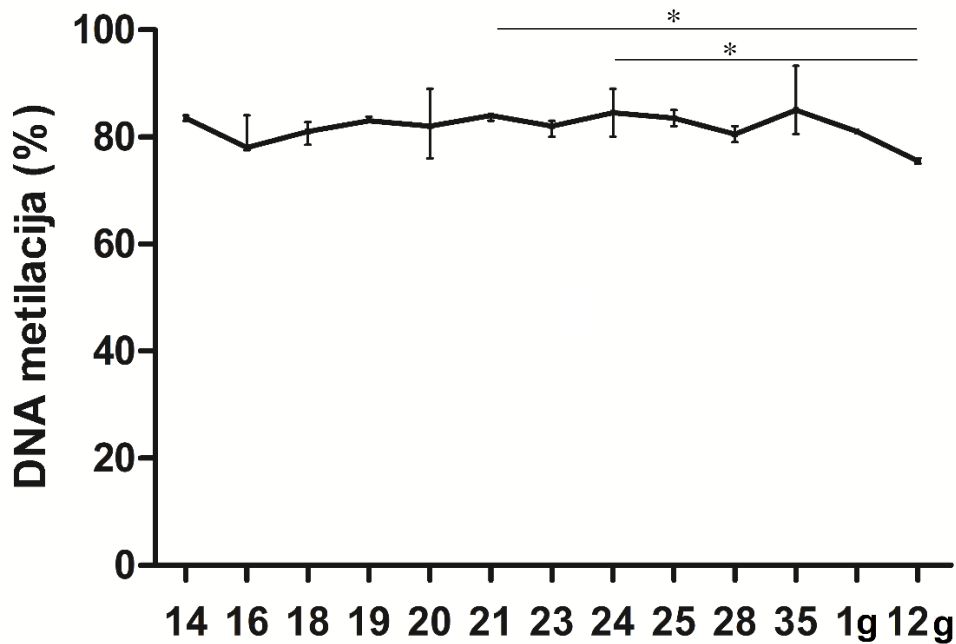
Slika 38. Prosjek postotka metilacije *LINE-1* ponavljajućih sljedova iz uzoraka ljudskih fetalnih sjemenika po tjednima. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao medijan \pm interkvartilni raspon. Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,01 označena je zvjezdicama (**).

Analiza metilacije *LINE-1* ponavljajućih sljedova na CpG1 mjestu po tjednima pokazala je statistički značajnu razliku kada su se usporedile vrijednosti u 20. (76,50 %) i 25. (76 %) tjednu trudnoće s vrijednostima u sjemeniku od 12 godina (62 %) (Slika 39, Tablica 17).



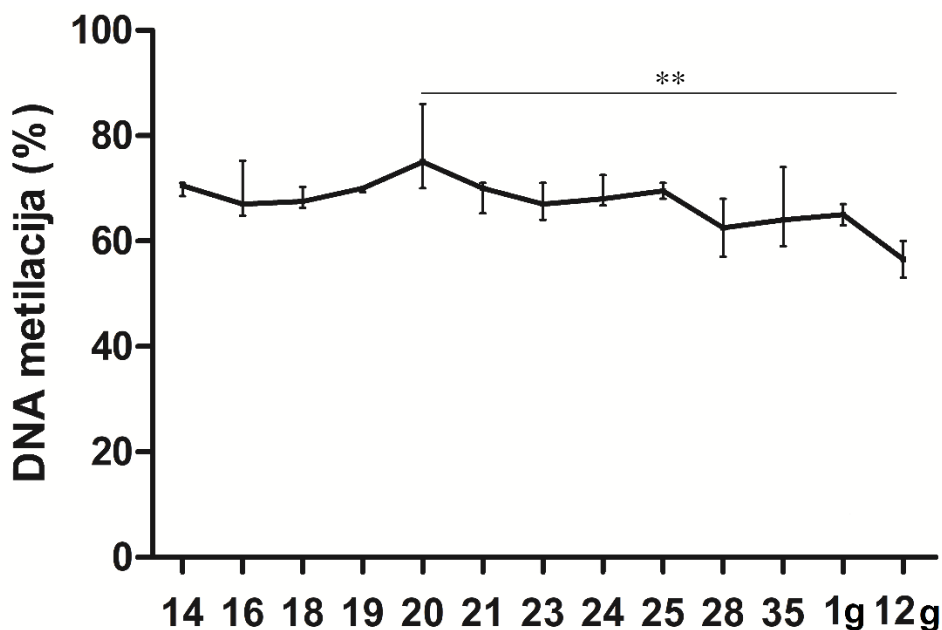
Slika 39. Postotak metilacije *LINE-1* ponavljajućih sljedova na CpG1 mjestu iz uzoraka ljudskih fetalnih sjemenika po tjednima. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao medijan \pm interkvartilni raspon. Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,05 označena je zvjezdicom (*).

Metilacija *LINE-1* ponavljajućih sljedova na CpG2 mjestu nije pokazala je statistički značajnu razliku kada su se uzorci analizirali po tromjesečjima (Slika 37, Tablica 16). Medijan vrijednosti kretao se od 83,5 % u prvom tromjesečju, 83 % u drugom do 82 % u trećem tromjesečju. Analizom po tjednima dobila se statistički značajna razlika kada su se usporedile vrijednosti u 21. (84 %) i 24. (84,5 %) tjednu trudnoće s vrijednostima u sjemeniku od 12 godina (75,5 %) (Slika 40, Tablica 17).



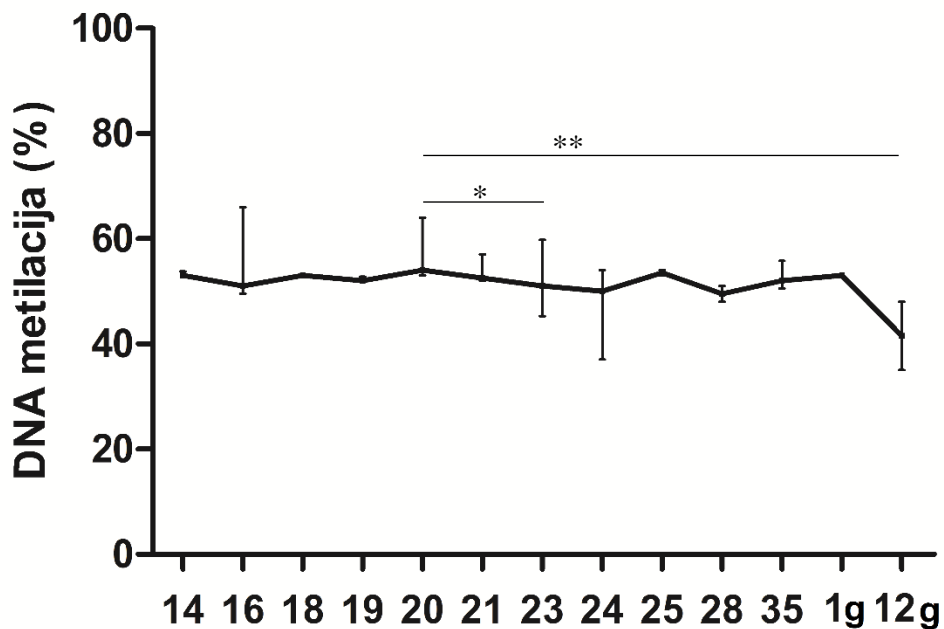
Slika 40. Postotak metilacije *LINE-1* ponavljajućih sljedova na CpG2 mjestu iz uzoraka ljudskih fetalnih sjemenika po tjednima. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao medijan \pm interkvartilni raspon. Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,05 označena je zvjezdicom (*).

Medijan vrijednosti metilacije *LINE-1* ponavljajućih sljedova na CpG3 mjestu analiziran po tromjesečjima kretao se od 70,5 % u prvom tromjesečju, 69 % u drugom do 64 % u trećem tromjesečju te nije pokazao statistički značajnu razliku (Slika 37. Tablica 16). Analizom po tjednima dobila se statistički značajna razlika kada su se usporedile vrijednosti u 20. (75 %) tjednu trudnoće s vrijednostima u sjemeniku od 12 godina (56,5 %) (Slika 41, Tablica 17).



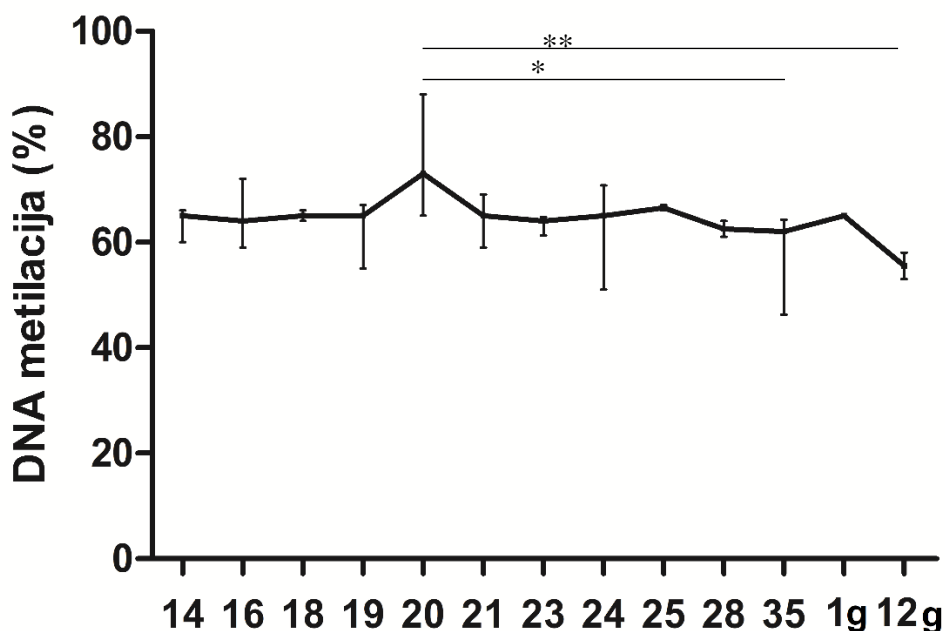
Slika 41. Postotak metilacije *LINE-1* ponavljajućih sljedova na CpG3 mjestu iz uzoraka ljudskih fetalnih sjemenika po tjednima. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao medijan \pm interkvartilni raspon. Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,01 označena je zvjezdicama (**).

Kada su se usporedile vrijednosti u 20. tjednu (53 %) s vrijednostima u sjemeniku 23. tjedna trudnoće (45,25 %) i onim od 12 godina (35 %) dobila se statistički značajna razlika na CpG4 mjestu odabranog *LINE-1* slijeda (Slika 42, Tablica 17).



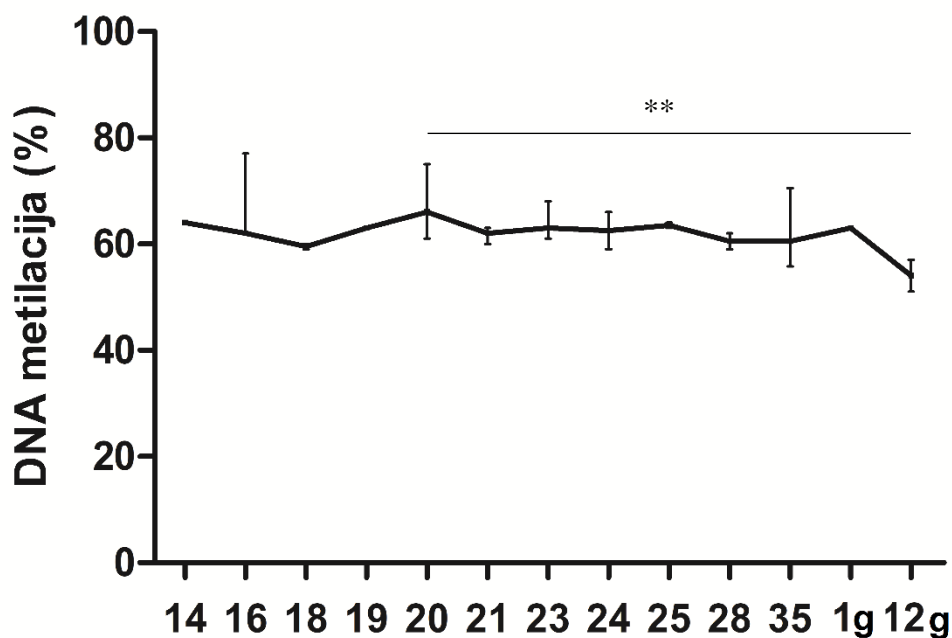
Slika 42. Postotak metilacije *LINE-1* ponavljajućih sljedova na CpG4 mjestu iz uzoraka ljudskih fetalnih sjemenika po tjednima. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao medijan \pm interkvartilni raspon. Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,05 označena je jednom (*), a ona od 0,01 dvjema zvjezdicama (**).

Analizom metilacije *LINE-1* ponavljajućih sljedova na CpG5 mjestu po tjednima dobila se statistički značajna razlika kada su se usporedile vrijednosti u 20. tjednu (73 %) s vrijednostima u sjemeniku 35. tjedna trudnoće (62 %) i onim od 12 godina (55,5 %) (Slika 43, Tablica 17).



Slika 43. Postotak metilacije *LINE-1* ponavljajućih sljedova na CpG5 mjestu iz uzoraka ljudskih fetalnih sjemenika po tjednima. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao medijan \pm interkvartilni raspon. Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,05 označena je jednom (*), a ona od 0,01 dvjema zvjezdicama (**).

Medijan vrijednosti metilacije *LINE-1* ponavljajućih sljedova na CpG6 mjestu analiziran tjednima bio je statistički značajna kada su se usporedile vrijednosti u 20. (66 %) tjednu trudnoće s vrijednostima u sjemeniku od 12 godina (54 %) (Slika 44, Tablica 17).



Slika 44. Postotak metilacije *LINE-1* ponavljajućih sljedova na CpG6 mjestu iz uzoraka ljudskih fetalnih sjemenika po tjednima. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao medijan \pm interkvartilni raspon. Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,01 označena je dvjema zvjezdicama (**).

5.3.2. Analiza metilacije diferencijalno metilirane regije utisnutog gena *H19*

Gen *H19* jedan je od najpoznatijih utisnutih gena, utišanih po očevoj liniji. Pravilno utišavanje tijekom rasta i razvoja od posebne je važnosti za razvoj spolnih stanica. Odabrana sekvenca CTCF6 gena *H19* uključila je 3 CpG mjesta. Rezultati su se analizirali grupirani po tromjesečjima (Slika 45, Tablica 18) i po tjednima (Slike 46 - 49, Tablica 19).

Tablica 18. Postotak metilacije CTCF6 regije gena *H19* izražen kao medijan, interkvartilni raspon te minimalna i maksimalna vrijednost po tromjesečjima trudnoće za pojedino CpG mjesto i prosjek vrijednosti.

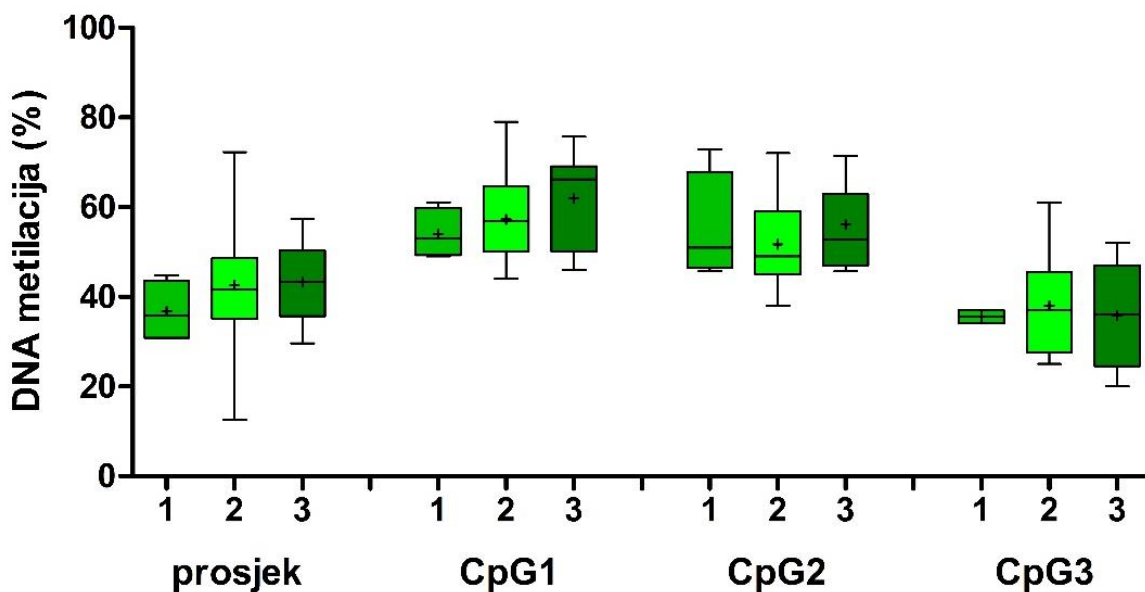
	PROSJEK METILACIJE			CpG1			CpG2		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
tromjesečje									
broj mjerenja	36	71	39	6	14	7	6	15	7
minimalna vrijednost	30,75	12,50	29,60	49,00	44,00	45,95	45,71	38,00	45,71
25 % percentila	30,90	35,11	35,71	49,25	50,00	50,00	46,53	45,00	47,00
medijan	35,77	41,70	43,40	53,00	56,88	66,22	50,93	49,00	52,86
75 % percentila	43,61	48,60	50,35	59,75	64,74	69,12	67,86	59,00	62,96
maksimalna vrijednost	44,75	72,25	57,40	61,00	79,00	75,68	72,86	72,00	71,43
	CpG3								
tromjesečje	1	2	3						
broj mjerenja	6	9	6						
minimalna vrijednost	34,00	25,00	20,00						
25 % percentila	34,00	27,50	24,50						
medijan	35,50	37,00	36,00						
75 % percentila	37,00	45,50	47,00						
maksimalna vrijednost	37,00	61,00	52,00						

Tablica 19. Postotak metilacije CTCF6 regije gena *H19* izražen kao medijan i interkvartilni raspon po tjednima trudnoće i postnatalno za pojedino CpG mjesto i prosjek vrijednosti.

PROSJEK METILACIJE					CpG1			
tjedan	broj mjerjenja	25 % perc.	medijan	75 % perc.	broj mjerjenja	25 % perc.	medijan	75 % perc.
12	30	37,00	46,93	52,86	6	51,00	53,50	56,00
14	24	46,53	49,00	49,75	6	49,00	49,50	50,00
16	30	38,00	44,00	45,00	6	44,00	45,00	46,00
17	30	36,00	49,00	54,00	6	54,00	54,00	54,00
18	30	26,00	40,00	54,05	6	54,05	54,05	54,05
19	30	43,00	47,00	60,29	6	60,29	63,26	66,22
21	60	45,25	50,00	68,50	18	50,00	54,00	72,00
23	12	37,25	44,00	61,25	6	50,00	50,00	50,00
24	36	51,00	57,00	61,40	6	57,00	57,00	57,00
25	24	35,00	55,00	56,76	6	56,76	56,76	56,76
26	30	39,00	50,00	59,46	6	59,46	59,46	59,46
28	30	36,00	57,91	66,22	6	66,22	67,67	69,12
35	42	46,03	50,50	54,96	9	50,00	55,95	75,68
39	30	59,00	62,00	69,00	6	59,00	68,00	68,25
1 g	30	66,18	68,28	70,37	6	66,18	66,18	66,18

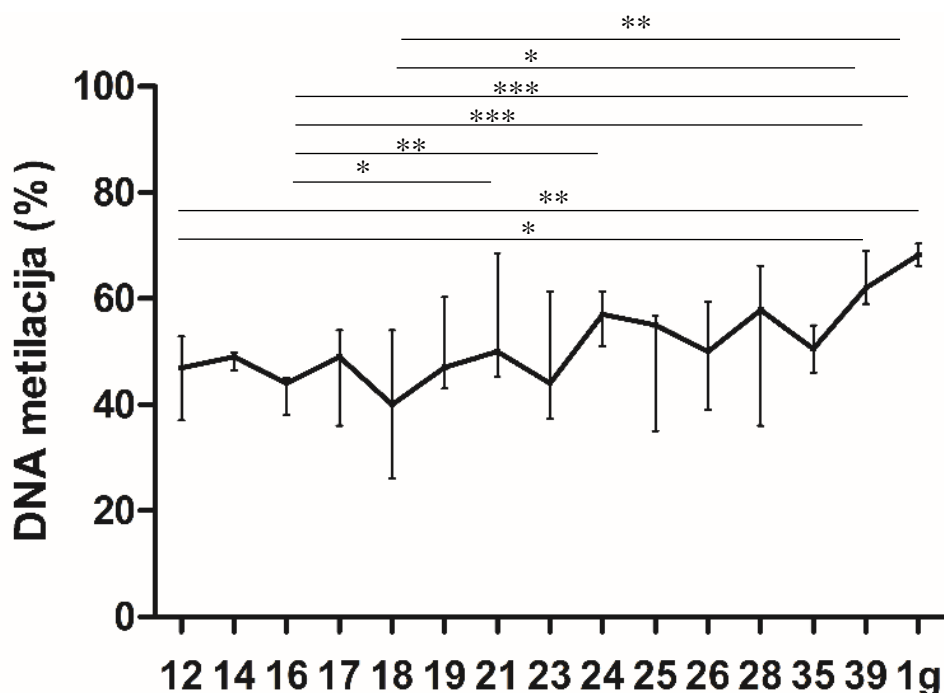
CpG2					CpG3			
tjedan	broj mjerjenja	25 % perc.	medijan	75 % perc.	broj mjerjenja	25 % perc.	medijan	75 % perc.
12	6	42,86	47,86	52,86	6	34,00	35,50	37,00
14	6	45,71	47,36	49,00				
16	6	38,00	41,50	45,00	6	35,00	35,00	35,00
17	6	49,00	49,00	49,00	6	36,00	36,00	36,00
18	6	40,00	40,00	40,00	6	26,00	26,00	26,00
19	6	43,00	45,00	47,00	6	29,00	29,00	29,00
21	12	46,08	52,15	68,50	6	41,00	43,00	45,00
23	6	65,00	65,00	65,00				
24	6	49,00	55,93	62,86	6	37,00	37,50	38,00
25	6	55,00	55,00	55,00				
26	6	50,00	50,00	50,00	6	35,00	35,00	35,00
28	6	52,86	57,91	62,96	6	39,00	39,00	39,00
35	9	45,71	47,00	51,00	6	30,00	33,00	36,00
39	6	62,00	66,72	71,43	6	42,00	47,00	52,00
1 g	6	70,37	70,37	70,37	6	45,00	45,00	45,00

Metilacija CTCF regije ljudskog gena *H19* niti u jednoj statističkoj analizi nije pokazala statistički značajnu razliku postotka između tromjesečja, bez obzira gledao li se prosjek CpG mjesta ili svako CpG mjesto zasebno. Statistički značajna razlika bila je prisutna kada se analiza provodila po tjednima trudnoće (Slike 46 - 49, Tablica 19).



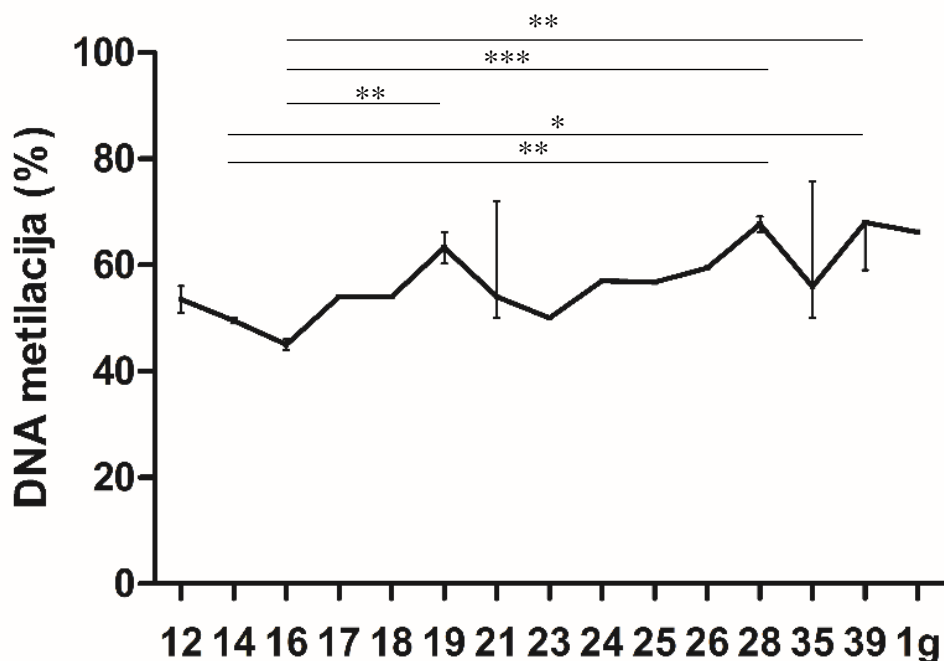
Slika 45. Postotak metilacije CTCF6 regije utisnutog gena *H19* sljedova iz uzoraka ljudskih fetalnih sjemenika po tromjesečjima trudnoće označenima s 1 (prvo), 2 (drugo) i 3 (treće tromjesečje). Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani medijanom (+), interkvartilnim rasponom (gornji i donji rub kvadrata) te minimalnom i maksimalnom vrijednosti (T-oznake).

Zbog uočene veće razlike između minimalne i maksimalne vrijednosti u drugom tromjesečju, pristupilo se analizi po tjednima. Uočena je razlika u usporedbi vrijednosti prosječne metilacije u 12. tjednu (46,93 %) s vrijednostima 39. tjedna (62 %) i jedne godine života (68,28 %). Između 16. tjedna trudnoće (44 %) te 21. (50 %), 24. (57 %), 39. tjedna (62 %) i jedne godine (68,28 %) također je nađena statistički značajna razlika. 18. tjedan trudnoće (40 %) imao je statistički značajno niže vrijednosti prosječne metilacije CTCF6 regije gena *H19* u usporedbi s 39. tjednom (62 %) i jednom godinom (68,28 %) (Slika 46, Tablica 19).



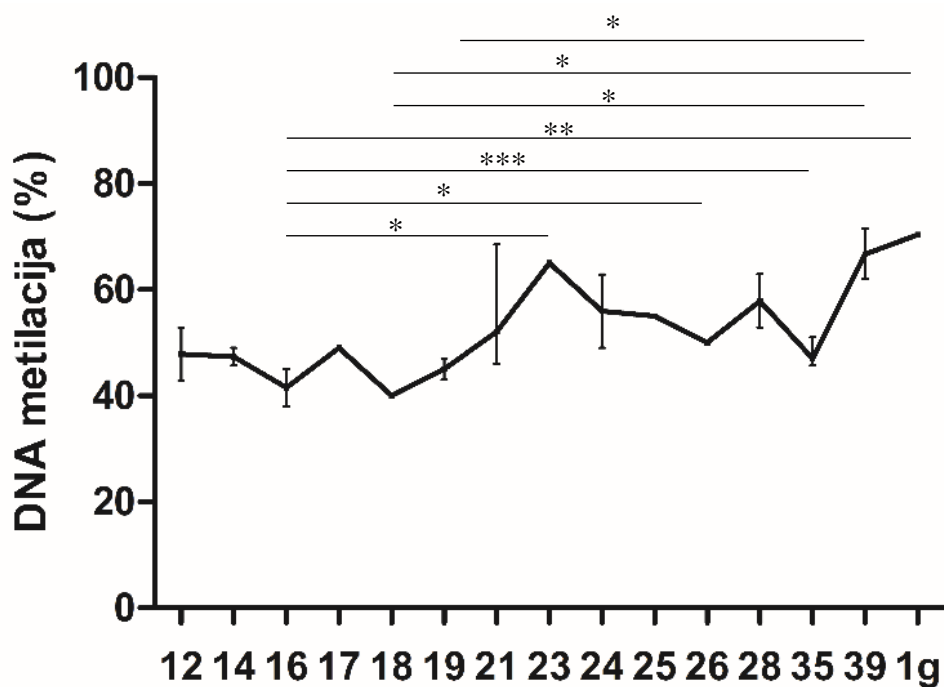
Slika 46. Prosjek postotka metilacije CTCF6 regije gena *H19* iz uzoraka ljudskih fetalnih sjemenika po tjednima trudnoće. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao medijan \pm interkvartilni raspon. Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,05 označena je jednom (*), manja od 0,01 dvjema (**), a manja od 0,001 trima zvjezdicama (***)

Razlika u vrijednostima metilacije CTCF6 regije gena *H19* na CpG1 mjestu uočena je u 14. tjednu (49,5 %), uspoređena s vrijednostima 28. (67,67 %) i 39. tjedna (68 %) i jedne godine života (68,28 %). Između 16. tjedna trudnoće (45 %) te 19. (63,26 %), 28. (67,67 %) i 39. tjedna (68 %) također je nađen statistički značajan porast (Slika 47, Tablica 19).



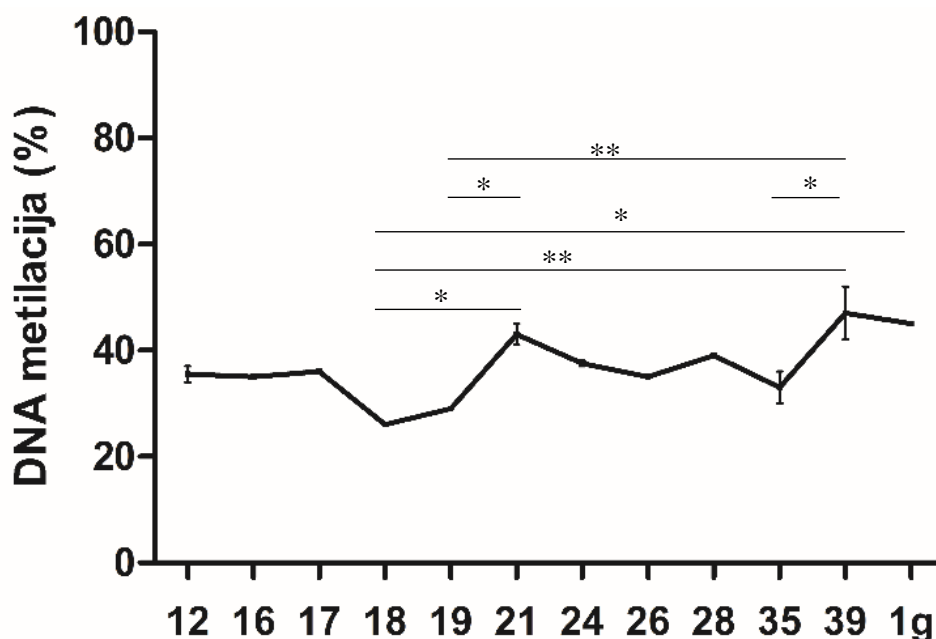
Slika 47. Postotak metilacije CTCF6 regije gena *H19* na CpG1 mjestu iz uzoraka ljudskih fetalnih sjemenika po tjednima trudnoće. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao medijan \pm interkvartilni raspon. Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,05 označena je jednom (*), manja od 0,01 dvjema (**), a manja od 0,001 trima zvjezdicama (***).

Analizom metilacije CTCF6 regije gena *H19* na CpG2 mjestu po tjednima dobila se statistički značajna razlika kada su se usporedile vrijednosti u 16. tjednu (41,5 %) s vrijednostima u sjemeniku od 23. (65 %), 26. (50 %), 39. tjedna (66,72 %) i jedne godine života (68,28 %). Između 18. tjedna trudnoće (40 %) te 39. (66,72 %) tjedna i jedne godine života (70,37 %) također je nađena statistički značajna razlika, kao i između 19. (45 %) i 39. tjedna trudnoće (66,72 %) (Slika 48, Tablica 19).



Slika 48. Postotak metilacije CTCF6 regije gena *H19* na CpG2 mjestu iz uzoraka ljudskih fetalnih sjemenika po tjednima. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao medijan \pm interkvartilni raspon. Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,05 označena je jednom (*), manja od 0,01 dvjema (**), a manja od 0,001 trima zvjezdicama (***).

Metilacija CTCF regije gena *H19* na CpG3 mjestu pokazala je razliku u 18. tjednu (26 %), uspoređenu s vrijednostima 21. (43 %), 39. tjedna (47 %) i jedne godine života (45 %). Između 19. tjedna trudnoće (29 %) te 21. (43 %) i 39. tjedna (47 %) trudnoće također je nađena statistički značajna razlika. 35. tjedan trudnoće (33 %) imao je statistički značajno niže vrijednosti prosječne metilacije CTCF regije gena *H19* u usporedbi s 39. tjednom (47 %) (Slika 49, Tablica 19).



Slika 49. Postotak metilacije CTCF6 regije gena *H19* na CpG3 mjestu iz uzoraka ljudskih fetalnih sjemenika po tjednima. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao medijan \pm interkvartilni raspon. Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,05 označena je jednom (*), a manja od 0,01 dvjema zvjezdicama (**).

5.3.3. Analiza metilacije *RBI* gena

Optimalna regija za analizu određena je prema podacima iz literature (329), kako bi se odredio način regulacije *RBI* gena, koji je jedan od glavnih regulatora staničnog ciklusa. Iako se smatra da je hipometiliran tijekom razvoja, zasebne analize za fetalne organe koji sadrže spolne stanice nisu rađene. Spolne stanice za velik broj gena imaju vlastiti epigenetski obrazac, znatno različit od ostalih vrsta diferencirajućih stanica. Određen je postotak DNA metilacije pet CpG mjesta promotorske regije *RBI* gena te prosjek toga postotka. I za *RBI* gen rezultati su prikazani i po tromjesečjima i po tjednima trudnoće.

