# Uloga PRDM9 gena u procesu rekombinacije DNA

**Matijević, Magdalena**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:368525

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-29**



*Repository / Repozitorij:*

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb








SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

**AGRONOMSKI FAKULTET**

# ULOGA *PRDM9* GENA U PROCESU REKOMBINACIJE DNA

DIPLOMSKI RAD

Magdalena Matijević

Zagreb, lipanj, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

**AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:

Genetika i Oplemenjivanje Životinja

# ULOGA *PRDM9* GENA U PROCESU REKOMBINACIJE DNA

DIPLOMSKI RAD

Magdalena Matijević

Mentor: doc.dr.sc. Maja Ferenčaković

Neposredni voditelj: dr.sc. Dinko Novosel

Zagreb, lipanj, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

**AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA**

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Magdalena Matijević**, JMBAG 0178093230, rođen/a dana 10.06.1993. u Zagrebu,

izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

**ULOGA *PRDM9* GENA U PROCESU REKOMBINACIJE DNA**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____ _____

*Potpis studenta / studentice*

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

**AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZVJEŠĆE**

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Magdalene Matijević**, JMBAG 0178093230, naslova

**ULOGA *PRDM9* GENA U PROCESU REKOMBINACIJE DNA**

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

| Povjerenstvo: | | | potpisi: |
|---|---|---|---|
| 1. | doc.dr.sc. Maja Ferenčaković | mentor | _____ |
| | dr.sc. Dinko Novosel | neposredni voditelj | _____ |
| 2. | prof.dr.sc. Ino Čurik | član | _____ |
| 3. | izv.prof.dr.sc. Vlatka Čubrić Čurik | član | _____ |

# Zahvala

Ovime zahvaljujem svojim profesorima MS studija ‘’Genetika i oplemenjivanje životinja’’ na stečenom znanju i praktičnom radu koje su mi pružili tijekom studija; te na ovoj nadasve zanimljivoj temi diplomskog rada koju su mi dodijelili, jer mi je poslužila kao usmjerenje za daljnje napredovanje u znanosti. Nadalje, zahvaljujem svojoj mentorici, doc.dr.sc. Maji Ferenčaković na njenom velikom strpljenju, mudrim i prijateljskim savjetima te nesebičnoj pomoći koje mi je pružila ne samo tijekom mentorstva, već tijekom cijelog studija. Puno, puno hvala.

Magdalena Matijević

## SADRŽAJ


**1. UVOD ..... 1**

**2. PREGLED LITERATURE ..... 2**

**2.1. DNA i kromosomi ..... 2**

**2.1.1. DNA ..... 2**

**2.1.2. Kromosomi ..... 2**

**2.2. Stanična dioba ..... 3**

**2.3. Varijabilnost i izvori varijabilnosti ..... 6**

**2.3.1. Slučajna orijentacija homolognih kromosoma u mejozi I ..... 8**

**2.4. Kromatin i njegova organizacija unutar jezgre ..... 11**

**2.4.1. Otkriće kromatina i kromosoma ..... 11**

**2.4.2. Kromatin ..... 12**

**2.4.3. Histoni ..... 13**

**2.4.4. Nukleosomi i kromatosomi ..... 14**

**2.4.5. Solenoid ..... 15**

**2.4.6. Kondenzini i kohezini ..... 16**

**2.4.7. Centromere i kinetohore ..... 19**

**2.4.8. Telomere ..... 19**

**2.5. Mejoza ..... 21**

**2.5.1. Profaza I mejoze ..... 22**

*Leptoten ..... 22*

*Sinaptonemski ili sinaptonemalni kompleks (SC) ..... 22*

*Zigoten ..... 24*

*Pahiten ..... 25*

*Diploten ..... 26*

*Dijakineza ..... 27*

**2.5.2.Kromosomalni crossing over ..... 28**

*Povijest ..... 28*

*Teorije podrijetla crossing overa ..... 29*

**2.6. Mejotska rekombinacija ..... 31**

**2.6.1. Inicijacija mejotske rekombinacije u sisavaca ..... 31**

**2.6.2. Proteini potrebni za rekombinaciju ..... 31**

*SPO11 ..... 31*

*MEI1 i REC114 ..... 32*

*WDR61 (Ski8) ..... 33*

*MRE11/RAD50/NBS1 (MRN kompleks)* ..... *33*
**2.6.3. Mjesta odvijanja rekombinacije - Rekombinacijski 'hotspotovi'** ... **36**
**2.6.4. Hotspot motivi** ..... **37**
**2.7. *PRDM9* gen** ..... **39**
**2.7.1. Povijest** ..... **40**
**2.8. Funkcionalne domene *PRDM9* gena** ..... **41**
**2.8.1. KRAB (*Krüppel-associated box*)** ..... **41**
*KRAB PRDM9 domena nužna je za pravilan tijek mejoze* ..... *42*
**2.8.2. SSXRD (*Synovial Sarcoma X Repression Domain*) domena** ..... **45**
**2.8.3. PR/SET domena** ..... **45**
*Metiltransferazna aktivnost esencijalna je za funkciju PRDM9* ..... *46*
*Metilacija histona* ..... *46*
*CXXC1 gen* ..... *47*
**2.8.4. ZF (*Zinc finger*) domena** ..... **49**
*Varijabilnost i evolucija ZF domene* ..... *49*
**2.9. Mehanizam rada *PRDM9* gena