Tablica 20. Postotak metilacije DNA *RBI* gena izražen kao medijan, interkvartilni raspon te minimalna i maksimalna vrijednost po tromjesečjima trudnoće za pojedino CpG mjesto i prosjek vrijednosti.

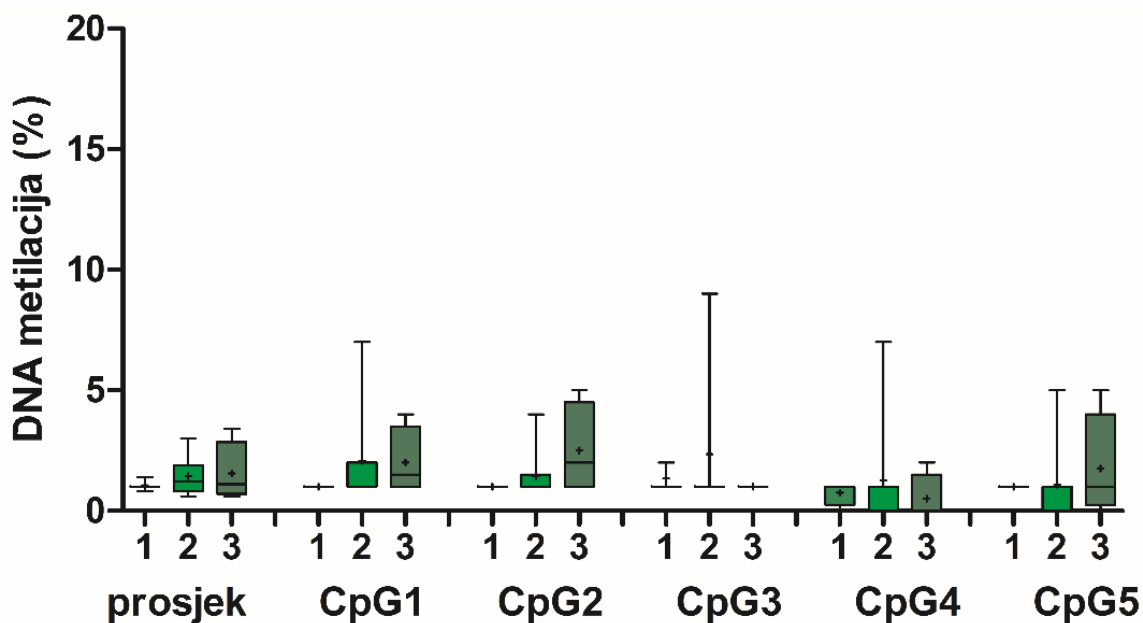
	PROSJEK METILACIJE			CpG1			CpG2		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
tromjesečje									
broj mjerenja	30	55	30	6	12	6	6	9	6
minimalna vrijednost	0,80	0,60	0,60	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
25 % percentila	0,80	0,80	0,70	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
medijan	1,00	1,20	1,10	1,00	1,00	1,50	1,00	1,00	2,00
75 % percentila	1,40	1,90	2,85	1,00	2,00	3,50	1,00	1,50	4,50
maksimalna vrijednost	1,40	3,00	3,40	1,00	7,00	4,00	1,00	4,00	5,00
	CpG3			CpG4			CpG5		
tromjesečje	1	2	3	1	2	3	1	2	3
broj mjerenja	6	11	6	6	12	6	6	11	6
minimalna vrijednost	1,00	1,00	1,00	0,0	0,0	0,0	1,00	0,0	0,0
25 % percentila	1,00	1,00	1,00	0,250	0,0	0,0	1,00	0,0	0,250
medijan	1,00	1,00	1,00	1,00	0,0	0,0	1,00	1,00	1,00
75 % percentila	2,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,50	1,00	1,00	4,00
maksimalna vrijednost	2,00	9,00	1,00	1,00	7,00	2,00	1,00	5,00	5,00

Tablica 21. Postotak metilacije DNA *RBI* gena izražen kao medijan i interkvartilni raspon po tjednima trudnoće i postnatalno za pojedino CpG mjesto i prosjek vrijednosti.

PROSJEK METILACIJE					CpG1			
tjedan	broj mjerjenja	25 % perc.	medijan	75 % perc.	broj mjerjenja	25 % perc.	medijan	75 % perc.
12	30	1,40	1,40	1,40	6	2,0	2,0	2,0
14	30	1,0	1,0	1,0	6	1,0	1,0	1,0
16	45	0,80	1,0	1,80	9	1,0	1,0	2,0
17	30	1,20	1,20	1,20	6	2,0	2,0	2,0
18	30	1,80	1,80	1,80	6	1,0	3,0	5,0
19	30	0,60	0,60	0,60	6	1,0	1,0	1,0
21	30	0,80	0,80	0,80	6	1,0	1,0	1,0
23	30	1,20	1,20	1,20	6	2,0	2,0	2,0
24	45	2,20	3,0	4,20	12	1,0	1,0	7,0
28	30	1,0	1,0	1,0	6	1,0	1,0	2,0
35	30	0,60	0,90	1,20	6	1,0	1,0	1,0
39	30	3,40	3,40	3,40	6	4,0	4,0	4,0
CpG2					CpG3			
tjedan	broj mjerjenja	25 % perc.	medijan	75 % perc.	broj mjerjenja	25 % perc.	medijan	75 % perc.
12	6	1,0	1,0	1,0	6	2,0	2,0	2,0
14	6	1,0	1,0	1,0	6	1,0	1,0	1,0
16	9	1,0	1,0	1,0	9	1,0	1,0	1,0
17	6	1,0	1,0	1,0	6	1,0	1,0	1,0
18	6	1,0	1,0	1,0	6	1,0	1,0	1,0
19	6	1,0	1,0	1,0	6	1,0	1,0	1,0
21	6	1,0	1,0	1,0	6	1,0	1,0	1,0
23	6	2,0	2,0	2,0	6	2,0	2,0	2,0
24	9	1,0	1,0	4,0	9	1,0	8,0	9,0
28	6	1,0	3,0	3,0	6	1,0	1,0	1,0
35	6	1,0	2,0	3,0	6	1,0	1,0	1,0
39	6	5,0	5,0	5,0	6	1,0	1,0	1,0

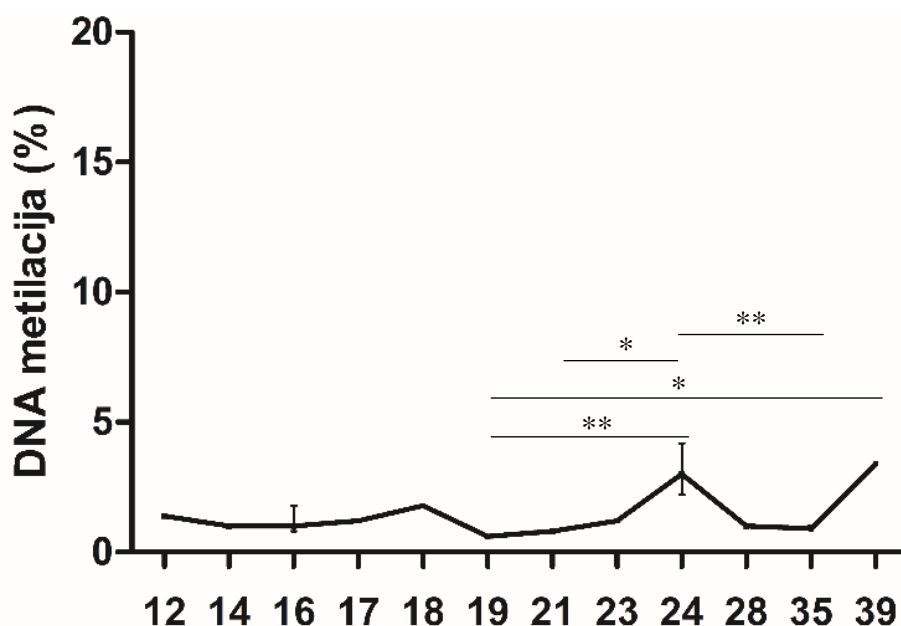
CpG4					CpG5			
tjedan	broj mjerjenja	25 % perc.	medijan	75 % perc.	broj mjerjenja	25 % perc.	medijan	75 % perc.
12	6	1,0	1,0	1,0	6	1,0	1,0	1,0
14	6	0,0	0,50	1,0	6	1,0	1,0	1,0
16	9	0,0	0,0	5,0	9	1,0	1,0	1,0
17	6	1,0	1,0	1,0	6	1,0	1,0	1,0
18	6	0,0	0,50	1,0	6	0,0	0,50	1,0
19	6	0,0	1,0	2,0	6	1,0	1,0	1,0
21	6	0,0	0,0	0,0	6	1,0	1,0	1,0
23	6	0,0	0,0	0,0	6	0,0	0,0	0,0
24	9	0,0	1,0	7,0	9	0,0	1,0	5,0
28	6	0,0	0,0	0,0	6	1,0	1,0	1,0
35	6	0,0	0,0	0,0	6	0,0	0,50	1,0
39	6	2,0	2,0	2,0	6	5,0	5,0	5,0

Analizom metilacije *RBI* gena po tromjesečjima nije se dobila statistički značajna razlika prikazana kao prosjek ili u pojedinom CpG mjestu (Slika 50, Tablica 20). Ipak, statistički značajna razlika u metilaciji postoji kada se podaci analiziraju po tjednima trudnoće (Slike 51 - 56, Tablica 21).



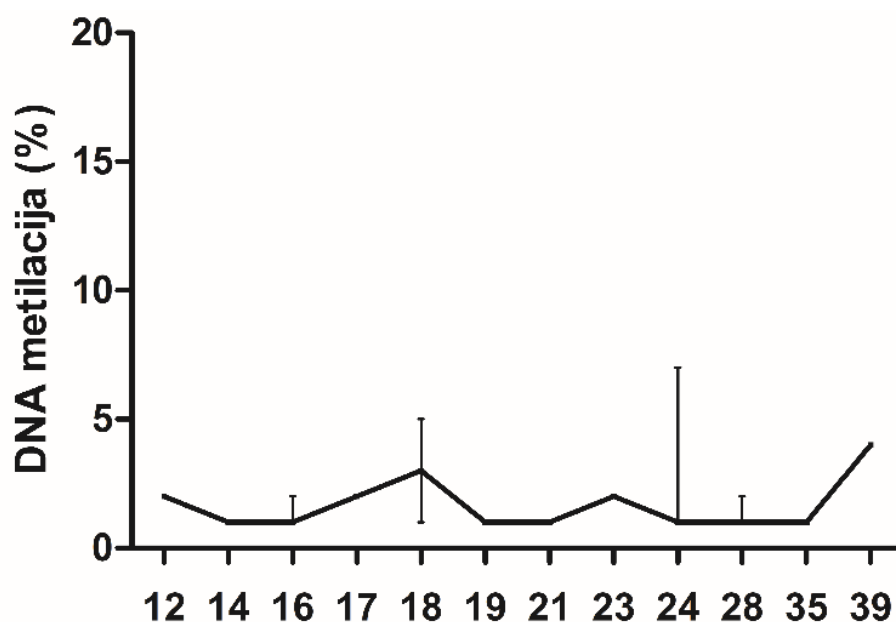
Slika 50. Postotak metilacije DNA *RBI* gena iz uzoraka ljudskih fetalnih sjemenika po tromjesečjima trudnoće označenima s 1 (prvo), 2 (drugo) i 3 (treće tromjesečje). Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani medijanom (+), interkvartilnim rasponom (gornji i donji rub kvadrata) te minimalnom i maksimalnom vrijednosti (T-oznake). Y-ordinata je modificirana (do 20%) zbog niskih vrijednosti metilacije.

Analizom po tjednima dobile su se određene statistički značajne razlike u metilaciji *RBI* gena u stanicama fetalnog sjemenika koje se ipak trebaju staviti u kontekst vrlo malih ukupnih vrijednosti metilacije. Usporedbom 19. (0,6 %) s 24. (3 %) ($p < 0,01$) i 39. tjednom trudnoće (3,4 %) ($p < 0,05$) dobila se statistički značajna razlika u prosječnom postotku metilacije *RBI* gena, kao i usporedbom 21. (0,8 %) s 24. tjednom (3 %) ($p < 0,05$) i 24. (3 %) s 35. tjednom trudnoće (0,9 %) ($p < 0,01$) (Slika 51, Tablica 21).



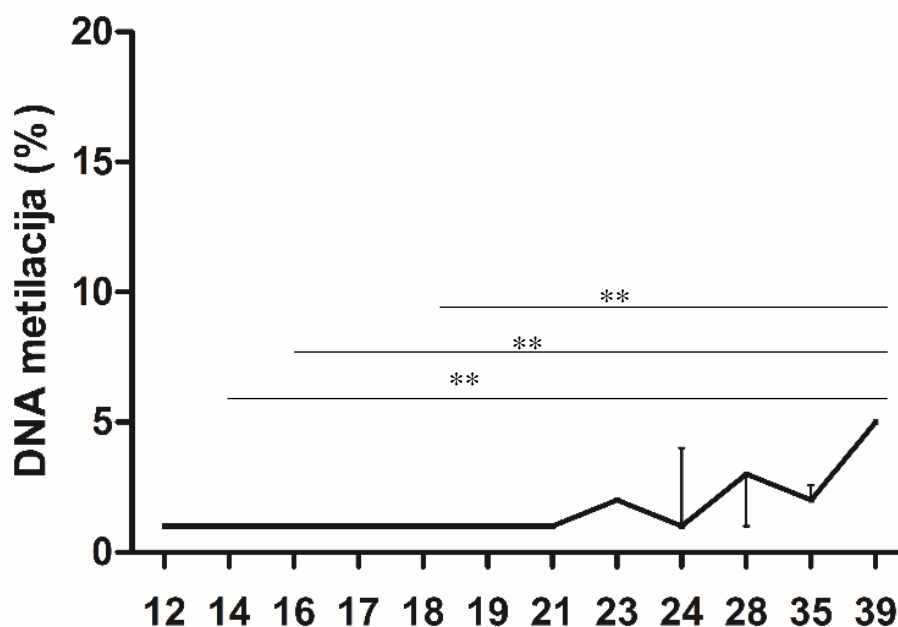
Slika 51. Prosječni postotak metilacije DNA *RBL* gena iz uzoraka ljudskih fetalnih sjemenika po tjednima trudnoće. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao medijan \pm interkvartilni raspon. Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,05 označena je jednom (*), a manja od 0,01 dvjema zvjezdicama (**).

Analiza metilacije *RBL* gena na CpG1 mjestu nije pokazala statistički značajnu razliku kada su se uzorci analizirali po tromjesečjima (Slika 50 i Tablica 20), a ni po tjednima trudnoće (Slika 52, Tablica 21). Medijan vrijednosti kretao se od 1 % u prvom tromjesečju, 1 % u drugom do 1,5 % u trećem tromjesečju.



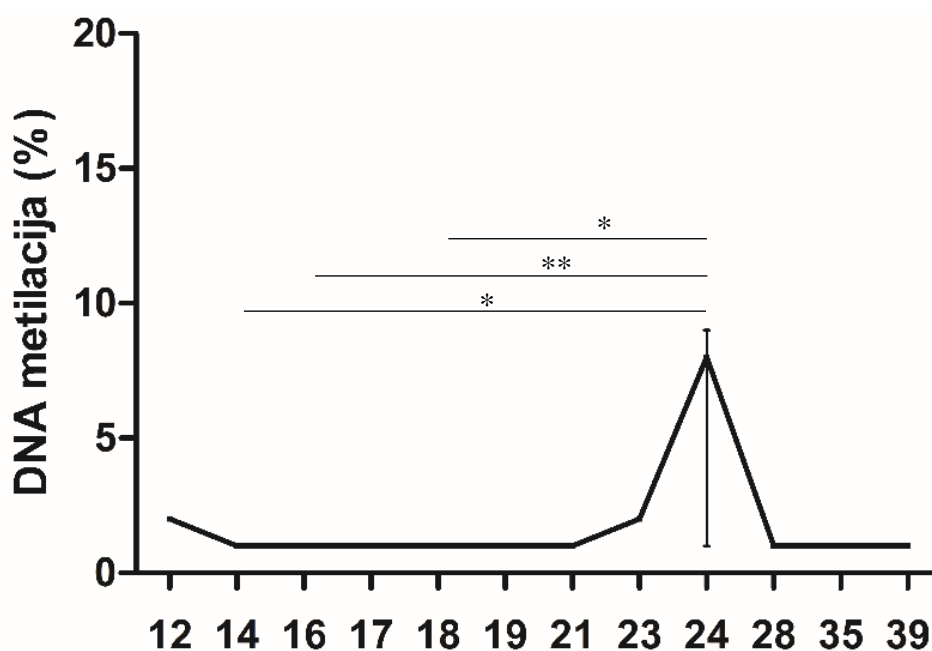
Slika 52. Postotak metilacije *RBI* gena na CpG1 mjestu iz uzoraka ljudskih fetalnih sjemenika po tjednima. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao medijan \pm interkvartilni raspon. Nema statistički značajne razlike.

Metilacija *RBI* gena na CpG2 mjestu po tjednima pokazala je statistički značajnu razliku kada su se usporedile vrijednosti 14. (1 %), 16. (1 %) i 18. tjedna (1 %) usporedile s vrijednostima 39. tjedna trudnoće (5 %) (Slika 53, Tablica 21).



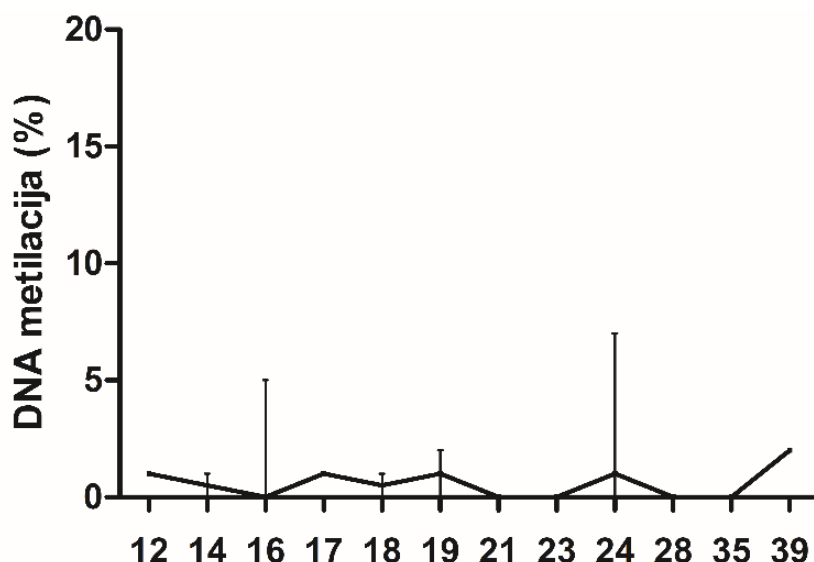
Slika 53. Postotak metilacije *RBI* gena na CpG2 mjestu iz uzoraka ljudskih fetalnih sjemenika po tjednima. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao medijan \pm interkvartilni raspon. Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,01 označena je dvjema zvjezdicama (**).

Medijan vrijednosti metilacije *RBI* gena na CpG3 mjestu analiziran po tromjesečjima kretao se od 1 % u prvom tromjesečju, 0 % u drugom do 0 % u trećem tromjesečju te nije pokazao statistički značajnu razliku (Slika 50, Tablica 20). Usporedbom vrijednosti metilacije 14. (1 %), 16. (1 %) i 18. tjedna (1 %) s vrijednostima 24. tjedna trudnoće (8 %) dobila se statistički značajna razlika (Slika 54, Tablica 21).



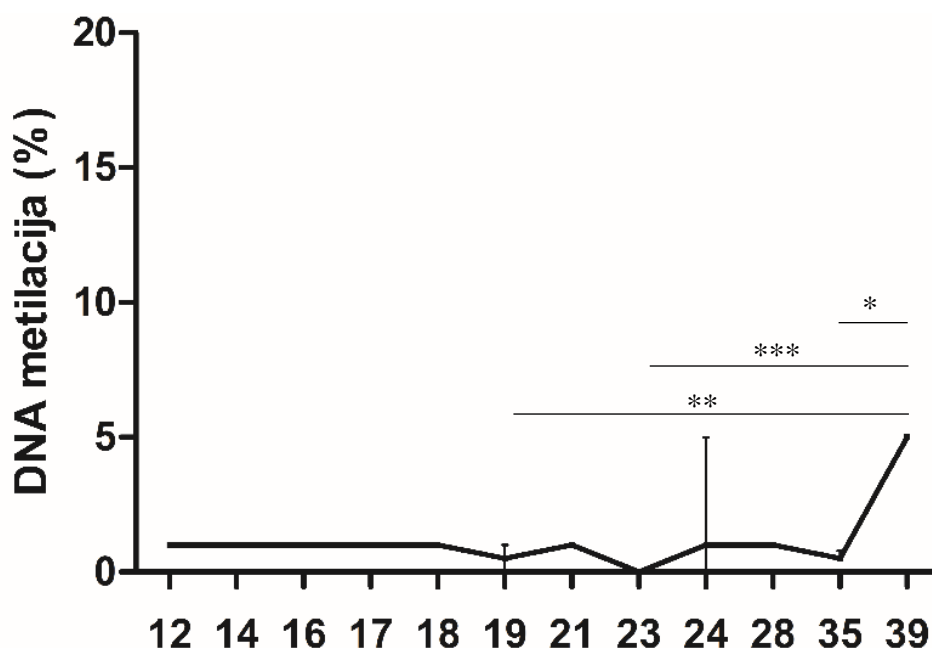
Slika 54. Postotak metilacije *RBI* gena na CpG3 mjestu iz uzoraka ljudskih fetalnih sjemenika po tjednima. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao medijan \pm interkvartilni raspon. Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,05 označena je jednom (*), a manja od 0,01 dvjema zvjezdicama (**).

Metilacija *RBI* gena na CpG4 mjestu nije pokazala je statistički značajnu razliku kada su se uzorci analizirali po tromjesečjima (Slika 50, Tablica 20), a ni po tjednima trudnoće (Slika 55, Tablica 21). Medijan vrijednosti kretao se od 1 % u prvom tromjesečju, 0 % u drugom i 0 % u trećem tromjesečju.



Slika 55. Postotak metilacije *RBI* gena na CpG4 mjestu iz uzoraka ljudskih fetalnih sjemenika po tjednima. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao medijan \pm interkvartilni raspon. Nema statistički značajne razlike.

Kada su se analizirale vrijednosti metilacije *RBI* gena na CpG5 mjestu po tjednima, uočila se statistički značajna razlika kada su se usporedile vrijednosti 19. (0,5 %), 23. (0 %) i 35. tjedna (0,5 %) s vrijednostima 39. tjedna trudnoće (5 %) dobila se statistički značajna razlika (Slika 56, Tablica 21).

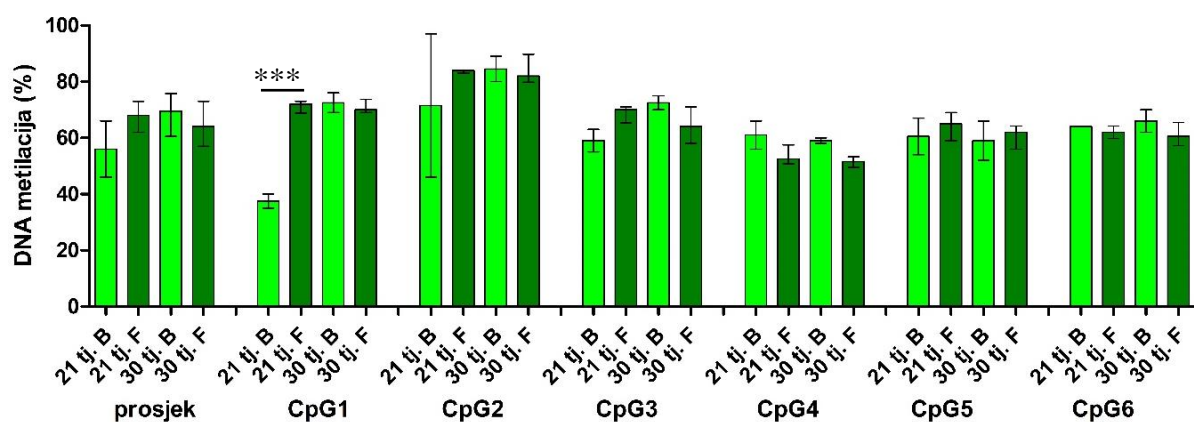


Slika 56. Postotak metilacije *RBI* gena na CpG5 mjestu iz uzoraka ljudskih fetalnih sjemenika po tjednima. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao medijan \pm interkvartilni raspon. Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,05 označena je jednom (*), manja od 0,01 dvjema (**), a manja od 0,001 trima zvjezdicama (***)

5.3.4. Utjecaj načina fiksacije i količine tkiva na rezultate pirosekvenciranja

Među arhivskim uzorcima ljudskih fetalnih sjemenika uočilo se da su pojedini bili fiksirani u Bouinovoj otopini, a ne formalinu, pa su se uzorci odgovarajućih stadija usporedili radi procjene kvalitete DNA i kako se odražava na pirosekvenciranje.

Parovi uzoraka nađeni su za 21. i 30. tjedan trudnoće, pa su isti uspoređeni pirosekvenciranjem. Analizirajući razlike u postotku metilacije *LINE-1* ponavljajućih sljedova za prosječnu vrijednost i pojedina CpG mjesta, uočeno je da postoje varijacije među parovima uzoraka, no samo između jednog para je bila statistički značajna ($p < 0,001$) (Slika 57).



Slika 57. Postotak metilacije *LINE-1* ponavljajućih sljedova u prosjeku te za svako pojedino CpG mjesto za 21. i 30. tjedan trudnoće. Prikazi postotka metilacije za uzorke fiksirane u Bouinovoj otopini su svijetlozeleni, dok su -uzorci fiksirani u 10 %-tnom formalinu tamnozeleni. ANOVA test, rezultati su prikazani kao medijan \pm interkvartilni raspon. Broj uzoraka je minimalno 6 po skupini. Statistički značajna P-vrijednost manja od 0,001 označena je trima zvjezdicama (***)

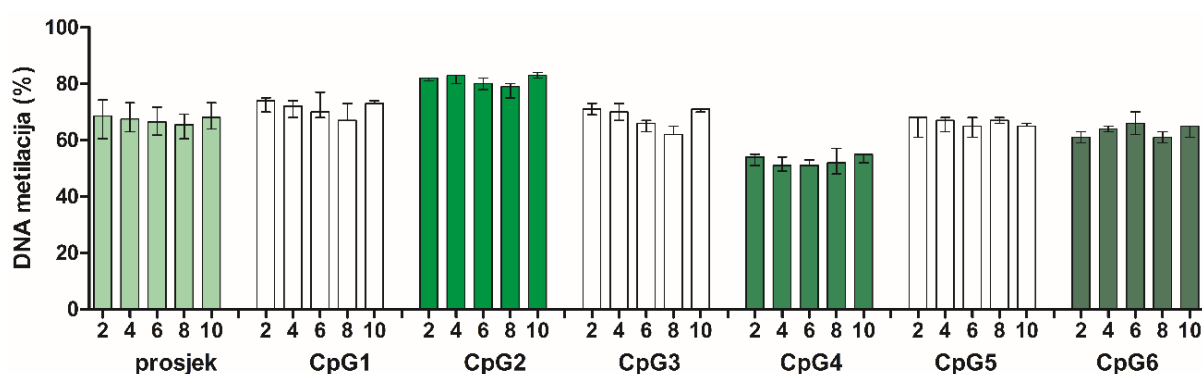
Iako postoje istraživanja koja preporučuju optimalan broj rezova za izolaciju DNA koji će se pirosekvencirati, većinom su rađena na karcinomskom i odraslom tkivu, pa se isti princip u ovom istraživanju primijenio na fetalno tkivo.

Odabran je uzorak čija je količina bila dovoljna za ispitivanje utjecaja broja rezova na kvalitetu pirosekvenciranja. Iako je količina izoliranog DNA bila u očekivanom porastu (Tablica 22) s obzirom na broj parafinskih rezova, u postupak pirosekvenciranja se ulazi s uvijek istom količinom DNA. Usporedba *LINE-1* ponavljajućih sekvenci pokazala je male razlike među uzorcima koje nisu bile statistički značajne, što se može objasniti statistički većom vjerojatnošću duže sekvence DNA koja nije degradirana u većem broju uzoraka.

Analizom prosjeka postotka metilacije p vrijednost je bila 0,7629, za CpG1 mjesto 0,3987, za CpG2 mjesto 0,0638, za CpG3 mjesto 0,0564, za CpG4 mjesto 0,5112, za CpG5 mjesto 0,7397, a za CpG6 mjesto 0,1518 (Slika 58).

Tablica 22. Prosječna (Δ) koncentracija DNA izražena u ng/ μ L po broju rezova. Iako je razlika veća od 10 puta između dva i deset rezova, to se ne odražava na pirosekvenciranje.

broj rezova	Δ konc/ng/ μ L
2	27,08
4	175,46
6	214,90
8	230,23
10	456,50



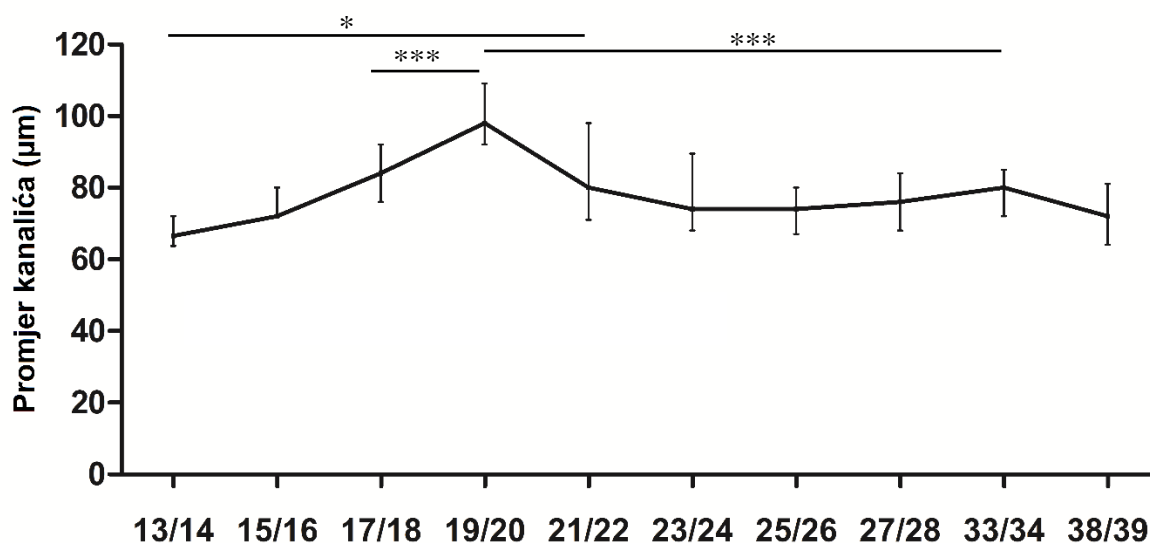
Slika 58. Postotak metilacije *LINE-1* ponavljajućih sljedova u prosjeku te za svako pojedino CpG mjesto. Broj rezova je od dva do deset istog uzorka. Kruskal-Wallis test, Dunnov test višestrukih usporedbi, rezultati su prikazani kao medijan \pm interkvartilni raspon. Broj uzoraka je minimalno 6 po skupini. Nema statistički značajne razlike.

5.4. Izražaj imunohistokemijskih biljega u tkivu fetalnih ljudskih sjemenika kroz stadije trudnoće

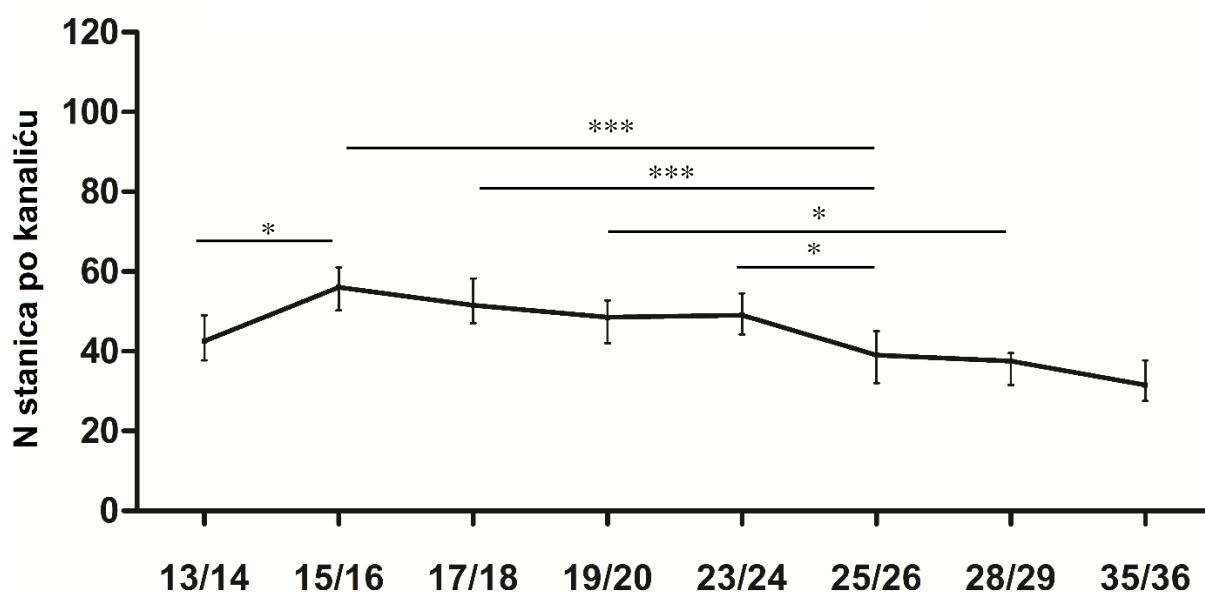
Analiza biljega Ki-67, proteina tumor supresorskog gena *RBI*, njegovih formi fosforiliranih na serinu 780 i 795 te biljega Sertolijevih stanica SOX9 provela se onako kako je opisano za štakorska tkiva. Broj smeđe obojenih stanica u minimalno 10 poprečno presječenih sjemenskih kanalića prikazao se grafički kao ukupan broj te broj normaliziran na ukupan broj stanica u kanaliću, a njegov promjer pomnožen sa 100 (334, 335).

5.4.1. Histološke karakteristike fetalnog ljudskog sjemenika

Slike 59 i 60 prikazuju dinamiku promjera sjemenih kanalića i broja stanica u kanaliću tijekom ljudske trudnoće. Promjer kanalića doseže vrhunac u 19. i 20. tpo te nakon toga postepeno pada, dok broj stanica kanalića raste do 15. tjedna te dalje vrlo blago ali kontinuirano pada, uglavnom zbog rasta stanica. Oboje se odražava na dobivene rezultate pri normalizaciji broja pozitivnih stanica po promjeru sjemenog kanalića.



Slika 59. Promjer sjemenih kanalića u istraživanim stadijima ljudske trudnoće izražen u mikrometrima. Prosječni promjer raste do 19/20 tpo te zatim postepeno pada. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao medijan ± interkvartilni raspon. Broj izmjerenih kanalića je minimalno 10 po tjednu. Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,05 označena je jednom (*), a ona manja od 0,001 s tri zvjezdice (***)



Slika 60. Ukupni broj stanica (N) po sjemenom kanaliću u istraživanim stadijima ljudske trudnoće. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani kao medijan ± interkvartilni raspon, a mjereno je u minimalno 10 kanalića po skupini. Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,05 označena je jednom (*), a ona manja od 0,001 s tri zvjezdice (***)

5.4.2. Izraženost Ki-67 biljega u ljudskom sjemeniku kroz stadije trudnoće

Ki-67, izražen u stanicama u S-fazi staničnog ciklusa u tkivu fetalnog sjemenika bio je izražen u jezgrama zametnih, Sertolijevih i Leydigovih stanica. Unutar sjemenih kanalića gotovo sve pozitivne stanice bile su zametne (Slika 65).

Kao i prije, rezultati su prikazani po tromjesečjima trudnoće, a potom po tjednima. U slučaju biljega Ki-67, već se u prikazu rezultata po tromjesečjima dobila statistički značajna razlika u izražaju gena (Slika 61 i 63, Tablica 23), a detaljnija dinamika izražaja prikazala se u grafu po tjednima (Slika 62 i 64, Tablica 24).

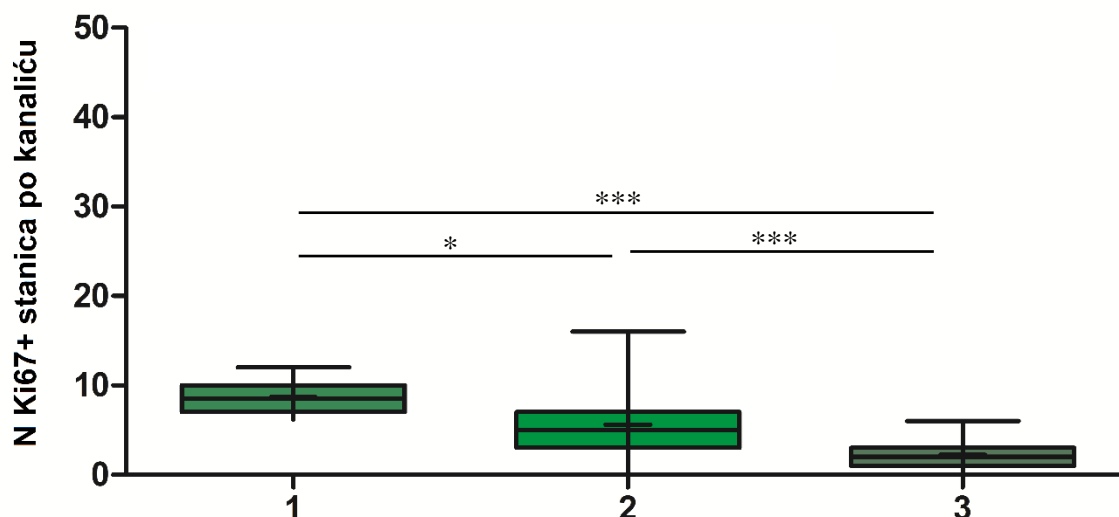
Analizirajući broj Ki-67-pozitivnih stanica po kanaliću, već se po tromjesečjima uočio pad vrijednosti prema kraju trudnoće. Gledajući iste vrijednosti po tjednima, kontinuirani blagi pad vrijednosti ima minimum u 21. tpo. U svim stadijima radi se o relativno malom ukupnom broju stanica.

Tablica 23. Numerički izraženi medijani i interkvartilni rasponi izraženosti biljega proliferacije Ki-67 po tromjesečjima trudnoće čovjeka.

Broj Ki-67+ stanica po sjemenom kanaliću			
tromjesečje	1	2	3
Minimum	7	0	0
25 % percentila	7	3	1
medijan	8,5	5	2
75 % percentila	10	7	3
maksimum	12	16	6
Broj Ki-67+ stanica po ukupnom broju stanica i po promjeru sjemenog kanalića			
tromjesečje	1	2	3
minimum	0,1984	0	0
25 % percentila	0,2036	0,07341	0,03647
medijan	0,2152	0,1149	0,07873
75 % percentila	0,2442	0,1688	0,1047
maksimum	0,2545	0,3788	0,3133

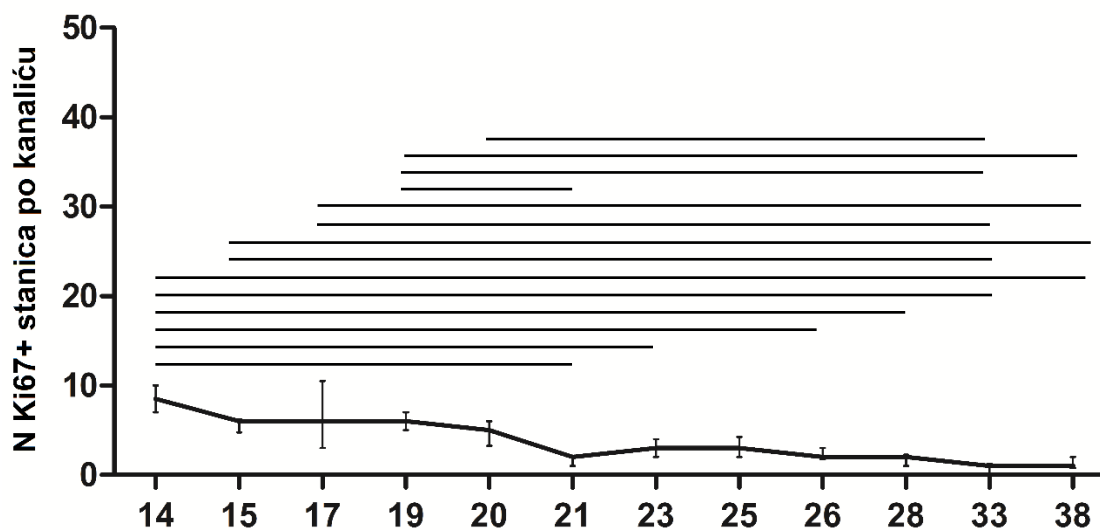
Tablica 24. Numerički izraženi medijani i interkvartilni rasponi izraženosti biljega proliferacije Ki-67 po tjednima trudnoće.

Broj Ki-67+ stanica po sjemenom kanaliću				Broj Ki-67+ stanica po ukupnom broju stanica i po promjeru sjemenog kanalića		
tjedan	25 % perc.	medijan	75 % perc.	25 % perc.	medijan	75 % perc.
14	1	3	7,25	0,03638	0,07248	0,2042
15	4,75	6	6,25	0,1463	0,165	0,1951
17	3	6	10,5	0,07703	0,1417	0,1933
19	5	6	7	0,1055	0,1445	0,1678
20	3,25	5	6	0,06268	0,08813	0,1138
21	1	2	2	0,02458	0,03125	0,05006
23	2	3	4	0,05804	0,08819	0,1145
25	2	3	4,25	0,09804	0,1227	0,1585
26	1,75	2	3	0,06879	0,08687	0,1257
28	1	2	2,25	0,02994	0,05278	0,06091
33	0	1	1,25	0,0	0,3532	0,06013
38	0,75	1	2	0,02185	0,0363	0,05918

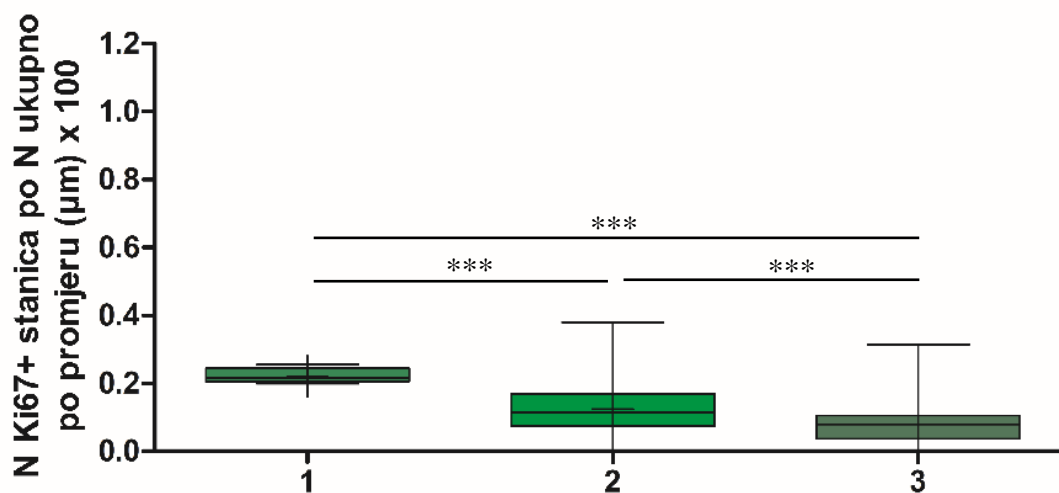


Slika 61. Broj stanica (N) pozitivnih na biljeg proliferacije Ki-67 po poprečno presječenom kanaliću u tromjesečjima trudnoće označenima s 1 (prvo), 2 (drugo) i 3 (treće tromjesečje). Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani medijanom (+), interkvartilnim rasponom (gornji i donji rub kvadrata) te minimalnom i maksimalnom vrijednosti (T-oznake). Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,05 označena je jednom (*), a ona manja od 0,001 s tri zvjezdice (***)

Gledajući iste rezultate po tjednima trudnoće, statistički značajne p-vrijednost manje od 0,05 zabilježene su između 14. i 25., 15. i 28., 19. i 26., 20. i 21. tpo, one manje od 0,01 između 15. i 21., 17. i 21., 17. i 23., 17. i 28., 19. i 23., 19. i 28. te 20. i 38. tpo, a $p < 0,001$ između 14. i 21., 14. i 23., 14. i 26., 14. i 28., 14. i 33., 14. i 38., 15. i 33., 15. i 38., 17. i 33., 17. i 38., 19. i 21., 19. i 33., 19. i 38. te između 20. i 33. tpo. Samo su one s $p < 0,001$ prikazane grafički (Slika 62).

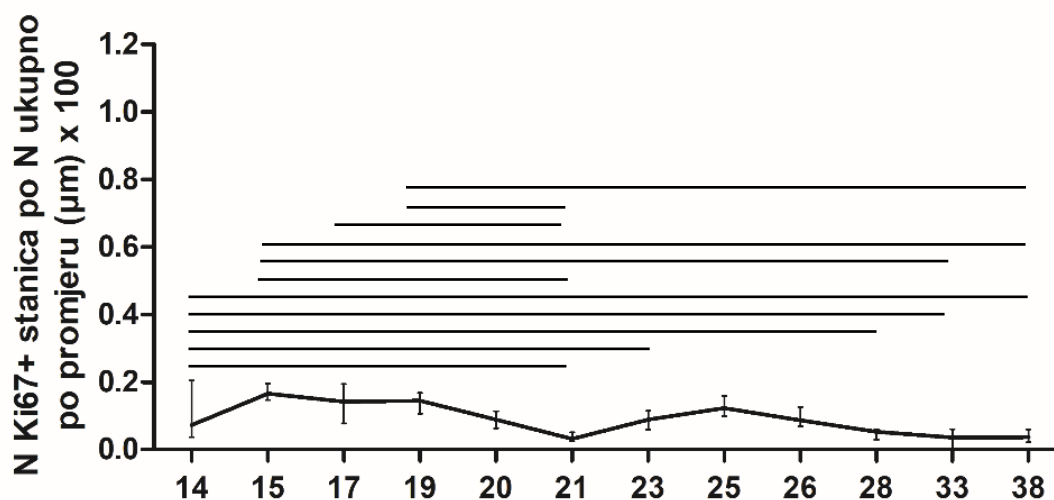


Slika 62. Broj stanica (N) pozitivnih na biljeg proliferacije Ki-67 po poprečno presječenom kanaliću u tjednima trudnoće. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom. Na grafu su označene samo najveće statistički značajne razlike s $p < 0,001$, a ostale navedene u tekstu.

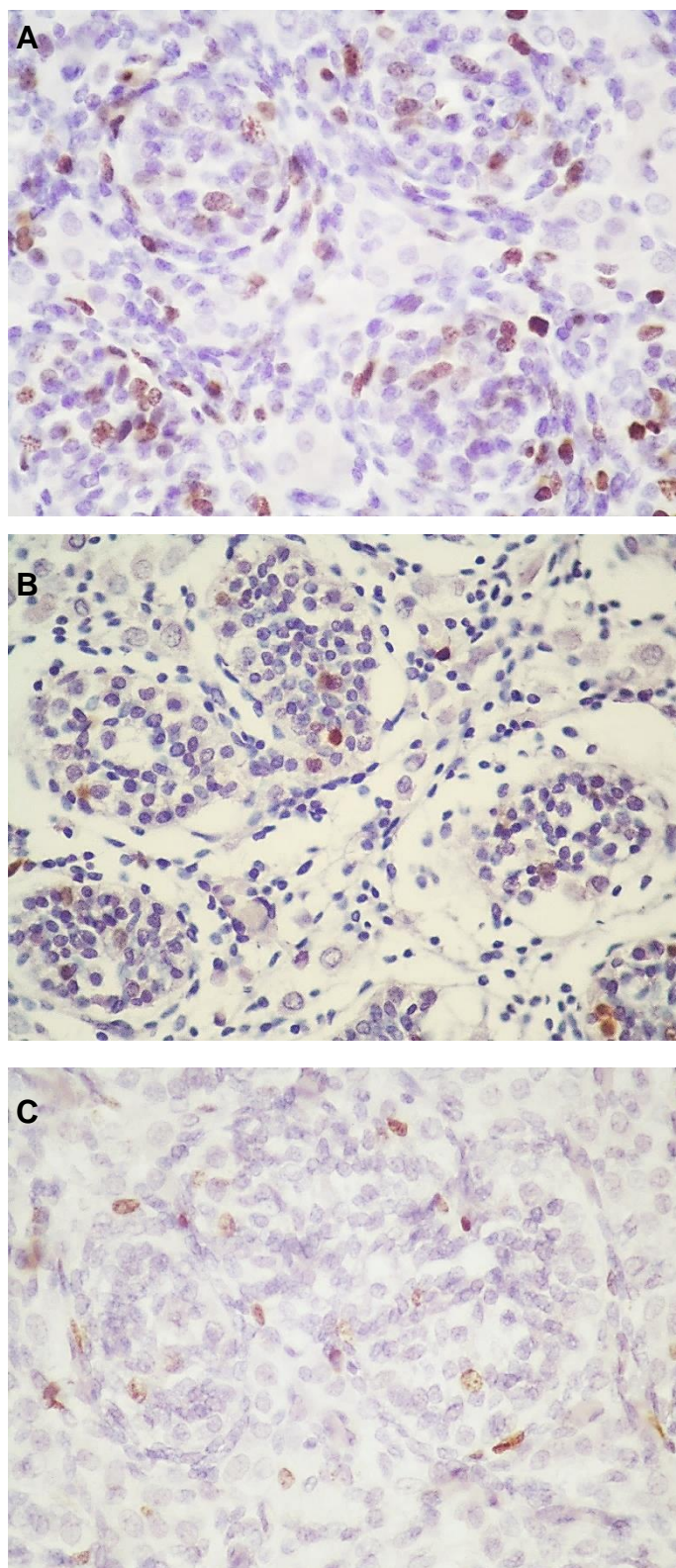


Slika 63. Broj stanica (N) pozitivnih na biljeg proliferacije Ki-67 po poprečno presječenom kanaliću normaliziran na ukupni broj stanica u kanaliću i njegov promjer u tromjesečjima trudnoće označenima s 1 (prvo), 2 (drugo) i 3 (treće tromjesečje). Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani medijanom (+), interkvartilnim rasponom (gornji i donji rub kvadrata) te minimalnom i maksimalnom vrijednosti (T-oznake). Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,001 s tri zvjezdice (***)

Statistički značajne p-vrijednosti po tjednima manje od 0,05 zabilježene su između 14. i 26., 17. i 28., 21. i 25., 25. i 38. tpo, one manje od 0,01 između 14. i 20., 15. i 28., 17. i 33., 17. i 38., 19. i 28., 19. i 33. te 20. i 38. tpo, a $p < 0,001$ između 14. i 21., 14. i 23., 14. i 28., 14. i 33., 14. i 38., 15. i 21., 15. i 33., 15. i 38., 17. i 21., 19. i 21., 19. i 38. tpo. Potonje su $p < 0,001$ prikazane grafički (Slika 64).



Slika 64. Broj stanica (N) pozitivnih na biljeg proliferacije Ki-67 po poprečno presječenom kanaliću normaliziran na ukupni broj stanica u kanaliću i njegov promjer u tjednima trudnoće. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom. Na grafu su označene samo najveće statistički značajne razlike s $p < 0,001$, a ostale navedene u tekstu.



Slika 65. Izraženost proteina Ki-67, biljega proliferacije u ljudskim sjemenicima u prvom (A), drugom (B) i trećem (C) tromjesečju, vizualizacija svjetlosnim mikroskopom. Uočava se sve manji broj Ki-67-pozitivnih stanica (smeđe obojane) napredovanjem trudnoće. Pozitivno obojene stanice prisutne su izvan i unutar kanalića te u njihovoj stijenci u svim stadijima. Bojenje DAB-om, kontrastiranje hemalaun-eozinom. Povećanje x 400.

5.4.3. Izraženost RB1 proteina u ljudskom sjemeniku kroz stadije trudnoće

Proteinski produkt tumor supresora *RB1* imao je ukupno veći broj pozitivnih stanica po sjemenom kanaliću od Ki-67 biljega. Izražen je uglavnom u jezgri, no u nekim stanicama dao je obojanost ograničenu na citoplazmu, jasno različitu od pozadinske obojenosti (engl. *background*). Broj RB1-pozitivnih stanica po kanaliću pokazao je pad prema kraju trudnoće, gledano po tromjesečjima, a po tjednima su zabilježene najviše vrijednosti između 15. i 19. tpo te zatim blagi kontinuirani pad (Slika 66 i 67, Tablica 25 i Tablica 26). Vrijednosti korigirane ukupnim brojem stanica u kanaliću i promjerom kanalića pokazale su rast broja RB1-pozitivnih stanica između 23. i 25. tpo, nakon jačeg pada u tjednima 20. i 21. (Slika 69), što je vidljivo i u analizi po tromjesečjima (Slika 68, Tablica 25). Pri brojanju se razlika u intenzitetu bojenja nije uračunavala, nego su se sve stanice s pozitivnim, smeđim signalom jednakovrijedno uračunavale.

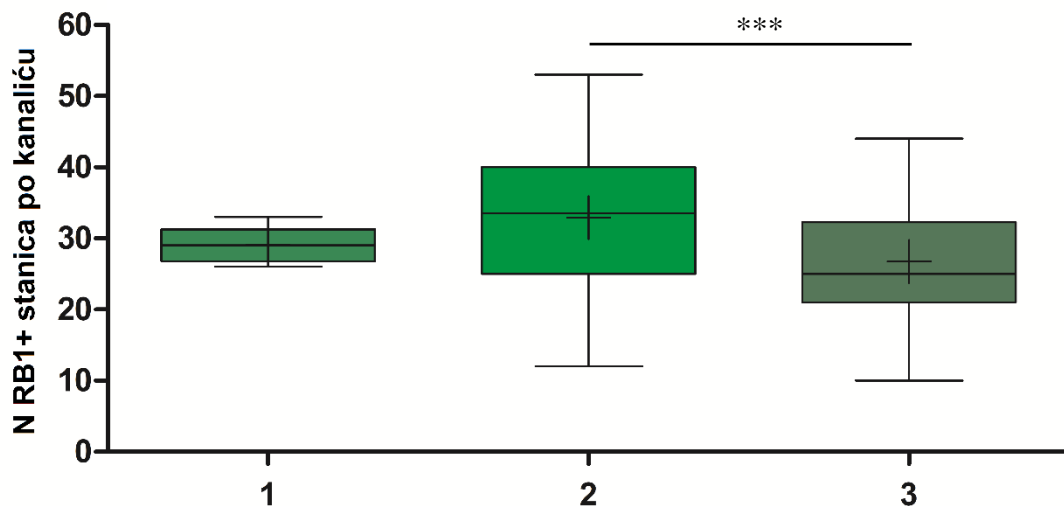
Tablica 25. Numerički izraženi medijani i interkvartilni rasponi izraženosti RB1 proteina po tromjesečjima trudnoće čovjeka.

Broj RB1+ stanica po sjemenom kanaliću			
tromjesečje	1	2	3
minimum	26	12	10
25 % percentila	26,75	25	21
medijan	29	33,5	25
75 % percentila	31,25	40	32,25
maksimum	33	53	44
Broj RB1+ stanica po ukupnom broju stanica i po promjeru sjemenog kanalića			
tromjesečje	1	2	3
Minimum	0,9333	0,2110	0,4340
25 % percentila	0,9659	0,6123	0,7480
Medijan	1,017	0,7984	0,9102
75 % percentila	1,089	0,9530	1,056
Maksimum	1,117	1,216	1,358

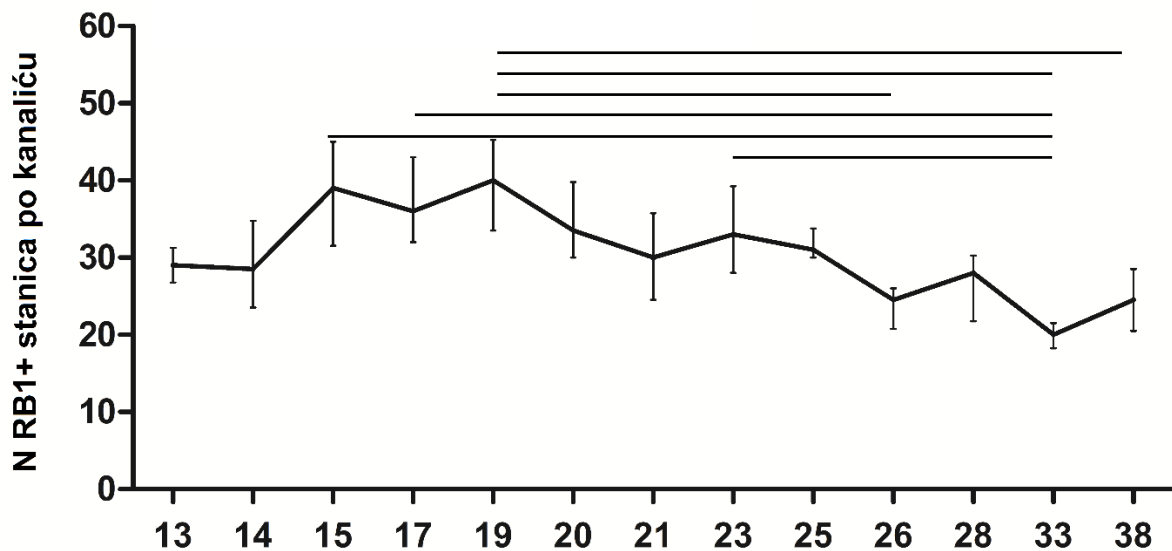
Tablica 26. Numerički izraženi medijani i interkvartilni rasponi izraženosti biljega RB1 po tjednima trudnoće.

Broj RB1+ stanica po sjemenom kanaliću				Broj RB1+ stanica po ukupnom broju stanica i po promjeru sjemenog kanalića		
tjedan	25 % perc.	medijan	75 % perc.	25 % perc.	medijan	75 % perc.
13	26,75	29	31,25	0,9659	1,017	1,089
14	23,5	28,5	34,75	0,8413	0,9085	0,9636
15	31,5	39	45	0,8184	0,9681	1,04
17	32	36	43	0,7563	0,8571	1,023
19	33,5	40	45,25	0,7998	0,899	1,004
20	30	33,5	39,75	0,535	0,6263	0,7098
21	24,5	30	35,75	0,5872	0,606	0,7197
23	28	33	39,25	0,9111	1,01	1,105
25	30	31	33,75	0,8572	0,9949	1,076
26	20,75	24,5	26	0,8841	1,077	1,192
28	21,75	28	30,25	0,629	0,6546	0,8051
33	18,25	20	21,5	0,7362	0,8333	0,9724
38	20,5	24,5	28,5	0,7237	0,8573	0,9506

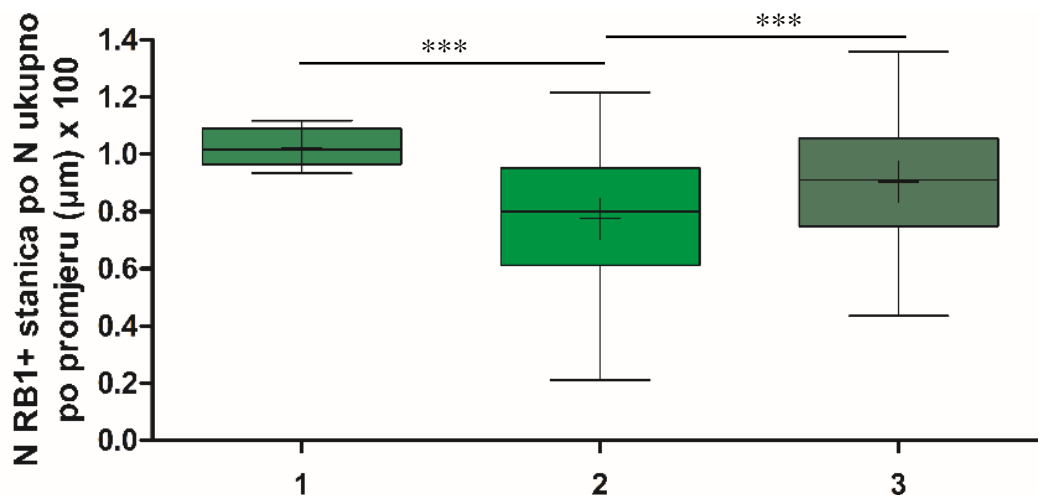
Iako je statistički značajna razlika bila prisutna već i na prijelazu drugog u treće tromjesečje, po tjednima trudnoće statistički značajne p-vrijednost manje od 0,05 zabilježene su između 15. i 26., 15. i 38., tpo, one manje od 0,01 između 14. i 19., 17. i 26., 17. i 38., 19. i 28., tpo, a $p < 0,001$ između 15. i 33., 17. i 33., 19. i 26., 19. i 33., 19. i 38, 23. i 33. tpo. Samo su one s $p < 0,001$ prikazane grafički (Slika 67).



Slika 66. Broj stanica (N) pozitivnih na RB1 protein po poprečno presječenom kanaliću u tromjesečjima trudnoće označenima s 1 (prvo), 2 (drugo) i 3 (treće tromjesečje). Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani medijanom (+), interkvartilnim rasponom (gornji i donji rub kvadrata) te minimalnom i maksimalnom vrijednosti (T-oznake). Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,001 označena je s tri zvjezdice (***)

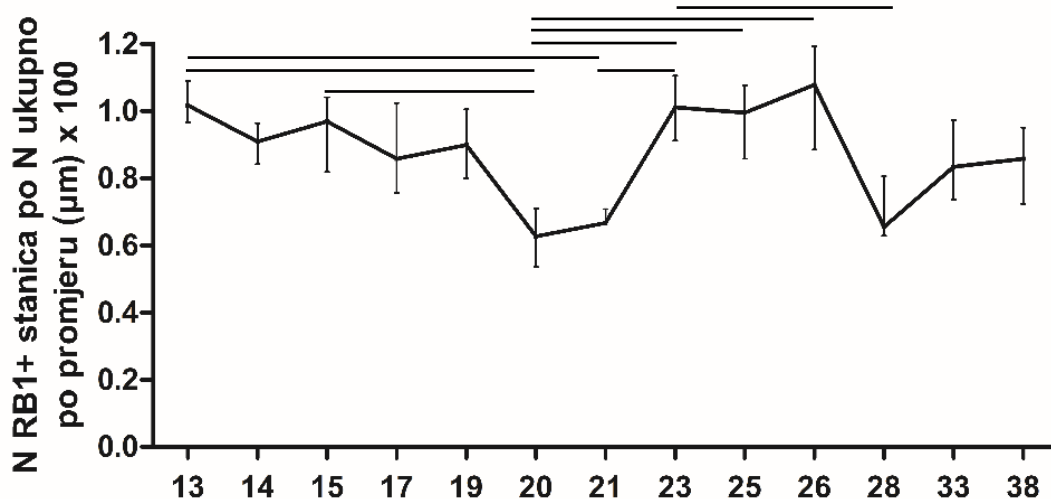


Slika 67. Broj stanica (N) pozitivnih na RB1 biljeg po poprečno presječenom kanaliću u tjednima trudnoće. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom. Na grafu su označene samo najveće statistički značajne razlike s $p < 0,001$, a ostale navedene u tekstu.

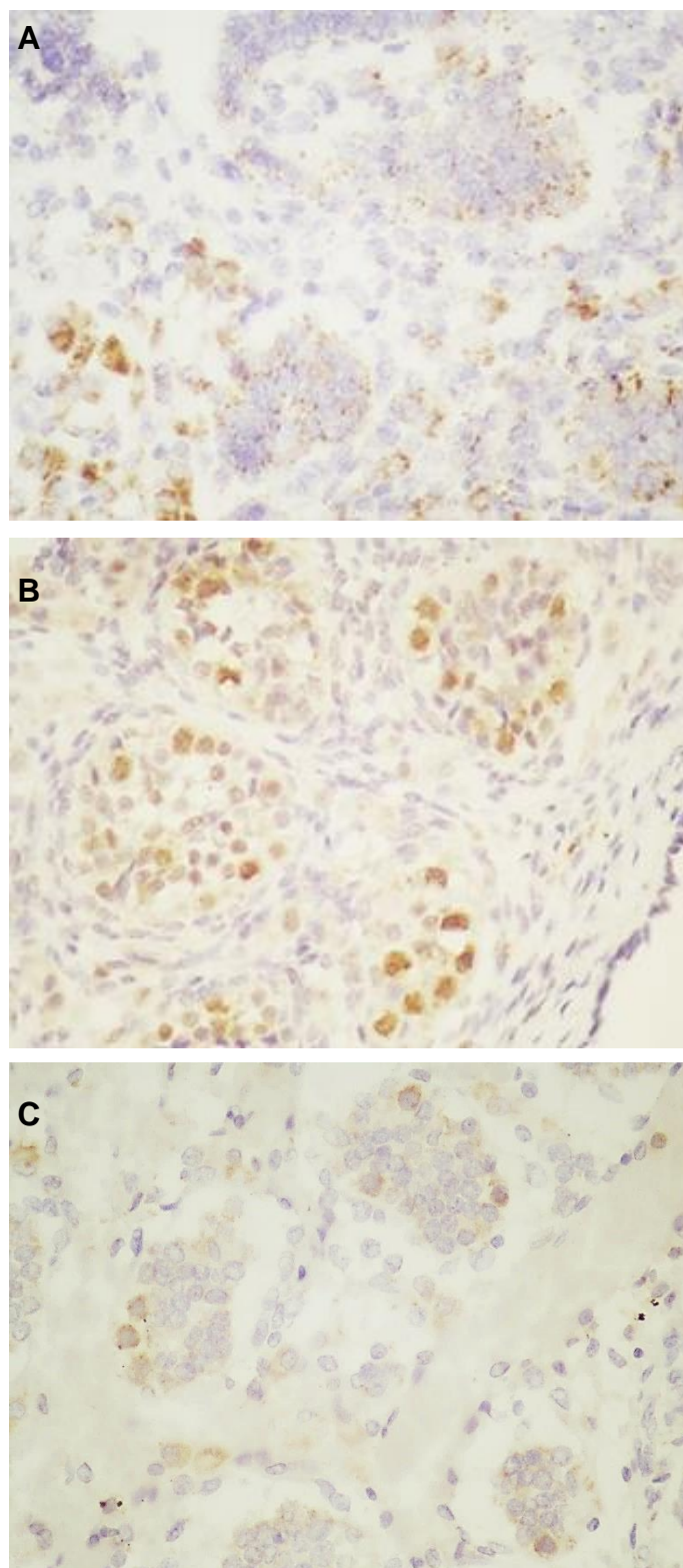


Slika 68. Broj stanica (N) pozitivnih na RB1 biljeg po poprečno presječenom kanaliću normaliziran na ukupni broj stanica u kanaliću i njegov promjer u tromjesečjima trudnoće označenima s 1 (prvo), 2 (drugo) i 3 (treće tromjesečje). Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani medijanom (+), interkvartilnim rasponom (gornji i donji rub kvadrata) te minimalnom i maksimalnom vrijednosti (T-oznake). Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,001 označena je s tri zvjezdice (***)

Po tjednima trudnoće statistički značajne p-vrijednost manje od 0,05 zabilježene su između 15. i 21., 17. i 20., 25. i 28. tpo, one manje od 0,01 između 13. i 28., 14. i 20., 19. i 20., 21. i 25., 21. i 26., 26. i 28. tpo, a $p < 0,001$ između 13. i 20., 13. i 21., 15. i 20., 20. i 23., 20. i 25., 20. i 26., 21. i 23, 23. i 28. tpo, a samo su one s $p < 0,001$ prikazane grafički (Slika 69).



Slika 69. Broj stanica (N) pozitivnih na RB1 biljeg po poprečno presječenom kanaliću normaliziran na ukupni broj stanica u kanaliću i njegov promjer u tjednima trudnoće. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom. Na grafu su označene samo najveće statistički značajne razlike s $p < 0,001$, a ostale navedene u tekstu.



Slika 70. Izraženost proteinskog produkta tumor supresora *RB1* u ljudskim sjemenicima u prvom (A), drugom (B) i trećem (C) tromjesečju, vizualizacija svjetlosnim mikroskopom. Uočava se sve najjače i najučestalije obojenje RB1-pozitivnih stanica (smeđe obojane) u drugom tromjesečju trudnoće. Pozitivno obojene stanice prisutne su izvan i unutar kanalića te u njihovoj stijenci u svim stadijima. Bojenje DAB-om, kontrastiranje hemalaun-eozinom. Povećanje x 400.

5.4.4. Izraženost RB1 proteina fosforiliranog na serinu 780 u ljudskom sjemeniku kroz stadije trudnoće

Biljeg RB1 proteina fosforiliran na serinu 780 (RB1Ser780) izražen je u jezgri, najčešće u zametnim stanicama, a u manjem broju i Sertolijevim i Leydigovim. Broj pozitivnih stanica po sjemenom kanaliću pokazao je pad prema kraju trudnoće, gledano po tromjesečjima, a po tjednima je najveći pad zabilježen u 19. tpo te prema kraju trudnoće (Slika 71 i 72, Tablica 27 i Tablica 28). Statistički značajne p-vrijednosti manje od 0,05 zabilježene su između 17. i 19., 21. i 26., tpo, one manje od 0,01 između 13. i 19., 15. i 19., 21. i 33., 19. i 28., tpo, a $p < 0,001$ između 13. i 26., 13. i 33., 15. i 26., 15. i 33., 17. i 26., 17. i 33., 23. i 26., 23. i 33. tpo. Samo one s $p < 0,001$ su prikazane grafički (Slika 72).

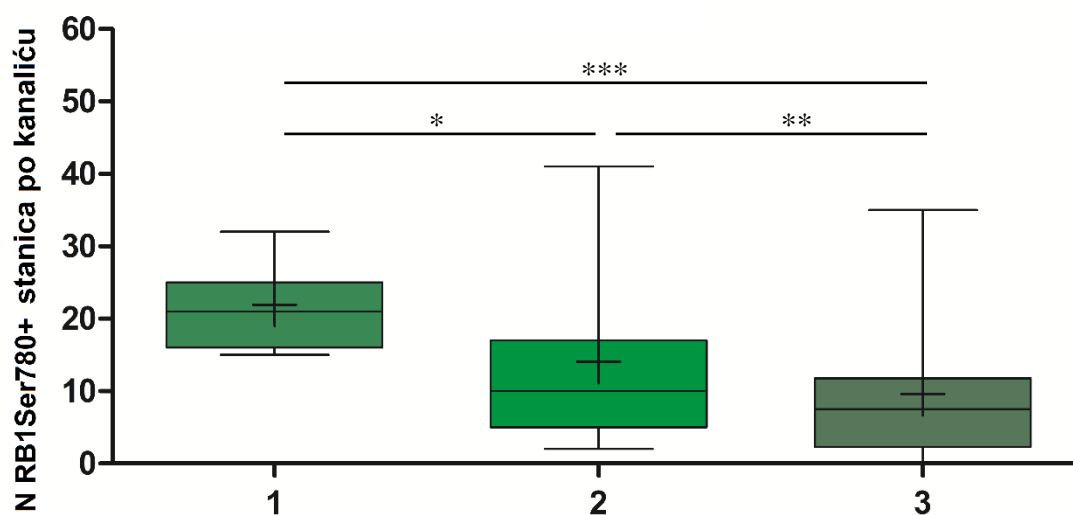
Vrijednosti korigirane ukupnim brojem stanica u kanaliću i promjerom kanalića pokazale su rast broja između 21. i 26. tpo, nakon jačeg pada u tjednima 20. i 21. (Slika 74, Tablica 28), što je vidljivo i u analizi po tromjesečjima (Slika 73, Tablica 27).

Tablica 27. Numerički izraženi medijani i interkvartilni rasponi izraženosti RB1Ser780 proteina po tromjesečjima trudnoće čovjeka.

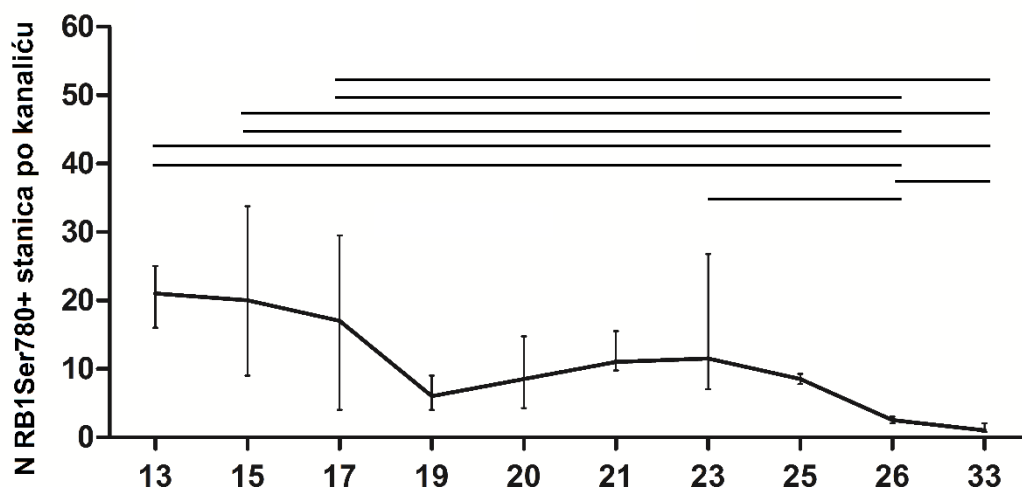
Broj RB1Ser780+ stanica po sjemenom kanaliću			
tromjesečje	1	2	3
Minimum	15	2	0
25 % percentila	16	5	2,25
Medijan	21	10	7,5
75 % percentila	25	17	11,75
maksimum	32	41	35
Broj RB1Ser780+ stanica po ukupnom broju stanica i po promjeru sjemenog kanalića			
tromjesečje	1	2	3
Minimum	0,6173	0,03704	0
25 % percentila	0,6315	0,1136	0,0935
Medijan	0,6698	0,2242	0,2302
75 % percentila	0,8369	0,3622	0,457
maksimum	0,9527	1,195	1,19

Tablica 28. Numerički izraženi medijani i interkvartilni rasponi izraženosti biljega RB1Ser780 po tjednima trudnoće.

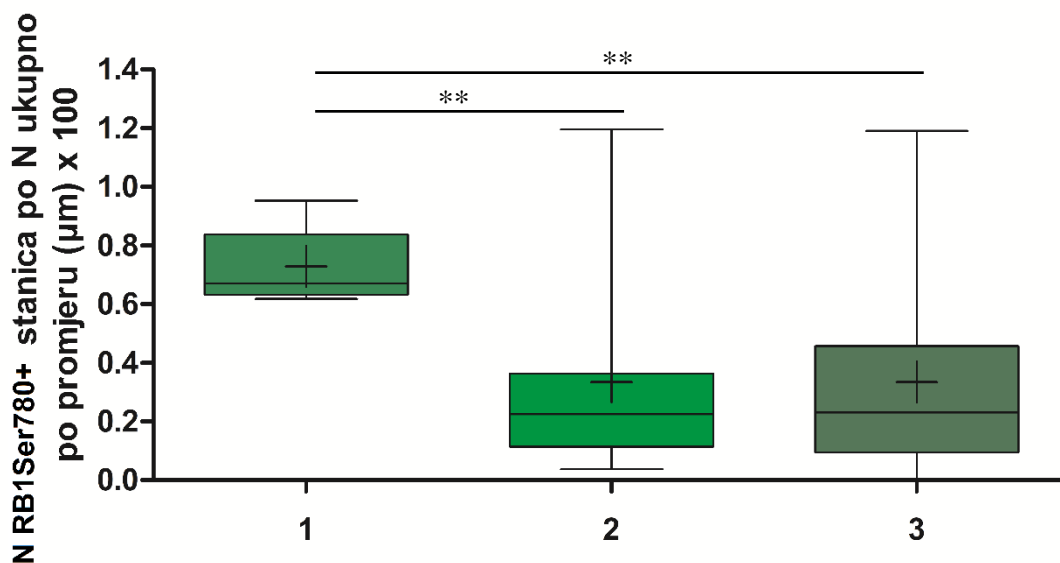
Broj RB1Ser780+ stanica po sjemenom kanaliću				Broj RB1Ser780+ stanica po ukupnom broju stanica i po promjeru sjemenog kanalića		
tjedan	25 % perc.	medijan	75 % perc.	25 % perc.	Medijan	75 % perc.
13	16	21	25	0,6315	0,6698	0,8369
15	9	20	33,75	0,2088	0,5547	1,018
17	4	17	29,5	0,09949	0,3098	0,6975
19	4	6	9	0,0958	0,1422	0,2042
20	4,25	8,5	14,75	0,08972	0,1490	0,2482
21	9,75	11	15,5	0,2314	0,2794	0,2961
23	7	11,5	26,75	0,2028	0,3571	0,8867
25	7,75	8,5	9,25	0,2937	0,3192	0,3798
26	2	2,5	3	0,07468	0,1139	0,1364
33	0,75	1	2	0,02604	0,05289	0,08015



Slika 71. Broj stanica (N) pozitivnih na RB1Ser780 protein po poprečno presječenom kanaliću u tromjesečjima trudnoće označenima s 1 (prvo), 2 (drugo) i 3 (treće tromjesečje). Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani medijanom (+), interkvartilnim rasponom (gornji i donji rub kvadrata) te minimalnom i maksimalnom vrijednosti (T-oznake). Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,05 označena je jednom (*), ona manja od 0,01 s dvije (**), a ona manja od 0,001 s tri zvjezdice (***)

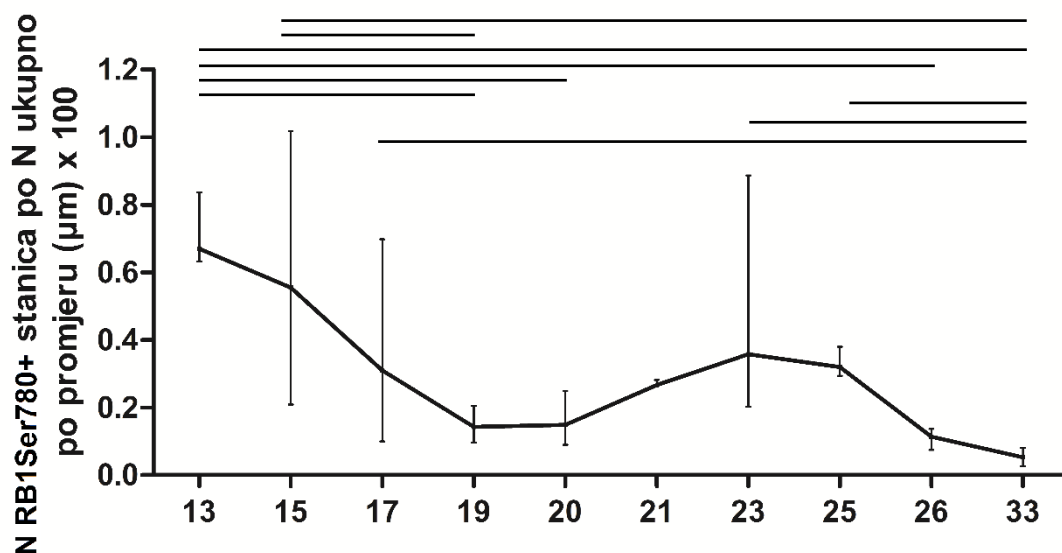


Slika 72. Broj stanica (N) pozitivnih na RB1Ser780 biljeg po poprečno presječenom kanaliću u tjednima trudnoće. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom. Na grafu su označene samo najveće statistički značajne razlike s $p < 0,001$, a ostale navedene u tekstu.

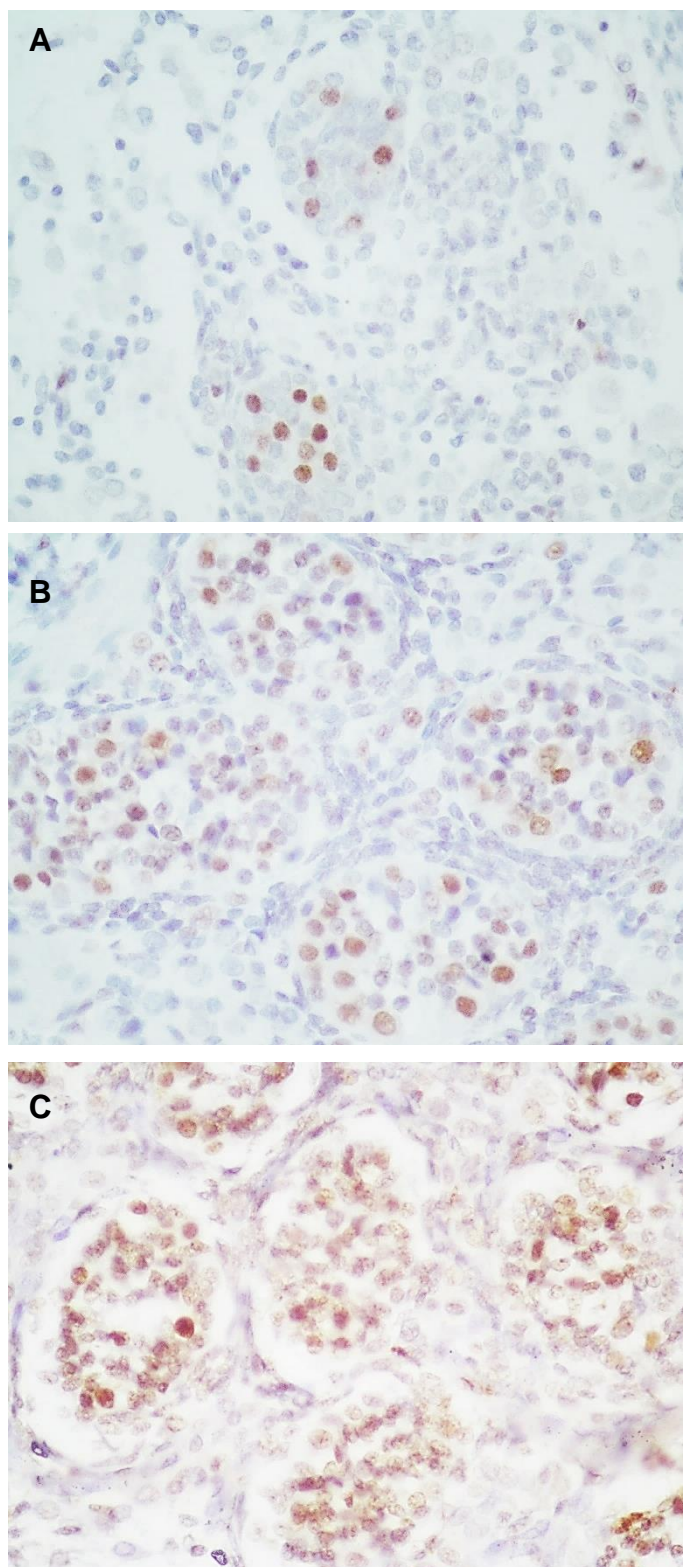


Slika 73. Broj stanica (N) pozitivnih na RB1Ser780 biljeg po poprečno presječenom kanaliću normaliziran na ukupni broj stanica u kanaliću i njegov promjer u tromjesečjima trudnoće označenima s 1 (prvo), 2 (drugo) i 3 (treće tromjesečje). Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani medijanom (+), interkvartilnim rasponom (gornji i donji rub kvadrata) te minimalnom i maksimalnom vrijednosti (T-oznake). Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,01 označena je s dvije zvjezdice (**).

Gledajući iste rezultate po tjednima trudnoće, statistički značajne p-vrijednost manje od 0,05 zabilježene su između 20. i 21., 21. i 33., one manje od 0,01 između 15. i 20., 15. i 26., 19. i 23., 23. i 26., a $p < 0,001$ između 13. i 19., 13. i 20., 13. i 26., 13. i 33., 15. i 19., 15. i 33., 17. i 33, 23. i 33., 25. i 33. tpo. Samo su one s $p < 0,001$ prikazane grafički (Slika 74).



Slika 74. Broj stanica (N) pozitivnih na RB1Ser780 biljeg po poprečno presječenom kanaliću normaliziran na ukupni broj stanica u kanaliću i njegov promjer u tjednima trudnoće. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Na grafu su označene samo najveće statistički značajne razlike s $p < 0,001$, a ostale navedene u tekstu.



Slika 75. Izraženost proteinskog produkta tumor supresora *RB1* fosforiliranog na serinu 780 (*RB1Ser780*) u ljudskim sjemenicima u prvom (A), drugom (B) i trećem (C) tromjesečju, vizualizacija svjetlosnim mikroskopom. Uočava se sve razlika u lokalizaciji i broju obojenih stanica među tromjesečjima. Pozitivno obojene stanice prisutne su unutar, a ponekad i izvan kanalića u svim stadijima. Bojenje DAB-om, kontrastiranje hemalaun-eozinom. Povećanje x 400.

5.4.5. Izraženost RB1 proteina fosforiliranog na serinu 795 u ljudskom sjemeniku kroz stadije trudnoće

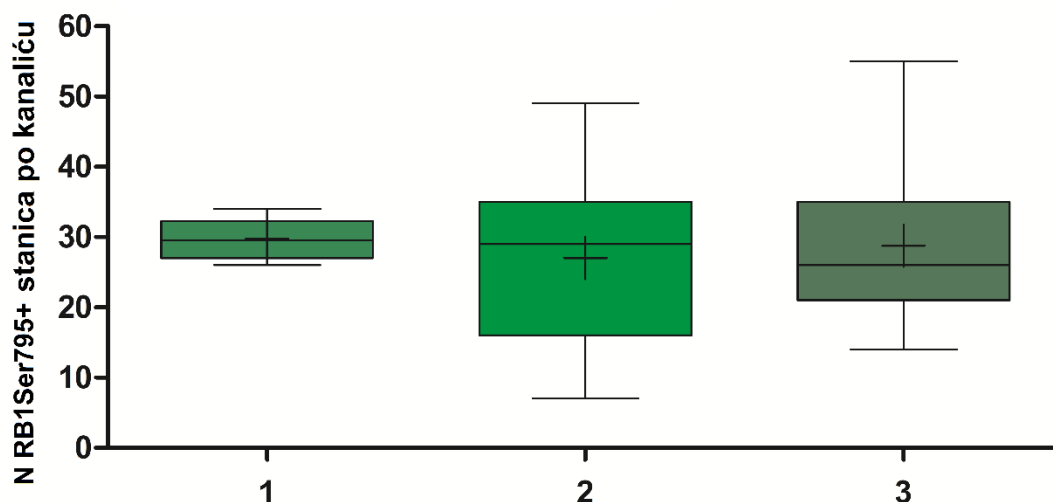
Biljeg RB1 proteina fosforiliran na serinu 795 (RB1Ser795) izražen je u jezgri, a često slabo i u citoplazmi zametnih stanica, Sertolijevih i Leydigovih. Gledano po tromjesečjima broj pozitivnih stanica po sjemenom kanaliću nije pokazao razliku, a po tjednima je najveći pad zabilježen u 20. i 21. tpo te skok vrijednosti u 23. tpo (Slika 76 i 77, Tablica 29 i Tablica 30). Statistički značajne p-vrijednost manje od 0,05 zabilježene su između 15. i 26., 15. i 33. tpo, one manje od 0,01 između 14. i 20., 14. i 21., 17. i 20., 17. i 21., 19. i 23., 23. i 26., 23. i 33. tpo, a $p < 0,001$ između 15. i 20., 15. i 21., 20. i 23., 21. i 23. tpo. Vrijednosti korigirane ukupnim brojem stanica u kanaliću i promjerom kanalića pokazale su pad vrijednost s najnižim iznosima 20. i 21. tpo, nakon čega raste u 23. tpo (Slika 79), a to se odražava i na analizu po tromjesečjima (Slika 78, Tablica 29).

Tablica 29. Numerički izraženi medijani i interkvartilni rasponi izraženosti RB1Ser795 proteina po tromjesečjima trudnoće čovjeka.

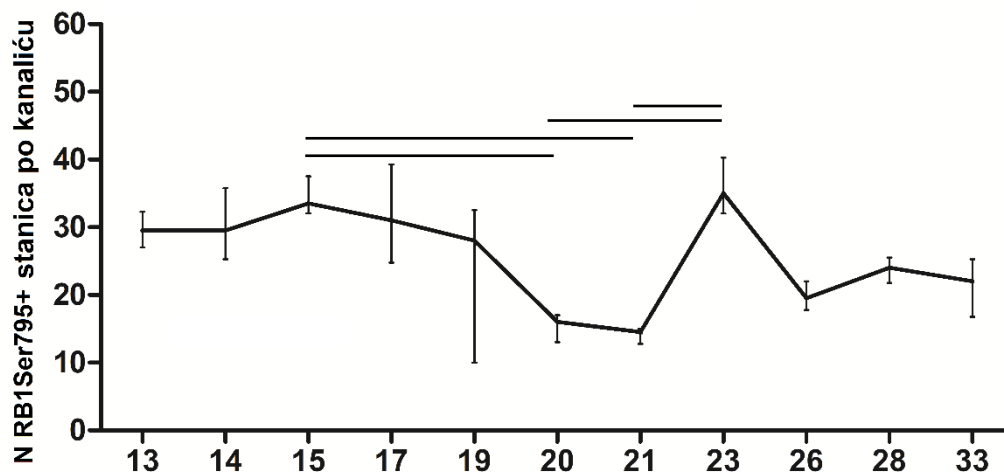
Broj RB1Ser795+ stanica po sjemenom kanaliću			
tromjesečje	1	2	3
minimum	26	7	14
25 % percentila	27	16	21
medijan	29,5	29	26
75 % percentila	32,25	35	35
maksimum	34	49	55
Broj RB1Ser795+ stanica po ukupnom broju stanica i po promjeru sjemenog kanalića			
tromjesečje	1	2	3
minimum	0,9333	0,1324	0,4767
25 % percentila	0,983	0,3587	0,7578
medijan	1,05	0,7503	0,9289
75 % percentila	1,108	0,9142	1,119
maksimum	1,128	1,097	1,667

Tablica 30. Numerički izraženi medijani i interkvartilni rasponi izraženosti biljega RB1Ser795 po tjednima trudnoće.

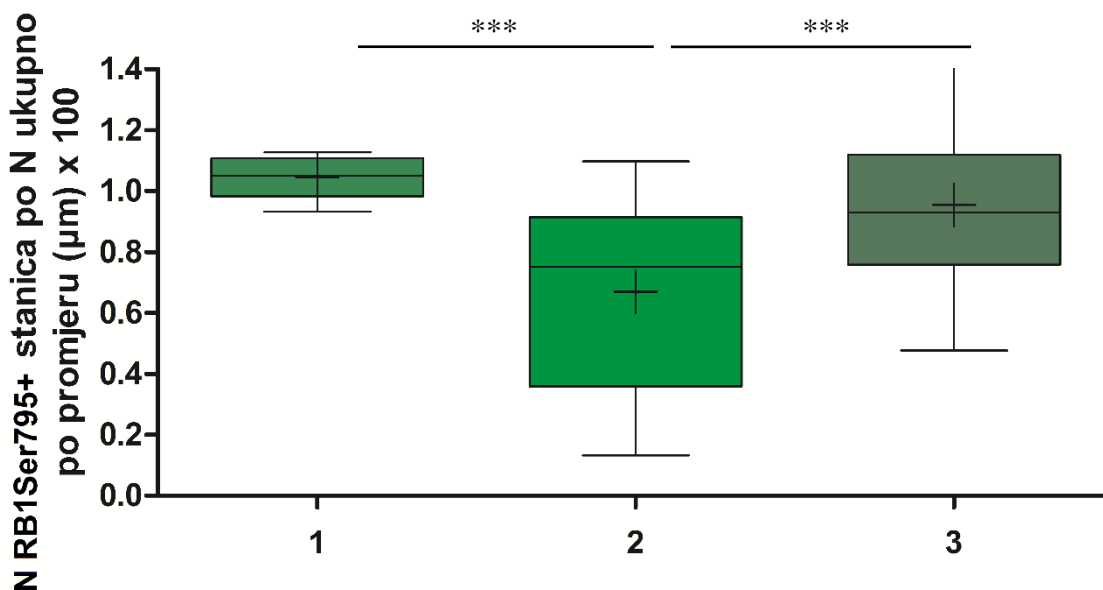
Broj RB1Ser795+ stanica po sjemenom kanaliću				Broj RB1Ser795+ stanica po ukupnom broju stanica i po promjeru sjemenog kanalića		
tjedan	25 % perc.	medijan	75 % perc.	25 % perc.	medijan	75 % perc.
13	27	29,5	32,25	0,983	1,05	1,108
14	25,25	29,5	35,75	0,885	0,9427	1,001
15	32	33,5	37,5	0,8929	0,9152	0,965
17	24,75	31	39,25	0,3861	0,7397	0,9145
19	10	28	32,5	0,2398	0,6457	0,7501
20	13	16	17	0,2043	0,2369	0,2882
21	12,75	14,5	15	0,2469	0,292	0,3985
23	32	35	40,25	0,9187	1,061	1,25
26	17,75	19,5	22	0,7388	0,8789	0,9765
28	21,75	24	25,5	0,5586	0,6276	0,677
33	16,75	22	25,25	0,7996	0,9112	1,024



Slika 76. Broj stanica (N) pozitivnih na RB1Ser795 protein po poprečno presječenom kanaliću u tromjesečjima trudnoće označenima s 1 (prvo), 2 (drugo) i 3 (treće tromjesečje). Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani medijanom (+), interkvartilnim rasponom (gornji i donji rub kvadrata) te minimalnom i maksimalnom vrijednosti (T-oznake). Nema statistički značajne razlike među grupama ($p=0.7472$).

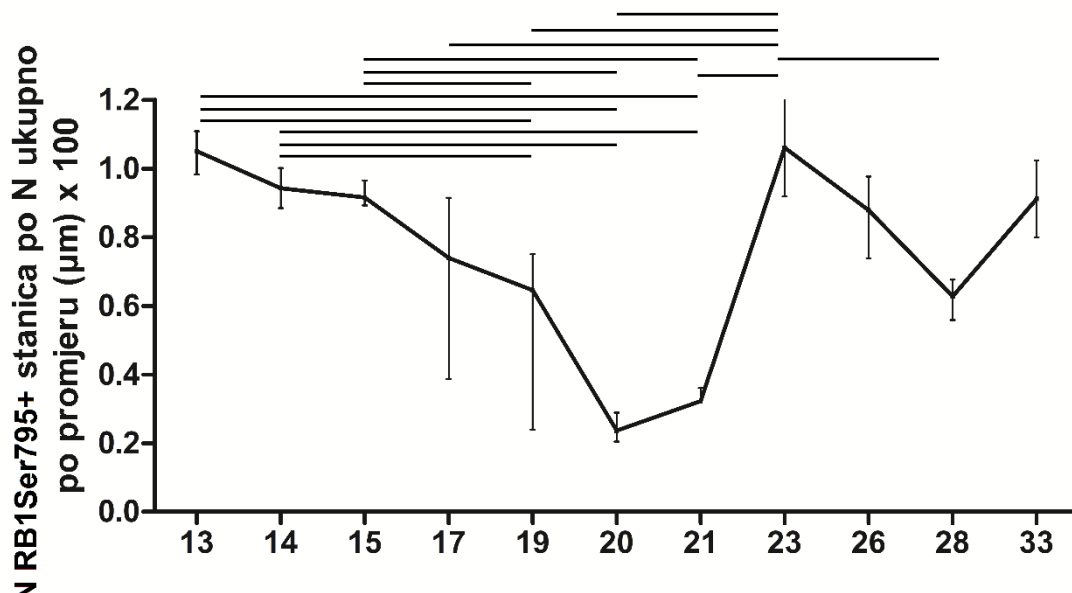


Slika 77. Broj stanica (N) pozitivnih na RB1Ser795 biljeg po poprečno presječenom kanaliću u tjednima trudnoće. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom. Na grafu su označene samo najveće statistički značajne razlike s $p < 0,001$, a ostale navedene u tekstu.

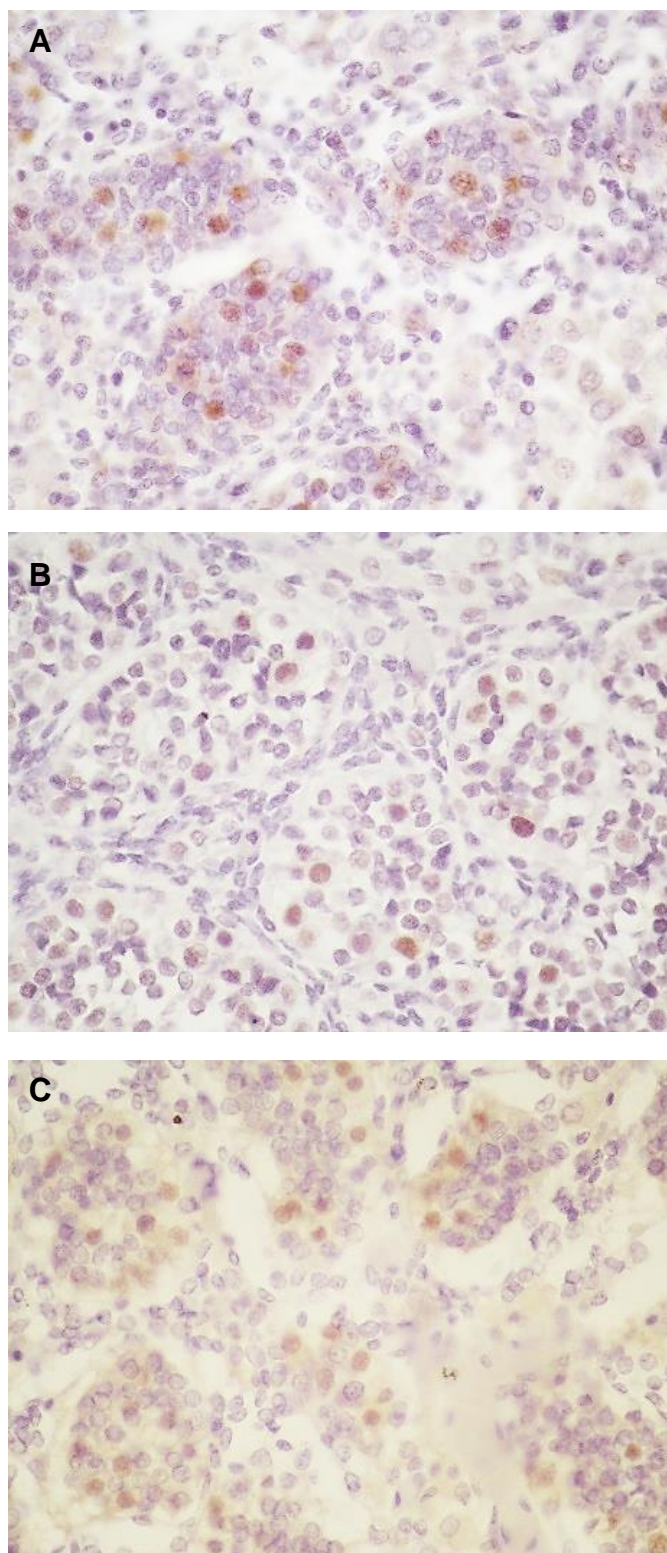


Slika 78. Broj stanica (N) pozitivnih na Rb1Ser795 biljeg po poprečno presječenom kanaliću normaliziran na ukupni broj stanica u kanaliću i njegov promjer u tromjesečjima trudnoće označenima s 1 (prvo), 2 (drugo) i 3 (treće tromjesečje). Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani medijanom (+), interkvartilnim rasponom (gornji i donji rub kvadrata) te minimalnom i maksimalnom vrijednosti (T-oznake). Statistički značajna p-vrijednost manja od 0,001 označena je s tri zvjezdice (***)

Analiza po tjednima imala je statistički značajne p-vrijednost manje od 0,05 zabilježene između 21. i 26., 21. i 33. tpo, one manje od 0,01 između 13. i 17., 13. i 28., 20. i 26., 20. i 33. tpo, a $p < 0,001$ između 13. i 19., 13. i 20., 13. i 21., 14. i 19., 14. i 20., 14. i 21., 15. i 19., 15. i 20. 15. i 21., 17. i 23., 19. i 23., 20. i 23., 21. i 23., 23. i 28. tpo.



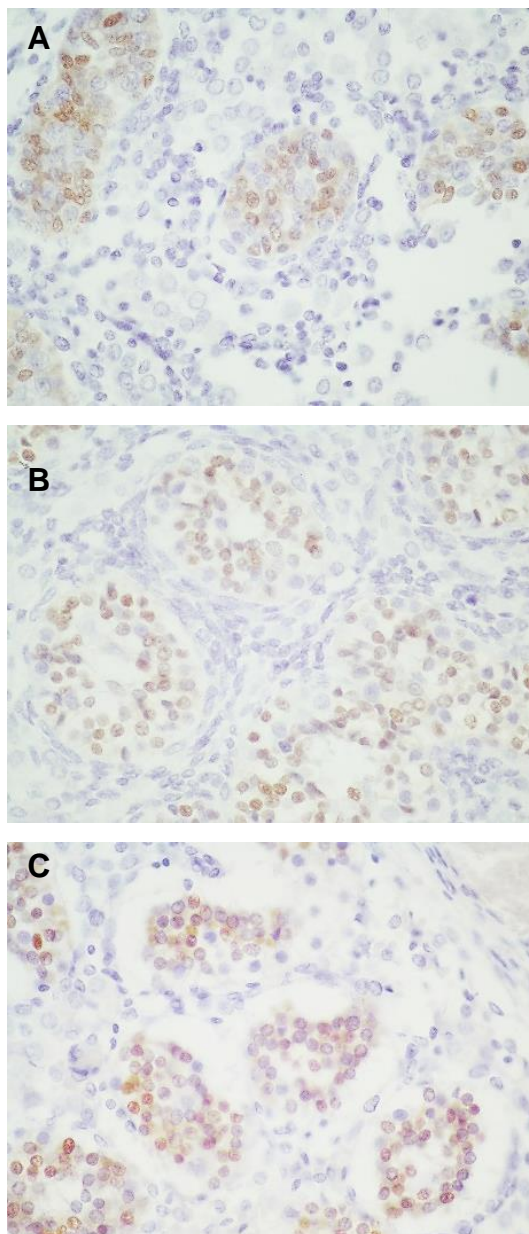
Slika 79. Broj stanica (N) pozitivnih na RB1Ser795 biljeg po poprečno presječenom kanaliću normaliziran na ukupni broj stanica u kanaliću i njegov promjer u tjednima trudnoće. Kruskal-Wallis test s Dunnovim testom višestrukih usporedbi. Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom. Na grafu su označene samo najveće statistički značajne razlike s $p < 0,001$, a ostale navedene u tekstu.



Slika 80. Izraženost proteinskog produkta tumor supresora *RB1* fosforiliranog na serinu 795 (*RB1Ser795*) u ljudskim sjemenicima u prvom (A), drugom (B) i trećem (C) tromjesečju, vizualizacija svjetlosnim mikroskopom. Uočava se sve razlika u lokalizaciji i broju obojenih stanica među tromjesečjima. Pozitivno obojene stanice prisutne su unutar, rijetko i izvan kanalića u svim stadijima. Bojenje DAB-om, kontrastiranje hemalaun-eozinom. Povećanje x 400.

5.4.6. Izraženost SOX9 proteina u ljudskom sjemeniku kroz stadije trudnoće

Da bismo razlučili Sertolijeve stanice od zametnih stanica u fetalnom sjemeniku koristili smo SOX9, biljeg Sertolijevih stanica. SOX9 kontinuirano je izražen od embrionalnog razdoblja te je jasno signalizirao smještaj Sertolijevih stanica isključivo unutar sjemenih kanalića. U usporedbi sa štakorskim sjemenicima, nije se uočio pravilan smještaj Sertolijevih stanica uz rub kanalića, nego je daleko više heterogen. (Slika 81).



Slika 81. Izraženost SOX9 biljega u Sertolijevim stanicama ljudskih sjemenika u prvom (A), drugom (B) i trećem (C) tromjesečju, vizualizacija svjetlosnim mikroskopom. Pozitivno obojene stanice prisutne su samo unutar kanalića u svim stadijima. Bojenje DAB-om, kontrastiranje hemalaun-eozinom. Povećanje x 400.

6. RASPRAVA

Rasvjetljavanje uzroka muške neplodnosti (uključujući neplodnost uslijed liječenja tumora sjemenika) izrazito je važan predmet istraživanja, s obzirom da je incidencija muške neplodnosti i tumora sjemenika u porastu među zapadnjačkom populacijom (1). Uz sve uložene napore, oko 15 % svih uzroka neplodnosti parova ostaje nerazjašnjeno (1). Temeljem znanja o epigenetskom ishodištu tumora, starenja i imunoloških bolesti (4, 5), pretpostavlja se da dio uzroka muške neplodnosti leži u poremećenoj epigenetskoj regulaciji, koja se može odviti već u ranom fetalnom razvoju (6). Polazna točka za rasvjetljavanje molekularnih mehanizama najčešće su životinjski modeli, uglavnom glodavci (2), dok su u istraživanjima na čovjeku posebno vrijedni kvalitetni svježi uzorci sjemenika odraslih muškaraca s poremećenim nalazima spermograma (3). Fetalni razvoj sjemenika čovjeka je nedovoljno istražen zbog rijetkosti ovakvih uzoraka, pa su istraživanja na ovom materijalu koja su provedena u ovoj disertaciji od posebnog značaja.

Mnoga istraživanja provedena, kako na životinjama, tako i na ljudima, ukazala su na utjecaj okolišnih čimbenika (epigenatora) na plodnost jedinke putem epigenetskih mehanizama kontrole gena. U životinja je moguć eksperimentalni pristup u kontroliranim uvjetima (214), a za razliku od toga, saznanja o utjecaju epigenetskih promjena na ljudske jedinke dobivena su najčešće u retrospektivnim studijama, nakon katastrofa, stanja izrazitog stresa ili presječnim istraživanjima karakteristika neplodnih ispitanika i njihovih bioloških parametara (337). Poznavajući način na koji okolišni čimbenici, odnosno epigenatori mogu mijenjati genski izražaj (4, 5), odavno se pretpostavilo da mogu poremetiti razvoj embrija ili fetusa, kada je neometana epigenetska regulacija od presudne važnosti. Tako se i značajan udio uzroka neplodnosti i tumora spolnog sustava povezuje s poremećajima epigenetičke regulacije tijekom prenatalnog života.

Istraživanja ljudskih zametnih stanica fetalne dobi značajno su ograničena zbog male količine dostupnog materijala pa se znanje o razvoju embrija i fetusa crpilo većinom iz uzoraka Carnegie zbirke (15). Ipak, tijekom godina došlo je do porasta istraživanja genskog izražaja i mehanizama epigenetske regulacije u sjemenicima ljudi i glodavaca (7, 154, 165, 180, 195, 319). U gotovo svakom istraživanju provedenom na uzorcima sjemenika čovjeka broj uzoraka je ograničavajući faktor, dok je kvaliteta uzoraka različita jer ovisi o zakonima država u kojima se istraživanje provodi. U posljednjih nekoliko godina uspjele su se provesti čak i funkcionalne studije ili studije vizualizacije modernim tehnikama (338), iako su ti podaci nedovoljni za

statističku obradu i prijenos na opću populaciju (10, 153). Danska, Kalifornija (SAD), Kina i Velika Britanija neke su od zemalja u kojima je, uz etičku dozvolu, dopušteno uzeti svježe tkivo embrija ili fetusa nakon pobačaja (10, 116, 117, 339). Time se proširuje mogućnost analize tkiva metodama koje se ne mogu provesti iz uzoraka koji su bili fiksirani i uklopljeni u parafin kao što su *in vitro* istraživanja na tkivima ljudskog fetalnog sjemenika uzgojenog u kulturi pod utjecajem različitih molekula (116, 339).

Više studija analizirale su epigenetičke promjene ljudskih primordijalnih i fetalnih zametnih stanica tijekom trudnoće (149, 151, 153) i pokazale su važnost zaustavljanja staničnog ciklusa zametnih stanica prije razdoblja *de novo* uspostavljanja spolnospecifičnih metilacijskih obrazaca (10, 63). Nekoliko studija istraživale su epigenetičke promjene u zametnim stanicama štakora, u kojima se karakteristično iste promjene odvijaju sinkrono (7, 9, 271), slično kao u miša (146, 150, 285, 340).

U svim istraživanjima do sada provedenim na fetalnim sjemenicima, nije se u potpunosti razjasnila regulacija izražaja *RBI* gena putem metilacije promotora, koji je jedan od glavnih regulatora staničnog ciklusa, kao ni uloga njegovih fosforiliranih i nefosforiliranih proteinskih produkata koji redom potiču ili zaustavljaju stanični ciklus. Također, analiza metilacije *LINE-1* ponavljajućih sekvenci te gena *H19* i *RBI* nisu se provele pirosekvenciranjem na ljudskim fetalnim tkivima, a na štakorskim samo djelomično (9).

Tijekom izrade ove disertacije, usporedno su se provele iste analize na fetalnom sjemeniku štakora i čovjeka tijekom razvoja, uključujući razdoblje uspostavljanja *de novo* DNA metilacijskih oznaka i prethodnog zaustavljanja staničnog ciklusa, kako bi se dobio uvid u dinamiku i kvalitetu tih promjena što je potrebno kao baza za daljnja istraživanja molekularnih mehanizama neplodnosti.

6.1. DNA metilacija u fetalnom tkivu sjemenika štakora

DNA metilacija presudan je mehanizam u oblikovanju genoma sisavaca kako bi se razvile jedinke sposobne za održavanje vrste, a tijekom specifikacije zametnih stanica epigenetičko reprogramiranje opsežno mijenja DNA metilacijske obrasce na spolnospecifičan način. Dok je broj istraživanja dinamike promjena DNA metilacije na mišu velik (146, 150, 340, 341), postoji samo nekoliko istraživanja epigenetičkih promjena imunohistokemijskim metodama na štakorskim zametnim stanicama (7, 166, 342), od kojih samo jedno analizira tkiva pirosekvenciranjem DMR regije gena *H19* (9). Rezultati ove disertacije obuhvatili su nešto širi

i detaljnije vremensko razdoblje štakorske trudnoće, od 16.5 dpc (engl. *days post coitum*) do dana pred okot, 21.5 dpc.

Dosadašnje spoznaje ukazuju na to da se u razdoblju od 19.5 do 20.5 dpc počinje odvijati *de novo* metilacija te završava nekoliko dana poslije okota (8, 9), no postoje studije koje ukazuju na raniji početak *de novo* DNA metilacije oko 15 dpc (166, 342). Do sada je kontrola aktivnosti proteinskog produkta *LINE-1* (engl. *Long INterpersed Element-1*) retrotranspozona detektirana samo u tkivu sjemenika fetalnog i odraslog štakora protutijelom (342, 343), gdje je nađen jak izražaj. Po našim saznanjima, u disertaciji su dobiveni prvi rezultati analize metilacijskog statusa *LINE-1* ponavljajućih sekvenci u tkivu fetalnog sjemenika štakora. Tri odabrana CpG otoka te njihove prosječne vrijednosti pokazale su kontinuirani, statistički značajan porast postotka metilacije *LINE-1* ponavljajućih sekvenci do 19.5 dpc, kada se dosegao plato vrijednosti koje se održavaju do dana okota, što je u skladu s dostupnom spomenutom literaturom te istraživanjima na mišjim zametnim stanicama. Naime, u mišjim fetalnim sjemenicima većina retrotranspozona i satelitnih sljedova DNA se *de novo* metilira do 18.5 dpc (341), a za očekivati je da će u štakorskom tkivu zbog dužeg trajanja trudnoće to odgovarati 19.5 ili 20.5 dpc. Ipak, postoje evolucijski mlađi *LINE-1* sljedovi koji uspijevaju izbjeći *de novo* metilaciju putem DNMT enzima te stvaraju prijetnju genomskom integritetu stanice. Ipak, takvi transpozonski sljedovi se ipak utišavaju, odnosno metiliraju putem PIWI proteina i piRNA vezanih na specifična mjesta retrotranspozona (230). Rezultati disertacije pokazuju statistički značajan porast prosječne metilacije *LINE-1* ponavljajućih sljedova do 19.5 dpc, a do kraja trudnoće porast postoji, no vrlo je blag (Slika 8), što može ukazivati na naknadnu metilaciju retrotranspozona PIWI proteinima i piRNA. Gotovo se ista krivulja dobiva gledajući svaki analizirani CpG zasebno (Slike 9 - 11). Blage razlike su vidljive u početnoj i krajnjoj vrijednosti dobivenih rezultata. CpG3 pokazuje postotak metilacije na dan okota od gotovo 100%, a i ostale vrijednosti DNA metilacije niti u jednom analiziranom CpG mjestu ne padaju ispod 60 % u 16.5 dpc, što pokazuje važnost visokog udjela metiliranosti ovih potencijalno opasnih ponavljajućih sljedova.

U čovjeka i miša poznat je velik broj utisnutih gena (129 za čovjeka i 149 za miša), dok ih u štakora ima ukupno 14 (185, 186). Nekoliko gena je među spomenutim vrstama izražena na isti način, s obzirom na utišavanje očevog ili majčinog alela. Tako su čovjeku, mišu i štakoru zajedničko utiskivanje gena *Peg3*, *Igf2*, *Rtl1*, *Dio3*, *Dlk1* i *Rasgrf1* s majčine (a izraženost s očeve strane) te *H19*, *Rian/MEG8*, *Dio3os* i *Gtl2/MEG3* s očeve strane. *H19* gen je predstavnik utisnutih gena po očevoj liniji. Mišji ICR (engl. *imprinted control region*) gena *H19* je regija

koja regulira gensku izraženost ovisno o metilacijskom statusu ICR-a (187, 188, 344). Evolucijski je sličan štakorskom, što se detaljno prikazalo u Amarger i sur. (333), po čijem radu su i dizajnirane početnice korištene pri analizi tkiva. Treba istaknuti da je *de novo* metilacija utisnutih gena u sjemeniku štakora istraživana u samo jednoj studiji analizom metilacijskih promjena u razdoblju od 16.5 dpc do 3 dana poslije okota, gdje je pokazan najveći porast metilacije DNA u postnatalnom razdoblju (9). Spomenuta studija koristila je metodu pirosekvenciranja, kao i u ovoj disertaciji, no analizirane sekvence DMR regije razlikuju se od one korištene u ovom radu te su smještene nešto više uzvodno prema DMR regiji *Igf2* gena (345). Rezultati ove disertacije analizirali su promjenu postotka DNA metilacije sedam CpG mjesta unutar DMR regije (engl. *differentially methylated region*) na uzorcima fetalnih štakorskih sjemenika pirosekvenciranjem. Prosječna metilacija te CpG mjesta 1, 2 i 6 pokazala su porast vrijednosti do 17.5 - 18.5 dpc s daljnjim zadržavanjem platoa postotka metilacije. Postoci metilacije uglavnom su se kretali između 40 - 60% (Slike 12 - 17), što odgovara zbirnim vrijednostima za zametne i Sertolijeve stanice u razdoblju koje se preklapa između spomenute studije u kojoj se analiza radila pirosekvenciranjem (9) i ove disertacije.

DNA metilacija *LINE-1* sljedova predstavlja razinu globalne metilacije genoma te se značajno razlikuje u zametnim i somatskim stanicama, jer je u potonjim rano i izrazito utišan, dok u zametnim stanicama ima drukčiju dinamiku (346). Zbog toga dobiveni porast razine metilacije *LINE-1* sljedova možemo pripisati porastom u zametnim stanicama. Utisnuti gen *H19* osjetljiv je indikator vanjskih utjecaja sposobnih mijenjati epigenetički status (202). Rezultati razine metilacije gena *H19* iz pročišćenih zametnih stanica dali bi detaljnije informacije no, s obzirom na to da je „onečišćenje“ somatskim stanicama kontinuirano te se promjene u razinama također mogu pripisati zametnim stanicama, jer somatske stanice imaju obrazac metilacije *H19* ostvaren prije razdoblja trudnoće istraživanih u ovom radu.

6.2. Proliferacija i izražaj RB1 proteina i njegovih fosforiliranih formi proteina u fetalnom tkivu sjemenika štakora

U nekoliko istraživanja analizirala se proliferacija stanica sjemenika glodavaca (271, 286, 287, 347), a rezultati ovog rada poklapaju se s najdetaljnijim prikazom nađenim u literaturi (271) jer oba pokazuju da gonocite štakora ulaze u stanje mirovanja oko 17.5 dpc te gotovo niti jedna gonocita ne proliferira (tj. nije Ki-67-pozitivna) u 19.5. dpc. S druge strane, dobiveni rezultati pokazuju da se broj proliferirajućih Sertolijevih stanica blago se počinje povećavati u

17.5 dpc te u 19.5 dpc čini ukupan broj stanica pozitivnih na Ki-67 u štakorskom sjemeniku (Slike 24 - 26). Dobivena deskriptivna opservacija ne poklapa se u potpunosti s poznatom literaturom. Naime, po Angelopoulou i sur. proliferacija Sertolijevih stanica u štakora povećava se do 18.5 dpc, a smanjuje do 20.5 dpc te ponovo raste do 7 dpp (98), no u tom radu koristio se Wistar soj štakora koji ima trudnoću dulju za 1 - 2 dana od soja Fischer, na kojem su se izvele analize za disertaciju.

U ovom radu ukupan broj Ki-67-pozitivnih stanica bio je manji nego u radu Nunes i sur. (271), što možemo pripisati drugom soju štakora ili različitom protutijelu, s obzirom na to da u radu nije navedena ni razlika u epitopu protutijela ni njegova specifičnost. Također, autori radova koji analiziraju proliferaciju stanica sjemenika koristili su različite metode brojenja stanica: proliferacijski indeks (broj pozitivnih i ukupnog broja stanica u kanaliću) (287), numeričku gustoću (347) ili nisu detaljno naveli kakav omjer su koristili (271). Rezultati doktorske disertacije uključuju rast broja stanica po kanaliću te promjer kanalića u kvantifikaciju pozitivno obojenih stanica, kako bi se dobio rezultat neovisan o histološkim parametrima te time donekle modificira rezultate. S obzirom na to da oba parametra rastu od 16.5 do 19.5 dpc, a zatim blago padaju (Slika 21 i 22), snižavaju broj stanica pozitivnih na Ki-67 (Slika 25) do 20.5 dpc. Navedena se analiza provela kao standardna i dobro poznata metoda obilježavanja stanica koje su u S-fazi staničnog ciklusa, radi bolje kontekstualizacije izražaja specifičnog regulatora staničnog ciklusa, RB1.

Nunes i sur. također su analizirali RB1 u uzorcima sjemenika štakora i pokazali izražaj RB1 u gonocitama 15 dpc, nešto niži 17 dpc, dok izražaja nije bilo u 19 dpc, a u Sertolijevim stanicama RB1 nije prisutan u niti jednom navedenom stadiju (271). S obzirom na izražaj toga proteina, rezultati ovog rada malo se razlikuju, iako prate trend pada broja pozitivnih stanica. U disertaciji najniži izražaj RB1 proteina bio je 18.5 dpc, dok se od 19.5 dpc do kraja trudnoće uočava blagi porast vrijednosti RB1-pozitivnih stanica (Slike 27 - 29), a čine ih i Sertolijeve i zametne stanice (Slika 29). Zbog korištenog načina brojanja pozitivnih signala, zanemarila se razlika u jačini intenziteta smeđe obojenosti (334, 335) (Slika 29). Razlike u dobivenim rezultatima mogu se objasniti drugim sojem ili epitopom protutijela, kao i za Ki-67.

Do sada u literaturi nije opisan izražaj zasebnih fosforiliranih formi RB1 proteina u stanicama fetalnog sjemenika štakora. U odrasle jedinke provedena je zbirna analiza svih fosforiliranih formi RB1 te je nađen vrlo jak izražaj RB1 u spermatogonijama te jezgreno obojenje Sertolijevih stanica na epitop RB1 proteina 300-380 (prepoznaje hipo- i jako

hiperfosforilirane forme RB1 proteina), ovisno o fazi spermatogeneze (348) te je to dovedeno u vezu s oscilacijama razine androgena.

Poznato je da je RB1 hipofosforiliran u stanicama u fazi mirovanja, a fosforilira se na serinu 780 i 795 uz pomoć CDK4/CDK6 tijekom srednje i kasne G1 faze (349). Rezultati disertacije ukazali su na sličan izražaj RB1 proteina fosforiliranog na serinu 780 i 795 u fetalnom sjemeniku. Izražaj oba biljega raste do 19.5 dpc, a zatim blago pada (Slike 30 i 33), iako s različitom strminom krivulje rasta. S obzirom na to da ukupan broj stanica po kanaliću i promjer kanalića rastu do 19.5 dpc, a zatim blago padaju (Slika 21 i 22), uključivanje tih parametara u izračun pozitivno obojenih stanica modificira rezultate i prikazuje ih kao relativni pad. Razlika u strmini pada izražaja RB1 proteina fosforiliranog na serinu 780 i 795 može se pripisati razlikama u dinamici fosforilacije i defosforilacije pri izlasku stanice iz stanja mirovanja staničnog ciklusa, s obzirom na to da su različite fosforilacije aktivne kroz različite faze staničnog ciklusa (npr. fosforilacija serina 795 jedna je od prvih modifikacija RB1 proteina do koje dolazi u G1 fazi staničnog ciklusa) (249). Kvalitativna analiza ukazuje da su pozitivno obojene i Sertolijeve i zametne stanice na oba protutijela. Ipak, naglašena je razlika u izgledu obojenosti: dok je izražaj RB1Ser780 više homogen i ravnomjerno raspoređen unutar jezgre (Slika 32), signal u RB1Ser795-pozitivnim stanicama zrnat je, vjerojatno vezan na određene dijelove DNA u jezgri (Slika35) te ima veći ukupni broj pozitivno obojenih stanica (Slika 33).

Istraživanje SOX9 biljega Sertolijeve stanice služilo je za potvrdu njihovog smještaja tijekom razvoja unutar sjemenih kanalića i usporedbu s izražajem i smještajem u ljudskim fetalnim sjemenicima (vidi 6.4.). U sjemenicima štakora Sertolijeve stanice već od 16.5 dpc zauzimaju periferno mjesto, uz rub sjemenih kanalića, samo što napredovanjem razvoja i sazrijevanjem mijenjaju oblik od plosnatih do trokutastih stanica spremnih za opskrbu zametnih stanica u daljnjih stadijima razvoja (Slika 36). U tom procesu sudjeluje i RB1 kao jedan od najvažnijih proteina u krajnjoj diferencijaciji Sertolijeve stanice (269).

Dobiveni rezultati imunohistokemijske analize štakorskih sjemenika sveobuhvatno pokazuju dinamiku proliferacije i dinamike staničnog ciklusa u populacijama stanica kanalića štakorskog sjemenika. Daljnja istraživanja mogla bi se usmjeriti na ulogu RB1Ser780 i RB1Ser795 specifičnu za sjemenik u fetalnom razvoju, npr. utjecajem ciljanog ometanja ili utišavanja tih fosforilacija na razvoj sjemenika i plodnost štakora.

6.3. DNA metilacija u fetalnom tkivu sjemenika čovjeka

DNA metilacija gena u fetalnim tkivima zaista je neistraženo područje zbog razloga navedenih u početku rasprave. Ova disertacija uključila je analizu *LINE-1* ponavljajućih sljedova, DMR regije *H19* i *RB1* gena. Potonjem genu analizirala se metiliranost zbog njezine uloge u zaustavljanju izražaja RB1 proteina. Niti jedan gen nije pokazao razliku u metiliranosti između tromjesečja trudnoće (Slika 37, 45 i 50). Ipak, uočivši veliku razliku u minimalnim i maksimalnim vrijednostima, analize su se provele i po tjednima, radi moguće dinamike DNA metilacije ovisne o tjednima trudnoće.

LINE-1 su podvrsta retrotranspozona, pokretnih genetičkih elemenata koji se transponiraju putem RNA intermedijera i utječu na regulaciju izražaja gena. Njihova pravovremena metilacija sprječava njihovo širenje po genomu umetanjem u genomski slijed što bi moglo dovesti i do muške neplodnosti (218). Iako se većina *LINE-1* sekvenci utišava u somatskim stanicama epigenetskim i posttranskripcijskim (222, 223) mehanizmima, kao što su CpG metilacija *LINE-1* i utišavanjem potaknutim malim interferirajućim siRNA te dr., na transgeničnim životinjama je pokazano kako dio *LINE-1* sljedova izbjegne utišavanje te se njihova aktivnost može uočiti u ranim embrionalnim stadijima te zametnim stanicama (225, 229). Kako bi se spriječila mutageneza uzrokovana transpozonomima, PIWI (engl. *P-element-induced wimpy testis*) proteini i piRNA preuzimaju *de novo* DNA metilaciju na retrotranspozonskim sljedovima (230).

Analizirana sekvenca, odabrana iz literature prema Daskalos i sur. (330), sadrži šest CpG mjesta. Analizirajući po tjednima trudnoće, najučestalija statistički značajna visoka razina DNA metilacije nalazila se u 20. tjednu trudnoće, gotovo na svim CpG mjestima te u prosječnim vrijednostima. Niska razina DNA metilacije na svim analiziranim CpG mjestima bila je prisutna u uzorcima dvanaestogodišnjaka, u pubertetu, vjerojatno početkom spermatogeneze. Po nedavnim istraživanjima, neke od histonskih modifikacija navode se kao važni prateći mehanizmi utišavanja retrotranspozona u spermijima. Tako je H4K20me3 izrazito pojačan na područjima heterokromatina u kojem se nalaze *LINE-1* sljedovi u ljudskim spermijima (350), a provodi se specifičnim histonskim metiltransferazama KMT5A, KMT5B i KMT5C.

Ukupno je razina DNA metilacije *LINE-1* sljedova bila dosta visoka, između 60 i 80 %, u prosjeku (Slike 38 - 44). Mogući uzrok izostanka strmih porasta postotka metilacije je opasnost mutagenog potencijala *LINE-1* sljedova i nužnosti da se iste utišaju u ranijim stadijima trudnoće od onih istraživanih u ovom radu, s obzirom na to da je pojačan izražaj proteina

kodiranih *LINE-1* sljedovima nađen u tumorima zametnih stanica dječje dobi, koji su često rezultat poremećaja epigenetičke regulacije zametnih stanica u embrionalno doba (346, 351). Također, s obzirom na to da je dinamika utišavanja retrotranspozona različita u somatskim i zametnim stanicama, a s obzirom na to da su se u radu analizirala cijela tkiva, nije moguće sa sigurnošću prepoznati razlike specifične za tip stanice, iako se sam porast razine metilacije može pripisati promjenama u zametnim stanicama jer je za njih postoji karakterističan obrazac metilacije.

U javanskog makakija analiza DNA metilacije od neonatalnog do odraslog razdoblja putem izražaja 5mC pokazano je progresivno uspostavljanje *de novo* metilacije postnatalno koje se nastavlja do odraslog razdoblja te ostaje stabilno (177).

Izražaj DNMT3a i 3b prisutan je u nekim fetalnim zametnim stanicama štakora 17.5 i 21.5 dpc, javanskog makakija 98 i 110 dpc te čovjeka 14. i 19. tpo (178), dok su najviše razine DNMT3a i DNMT1 u ljudskom fetalnom sjemeniku nađene su u 22. tpo, a visoke između 21. i 23. tpo (179), po čemu možemo pretpostaviti da se baš u to vrijeme DNA prespermatogonija remetiliraju te se odvija genomska utiskivanje po očevom obrascu (vidi dalje). Niske razine metilacije muških PGC održavaju se barem do 19. tpo (153). Imunohistokemijsko bojenje 5-metilcitozinom pokazalo je da se gonocite ljudskih fetalnih sjemenika između 20. i 40. tjedna trudnoće nisu pozitivne, dok je signal u Sertolijevim stanicama srednje pozitivan (180).

U miša, tijekom daljnje spermatogenične diferencijacije DNA zametnih stanica dodatno se metiliraju te na kraju spermiji imaju oko 80 - 90 % metilacije na CpG mjestima (181). Kod ljudi ne postoji znatna razlika metilacije DNA među spermatogonijalnim matičnim stanicama odraslog muškarca i spermija, ukazujući da se metilacijski obrazac većinom formira prije nastupa spermatogeneze (182), kao i kod javanskog makakija (177).

Gen *H19* odabran je kao predstavnik utisnutih gena presudnih za normalan razvoj muških zametnih stanica. Njegova poremećena metilacija povezana je s nizom uzroka muške neplodnosti (197-201), a detektirana je u regulatornom slijedu CTCF-vezujućeg mjesta 6 (CTCF6), smještenog u DMR regiji *IGF2-H19*. Navedeno se dovodi u vezu s negativnim utjecajem na razvoj embrija, fetusa i ishod trudnoće (198), s obzirom na to da su metilacijski poremećaji *IGF2-H19* nađeni su u tkivu fetusa začetih metodama potpomognute oplodnje, što je dovedeno u vezu sa smanjenom težinom pri porodu (202). Poznat je metilacijski obrazac *H19* gena u zametnim stanicama javanskog makakija, u kojeg se pretpostavlja uspostavljanje *de novo* metilacije postnatalno, sve do odraslog razdoblja (177). Slično tome, u ljudi je pokazana hipometiliranost DMR regije *H19* u fetalnim spermatogonijama 24. tpo na samo jednom uzorku

te da se spolnospecifična metiliranost DMR regije *H19* uspostavlja tek prije ulaska u mejozu u spermijima ulaskom u pubertet (204, 205). Navedeno ukazuje da se DMR regija *H19* u muških spolnih stanica metilira prije spermatogeneze i ulaska stanica u mejozu, no zbog oskudnog broja uzoraka i zaključaka izvedenih na njihovom vrlo malom broju nije sigurno da se *de novo* metilacija DMR regije *H19* provodi isključivo poslijenatalno. Ipak, saznanja o metilacijskom statusu *H19* u tumorima zametnih stanica, za koje se zbog izražaja biljega matičnosti i metilacijskog statusa drugih gena pretpostavlja da potječu od fetalnih zametnih stanica (352) govore u prilog tome da se *H19* ne metilira u fetalnom razdoblju, ili barem ne u prvoj polovici trudnoće (353).

U ovoj su se disertaciji analizirala tri CpG mjesta na kojima su se prosječne vrijednosti DNA metilacije kretale između 35 - 65% (Slike 45 - 49). Analizom po tjednima dobio se trend blagog rasta vrijednosti od 12. tjedna trudnoće do postnatalnog razdoblja (1 godina), uz varijacije vrijednosti između istraživanih tjedana. Iako postoji mnogo statistički značajno različitih vrijednosti, dio njih može ukazivati na varijaciju kvalitete uzoraka ili neprimjerenost uprosječivanja vrijednosti u slučaju CTCF6 regije *H19*. Naime, gledano po svakom CpG mjestu zasebno, uočava se porast vrijednosti u 19. (CpG1), 23. (CpG2) i 21. tjednu (CpG3) te na svakom pri kraju trudnoće, što može ukazivati na mehanizam *de novo* metilacije koji je specifičan za stadij i lokalizaciju, tj. CpG mjesto.

DNA metilacija tumorsupresorskog *RBI* gena se analizirala u fetalnom sjemeniku kako bi ustanovili odnos između metilacije gena i pripadajućeg proteinskog izražaja jer je poznato da je izražaj RB1 proteina vrlo oskudan u nekim matičnim stanicama kao što su bazalne stanice epidermisa ili proliferirajuće stanice mrežnice (354). *RBI* je metiliran u više tipova tumora, na jednom ili oba alela (355) te takva inaktivirajuća hipermetilacija promotorske regije pogoduje razvoju malignih tumora mrežnice u djece (236) nekontroliranom proliferacijom tih stanica. Optimalna regija za analizu određena je prema podacima iz literature (329). Iako se smatra da je hipometiliran tijekom razvoja (356), opsežne analize za fetalne organe koji sadrže spolne stanice nisu rađene. Spolne stanice za velik broj gena imaju vlastiti epigenetski obrazac, znatno različit od ostalih vrsta diferencirajućih stanica. Određen je postotak DNA metilacije pet CpG mjesta te prosjek tog postotka. Iako su se neke od razlika pokazale statistički značajnim, s obzirom na to da se uspoređuju međusobno, radi se o ukupno vrlo malim vrijednostima (medijan 0 - 8%), pa se ukupno gledajući ne može govoriti o stadiju ili trendu porasta. S obzirom na to da je proteinski produkt *RBI* gena jedan od glavnih (negativnih) regulatora staničnog ciklusa, a promjena metilacijskog statusa gena nije praktičan mehanizam kontrole količine

izražaja gena te se tijekom staničnog ciklusa aktivnost RB1 regulira posttranslacijskim promjenama, kao što je fosforilacija. Dakle, u fetalnom sjemeniku čovjeka pronađena je hipometilacija *RB1* gena što korelira s njegovim snažnim proteinskim izražajem.

Razina globalne metilacije genoma izražena DNA metilacijom *LINE-1* sljedova važan je pokazatelj epigenetske regulacije koja je ovim rezultatima pokazana u uzorcima ljudskih sjemenika u fetalnom razdoblju. Rast razine sredinom trudnoće ukazuje na prenatalno utišavanje transpozonskih sljedova. Iako bi rezultati razine metilacije gena *H19* iz odijeljenih stanica dali informacije tipične za zametne stanice, to se iz parafinskih uzoraka koji su bili na raspolaganju, nije moglo jednostavno izvesti. Ipak, zbirni rezultati za sve tipove stanica sjemenika pokazuju porast vrijednosti diferencijalno metilirane regije *H19* do kraja trudnoće, što je tipično samo za zametne stanice. Razina metilacije *RB1* gena ima toliko niske ukupne vrijednosti, da se može smatrati kako je taj gen hipometiliran u trudnoći u svim vrstama stanica sjemenika.

6.4. Proliferacija i izražaj RB1 proteina i njegovih fosforiliranih formi proteina u fetalnom tkivu sjemenika čovjeka

Proliferacija stanica ljudskog sjemenika dosta je dobro opisana u literaturi. Analizom transkriptoma i izražaja gena, izračunato je da između 8. i 10. tpo $\frac{1}{4}$ ukupnog broja zametnih stanica proliferira, a nadalje se događaji odvijaju poprilično asinkrono. Naime, u ljudskom fetalnom sjemeniku u isto vrijeme i u istom kanaliću mogu postojati stanice koje se tek naseljavaju i one koje su već ušle u stadij mirovanja staničnog ciklusa. Do 23. tpo gotovo 70% zametnih stanica sjemenika miruje (10). Biljegu proliferacije Ki-67 u svim radovima pada broj pozitivno obojenih stanica napredovanjem trudnoće do poroda. Do 24. tpo Ki-67 uglavnom se nalazi samo u gonocitama, koje su pozitivne na OCT4 biljeg matičnosti (ali ne i svim gonocitama), a poslije i u nekim prespermatogonijama, smještenim periferno unutar sjemenog kanalića (314, 321). Transkripcijski profil stanica ljudskog sjemenika pokazuje da proliferira samo 10 % somatskih stanica i u 7. i u 18. tpo (63). U ovom radu pokazano je da je Ki-67 biljeg bio izražen u jezgrama zametnih, Sertolijevih i Leydigovih stanica, dok su unutar kanalića skoro sve pozitivne stanice bile gonocite (Slika 65). Već se u analizi po tromjesečjima dobio statistički značajan pad izražaja Ki-67 prema kraju trudnoće (Slika 61 i 63). Detaljnija dinamika izražaja prikazala je najnižu vrijednost u 21. tpo u grafu po tjednima (Slika 62 i 64).

Po dostupnoj literaturi, u sjemenicima odraslih pacijenata RB1 se detektirao u Sertolijevim stanicama, većini spermatogonija i spermatocita te slabo u spermatidama (273, 274), dok je u fetalnim sjemenicima od 15. i 28. tpo bio jedva izražen u zametnim stanicama (276). S obzirom na to da je u spomenutom istraživanju korišteno „pan-RB1“ protutijelo, koje je dosta nespecifično, pitanje je njegove reaktivnosti te epitopa na kojeg se veže. Drugo istraživanje navelo je prisutnost RB1 proteina u Sertolijevim stanicama i prospermatogonijama unutar sjemenih kanalića fetalnog sjemenika (272). U rezultatima dobivenim protutijelom koje detektira RB1, zabilježio se porast broja RB1-pozitivnih stanica u 15. i 19. tpo te daljnji varijabilan pad prema kraju trudnoće. Korekcija broja s ukupnim brojem stanica po sjemenom kanaliću i njegovom promjeru, naglasio se pad vrijednosti u 20. i 21. tpo te ponovni porast od 23. do 26. tpo (Slike 67 i 69). Uz manje detalja, navedene promjene su se uočile i po analizama po tromjesečjima (Slike 66 i 68). Izražaj je najviše bio prisutan u jezgrama zametnih stanica te i u pokojnoj Sertolijevoj stanici (Slika 70).

Kontrola funkcije RB1 tijekom staničnog ciklusa ostvaruje se opsežnim reverzibilnim posttranslacijskim modifikacijama (244), a kako ciklus napreduje, mjesta (de)fosforilacije se mijenjaju (249). Fosforilacijom serina 780 RB1 regulira spermatogonijalnu staničnu proliferaciju (255), a pokazano je i povećanje fosforilacije RB1 proteina na serinu 780 pod utjecajem androgena na staničnim linijama raka prostate (254). U stanicama fetalnih sjemenika u ovom istraživanju RB1 fosforiliran na serinu 780 najčešće je bio izražen u jezgrama zametnih stanica te u manjem broju Sertolijevim i Leydigovim stanicama (Slika 75). Gledajući broj RB1Ser780-pozitivnih stanica po sjemenom kanaliću, uvidio se pad vrijednosti prema kraju trudnoće i po tromjesečjima i po tjednima (Slika 71 i 72). Analizom po tjednima zabilježen je dodatni pad u 19. tpo (Slika 72). Rezultati broja pozitivnih stanica u omjeru na ukupan broj stanica kanalića i promjer pokazali su pad vrijednosti 20. - 21. tpo, nakon kojeg slijedi porast u 23. - 26. tpo (Slika 74), što se odražava i na rezultate po tromjesečjima (Slika 73, Tablica 27).

U rezultatima disertacije RB1Ser795 imao je znatno viši izražaj, uglavnom lokaliziran u jezgri, a često je bio prisutan i niski izražaj u citoplazmi zametnih, Sertolijevih i Leydigovih stanica. Broj pozitivnih stanica po sjemenom kanaliću najviše je pao u 20. i 21. tpo te se povisio u 23. tpo (Slika 77), no po tromjesečjima nije bilo razlike (Slika 76). Broj RB1Ser795 korigiran ukupnim brojem i promjerom kanalića pao je do najnižih vrijednosti 20. i 21. tpo, nakon čega slijedi porast u 23. tpo (Slika 79), što se uočava u rezultatima po tromjesečjima (Slika 78). Dok dosadašnja literatura navodi različite podatke, ovi su rezultati potkrijepljeni pozitivnim i

negativnim kontrolama kojima se osigurava tehnička ispravnost metode. Spomenuta literatura pokazuje da u sjemeniku odraslih muškaraca RB1 fosforiliran na serinu 795 postoji u dijelu spermatogonija, a u fetalnom sjemeniku prisutan je u malom broju zametnih stanica (275, 276).

Nakon pokretajućeg signala, stanice u mirovanju ulaze u stanični ciklus te se u ranoj G1 fazi RB1 fosforilira i potom oslobađa E2F1-3 transkripcijske faktore. Daljnja kaskadna reakcija odvija se dijelom u citoplazmi te ne nastupa odmah (357). To je mogući razlog kvalitete i kvantitete formi RB1 proteina analiziranih u ovom radu. Također, terminalno diferencirane stanice te stanice u privremenom mirovanju nisu identično regulirane, iako se koriste gotovo isti kaskadni putevi. Dokazano je da je terminalna diferencijacija i stanični ciklus odvojeni procesi, iako se to ne može prepoznati transkripcijskim studijama (358).

SOX9, biljeg Sertolijevih stanica, dao je uvid u heterogenost histološkog smještaja tih stanica unutar sjemenih kanalića, u usporedbi s pravilno rubno smještenim štakorskim Sox9-pozitivnim Sertolijevim stanicama (Slika 81).

Izražaj biljega proliferacije te RB1 i fosforiliranih formi pokazuje zaustavljanje staničnog ciklusa zametnih stanica asinkrono tijekom sredine trudnoće. Rezultati disertacije se generalno poklapaju s dostupnom literaturom u vidu razdoblja aktivnosti i mirovanja stanica fetalnog sjemenika, uz blage razlike. Fosforilacije RB1 se nisu prikazale ovako detaljno niti u jednom do sada poznatom radu te predstavljaju jasan pokazatelj kontrole staničnog ciklusa gonocita posttranslacijskim promjenama RB1 proteina.

6.5. Metodološka usporedba metoda pohrane i količine tkiva

Evaluacija metoda dugoročne pohrane tkiva važan je aspekt molekularnih istraživanja. Ovisno o prostornim i tehnološkim mogućnostima, obučeni osoblja, razne kliničke ustanove pohranjuju tkiva na razne načine. Ako se uspoređuju istim metodama, postavlja se pitanje usporedivosti tih rezultata. Često je u rutinskom radu najpraktičnije i najjednostavnije uzorkovana tkiva fiksirati, dehidrirati te uroniti u parafin te čuvati u predviđenom mjestu, koje često ni nema uvjete za hlađenje. Takve zbirke kliničkih uzoraka potencijalno predstavljaju ogroman izvor vrijednih informacija o stupnju metilacije pojedinih gena između zdravih i patološko promijenjenih uzoraka te promjeni metilacije gena tijekom razvoja. S druge strane, molekularna istraživanja u kojima se uzorkuju stanične linije ili životinjski modeli redovito se

provode na sveže smrznutim uzorcima jer laboratoriji uglavnom imaju za to predviđena rashladna tijela u kojima je dugoročna pohrana moguća. Dugoročna pohrana u istraživanjima mora biti predviđena i pretpostavlja se da nema posljedice na kvalitetu DNA, RNA i njihove epigenetičke promjene (359). Tijekom pripreme ove doktorske disertacije, na uzorcima fetalnih štakorskih sjemenika proveo se identičan protokol bisulfitne konverzije i pirosekvenciranja uz razliku u metodi izolacije DNA iz svježe smrznutog tkiva, pohranjenog na -80 °C te onog fiksiranog, dehidriranog i uronjenog u parafin, koje se čuva na +4 °C (vidi: Materijal i metode: Izolacija genomskog DNA). Dobiveni rezultati ukazali su da izostanak statistički značajnih razlika između prosječnih vrijednosti postotaka metilacije DNA uzoraka istih stadija pohranjenih na različit način kada se analiziraju *LINE-1* ponavljajuće sekvence i utisnuti gen *H19*, kako prosječna vrijednost metilacije, tako i pojedina CpG mjesta. Iako razlike među parovima svježe smrznut - fiksiran, pa pohranjen u parafinu postoje (Slike 18 - 20), rezultati pokazuju da one ne utječu na statističke rezultate, što nam potvrđuje kako se tkiva pohranjena u kliničkim ustanovama mogu jednakovrijedno koristiti u molekularnim istraživanjima, ako su po mogućnosti skupljena u relativno kratkom vremenskom razdoblju. Naime, stajanjem zbog fiksacije u formalinu se DNA može fragmentirati, a rezultati analize metilacije mogu postati teško ponovljivi (328). U našem se slučaju pohrana štakorskih uzoraka svela na samo nekoliko mjeseci te se u rezultatima nisu primijetile varijacije u ponovljenim mjerenjima.

Usporedba metoda pohrane tkiva primijenila se i na ljudskim fetalnim uzorcima. Kako su neku uzorci bili fiksirani u Bouinovoj otopini, a neki u 10 %-tnom formalinu, izabrali su se uzorci odgovarajućih stadija radi usporedbe. Ova je usporedba pokazala određene varijacije među parovima, koje ipak nisu bile statistički značajne. Ovo je važan rezultat prvenstveno jer se u kliničkoj praksi uzorci sjemenika vrlo često pohranjuju u Bouinovoj otopini za očuvanje histološke strukture sjemenika i smanjivanje deformiranja tkiva, prisutnog pri fiksiranju u formalinu (360).

Uzorci sjemenika, pogotovo biopsije malog volumena, koje se iz sjemenika uzimaju kao jedan od posljednjih koraka u razjašnjenju uzroka muške neplodnosti (361), predstavljaju vrijedan materijal na kojem bi se, nakon kliničke iskorištenosti, mogle provoditi opsežne analize molekularnih puteva poznatih bolesti nepoznatog uzroka. U kliničkom protokolu za programirano smrzavanje tkiva sjemenika, koje se provodi na KBC Zagreb, pod nadležnosti prof. dr. sc. Davora Ježeka, predviđeno je upareno pohranjivanje tkiva uzetih prilikom biopsije sjemenika. Kada se iz svakog sjemenika u prosjeku uzme pet malih cilindara tkiva azoospermičnih muškaraca, svaki se cilindar prepolovi, jedna polovica podliježe programiranom smrzavanju, a druga se polovica histološki i imunohistokemijski analizira i

procjenjuje postoji li potencijal spermatogeneze u drugoj polovici smrznutog tkiva (362). Etički se ne smatra opravdanim koristiti tkivo sjemenika pohranjenog ovim protokolom programiranog smrzavanja ako postoji mogućnost nalaženja spermija sposobnog za umjetnu oplodnju (engl. *in vitro* fertilisation, IVF), čak ni ako postoji „višak“ cilindara. U tom slučaju, dio tkiva pripremljen za histopatološku analizu ostaje kao materijal koji bi se mogao obrađivati u laboratoriju za molekularna istraživanja. Zato je važno evaluirati metode pohrane i fiksacije, kako bi takvi vrijedni uzorci, kada su već dostupni, bili izvor relevantnih, ponovljivih informacija o genomu i epigenomu neplodnih muškaraca. U našem laboratoriju, uzorci fiksirani Bouinovom otopinom često su davali rezultate koji nisu bili ponovljivi, tj. razlika u višestruko ponovljenim mjerenjima na istom uzorku istom metodom bila je veća od 10, pa čak i 20 % (neobjavljeni rezultati). Još nije razjašnjeno u potpunosti je li razlog tih varijacija duljina pohrane ili sam fiksativ (363, 364).

Usporedbom broja rezova pri izolaciji DNA, od dva do deset, nisu se našle razlike u rezultatima pirosekvenciranja, jer se u koraku bisulfitne konverzije stavlja varijabilna količina DNA, kako bi svi uzorci imali 1 ng/mL DNA u smjesi reagensa. Količina izoliranog DNA pokazala je značajno različite rezultate prema broju rezova od 10 μ m (od 27 ng/ μ L za dva reza do 456 za deset rezova). I u ovom dijelu istraživanja usporedba se provela pirosekvenciranjem *LINE-1* ponavljajućih sekvence koje daju najusporedivije rezultate. Manje razlike u postotku pirosekvenciranja među uzorcima različitog broja rezova mogu se objasniti statistički većom vjerojatnošću da se dulja nedegradirana sekvenca DNA nađe u većem broju uzoraka.

Prema dostupnoj literaturi, ovakve metodološke usporedbe, tj. usporedba dvaju fiksativa te broja rezova iz kojih se izolirao DNA još nisu rađene na fetalnim tkivima. Ovim istraživanjem potvrdilo se da se uzorci sjemenika rutinski fiksirani u Bouinovoj otopini mogu koristiti i za analize epigenoma, što je obećavajuće pri korištenju arhivskih baza tkiva sjemenika koja se fiksiraju ovom metodom. Daljnja vrijedna spoznaja je da su za kvalitetnu i usporedivu analizu bila dovoljna samo dva reza od 10 μ m ionako malih fetalnih sjemenika. Uzimajući u obzir degradaciju DNA koja se događa duljim stajanjem uzoraka fiksiranih u formalinu te odabirom kraćih početnica za PRC i pirosekvenciranje, otvara se mogućnost opširnih analiza vrlo malih količina tkiva, što je posebno obećavajuće za rijetke uzorke kao što su fetalni organi.

6.6. Usporedba analiziranih varijabli između čovjeka i štakora

Nekoliko autora posvetila se usporedbi razdoblja trudnoće čovjeka i glodavaca. Unatoč razlici u trajanju, placentaciji i položaju zamenih listića, postoje procesi u razvoju po kojima

glodavci predstavljaju vrijedan model istraživanja koji se može prenijeti na čovjeka. Tako je za stupanj i razinu mijelinizacije štakorskog mozga predloženo da se prenatalni razvoj u štakora poklapa s prva dva tromjesečja razvoja mozga u ljudi. Prijelaz prvog u drugo tromjesečje u štakora se odvija jedan do dva dana pred okot, a treće tromjesečje u ljudi odražava se kao prvi tjedni postnatalnog razvoja (365). Autori koji su koristili matematički model usporedbe anatomskog razvoja različitih dijelova štakorskog i ljudskog mozga za svaku analiziranu regiju su dobili malo drugačiju razvojnu krivulju preklapanja (366). Za razvoj cijelog spolnog sustava među vrstama još nije predložena slična usporedba, no pokazano je nekoliko usporednih prikaza epigenetskih promjena zametnih stanica među čovjekom, glodavcima, makakijem i svinjom (149, 286, 322, 367, 368).

Usporedba vrijednosti DNA metilacije *LINE-1* ponavljajućih transpozonskih sljedova u štakora i čovjeka pokazuje da se razdoblje do 19.5 dpc ima najstrmiji porast postotka metilacije, nakon kojeg se nastavlja znatno blaži rast vrijednosti, dok u čovjeka metilacija *LINE-1* sljedova zadržava otprilike istu razinu DNA metilacije, osim rasta u 20. tjednu trudnoće te pada ulaskom u pubertet i početkom spermatogeneze. U čovjeka se vjerojatno značajniji porast vrijednosti metilacije repetitivnih sljedova odvija u ranijim stadijima od onih analiziranih u disertaciji, što predstavlja razliku između dva organizma.

Spolnospecifična *de novo* metilacija DNA odvija od 17. dana embrionalnog razvoja sjemenika u štakora, iako u spolnim stanicama većinom postnatalno (9), a u čovjeka vjerojatno kroz duže vremensko razdoblje te je analizirana razinom metilacije DMR regije utisnutog gena *H19*. jer se iako postoji trend porasta DNA metilacije napredovanjem trudnoće, najviše u drugom tromjesečju (16. - 23. tpo), nema značajne razlike između analiziranih razdoblja (14. - 39. tpo), što se samo djelomično slaže s dosadašnjim pretpostavkama dobivenim na istraživanjima razine metilacije *H19* u spolnim stanicama javanskog makakija, koja pokazuju postnatalnu uspostavu utiskivanja toga gena, kao i istraživanja na ljudskim uzorcima (204, 205).

Proliferacija stanica u sjemenim kanalićima u ljudi doseže najmanji broj u 21. tpo, ima porast do 25. tpo te ponovo pada krajem trudnoće, što je vjerojatno povezano s cikliranjem novodiferenciranih prespermatogonija. Sličan se trend uočava kod štakora, samo što je najniži broj zabilježen 19.5 dpc, nakon čega slijedi blagi porast broja proliferirajućih (Ki-67+) stanica. Po spomenutim istraživanjima koja su uspoređivala štakorski i ljudski razvoj mozga te se po ovom parametru može pretpostaviti da većina štakorske trudnoće odgovara ljudskom prvom tromjesečju, pred okot počinje drugo tromjesečje, a po literaturi, postnatalno treće tromjesečje se nastavlja na ljudsko postnatalno razdoblje, s obzirom na to da se cikliranje novodiferenciranih spermatogonija u štakora događa postnatalno od 3 dpp.

Izrazit pad RB1-pozitivnih stanica u štakorskom sjemeniku 18.5 dpc može se usporediti s padom broja stanica u staničnom ciklusu 20. - 21. tpo u ljudi. Blagi porast broja krajem trudnoće u štakora nagovješćuje postnatalni rast broja stanica koje cikliraju, što prati broj proliferirajućih stanica, označenih biljekom Ki-67. I u ljudi je primjetan rast broja RB1+ stanica 23. - 26. tpo, a zatim pad do kraja trudnoće. Fosforilirane forme RB1 proteina, RB1Ser780 i RB1795 u štakorskom sjemeniku imaju sličnu krivulju promjene izražaja: pada im do 19.5 dpc, blaže od RB1 te zatim vrlo malo raste do okota. U ljudi je trend sličan, uz razliku u ukupnom broju stanica s izraženim RB1Ser780 i RB1Ser795, kada se međusobno usporede.

Zbirno, pad proliferacije stanica fetalnog sjemenika u trudnoći štakora opaža se prema kraju trudnoće, kad se opaža i značajan porast globalne metilacije DNA. Dinamika mitotičkog ciklusa i metilacije prisutna je i u ljudskom sjemeniku, u kojem se opaža značajni pad proliferacije stanica i povećanje izražaja negativnog regulatora staničnog ciklusa u drugom tromjesečju prema kraju trudnoće, najviše izražen od 20-23. tpo kada je primjetan trend porasta DNA metilacije na pojedinim CpG točkama *LINE-1* ponavljajućih sljedova, sa značajno većom razinom metilacije nego u predpubertalnom razdoblju. Što se tiče metilacije diferencijalno metiliranih regija utisnutih gena, koja je spolno specifična (npr. *H19*), u štakorskom fetalnom sjemeniku izražena je u istom razdoblju kad i globalna metilacija, dok se u ljudskom sjemeniku događa u drugom tromjesečju, no nešto ranije, jer je najizraženija razlika u metilaciji DMR regije *H19* vidljiva između 16. i 21. tpo.

Dobiveni rezultati pridonose razumijevanju normalnih razvojnih procesa u ljudskom sjemeniku te ih na relevantan način uspoređuju sa štakorskim, radi procjene prikladnosti glodavaca kao modela za istraživanje navedenih promjena. U svjetlu izrazitoga rasta incidencije muške neplodnosti i tumora sjemenika, a znajući da dio uzroka proizlazi iz neadekvatno razvijenih fetalnih zametnih stanica, od presudne je važnosti odrediti razdoblja trudnoće u kojemu se te promjene najlakše mogu odviti (osjetljiva razdoblja). Relativno brz rast spomenute incidencije ukazuje da se te promjene ne događaju na genetskoj, nego vjerojatnije na epigenetskoj razini. Daljnja istraživanja svakako se trebaju usmjeriti na istraživanje utjecaja tvari koje nas okružuju u svakodnevnom životu, a imaju epigenetsko djelovanje, kao što su lijekovi, insekticidi, ostatne tvari iz plastike i dr. Rezultati ove disertacije ukazuju na sredinu ljudske trudnoće kao razdoblje posebno osjetljivo na takve utjecaje jer se tada zaustavlja stanični ciklus kako bi se mogle odviti spolnospecifične epigenetske promjene u zametnim stanicama. Fetalne zametne stanice od hipometiliranog prelaze u adekvatno metilirano stanje,

izbjegavajući time genomsku nestabilnost i pretjeranu proliferaciju koja u odrasloj dobi može dovesti do tumorigeneze. U štakora se iste promjene događaju u zadnjoj trećini trudnoće i nastavljaju poslijenatalno te se u funkcionalnim studijama epigenetskih promjena zametnih stanica štakora, koje služe kao model za ljudske bolesti i stanja, to treba uzeti u obzir. Također, mogućnost odvajanja različitih vrsta stanica unutar sjemenika te njihova zasebna analiza dala bi više informacija, no skupljanje svježih ljudskih tkiva izrazito je otežano. U ovoj disertaciji također je pokazana vrijednost arhivskih uzoraka, s obzirom na kvalitetu DNA i vrlo malih količina potrebnih za primjerenu analizu.

7. ZAKLJUČCI

Dobiveni rezultati ukazuju na nekoliko najvažnijih zaključaka:

1. Rezultati disertacije detaljno opisuju dinamiku metilacije DNA (transpozon *LINE-1*, utisnuti gen *H19* i gen supresor tumora *RB1*) i biljega aktivnosti staničnog ciklusa (Ki-67, RB1, fosforilirani RB1) u sjemeniku sisavaca za vrijeme trudnoće što predstavlja bazu za bolju analizu urođenih poremećaja plodnosti.
2. Značajni porast postotka DNA metilacije *LINE-1* ponavljajućih sljedova od 16.5 do 21.5 dpc i diferencijalno metilirane regije (DMR) utisnutog gena *H19* u tkivu štakorskog sjemenika od 16.5 do 17.5 dpc koja ostaje visoka do kraja trudnoće u skladu je s odvijanjem *de novo* metilacije DNA od 17.5 dpc.
3. U ljudskom fetalnom sjemeniku postotak DNA metilacije *LINE-1* ponavljajućih sljedova je visok tijekom trudnoće, a značajno je veći u 20. tjednu trudnoće u odnosu na prepubertalni sjemenik (12 godina). Za postotak DNA metilacije DMR regije utisnutog gena *H19* primijećen je trend porasta metilacije prema kraju trudnoće te upućuje na drugo tromjesečje trudnoće kao razdoblje mogućeg početka *de novo* metilacije.
4. Promotorska regija regulatora staničnog ciklusa *RB1* gena općenito je hipometilirana u ljudskom fetalnom sjemeniku kroz cijelo analizirano razdoblje trudnoće (ispod 5%), što upućuje na važnost njegove aktivnosti za razvoj (proliferaciju i diferencijaciju) zametnih stanica.
5. U štakora, temeljem značajnog smanjenja izražaja proliferacijskog biljega Ki-67 (od 16.5 do 20.5 dpc), kao i naglog pada izražaja fosforiliranih RB1 proteina (između 16.5 i 19.5 dpc) u odnosu na promjer sjemenih kanalića i ukupan broj stanica u njima može se zaključiti da stanični ciklus miruje. Značajno povećanje izražaja neposredno pred kraj trudnoće (19.5 - 20.5 dpc) fosforiliranih formi RB1 proteina neophodnih za izlaz iz G1 faze ciklusa

ukazuje na pripremu za očekivani nastavak ciklusa i mitotičku proliferaciju nakon okota.

6. Značajno smanjenje izražaja biljega proliferacije Ki-67 i fosforiliranih formi RB1 od prvog prema drugom tromjesečju u odnosu na promjer sjemenih kanalića i ukupan broj stanica u njima ukazuje na smanjenje aktivnosti staničnog ciklusa. Povećanje izražaja ukupnog RB1 proteina od drugog prema trećem tromjesečju trudnoće i dijela fosforiliranih formi RB1 ukazuje na moguću pripremu za nastavak ciklusa poslije poroda.
7. Način fiksacije uzoraka ne utječe na rezultate pirosekvenciranja, kao ni količina tkiva iz koje se izolira DNA.

8. SAŽETAK

Neki od uzroka muške neplodnost mogu imati ishodište u epigenetičkim poremećajima tijekom prenatalnog života. Cilj disertacije bio je istražiti DNA metilaciju *LINE-1* transpozonskih ponavljajućih sljedova i diferencijalno metilirane regije (DMR) utisnutog gena *H19* u tkivu fetalnog sjemenika čovjeka i štakora te *RB1* tumorsupresorskog gena u čovjeka usporedno sa staničnom proliferacijom i izražajem tumor supresora RB1 te njegovih fosforiliranih oblika. DNA metilacija u fetalnom štakorskom sjemeniku značajno raste za *LINE-1* od 16.5 do 21.5 dpc, a za *H19* do 17.5 dpc. Analiza ljudskih uzoraka pokazuje visoku razinu metilacije *LINE-1* tijekom trudnoće te značajno sniženje u pubertetu, a za *H19* rast do kraja trudnoće, dok je *RB1* tijekom trudnoće hipometiliran (ispod 5%). Izražaj biljega proliferacije Ki-67 u štakorskom sjemeniku značajno se smanjuje od 16.5 do 19.5 dpc kao i izražaj fosforiliranih RB1 proteina u odnosu na ukupan broj stanica i promjer kanalića, a zatim se povisuje (19.5 - 20.5 dpc). U ljudskim sjemenicima izražaj Ki-67 i fosforiliranih oblika RB1 u odnosu na ukupan broj stanica i promjer kanalića pada od prvog prema drugom tromjesječju, a od drugog prema trećem raste ukupni RB1 i dio fosforiliranih formi. Rezultati ovog rada značajni su kao baza za daljnje istraživanje uzroka neplodnosti ili tumora sjemenika koji mogu biti uzrokovani promjenom metilacije gena koji djeluju na stabilnost genoma, genomsko utiskivanje i regulaciju staničnog ciklusa.

9. ABSTRACT

Methylation of RB1, H19 genes and LINE 1 repetitive sequence during fetal development of testis in man and in rat, Marta Himmelreich Perić, 2022

Some of the causes of male infertility may have their origin in epigenetic disorders during prenatal life. The aim of the study was to investigate DNA methylation of *LINE-1* transposon repetitive sequences and the imprinted differentially methylated region (DMR) of *H19* gene in human and rat fetal testis and the *RB1* tumor suppressor gene in humans in parallel with the expression of RB1 protein and its phosphorylated forms. DNA methylation in the fetal rat testis increases significantly for *LINE-1* from 16.5 to 21.5 dpc, and for *H19* to 17.5 dpc. Analysis of human samples showed a high level of *LINE-1* methylation during pregnancy with a significant decrease in puberty, and for *H19* an increase until the end of pregnancy, while *RB1* was hypomethylated during pregnancy (below 5%). The expression of Ki-67 proliferation marker in the rat testis is significantly reduced from 16.5 to 19.5 dpc as well as the expression of phosphorylated RB1 proteins from 16.5 and 19.5 relative to total cell number and tubular diameter, and is increased from 19.5 to 20.5. In human testes, the expression of Ki-67 and phosphorylated RB1 in relation to the total number of cells and the diameter of the tubules decreases from the first to the second trimester, and from the second to the third the total RB1 and a part of the phosphorylated forms increase. The results of this work are important as a basis for further research into the causes of infertility or testicular tumors that may be caused by altered methylation of genes that affect genome stability, genomic imprinting, and cell cycle regulation.

10. POPIS LITERATURE

1. Carson SA, Kallen AN. Diagnosis and management of infertility: a review. *JAMA*. 2021;326(1):65-76.
2. O'Bryan MK, de Kretser D. Mouse models for genes involved in impaired spermatogenesis. *Int J Androl*. 2006;29(1):76-89.
3. Machen GL, Sandlow JJ. Causes of male infertility. Cham: Springer International Publishing; 2020. p. 3-14.
4. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 2004;429(6990):457-63.
5. Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ*. 2006;174(3):341-8.
6. Messerschmidt DM, Knowles BB, Solter D. DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. *Genes Dev*. 2014;28(8):812-28.
7. Rwigemera A, El omri-Charai R, Lecante LL, Delbes G. Dynamics in the expression of epigenetic modifiers and histone modifications in perinatal rat germ cells during de novo DNA methylation. *Biol Reprod*. 2020;104(2):361-73.
8. Rose CM, van den Driesche S, Sharpe RM, Meehan RR, Drake AJ. Dynamic changes in DNA modification states during late gestation male germ line development in the rat. *Epigenetics Chromatin*. 2014;7(1):19.
9. Rwigemera A, Joao F, Delbes G. Fetal testis organ culture reproduces the dynamics of epigenetic reprogramming in rat gonocytes. *Epigenetics Chromatin*. 2017;10:19.
10. Wang R, Liu X, Li L, Yang M, Yong J, Zhai F, et al. Dissecting human gonadal cell lineage specification and sex determination using a single-cell RNA-seq approach. *Genom Proteom Bioinf*. 2022;S1672-0229(22)00038-9.
11. Felix W. The development of the urogenital organs. in: Kiebel, R, Mall, FP (Eds), *Manual of Human Embryology* Lippincott, Philadelphia. 1912.
12. McLaren A. Primordial germ cells in the mouse. *Dev Biology*. 2003;262(1):1-15.
13. Mäkelä J-A, Koskenniemi JJ, Virtanen HE, Toppari J. Testis development. *Endocr Rev*. 2018;40(4):857-905.
14. Witschi E. Migration of the germ cells of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal folds. *Contrib Embryol*. 1948;209:21.
15. <https://www.ehd.org/virtual-human-embryo/>.
16. Lawson KA, Dunn NR, Roelen BA, Zeinstra LM, Davis AM, Wright CV, et al. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev*. 1999;13(4):424-36.
17. Ying Y, Liu XM, Marble A, Lawson KA, Zhao GQ. Requirement of Bmp8b for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Mol Endocrinol*. 2000;14(7):1053-63.
18. Ying Y, Zhao GQ. Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse. *Dev Biol*. 2001;232(2):484-92.
19. Tan H, Tee W-W. Committing the primordial germ cell: An updated molecular perspective. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2019;11(1):e1436.
20. Vincent SD, Dunn NR, Sciammas R, Shapiro-Shalef M, Davis MM, Calame K, et al. The zinc finger transcriptional repressor Blimp1/Prdm1 is dispensable for early axis formation but is required for specification of primordial germ cells in the mouse. *Development*. 2005;132(6):1315-25.

21. Ohinata Y, Payer B, O'Carroll D, Ancelin K, Ono Y, Sano M, i sur. Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature*. 2005;436(7048):207-13.
22. Kurimoto K, Yabuta Y, Ohinata Y, Shigeta M, Yamanaka K, Saitou M. Complex genome-wide transcription dynamics orchestrated by Blimp1 for the specification of the germ cell lineage in mice. *Genes Dev*. 2008;22(12):1617-35.
23. Ohinata Y, Ohta H, Shigeta M, Yamanaka K, Wakayama T, Saitou M. A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice. *Cell*. 2009;137(3):571-84.
24. Aramaki S, Hayashi K, Kurimoto K, Ohta H, Yabuta Y, Iwanari H, i sur. A mesodermal factor, T, specifies mouse germ cell fate by directly activating germline determinants. *Dev Cell*. 2013;27(5):516-29.
25. Yu J, Angelin-Duclos C, Greenwood J, Liao J, Calame K. Transcriptional repression by blimp-1 (PRDI-BF1) involves recruitment of histone deacetylase. *Mol Cell Biol*. 2000;20(7):2592-603.
26. Gyory I, Wu J, Fejér G, Seto E, Wright KL. PRDI-BF1 recruits the histone H3 methyltransferase G9a in transcriptional silencing. *Nat Immunol*. 2004;5(3):299-308.
27. Ancelin K, Lange UC, Hajkova P, Schneider R, Bannister AJ, Kouzarides T, i sur. Blimp1 associates with Prmt5 and directs histone arginine methylation in mouse germ cells. *Nature Cell Biol*. 2006;8(6):623-30.
28. Su ST, Ying HY, Chiu YK, Lin FR, Chen MY, Lin KI. Involvement of histone demethylase LSD1 in Blimp-1-mediated gene repression during plasma cell differentiation. *Mol Cell Biol*. 2009;29(6):1421-31.
29. Cretney E, Xin A, Shi W, Minnich M, Masson F, Miasari M, i sur. The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2011;12(4):304-11.
30. Magnúsdóttir E, Dietmann S, Murakami K, Günesdogan U, Tang F, Bao S, i sur. A tripartite transcription factor network regulates primordial germ cell specification in mice. *Nat Cell Biol*. 2013;15(8):905-15.
31. Ginsburg M, Snow MH, McLaren A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development*. 1990;110(2):521-8.
32. Sato M, Kimura T, Kurokawa K, Fujita Y, Abe K, Masuhara M, i sur. Identification of PGC7, a new gene expressed specifically in preimplantation embryos and germ cells. *Mech Dev*. 2002;113(1):91-4.
33. Yabuta Y, Kurimoto K, Ohinata Y, Seki Y, Saitou M. Gene expression dynamics during germline specification in mice identified by quantitative single-cell gene expression profiling. *Biol Reprod*. 2006;75(5):705-16.
34. Sasaki K, Nakamura T, Okamoto I, Yabuta Y, Iwatani C, Tsuchiya H, i sur. The germ cell fate of cynomolgus monkeys is specified in the nascent amnion. *Dev Cell*. 2016;39(2):169-85.
35. De Felici M. Origin, migration, and proliferation of human primordial germ cells. In: Coticchio G, Albertini DF, De Santis L, eds *Oogenesis* London, UK: Springer-Verlag. 2013; pp 19-37.
36. McKay DG, Hertig AT, Adams EC, Danziger S. Histochemical observations on the germ cells of human embryos. *Anat Rec*. 1953;117(2):201-19.
37. Kerr CL, Hill CM, Blumenthal PD, Gearhart JD. Expression of pluripotent stem cell markers in the human fetal ovary. *Hum Reprod*. 2008;23(3):589-99.
38. Høyer PE, Byskov AG, Møllgård K. Stem cell factor and c-Kit in human primordial germ cells and fetal ovaries. *Mol Cell Endocrinol*. 2005;234(1-2):1-10.
39. Mamsen LS, Brøchner CB, Byskov AG, Møllgård K. The migration and loss of human primordial germ stem cells from the hind gut epithelium towards the gonadal ridge. *Int J Dev Biol*. 2012;56(10-12):771-8.

40. Anderson RA, Fulton N, Cowan G, Coutts S, Saunders PT. Conserved and divergent patterns of expression of DAZL, VASA and OCT4 in the germ cells of the human fetal ovary and testis. *BMC Dev Biol.* 2007;7:136.
41. Fang F, Li Z, Zhao Q, Xiong C, Ni K. Analysis of multi-lineage gene expression dynamics during primordial germ cell induction from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):100.
42. Irie N, Weinberger L, Tang WWC, Kobayashi T, Viukov S, Manor YS, et al. SOX17 is a critical specifier of human primordial germ cell fate. *Cell.* 2015;160(1-2):253-68.
43. Fujimoto T, Miyayama Y, Fuyuta M. The origin, migration and fine morphology of human primordial germ cells. *Anat Rec.* 1977;188(3):315-30.
44. Barton LJ, LeBlanc MG, Lehmann R. Finding their way: themes in germ cell migration. *Curr Opin Cell Biol.* 2016;42:128-37.
45. Freeman B. The active migration of germ cells in the embryos of mice and men is a myth. *Reproduction.* 2003;125(5):635-43.
46. Møllgård K, Jespersen A, Lutterodt MC, Yding Andersen C, Høyer PE, Byskov AG. Human primordial germ cells migrate along nerve fibers and Schwann cells from the dorsal hind gut mesentery to the gonadal ridge. *Mol Hum Reprod.* 2010;16(9):621-31.
47. Schneider DT, Schuster AE, Fritsch MK, Hu J, Olson T, Lauer S, et al. Multipoint imprinting analysis indicates a common precursor cell for gonadal and nongonadal pediatric germ cell tumors. *Cancer Res.* 2001;61(19):7268-76.
48. Gu Y, Runyan C, Shoemaker A, Surani A, Wylie C. Steel factor controls primordial germ cell survival and motility from the time of their specification in the allantois, and provides a continuous niche throughout their migration. *Development.* 2009;136(8):1295-303.
49. Upadhyay S, Zamboni L. Ectopic germ cells: natural model for the study of germ cell sexual differentiation. *PNAS USA.* 1982;79(21):6584-8.
50. Samokhvalov IM. Return to the hematopoietic stem cell origin. *Cell Regen.* 2012;1(1):9.
51. Fujimoto T, Yoshinaga K, Kono I. Distribution of fibronectin on the migratory pathway of primordial germ cells in mice. *Anat Rec.* 1985;211(3):271-8.
52. De Felici M, Scaldaferrri ML, Farini D. Adhesion molecules for mouse primordial germ cells. *Front Biosci.* 2005;10:542-51.
53. Richardson BE, Lehmann R. Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(1):37-49.
54. Hamer G, de Rooij DG. Mutations causing specific arrests in the development of mouse primordial germ cells and gonocytes. *Biol Reprod.* 2018;99(1):75-86.
55. Molyneaux KA, Wang Y, Schaible K, Wylie C. Transcriptional profiling identifies genes differentially expressed during and after migration in murine primordial germ cells. *Gene Expr Patterns.* 2004;4(2):167-81.
56. Toyooka Y, Tsunekawa N, Takahashi Y, Matsui Y, Satoh M, Noce T. Expression and intracellular localization of mouse Vasa-homologue protein during germ cell development. *Mech Dev.* 2000;93(1-2):139-49.
57. Seligman J, Page DC. The Dazh gene is expressed in male and female embryonic gonads before germ cell sex differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;245(3):878-82.
58. Enders GC, May JJ, 2nd. Developmentally regulated expression of a mouse germ cell nuclear antigen examined from embryonic day 11 to adult in male and female mice. *Dev Biol.* 1994;163(2):331-40.
59. Chang DH, Cattoretti G, Calame KL. The dynamic expression pattern of B lymphocyte induced maturation protein-1 (Blimp-1) during mouse embryonic development. *Mech Dev.* 2002;117(1-2):305-9.
60. Cooke JE, Godin I, Ffrench-Constant C, Heasman J, Wylie CC. Culture and manipulation of primordial germ cells. *Methn Enzymol.* 1993;225:37-58.

61. Coucouvanis EC, Jones PP. Changes in protooncogene expression correlated with general and sex-specific differentiation in murine primordial germ cells. *Mech Dev.* 1993;42(1-2):49-58.
62. Manova K, Bachvarova RF. Expression of c-kit encoded at the W locus of mice in developing embryonic germ cells and presumptive melanoblasts. *Dev Biol.* 1991;146(2):312-24.
63. Li L, Dong J, Yan L, Yong J, Liu X, Hu Y, i sur. Single-cell RNA-seq analysis maps development of human germline cells and gonadal niche interactions. *Cell Stem Cell.* 2017;20(6):858-73.e4.
64. Gkoutela S, Zhang KX, Shafiq TA, Liao WW, Hargan-Calvopiña J, Chen PY, i sur. DNA demethylation dynamics in the human prenatal germline. *Cell.* 2015;161(6):1425-36.
65. Bashamboo A, Eozenou C, Rojo S, McElreavey K. Anomalies in human sex determination provide unique insights into the complex genetic interactions of early gonad development. *Clin Genet.* 2017;91(2):143-56.
66. Armstrong JF, Pritchard-Jones K, Bickmore WA, Hastie ND, Bard JB. The expression of the Wilms' tumour gene, WT1, in the developing mammalian embryo. *Mech Dev.* 1993;40(1-2):85-97.
67. Hammes A, Guo JK, Lutsch G, Leheste JR, Landrock D, Ziegler U, i sur. Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell.* 2001;106(3):319-29.
68. Hu YC, Okumura LM, Page DC. Gata4 is required for formation of the genital ridge in mice. *PLoS Genet.* 2013;9(7):e1003629.
69. Miyamoto N, Yoshida M, Kuratani S, Matsuo I, Aizawa S. Defects of urogenital development in mice lacking Emx2. *Development.* 1997;124(9):1653-64.
70. Birk OS, Casiano DE, Wassif CA, Cogliati T, Zhao L, Zhao Y, i sur. The LIM homeobox gene Lhx9 is essential for mouse gonad formation. *Nature.* 2000;403(6772):909-13.
71. Luo X, Ikeda Y, Parker KL. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell.* 1994;77(4):481-90.
72. Hanley NA, Hagan DM, Clement-Jones M, Ball SG, Strachan T, Salas-Cortés L, i sur. SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mech Dev.* 2000;91(1-2):403-7.
73. Hanley NA, Ball SG, Clement-Jones M, Hagan DM, Strachan T, Lindsay S, i sur. Expression of steroidogenic factor 1 and Wilms' tumour 1 during early human gonadal development and sex determination. *Mech Dev.* 1999;87(1-2):175-80.
74. Schmahl J, Eicher EM, Washburn LL, Capel B. Sry induces cell proliferation in the mouse gonad. *Development.* 2000;127(1):65-73.
75. Nishino K, Hattori N, Tanaka S, Shiota K. DNA methylation-mediated control of Sry gene expression in mouse gonadal development. *J Biol Chem.* 2004;279(21):22306-13.
76. Wilhelm D, Washburn LL, Truong V, Fellous M, Eicher EM, Koopman P. Antagonism of the testis- and ovary-determining pathways during ovotestis development in mice. *Mech Dev.* 2009;126(5-6):324-36.
77. Bullejos M, Koopman P. Delayed Sry and Sox9 expression in developing mouse gonads underlies B6-Y(DOM) sex reversal. *Dev Biol.* 2005;278(2):473-81.
78. Kuroki S, Matoba S, Akiyoshi M, Matsumura Y, Miyachi H, Mise N, i sur. Epigenetic regulation of mouse sex determination by the histone demethylase Jmjd1a. *Science.* 2013;341(6150):1106-9.
79. Del Valle I, Buonocore F, Duncan AJ, Lin L, Barenco M, Parnaik R, i sur. A genomic atlas of human adrenal and gonad development. *Wellcome Open Res.* 2017;2:25.
80. Ostrer H, Huang HY, Masch RJ, Shapiro E. A cellular study of human testis development. *Sex Dev.* 2007;1(5):286-92.

81. Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kwok C, Weller PA, Stevanović M, i sur. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature*. 1994;372(6506):525-30.
82. Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, i sur. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell*. 1994;79(6):1111-20.
83. Morais da Silva S, Hacker A, Harley V, Goodfellow P, Swain A, Lovell-Badge R. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat Genet*. 1996;14(1):62-8.
84. Huang B, Wang S, Ning Y, Lamb AN, Bartley J. Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. *Am J Med Genet*. 1999;87(4):349-53.
85. Cox JJ, Willatt L, Homfray T, Woods CG. A SOX9 duplication and familial 46,XX developmental testicular disorder. *NEJM*. 2011;364(1):91-3.
86. Sekido R, Lovell-Badge R. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature*. 2008;453(7197):930-4.
87. Kim Y, Kobayashi A, Sekido R, DiNapoli L, Brennan J, Chaboissier MC, i sur. Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS Biol*. 2006;4(6):e187.
88. Bagheri-Fam S, Ono M, Li L, Zhao L, Ryan J, Lai R, i sur. FGFR2 mutation in 46,XY sex reversal with craniosynostosis. *Hum Mol Genet*. 2015;24(23):6699-710.
89. Georg I, Bagheri-Fam S, Knowler KC, Wieacker P, Scherer G, Harley VR. Mutations of the SRY-responsive enhancer of SOX9 are uncommon in XY gonadal dysgenesis. *Sex Dev*. 2010;4(6):321-5.
90. Polanco JC, Wilhelm D, Davidson TL, Knight D, Koopman P. Sox10 gain-of-function causes XX sex reversal in mice: implications for human 22q-linked disorders of sex development. *Hum Mol Genet*. 2010;19(3):506-16.
91. Barrionuevo F, Georg I, Scherthan H, Lécureuil C, Guillou F, Wegner M, i sur. Testis cord differentiation after the sex determination stage is independent of Sox9 but fails in the combined absence of Sox9 and Sox8. *Dev Biol*. 2009;327(2):301-12.
92. Aksglaede L, Sørensen K, Boas M, Mouritsen A, Hagen CP, Jensen RB, i sur. Changes in anti-Müllerian hormone (AMH) throughout the life span: a population-based study of 1027 healthy males from birth (cord blood) to the age of 69 years. *J Clin Endocr*. 2010;95(12):5357-64.
93. Miller WL, Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev*. 2011;32(1):81-151.
94. Cunha GR, Robboy SJ, Kurita T, Isaacson D, Shen J, Cao M, i sur. Development of the human female reproductive tract. *Differentiation*. 2018;103:46-65.
95. Zhou B, Hutson JM. Human chorionic gonadotropin (hCG) fails to stimulate gonocyte differentiation in newborn mouse testes in organ culture. *J Urol*. 1995;153(2):501-5.
96. Zhou B, Watts LM, Hutson JM. Germ cell development in neonatal mouse testes in vitro requires müllerian inhibiting substance. *J Urol*. 1993;150(2):613-6.
97. Blaschko SD, Cunha GR, Baskin LS. Molecular mechanisms of external genitalia development. *Differentiation*. 2012;84(3):261-8.
98. Angelopoulou R, Balla M, Lavranos G, Chalikias M, Kitsos C, Baka S, i sur. Sertoli cell proliferation in the fetal and neonatal rat testis: A continuous phenomenon? *Acta Histochem*. 2008;110(4):341-7.
99. Zhengwei Y, Wreford NG, de Kretser DM. A Quantitative Study of Spermatogenesis in the Developing Rat Testis. *Biol Reprod*. 1990;43(4):629-35.
100. Kluin PM, Kramer MF, de Rooij DG. Proliferation of spermatogonia and Sertoli cells in maturing mice. *Anat Embryol*. 1984;169(1):73-8.

101. Cortes D, Müller J, Skakkebaek NE. Proliferation of Sertoli cells during development of the human testis assessed by stereological methods. *Int J Androl.* 1987;10(4):589-96.
102. Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction.* 2003;125(6):769-84.
103. Gu X, Heinrich A, DeFalco T. Testicular macrophages are recruited during a narrow time window by fetal Sertoli cells to promote organ-specific developmental functions. *bioRxiv.* 2022;2022.05.05.490754.
104. Nel-Themaat L, Vadakkan TJ, Wang Y, Dickinson ME, Akiyama H, Behringer RR. Morphometric analysis of testis cord formation in Sox9-EGFP mice. *Dev Dynam.* 2009;238(5):1100-10.
105. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell.* 2007;128(4):635-8.
106. Barrero MJ, Boué S, Izpisua Belmonte JC. Epigenetic mechanisms that regulate cell identity. *Cell stem cell.* 2010;7(5):565-70.
107. Dupont C, Froenicke L, Lyons LA, Bavister BD, Brenner CA. Chromosomal instability in rhesus macaque preimplantation embryos. *Fertil Steril.* 2009;91(4):1230-7.
108. Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D. Overview and concepts. In *Epigenetics*, 1 edn Eds CD Allis, T Jenuwein & D Reinberg New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press. 2007; pp 23-56.
109. Bulić-Jakuš F, Katušić Bojanac A, Jurić-Lekić G, Vlahović M, Sinčić N. Teratoma: from spontaneous tumors to the pluripotency/malignancy assay. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2016;5(2):186-209.
110. Willbanks A, Leary M, Greenshields M, Tyminski C, Heerboth S, Lapinska K, i sur. The evolution of epigenetics: from prokaryotes to humans and its biological consequences. *Genetics Epigenetics.* 2016;8:25-36.
111. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet.* 2003;33(3):245-54.
112. Herceg Z, Hainaut P. Genetic and epigenetic alterations as biomarkers for cancer detection, diagnosis and prognosis. *Mol Oncol.* 2007;1(1):26-41.
113. Herceg Z. Epigenetic mechanisms as an interface between the environment and genome. *Adv Exp Med Biol.* 2016;903:3-15.
114. Blomen VA, Boonstra J. Stable transmission of reversible modifications: maintenance of epigenetic information through the cell cycle. *CMLS.* 2011;68(1):27-44.
115. Turner BM. Epigenetic responses to environmental change and their evolutionary implications. *Philos Trans R Soc Lond B, Biol Sci.* 2009;364(1534):3403-18.
116. Ben Maamar M, Lesné L, Hennig K, Desdoits-Lethimonier C, Kilcoyne KR, Coiffec I, i sur. Ibuprofen results in alterations of human fetal testis development. *Sci Rep.* 2017;7:44184.
117. van den Driesche S, Macdonald J, Anderson RA, Johnston ZC, Chetty T, Smith LB, i sur. Prolonged exposure to acetaminophen reduces testosterone production by the human fetal testis in a xenograft model. *Sci Transl Med.* 2015;7(288):288ra80.
118. Rotondo JC, Aquila G, Oton-Gonzalez L, Selvatici R, Rizzo P, De Mattei M, i sur. Methylation of SERPINA1 gene promoter may predict chronic obstructive pulmonary disease in patients affected by acute coronary syndrome. *Clin Epigenetics.* 2021;13(1):79.
119. Nakao M. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene.* 2001;278(1-2):25-31.
120. Lister R, Ecker JR. Finding the fifth base: genome-wide sequencing of cytosine methylation. *Genome Res.* 2009;19(6):959-66.
121. Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet.* 2013;14(3):204-20.

122. Greenberg MVC, Bourc'his D. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(10):590-607.
123. Ziller MJ, Gu H, Müller F, Donaghey J, Tsai LT, Kohlbacher O, i sur. Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nature.* 2013;500(7463):477-81.
124. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet.* 2012;13(7):484-92.
125. Larsen F, Gundersen G, Lopez R, Prydz H. CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics.* 1992;13(4):1095-107.
126. Zhu J, He F, Hu S, Yu J. On the nature of human housekeeping genes. *Trends Genet.* 2008;24(10):481-4.
127. Pérez-Palacios R, Bourc'his D. A single-cell chromatin map of human embryos. *Nat Cell Biol.* 2018;20(7):742-4.
128. Barau J, Teissandier A, Zamudio N, Roy S, Nalesso V, Héroult Y, i sur. The DNA methyltransferase DNMT3C protects male germ cells from transposon activity. *Science.* 2016;354(6314):909-12.
129. Aapola U, Mäenpää K, Kaipia A, Peterson P. Epigenetic modifications affect Dnmt3L expression. *Biochem J.* 2004;380(Pt 3):705-13.
130. Liu Y, Oakeley EJ, Sun L, Jost JP. Multiple domains are involved in the targeting of the mouse DNA methyltransferase to the DNA replication foci. *Nucleic Acids Res.* 1998;26(4):1038-45.
131. Rotondo JC, Lanzillotti C, Mazziotta C, Tognon M, Martini F. Epigenetics of male infertility: the role of DNA methylation. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:689624.
132. Melamed P, Yosefzon Y, David C, Tsukerman A, Pnueli L. Tet enzymes, variants, and differential effects on function. *Front Cell Dev Biol.* 2018;6:22.
133. Williams K, Christensen J, Helin K. DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands? *EMBO reports.* 2011;13(1):28-35.
134. Jin C, Qin T, Barton MC, Jelinek J, Issa JP. Minimal role of base excision repair in TET-induced global DNA demethylation in HEK293T cells. *Epigenetics.* 2015;10(11):1006-13.
135. Valinluck V, Sowers LC. Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Res.* 2007;67(3):946-50.
136. Reik W, Walter J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet.* 2001;2(1):21-32.
137. Castillo J, Jodar M, Oliva R. The contribution of human sperm proteins to the development and epigenome of the preimplantation embryo. *Hum Reprod Update.* 2018;24(5):535-55.
138. Hanna CW, Demond H, Kelsey G. Epigenetic regulation in development: is the mouse a good model for the human? *Hum Reprod Update.* 2018;24(5):556-76.
139. Wasserzug-Pash P, Klutstein M. Epigenetic changes in mammalian gametes throughout their lifetime: the four seasons metaphor. *Chromosoma.* 2019;128(3):423-41.
140. Kohan-Ghadr HR, Kadam L, Jain C, Armant DR, Drewlo S. Potential role of epigenetic mechanisms in regulation of trophoblast differentiation, migration, and invasion in the human placenta. *Cell Adh Migr.* 2016;10(1-2):126-35.
141. Ferguson-Smith AC, Bourc'his D. The discovery and importance of genomic imprinting. *eLife.* 2018;7.
142. Zhang W, Barger CJ, Link PA, Mhawech-Fauceglia P, Miller A, Akers SN, i sur. DNA hypomethylation-mediated activation of cancer/testis antigen 45 (CT45) genes is associated with disease progression and reduced survival in epithelial ovarian cancer. *Epigenetics.* 2015;10(8):736-48.

143. Cheishvili D, Stefanska B, Yi C, Li CC, Yu P, Arakelian A, i sur. A common promoter hypomethylation signature in invasive breast, liver and prostate cancer cell lines reveals novel targets involved in cancer invasiveness. *Oncotarget*. 2015;6(32):33253-68.
144. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *PNAS USA*. 1999;96(15):8681-6.
145. Yin AA, Lu N, Etcheverry A, Aubry M, Barnholtz-Sloan J, Zhang LH, i sur. A novel prognostic six-CpG signature in glioblastomas. *CNS Neurosci Ther*. 2018;24(3):167-77.
146. Saitou M, Kagiwada S, Kurimoto K. Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells. *Development*. 2012;139(1):15-31.
147. Beard C, Li E, Jaenisch R. Loss of methylation activates Xist in somatic but not in embryonic cells. *Genes Dev*. 1995;9(19):2325-34.
148. Saitou M, Miyauchi H. Gametogenesis from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2016;18(6):721-35.
149. Tang WW, Kobayashi T, Irie N, Dietmann S, Surani MA. Specification and epigenetic programming of the human germ line. *Nat Rev Genet*. 2016;17(10):585-600.
150. Seisenberger S, Andrews S, Krueger F, Arand J, Walter J, Santos F, i sur. The dynamics of genome-wide DNA methylation reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mol Cell*. 2012;48(6):849-62.
151. Tang WW, Dietmann S, Irie N, Leitch HG, Floros VI, Bradshaw CR, i sur. A unique gene regulatory network resets the human germline epigenome for development. *Cell*. 2015;161(6):1453-67.
152. Guibert S, Forné T, Weber M. Global profiling of DNA methylation erasure in mouse primordial germ cells. *Genome Res*. 2012;22(4):633-41.
153. Guo F, Yan L, Guo H, Li L, Hu B, Zhao Y, i sur. The transcriptome and DNA methylome landscapes of human primordial germ cells. *Cell*. 2015;161(6):1437-52.
154. Hajkova P, Ancelin K, Waldmann T, Lacoste N, Lange UC, Cesari F, i sur. Chromatin dynamics during epigenetic reprogramming in the mouse germ line. *Nature*. 2008;452(7189):877-81.
155. Lane N, Dean W, Erhardt S, Hajkova P, Surani A, Walter J, i sur. Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse. *Genesis*. 2003;35(2):88-93.
156. Tam PP, Zhou SX, Tan SS. X-chromosome activity of the mouse primordial germ cells revealed by the expression of an X-linked lacZ transgene. *Development*. 1994;120(10):2925-32.
157. Sugimoto M, Abe K. X chromosome reactivation initiates in nascent primordial germ cells in mice. *PLoS Genet*. 2007;3(7):e116.
158. Hackett JA, Sengupta R, Zyllicz JJ, Murakami K, Lee C, Down TA, i sur. Germline DNA demethylation dynamics and imprint erasure through 5-hydroxymethylcytosine. *Science*. 2013;339(6118):448-52.
159. Yamaguchi S, Hong K, Liu R, Inoue A, Shen L, Zhang K, i sur. Dynamic of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine during germ cell reprogramming. *Cell Res*. 2013;23:329-39.
160. Vincent JJ, Huang Y, Chen PY, Feng S, Calvopiña JH, Nee K, i sur. Stage-specific roles for tet1 and tet2 in DNA demethylation in primordial germ cells. *Cell Stem Cell*. 2013;12(4):470-8.
161. Yamaji M, Seki Y, Kurimoto K, Yabuta Y, Yuasa M, Shigeta M, i sur. Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. *Nat Genet*. 2008;40(8):1016-22.

162. Hargan-Calvopina J, Taylor S, Cook H, Hu Z, Lee SA, Yen MR, i sur. Stage-specific demethylation in primordial germ cells safeguards against precocious differentiation. *Dev Cell*. 2016;39(1):75-86.
163. He YF, Li BZ, Li Z, Liu P, Wang Y, Tang Q, i sur. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science*. 2011;333(6047):1303-7.
164. Maiti A, Drohat AC. Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites. *J Biol Chem*. 2011;286(41):35334-8.
165. Hill PWS, Leitch HG, Requena CE, Sun Z, Amouroux R, Roman-Trufero M, i sur. Epigenetic reprogramming enables the transition from primordial germ cell to gonocyte. *Nature*. 2018;555(7696):392-6.
166. Cantão I, Tesser R, Stumpp T. An initial investigation of an alternative model to study rat primordial germ cell epigenetic reprogramming. *Biol Proced Online*. 2017; 9:9.
167. Sugawa F, Araúzo-Bravo MJ, Yoon J, Kim KP, Aramaki S, Wu G, i sur. Human primordial germ cell commitment in vitro associates with a unique PRDM14 expression profile. *EMBO J*. 2015;34(8):1009-24.
168. Kaneda M, Okano M, Hata K, Sado T, Tsujimoto N, Li E, i sur. Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature*. 2004;429(6994):900-3.
169. Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, Yoder JA, Hsieh CL, Zhang X, i sur. Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science*. 2006;311(5759):395-8.
170. Bourc'his D, Bestor TH. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature*. 2004;431(7004):96-9.
171. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999;99(3):247-57.
172. Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*. 1992;69(6):915-26.
173. Li JY, Lees-Murdock DJ, Xu GL, Walsh CP. Timing of establishment of paternal methylation imprints in the mouse. *Genomics*. 2004;84(6):952-60.
174. Davis TL, Yang GJ, McCarrey JR, Bartolomei MS. The H19 methylation imprint is erased and re-established differentially on the parental alleles during male germ cell development. *Hum Mol Genet*. 2000;9(19):2885-94.
175. Western PS, van den Bergen JA, Miles DC, Sinclair AH. Male fetal germ cell differentiation involves complex repression of the regulatory network controlling pluripotency. *FASEB J*. 2010;24(8):3026-35.
176. La Salle S, Mertineit C, Taketo T, Moens PB, Bestor TH, Trasler JM. Windows for sex-specific methylation marked by DNA methyltransferase expression profiles in mouse germ cells. *Dev Biol*. 2004;268(2):403-15.
177. Langenstroth-Röwer D, Gromoll J, Wistuba J, Tröndle I, Laurentino S, Schlatt S, i sur. De novo methylation in male germ cells of the common marmoset monkey occurs during postnatal development and is maintained in vitro. *Epigenetics*. 2017;12(7):527-39.
178. Chambers T, Dean A, Van den Driesche S, Mitchell R, Macpherson S, Anderson R, i sur. DNA methyltransferase 3a, 3b and 3L expression in fetal germ cells and its modulation. *Endoc Abstr*. 2013;31:P295.
179. Galetzka D, Weis E, Tralau T, Seidmann L, Haaf T. Sex-specific windows for high mRNA expression of DNA methyltransferases 1 and 3A and methyl-CpG-binding domain proteins 2 and 4 in human fetal gonads. *Mol Reprod Dev*. 2007;74(2):233-41.

180. Almstrup K, Nielsen JE, Mlynarska O, Jansen MT, Jørgensen A, Skakkebaek NE, i sur. Carcinoma in situ testis displays permissive chromatin modifications similar to immature foetal germ cells. *Br J Cancer*. 2010;103(8):1269-76.
181. Kobayashi H, Sakurai T, Imai M, Takahashi N, Fukuda A, Yayoi O, i sur. Contribution of intragenic DNA methylation in mouse gametic DNA methylomes to establish oocyte-specific heritable marks. *PLoS Genet*. 2012;8(1):e1002440.
182. Guo J, Grow EJ, Yi C, Mlcochova H, Maher GJ, Lindskog C, i sur. Chromatin and single-cell RNA-seq profiling reveal dynamic signaling and metabolic transitions during human spermatogonial stem cell development. *Cell Stem Cell*. 2017;21(4):533-46.e6.
183. Habib WA, Brioude F, Azzi S, Rossignol S, Linglart A, Sobrier ML, i sur. Transcriptional profiling at the DLK1/MEG3 domain explains clinical overlap between imprinting disorders. *Sci Adv*. 2019;5(2):eaau9425.
184. Freschi A, Del Prete R, Pignata L, Cecere F, Manfredola F, Mattia M, i sur. The number of the CTCF binding sites of the H19/IGF2:IG-DMR correlates with DNA methylation and expression imprinting in a humanized mouse model. *Hum Mol Genet*. 2021;30(16):1509-20.
185. <https://www.geneimprint.com/site/genes-by-species>.
186. Hori N, Kubo S, Sakasegawa T, Sakurai C, Hatsuzawa K. OCT3/4-binding sequence-dependent maintenance of the unmethylated state of CTCF-binding sequences with DNA demethylation and suppression of de novo DNA methylation in the H19 imprinted control region. *Gene*. 2020;743:144606.
187. Engel N, Thorvaldsen JL, Bartolomei MS. CTCF binding sites promote transcription initiation and prevent DNA methylation on the maternal allele at the imprinted H19/Igf2 locus. *Hum Mol Genet*. 2006;15(19):2945-54.
188. Hori N, Nakano H, Takeuchi T, Kato H, Hamaguchi S, Oshimura M, i sur. A dyad oct-binding sequence functions as a maintenance sequence for the unmethylated state within the H19/Igf2-imprinted control region. *J Biol Chem*. 2002;277(31):27960-7.
189. Bell AC, Felsenfeld G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature*. 2000;405(6785):482-5.
190. Hark AT, Schoenherr CJ, Katz DJ, Ingram RS, Levorse JM, Tilghman SM. CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature*. 2000;405(6785):486-9.
191. Qiu X, Vu TH, Lu Q, Ling JQ, Li T, Hou A, i sur. A complex deoxyribonucleic acid looping configuration associated with the silencing of the maternal Igf2 allele. *Mol Endocrinol*. 2008;22(6):1476-88.
192. Thorvaldsen JL, Duran KL, Bartolomei MS. Deletion of the H19 differentially methylated domain results in loss of imprinted expression of H19 and Igf2. *Genes Dev*. 1998;12(23):3693-702.
193. Tremblay KD, Saam JR, Ingram RS, Tilghman SM, Bartolomei MS. A paternal-specific methylation imprint marks the alleles of the mouse H19 gene. *Nat Genet*. 1995;9(4):407-13.
194. Ueda T, Abe K, Miura A, Yuzuriha M, Zubair M, Noguchi M, i sur. The paternal methylation imprint of the mouse H19 locus is acquired in the gonocyte stage during foetal testis development. *Genes Cells*. 2000;5(8):649-59.
195. Gunes S, Arslan MA, Hekim GNT, Asci R. The role of epigenetics in idiopathic male infertility. *J Assist Reprod Genet*. 2016;33(5):553-69.
196. Arnaud P. Genomic imprinting in germ cells: imprints are under control. *Reproduction*. 2010;140(3):411-23.
197. Marques CJ, Francisco T, Sousa S, Carvalho F, Barros A, Sousa M. Methylation defects of imprinted genes in human testicular spermatozoa. *Fertil Steril*. 2010;94(2):585-94.

198. Boissonnas CC, Abdalaoui HE, Haelewyn V, Fauque P, Dupont JM, Gut I, i sur. Specific epigenetic alterations of IGF2-H19 locus in spermatozoa from infertile men. *EJHG*. 2010;18(1):73-80.
199. Kobayashi H, Sato A, Otsu E, Hiura H, Tomatsu C, Utsunomiya T, i sur. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Hum Mol Genet*. 2007;16(21):2542-51.
200. Rotondo JC, Selvatici R, Di Domenico M, Marci R, Vesce F, Tognon M, i sur. Methylation loss at H19 imprinted gene correlates with methylenetetrahydrofolate reductase gene promoter hypermethylation in semen samples from infertile males. *Epigenetics*. 2013;8(9):990-7.
201. Tang Q, Pan F, Yang J, Fu Z, Lu Y, Wu X, i sur. Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm: a case-control study. *Clin Epigenetics*. 2018;10(1):134.
202. Lou H, Le F, Hu M, Yang X, Li L, Wang L, i sur. Aberrant DNA methylation of IGF2-H19 locus in human fetus and in spermatozoa from assisted reproductive technologies. *Reprod Sci*. 2019;26(7):997-1004.
203. Chang S, Bartolomei MS. Modeling human epigenetic disorders in mice: Beckwith-Wiedemann syndrome and Silver-Russell syndrome. *Dis Model Mech*. 2020;13(5):dmm044123.
204. Fend-Guella DL, von Kopylow K, Spiess A-N, Schulze W, Salzbrunn A, Diederich S, i sur. The DNA methylation profile of human spermatogonia at single-cell- and single-allele-resolution refutes its role in spermatogonial stem cell function and germ cell differentiation. *Mol Hum Reprod*. 2019;25(6):283-94.
205. Kerjean A, Dupont J-M, Vasseur C, Le Tessier D, Cuisset L, Paldi A, i sur. Establishment of the paternal methylation imprint of the human H19 and MEST/PEG1 genes during spermatogenesis. *Hum Mol Genet*. 2000;9(14):2183-7.
206. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Publishing, Inc. 1989
207. Lachner M, Jenuwein T. The many faces of histone lysine methylation. *Curr Opin Cell Biol*. 2002;14(3):286-98.
208. Fuks F. DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. *Curr Opin Genet Dev*. 2005;15(5):490-5.
209. Berger SL. Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev*. 2002;12(2):142-8.
210. Fernandez-Capetillo O, Mahadevaiah SK, Celeste A, Romanienko PJ, Camerini-Otero RD, Bonner WM, i sur. H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Dev Cell*. 2003;4(4):497-508.
211. Baarends WM, Wassenaar E, Hoogerbrugge JW, Schoenmakers S, Sun ZW, Grootegoed JA. Increased phosphorylation and dimethylation of XY body histones in the Hr6b-knockout mouse is associated with derepression of the X chromosome. *J Cell Sci*. 2007;120(11):1841-51.
212. Shiio Y, Eisenman RN. Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *PNAS USA*. 2003;100(23):13225-30.
213. Rogers RS, Inselman A, Handel MA, Matunis MJ. SUMO modified proteins localize to the XY body of pachytene spermatocytes. *Chromosoma*. 2004;113(5):233-43.
214. Abe M, Tsai SY, Jin SG, Pfeifer GP, Szabó PE. Sex-specific dynamics of global chromatin changes in fetal mouse germ cells. *PLoS One*. 2011;6(8):e23848.
215. Seki Y, Hayashi K, Itoh K, Mizugaki M, Saitou M, Matsui Y. Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice. *Dev Biol*. 2005;278(2):440-58.

216. Kim S, Günesdogan U, Zyllicz JJ, Hackett JA, Cougot D, Bao S, i sur. PRMT5 protects genomic integrity during global DNA demethylation in primordial germ cells and preimplantation embryos. *Mol Cell*. 2014;56(4):564-79.
217. Hasegawa K, Sin H-S, Maezawa S, Broering Tyler J, Kartashov Andrey V, Alavattam Kris G, i sur. SCML2 establishes the male germline epigenome through regulation of histone h2a ubiquitination. *Dev Cell*. 2015;32(5):574-88.
218. Solyom S, Kazazian HH, Jr. Mobile elements in the human genome: implications for disease. *Genome Med*. 2012;4(2):12.
219. Beck CR, Garcia-Perez JL, Badge RM, Moran JV. LINE-1 elements in structural variation and disease. *Annu Rev Genomics Human Genet*. 2011;12:187-215.
220. Branco MR, King M, Perez-Garcia V, Bogutz AB, Caley M, Fineberg E, i sur. Maternal DNA methylation regulates early trophoblast development. *Dev Cell*. 2016;36(2):152-63.
221. Brouha B, Schustak J, Badge RM, Lutz-Prigge S, Farley AH, Moran JV, i sur. Hot L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population. *PNAS USA*. 2003;100(9):5280-5.
222. Pizarro J, Cristofari G. Post-transcriptional control of LINE-1 retrotransposition by cellular host factors in somatic cells. *Front Cell Dev Biol*. 2016;4:14.
223. Goodier JL. Restricting retrotransposons: a review. *Mob DNA*. 2016;7:16.
224. Muotri AR, Chu VT, Marchetto MCN, Deng W, Moran JV, Gage FH. Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition. *Nature*. 2005;435(7044):903-10.
225. Kano H, Godoy I, Courtney C, Vetter MR, Gerton GL, Ostertag EM, i sur. L1 retrotransposition occurs mainly in embryogenesis and creates somatic mosaicism. *Genes Dev*. 2009;23(11):1303-12.
226. Lee E, Iskow R, Yang L, Gokcumen O, Haseley P, Luquette LJ, 3rd, i sur. Landscape of somatic retrotransposition in human cancers. *Science*. 2012;337(6097):967-71.
227. Sur D, Kustwar RK, Budania S, Mahadevan A, Hancks DC, Yadav V, i sur. Detection of the LINE-1 retrotransposon RNA-binding protein ORF1p in different anatomical regions of the human brain. *Mob DNA*. 2017;8(1):17.
228. Budania S, Sur D, Nangal J, Pilli S, Mukherjee K, Biswas M, i sur. LINE-1 retrotransposon encoded ORF1p expression and promoter methylation in oral squamous cell carcinoma: a pilot study. *Cancer Genet*. 2020;244:21-9.
229. Ergün S, Buschmann C, Heukeshoven J, Dammann K, Schnieders F, Lauke H, i sur. Cell type-specific expression of LINE-1 open reading frames 1 and 2 in fetal and adult human tissues. *J Biol Chem*. 2004;279(26):27753-63.
230. Aravin AA, Sachidanandam R, Bourc'his D, Schaefer C, Pezic D, Toth KF, i sur. A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice. *Mol Cell*. 2008;31(6):785-99.
231. Carrieri C, Comazzetto S, Grover A, Morgan M, Buness A, Nerlov C, i sur. A transit-amplifying population underpins the efficient regenerative capacity of the testis. *J Exp Med*. 2017;214(6):1631-41.
232. Ernst C, Odom DT, Kutter C. The emergence of piRNAs against transposon invasion to preserve mammalian genome integrity. *Nat Commun*. 2017;8(1):1411.
233. Gomes Fernandes M, He N, Wang F, Van Iperen L, Eguizabal C, Matorras R, i sur. Human-specific subcellular compartmentalization of P-element induced wimpy testis-like (PIWIL) granules during germ cell development and spermatogenesis. *Hum Reprod*. 2018;33(2):258-69.
234. Mäkelä JA, Toppari J. Retinoblastoma-E2F transcription factor interplay is essential for testicular development and male fertility. *Front Endocrinol*. 2022;13:903684.

235. Wolgemuth D, Manterola M, Vasileva A. Role of cyclins in controlling progression of mammalian spermatogenesis. *Int J Dev Biol.* 2013;57:159-68.
236. Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, et al. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature.* 1986;323(6089):643-6.
237. Lee WH, Bookstein R, Hong F, Young LJ, Shew JY, Lee EY. Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science.* 1987;235(4794):1394-9.
238. Hannon GJ, Demetrick D, Beach D. Isolation of the Rb-related p130 through its interaction with CDK2 and cyclins. *Genes Dev.* 1993;7(12a):2378-91.
239. Zhu L, van den Heuvel S, Helin K, Fattaey A, Ewen M, Livingston D, et al. Inhibition of cell proliferation by p107, a relative of the retinoblastoma protein. *Genes Dev.* 1993;7(7a):1111-25.
240. Classon M, Harlow E. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nature reviews Cancer.* 2002;2(12):910-7.
241. Zheng L, Lee WH. Retinoblastoma tumor suppressor and genome stability. *Adv Cancer Res.* 2002;85:13-50.
242. Qin XQ, Chittenden T, Livingston DM, Kaelin WG, Jr. Identification of a growth suppression domain within the retinoblastoma gene product. *Genes Dev.* 1992;6(6):953-64.
243. Classon M, Salama S, Gorka C, Mulloy R, Braun P, Harlow E. Combinatorial roles for pRB, p107, and p130 in E2F-mediated cell cycle control. *PNAS USA.* 2000;97(20):10820-5.
244. Munro S, Carr SM, La Thangue NB. Diversity within the pRb pathway: is there a code of conduct? *Oncogene.* 2012;31(40):4343-52.
245. Zarkowska T, Mittnacht S. Differential phosphorylation of the retinoblastoma protein by G1/S cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem.* 1997;272(19):12738-46.
246. Hinds PW, Mittnacht S, Dulic V, Arnold A, Reed SI, Weinberg RA. Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell.* 1992;70(6):993-1006.
247. Martinsson H-S, Starborg M, Erlandsson F, Zetterberg A. Single cell analysis of G1 check points—the relationship between the restriction point and phosphorylation of pRb. *Experimental Cell Res.* 2005;305(2):383-91.
248. Ludlow JW, Glendening CL, Livingston DM, DeCarprio JA. Specific enzymatic dephosphorylation of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol.* 1993;13(1):367-72.
249. Rubin E, Mittnacht S, Villa-Moruzzi E, Ludlow JW. Site-specific and temporally-regulated retinoblastoma protein dephosphorylation by protein phosphatase type 1. *Oncogene.* 2001;20(29):3776-85.
250. Binné UK, Classon MK, Dick FA, Wei W, Rape M, Kaelin WG, Jr., et al. Retinoblastoma protein and anaphase-promoting complex physically interact and functionally cooperate during cell-cycle exit. *Nat Cell Biol.* 2007;9(2):225-32.
251. Macdonald JI, Dick FA. Posttranslational modifications of the retinoblastoma tumor suppressor protein as determinants of function. *Genes Cancer.* 2012;3(11-12):619-33.
252. Delston RB, Matatall KA, Sun Y, Onken MD, Harbour JW. p38 phosphorylates Rb on Ser567 by a novel, cell cycle-independent mechanism that triggers Rb-Hdm2 interaction and apoptosis. *Oncogene.* 2011;30(5):588-99.
253. Harbour JW, Luo RX, Dei Santi A, Postigo AA, Dean DC. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell.* 1999;98(6):859-69.
254. Taneja SS, Ha S, Garabedian MJ. Androgen stimulated cellular proliferation in the human prostate cancer cell line LNCaP is associated with reduced retinoblastoma protein expression. *J Cell Biochemi.* 2002;84(1):188-200.

255. Feng LX, Ravindranath N, Dym M. Stem cell factor/c-kit up-regulates cyclin D3 and promotes cell cycle progression via the phosphoinositide 3-kinase/p70 S6 kinase pathway in spermatogonia. *J Biol Chem.* 2000;275(33):25572-6.
256. Nair JS, Ho AL, Tse AN, Coward J, Cheema H, Ambrosini G, i sur. Aurora B kinase regulates the postmitotic endoreduplication checkpoint via phosphorylation of the retinoblastoma protein at serine 780. *Mol Biol Cell.* 2009;20(8):2218-28.
257. Huynh H, Do PT, Nguyen TH, Chow P, Tan PH, Quach TH, i sur. Extracellular signal-regulated kinase induces cyclin D1 and Cdk-2 expression and phosphorylation of retinoblastoma in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol.* 2004;25(6):1839-47.
258. Wong PP, Pickard A, McCance DJ. p300 alters keratinocyte cell growth and differentiation through regulation of p21(Waf1/CIP1). *PloS One.* 2010;5(1):e8369.
259. Uchida C, Miwa S, Kitagawa K, Hattori T, Isobe T, Otani S, i sur. Enhanced Mdm2 activity inhibits pRB function via ubiquitin-dependent degradation. *EMBO J.* 2005;24(1):160-9.
260. Ledl A, Schmidt D, Müller S. Viral oncoproteins E1A and E7 and cellular LxCxE proteins repress SUMO modification of the retinoblastoma tumor suppressor. *Oncogene.* 2005;24(23):3810-8.
261. Spencer SL, Cappell SD, Tsai FC, Overton KW, Wang CL, Meyer T. The proliferation-quiescence decision is controlled by a bifurcation in CDK2 activity at mitotic exit. *Cell.* 2013;155(2):369-83.
262. Naetar N, Soundarapandian V, Litovchick L, Goguen KL, Sablina AA, Bowman-Colin C, i sur. PP2A-mediated regulation of Ras signaling in G2 is essential for stable quiescence and normal G1 length. *Mol Cell.* 2014;54(6):932-45.
263. Barr AR, Cooper S, Heldt FS, Butera F, Stoy H, Mansfeld J, i sur. DNA damage during S-phase mediates the proliferation-quiescence decision in the subsequent G1 via p21 expression. *Nat Commun.* 2017;8:14728.
264. Arora M, Moser J, Phadke H, Basha AA, Spencer SL. Endogenous replication stress in mother cells leads to quiescence of daughter cells. *Cell Rep.* 2017;19(7):1351-64.
265. Yang HW, Chung M, Kudo T, Meyer T. Competing memories of mitogen and p53 signalling control cell-cycle entry. *Nature.* 2017;549(7672):404-8.
266. Lezaja A, Altmeyer M. Inherited DNA lesions determine G1 duration in the next cell cycle. *Cell Cycle.* 2018;17(1):24-32.
267. Moser J, Miller I, Carter D, Spencer SL. Control of the restriction point by Rb and p21. *PNAS USA.* 2018;115(35):E8219-e27.
268. Yan W, West A, Toppari J, Lähdetie J. Stage-specific expression and phosphorylation of retinoblastoma protein (pRb) in the rat seminiferous epithelium. *Mol Cell Endocrinol.* 1997;132(1):137-48.
269. Nalam RL, Andreu-Vieyra C, Braun RE, Akiyama H, Matzuk MM. Retinoblastoma protein plays multiple essential roles in the terminal differentiation of Sertoli cells. *Mol Endocrinol.* 2009;23(11):1900-13.
270. Rotgers E, Cisneros-Montalvo S, Nurmio M, Toppari J. Retinoblastoma protein represses E2F3 to maintain Sertoli cell quiescence in mouse testis. *J Cell Sci.* 2019;132(14):jcs229849.
271. Nunes M, Arantes AD, Tesser RB, da Silva PH, da Silva LR, de Oliva SU, i sur. Non-apoptotic role of cleaved caspase 3 in rat gonocyte. *bioRxiv.* 2020:2020.02.18.953646.
272. Marić S, Bulić-Jakuš F, Ježek D, Jurić-Lekić G, Kos M, Vlahović M. Expression of the proliferating cell nuclear antigen and protein products of tumour suppressor genes in the human foetal testis. *Andrologia.* 2004;36(1):24-30.
273. Cordon-Cardo C, Richon VM. Expression of the retinoblastoma protein is regulated in normal human tissues. *Am J Pathol.* 1994;144(3):500-10.

274. Bartkova J, Lukas C, Sørensen CS, Meyts ER-D, Skakkebaek NE, Lukas J, i sur. Deregulation of the RB pathway in human testicular germ cell tumours. *J Pathol.* 2003;200(2):149-56.
275. Hu YC, de Rooij DG, Page DC. Tumor suppressor gene Rb is required for self-renewal of spermatogonial stem cells in mice. *PNAS USA.* 2013;110(31):12685-90.
276. Bartkova J, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE, Lukas J, Bartek J. Deregulation of the G1/S-phase control in human testicular germ cell tumours. *APMIS.* 2003;111(1):252-65; discussion 65-6.
277. Lee EY, Chang CY, Hu N, Wang YC, Lai CC, Herrup K, i sur. Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature.* 1992;359(6393):288-94.
278. Clarke AR, Maandag ER, van Roon M, van der Lugt NM, van der Valk M, Hooper ML, i sur. Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. *Nature.* 1992;359(6393):328-30.
279. Du G, Oatley MJ, Law NC, Robbins C, Wu X, Oatley JM. Proper timing of a quiescence period in precursor prospermatogonia is required for stem cell pool establishment in the male germline. *Development.* 2021;148(9).
280. Yang QE, Gwost I, Oatley MJ, Oatley JM. Retinoblastoma protein (RB1) controls fate determination in stem cells and progenitors of the mouse male germline. *Biol Reprod.* 2013;89(5):113.
281. Spiller CM, Wilhelm D, Koopman P. Retinoblastoma 1 protein modulates XY germ cell entry into G1/G0 arrest during fetal development in mice. *Biol Reprod.* 2010;82(2):433-43.
282. Ahmed EA, Barten-van Rijbroek AD, Kal HB, Sadri-Ardekani H, Mizrak SC, van Pelt AM, i sur. Proliferative activity in vitro and DNA repair indicate that adult mouse and human Sertoli cells are not terminally differentiated, quiescent cells. *Biol Reprod.* 2009;80(6):1084-91.
283. Mäkelä JA, Toppari J, Rivero-Müller A, Ventelä S. Reconstruction of mouse testicular cellular microenvironments in long-term seminiferous tubule culture. *PloS One.* 2014;9(3):e90088.
284. Tam PP, Snow MH. Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol.* 1981;64:133-47.
285. Western PS, Miles DC, van den Bergen JA, Burton M, Sinclair AH. Dynamic regulation of mitotic arrest in fetal male germ cells. *Stem Cells.* 2008;26(2):339-47.
286. Culty M. Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage. *Birth Defects Res C: Embryo Today: Reviews.* 2009;87(1):1-26.
287. Nagano R, Tabata S, Nakanishi Y, Ohsako S, Kurohmaru M, Hayashi Y. Reproliferation and relocation of mouse male germ cells (gonocytes) during prespermatogenesis. *Anat Rec.* 2000;258(2):210-20.
288. Vergouwen RP, Jacobs SG, Huiskamp R, Davids JA, de Rooij DG. Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *J Reprod Fertil.* 1991;93(1):233-43.
289. Picut CA, Remick AK, de Rijk EPCT, Simons ML, Stump DG, Parker GA. Postnatal development of the testis in the rat:morphologic study and correlation of morphology to neuroendocrine parameters. *Toxicol Pathol.* 2015;43(3):326-42.
290. Mamsen LS, Lutterodt MC, Andersen EW, Byskov AG, Andersen CY. Germ cell numbers in human embryonic and fetal gonads during the first two trimesters of pregnancy: analysis of six published studies. *Hum Reprod.* 2011;26(8):2140-5.
291. Hilscher B, Engemann A. Histological and morphometric studies on the kinetics of germ cells and immature Sertoli cells during human prespermatogenesis. *Andrologia.* 1992;24(1):7-10.

292. Richards AJ, Enders GC, Resnick JL. Activin and TGFbeta limit murine primordial germ cell proliferation. *Dev Biol.* 1999;207(2):470-5.
293. Godin I, Wylie CC. TGF beta 1 inhibits proliferation and has a chemotropic effect on mouse primordial germ cells in culture. *Development.* 1991;113(4):1451-7.
294. Kaipia A, Toppari J, Huhtaniemi I, Paranko J. Sex difference in the action of activin-A on cell proliferation of differentiating rat gonad. *Endocrinology.* 1994;134(5):2165-70.
295. Moreno SG, Attali M, Allemand I, Messiaen S, Fouchet P, Coffigny H, i sur. TGFbeta signaling in male germ cells regulates gonocyte quiescence and fertility in mice. *Dev Biol.* 2010;342(1):74-84.
296. Mendis SH, Meachem SJ, Sarraj MA, Loveland KL. Activin A balances Sertoli and germ cell proliferation in the fetal mouse testis. *Biol Reprod.* 2011;84(2):379-91.
297. DiNapoli L, Batchvarov J, Capel B. FGF9 promotes survival of germ cells in the fetal testis. *Development.* 2006;133(8):1519-27.
298. Moniot B, Ujjan S, Champagne J, Hirai H, Aritake K, Nagata K, i sur. Prostaglandin D2 acts through the Dp2 receptor to influence male germ cell differentiation in the foetal mouse testis. *Development.* 2014;141(18):3561-71.
299. Merlet J, Racine C, Moreau E, Moreno SG, Habert R. Male fetal germ cells are targets for androgens that physiologically inhibit their proliferation. *PNAS USA.* 2007;104(9):3615-20.
300. Trautmann E, Guerquin MJ, Duquenne C, Lahaye JB, Habert R, Livera G. Retinoic acid prevents germ cell mitotic arrest in mouse fetal testes. *Cell Cycle.* 2008;7(5):656-64.
301. Kimura T, Suzuki A, Fujita Y, Yomogida K, Lomeli H, Asada N, i sur. Conditional loss of PTEN leads to testicular teratoma and enhances embryonic germ cell production. *Development.* 2003;130(8):1691-700.
302. Krentz AD, Murphy MW, Kim S, Cook MS, Capel B, Zhu R, i sur. The DM domain protein DMRT1 is a dose-sensitive regulator of fetal germ cell proliferation and pluripotency. *PNAS USA.* 2009;106(52):22323-8.
303. Cook MS, Munger SC, Nadeau JH, Capel B. Regulation of male germ cell cycle arrest and differentiation by DND1 is modulated by genetic background. *Development.* 2011;138(1):23-32.
304. Molyneaux KA, Stallock J, Schaible K, Wylie C. Time-lapse analysis of living mouse germ cell migration. *Dev Biol.* 2001;240(2):488-98.
305. Culty M. Gonocytes, from the fifties to the present: is there a reason to change the name? *Biol Reprod.* 2013;89(2):46.
306. McCarrey JR. Toward a more precise and informative nomenclature describing fetal and neonatal male germ cells in rodents. *Biol Reprod.* 2013;89(2):47.
307. Pui HP, Saga Y. Gonocytes-to-spermatogonia transition initiates prior to birth in murine testes and it requires FGF signaling. *Mech Dev.* 2017;144(Pt B):125-39.
308. Suzuki A, Tsuda M, Saga Y. Functional redundancy among Nanos proteins and a distinct role of Nanos2 during male germ cell development. *Development.* 2007;134(1):77-83.
309. Pui HP, Saga Y. NANOS2 acts as an intrinsic regulator of gonocytes-to-spermatogonia transition in the murine testes. *Mech Dev.* 2018;149:27-40.
310. Roosen-Runge EC, Leik J. Gonocyte degeneration in the postnatal male rat. *The Am J Anat.* 1968;122(2):275-99.
311. Beaumont HM, Mandl AM. A quantitative study of primordial germ cells in the male rat. *J Embryol Exp Morphol.* 1963;11(4):715-40.
312. Koubova J, Menke DB, Zhou Q, Capel B, Griswold MD, Page DC. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *PNAS USA.* 2006;103(8):2474-9.
313. Bowles J, Knight D, Smith C, Wilhelm D, Richman J, Mamiya S, i sur. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science.* 2006;312(5773):596-600.

314. Honecker F, Stoop H, de Krijger RR, Chris Lau YF, Bokemeyer C, Looijenga LH. Pathobiological implications of the expression of markers of testicular carcinoma in situ by fetal germ cells. *J Pathol.* 2004;203(3):849-57.
315. Lundgaard Riis M, Jørgensen A. Deciphering sex-specific differentiation of human fetal gonads: insight from experimental models. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10:902082.
316. Rajpert-De Meyts E, Hanstein R, Jørgensen N, Graem N, Vogt PH, Skakkebaek NE. Developmental expression of POU5F1 (OCT-3/4) in normal and dysgenetic human gonads. *Hum Reprod.* 2004;19(6):1338-44.
317. Childs AJ, Cowan G, Kinnell HL, Anderson RA, Saunders PT. Retinoic Acid signalling and the control of meiotic entry in the human fetal gonad. *PLoS One.* 2011;6(6):e20249.
318. Gaskell TL, Esnal A, Robinson LL, Anderson RA, Saunders PT. Immunohistochemical profiling of germ cells within the human fetal testis: identification of three subpopulations. *Biol Reprod.* 2004;71(6):2012-21.
319. Hoei-Hansen CE, Almstrup K, Nielsen JE, Brask Sonne S, Graem N, Skakkebaek NE, i sur. Stem cell pluripotency factor NANOG is expressed in human fetal gonocytes, testicular carcinoma in situ and germ cell tumours. *Histopathology.* 2005;47(1):48-56.
320. Heeren AM, He N, de Souza AF, Goercharn-Ramlal A, van Iperen L, Roost MS, i sur. On the development of extragonadal and gonadal human germ cells. *Biol Open.* 2016;5(2):185-94.
321. Overeem AW, Chang YW, Spruit J, Roelse CM, Chuva De Sousa Lopes SM. Ligand-receptor interactions elucidate sex-specific pathways in the trajectory from primordial germ cells to gonia during human development. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:661243.
322. Czukiewska SM, Chuva de Sousa Lopes SM. Fetal germ cell development in humans, a link with infertility. *Semin Cell Dev Biol.* 2022;S1084-9521(22)00117-3.
323. Forest MG, Cathiard AM, Bertrand JA. Evidence of testicular activity in early infancy. *J Clin Endocr.* 1973;37(1):148-51.
324. Forest MG, Sizonenko PC, Cathiard AM, Bertrand J. Hypophyso-gonadal function in humans during the first year of life. 1. Evidence for testicular activity in early infancy. *J Clin Investig.* 1974;53(3):819-28.
325. Hadžiselimović F, Thommen L, Girard J, Herzog B. The significance of postnatal gonadotropin surge for testicular development in normal and cryptorchid testes. *J Urol.* 1986;136(1):274-6.
326. Job JC, Toublanc JE, Chaussain JL, Gendrel D, Garnier P, Roger M. Endocrine and immunological findings in cryptorchid infants. *Horm Res.* 1988;30(4-5):167-72.
327. Loebenstein M, Thorup J, Cortes D, Clasen-Linde E, Hutson JM, Li R. Cryptorchidism, gonocyte development, and the risks of germ cell malignancy and infertility: A systematic review. *J Pediatr Surg.* 2020;55(7):1201-10.
328. Talukdar FR, Abramović I, Cuenin C, Carreira C, Gangane N, Sincic N, i sur. A protocol for good quality genomic DNA isolation from formalin-fixed paraffin-embedded tissues without using commercial kits. *bioRxiv.* 2021;2021.07.23.452892.
329. <https://genome.ucsc.edu/>.
330. Daskalos A, Nikolaidis G, Xinarianos G, Savvari P, Cassidy A, Zakopoulou R, i sur. Hypomethylation of retrotransposable elements correlates with genomic instability in non-small cell lung cancer. *In J Cancer.* 2009;124(1):81-7.
331. Bruno C, Carmignac V, Netchine I, Choux C, Duffourd Y, Faivre L, i sur. Germline correction of an epimutation related to Silver-Russell syndrome. *Hum Mol Genet.* 2015;24(12):3314-21.
332. Hamm CA, Xie H, Costa FF, Vanin EF, Seftor EA, Sredni ST, i sur. Global demethylation of rat chondrosarcoma cells after treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine results in increased tumorigenicity. *PLoS One.* 2009;4(12):e8340.

333. Amarger V, Giudicelli F, Pagniez A, Parnet P. Perinatal high methyl donor alters gene expression in IGF system in male offspring without altering DNA methylation. *Future Sci OA*. 2017;3(1):Fso164.
334. Chen LY, Willis WD, Eddy EM. Targeting the Gdnf Gene in peritubular myoid cells disrupts undifferentiated spermatogonial cell development. *PNAS USA*. 2016;113(7):1829-34.
335. Kvist K, Clasen-Linde E, Langballe O, Hansen SH, Cortes D, Thorup J. The expression of markers for intratubular germ cell neoplasia in normal infantile testes. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:286.
336. Franchi LL, Mandl AM. The ultrastructure of germ cells in foetal and neonatal male rats. *J Embryol Exp Morphol*. 1964;12:289-308.
337. Ahmed F. Epigenetics: Tales of adversity. *Nature*. 2010;468(7327):S20-S.
338. Belle M, Godefroy D, Couly G, Malone SA, Collier F, Giacobini P, i sur. Tridimensional visualization and analysis of early human development. *Cell*. 2017;169(1):161-73.e12.
339. Baskin L, Cao M, Derpinghaus A, Aksel S, Overland M, Li Y, i sur. A model to study human ovotesticular syndrome. *Differentiation*. 2021;S0301468121000694.
340. Shirakawa T, Yaman-Deveci R, Tomizawa S, Kamizato Y, Nakajima K, Sone H, i sur. An epigenetic switch is crucial for spermatogonia to exit the undifferentiated state toward a Kit-positive identity. *Development*. 2013;140(17):3565-76.
341. Zhou S, Sakashita A, Yuan S, Namekawa SH. Retrotransposons in the mammalian male germline. *Sex Dev*. 2022;1-19.
342. Rocha-da-Silva L, Armelin-Correa L, Cantão IH, Flister VJF, Nunes M, Stumpp T. Expression of genome defence protein members in proliferating and quiescent rat male germ cells and the Nuage dynamics. *PloS One*. 2019;14(6):e0217941.
343. Mukherjee K, Sur D, Singh A, Rai S, Das N, Sekar R, i sur. Robust expression of LINE-1 retrotransposon encoded proteins in oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2021;21(1):628.
344. Matsuzaki H, Miyajima Y, Fukamizu A, Tanimoto K. Orientation of mouse H19 ICR affects imprinted H19 gene expression through promoter methylation-dependent and -independent mechanisms. *Commun Biol*. 2021;4(1):1410.
345. Stadnick MP, Pieracci FM, Cranston MJ, Taksel E, Thorvaldsen JL, Bartolomei MS. Role of a 461-bp G-rich repetitive element in H19 transgene imprinting. *Dev Genes Evol*. 1999;209(4):239-48.
346. Kerachian MA, Kerachian M. Long interspersed nucleotide element-1 (LINE-1) methylation in colorectal cancer. *Clin Chim Acta*. 2019;488:209-14.
347. Zogbi C, Tesser RB, Encinas G, Miraglia SM, Stumpp T. Gonocyte development in rats: proliferation, distribution and death revisited. *Histochem Cell Biol*. 2012;138(2):305-22.
348. Tan KAL, Turner KJ, Saunders PTK, Verhoeven G, De Gendt K, Atanassova N, i sur. Androgen regulation of stage-dependent cyclin D2 expression in Sertoli cells suggests a role in modulating androgen action on spermatogenesis. *Biol Reprod*. 2005;72(5):1151-60.
349. Baker SJ, Reddy EP. CDK4: a key player in the cell cycle, development, and cancer. *Genes Cancer*. 2012;3(11-12):658-69.
350. Ozturk N, Dansranjav T, Gies S, Calay D, Shiplu S, Creppe C, i sur. H4K20me3 marks distal intergenic and repetitive regions in human mature spermatozoa. *Development*. 2021;148(15):dev196477.
351. Bratthauer GL, Fanning TG. LINE-1 retrotransposon expression in pediatric germ cell tumors. *Cancer*. 1993;71(7):2383-6.
352. Kristensen DG, Nielsen JE, Jørgensen A, Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Almstrup K. Evidence that active demethylation mechanisms maintain the genome of carcinoma in situ cells hypomethylated in the adult testis. *Br J Cancer*. 2014;110(3):668-78.

353. Kawakami T, Zhang C, Okada Y, Okamoto K. Erasure of methylation imprint at the promoter and CTCF-binding site upstream of H19 in human testicular germ cell tumors of adolescents indicate their fetal germ cell origin. *Oncogene*. 2006;25(23):3225-36.
354. Szekely L, Jiang WQ, Bulić-Jakuš F, Rosen A, Ringertz N, Klein G, i sur. Cell type and differentiation dependent heterogeneity in retinoblastoma protein expression in SCID mouse fetuses. *Cell Growth Differ*. 1992;3(3):149-56.
355. Lipsick J. *A History of Cancer Research: Tumor Suppressor Genes*. Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2020;12(2):a035907.
356. Cohen Y, Merhavi-Shoham E, Avraham RB, Frenkel S, Pe'er J, Goldenberg-Cohen N. Hypermethylation of CpG island loci of multiple tumor suppressor genes in retinoblastoma. *Experimental eye research*. 2008;86(2):201-6.
357. Giacinti C, Giordano A. RB and cell cycle progression. *Oncogene*. 2006;25(38):5220-7.
358. Buttitta LA, Edgar BA. Mechanisms controlling cell cycle exit upon terminal differentiation. *Curr Opin Cell Biol*. 2007;19(6):697-704.
359. Kalmár A, Péterfia B, Wichmann B, Patai ÁV, Barták BK, Nagy ZB, i sur. Comparison of automated and manual dna isolation methods for dna methylation analysis of biopsy, fresh frozen, and formalin-fixed, paraffin-embedded colorectal cancer samples. *J Lab Autom*. 2015;20(6):642-51.
360. Bergmann M, Kliesch S. Testicular biopsy and histology. In: Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S, editors. *Andrology: Male reproductive health and dysfunction*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010. p. 155-67.
361. Ježek D, Knuth UA, Schulze W. Successful testicular sperm extraction (TESE) in spite of high serum follicle stimulating hormone and azoospermia: correlation between testicular morphology, TESE results, semen analysis and serum hormone values in 103 infertile men. *Hum Reprod (Oxford, England)*. 1998;13(5):1230-4.
362. Hauptman D, Hudolin T, Zimak Z, Kuliš T, Ježek D, Kaštelan Ž. Conventional TESE technique: A short review and a single-centre experience in 9 years. *Rad Hrvat akad znan umjet*. 2021;547.
363. O'Leary JJ, Browne G, Landers RJ, Crowley M, Healy IB, Street JT, i sur. The importance of fixation procedures on DNA template and its suitability for solution-phase polymerase chain reaction and PCR in situ hybridization. *Histochem J*. 1994;26(4):337-46.
364. Babayev SN, Arslan E, Kogan S, Moy F, Oktay K. Evaluation of ovarian and testicular tissue cryopreservation in children undergoing gonadotoxic therapies. *J Assist Reprod Genet*. 2013;30(1):3-9.
365. Markova V, Holm C, Pinborg AB, Thomsen LL, Moos T. Impairment of the developing human brain in iron deficiency: correlations to findings in experimental animals and prospects for early intervention therapy. *Pharmaceuticals*. 2019;12(3):120.
366. Ohmura Y, Kuniyoshi Y. A translational model to determine rodent's age from human foetal age. *Sci Rep*. 2017;7(1):17248.
367. Zhu Q, Sang F, Withey S, Tang W, Dietmann S, Klisch D, i sur. Specification and epigenomic resetting of the pig germline exhibit conservation with the human lineage. *Cell reports*. 2021;34(6):108735.
368. Guo H, Hu B, Yan L, Yong J, Wu Y, Gao Y, i sur. DNA methylation and chromatin accessibility profiling of mouse and human fetal germ cells. *Cell Res*. 2017;27(2):165-83.

11. ŽIVOTOPIS

Marta Himmelreich Perić rođena je 30. siječnja 1989. godine u Zagrebu. Nakon završene XV. gimnazije upisuje Medicinski fakultet u Zagrebu, a diplomu stječe 2014. godine. Po završetku pripravničkog staža u KBC „Sestre milosrdnice“ radi na otoku Silbi i u Karlovcu kao liječnik opće medicine te se usavršava na primjerenim tečajevima. Doktorski studij „Biomedicina i zdravstvo“ pri MEF-u upisuje 2017. godine, a 2018. priključuje se radu Znanstvenog centra izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu na projektu „Reproduktivna i regenerativna medicina - istraživanje novih platformi i potencijala“ pod vodstvom prof. dr. sc. Davora Ježeka u suradničkom zvanju, na radnom mjestu asistenta. Pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ane Katušić Bojanac i u suradnji s prof. dr. sc. Florijanom Bulić-Jakuš i prof. dr. sc. Davorom Ježekom aktivno sudjeluje u istraživačkom radu kao doktorand. Tijekom rada na projektu objavljuje niz članaka u znanstvenim časopisima, sudjeluje u radu kongresa i tečajeva te u izvedbi nastave za studente medicine.

Udana je, majka jedne kćeri. Govori mađarski i engleski jezik.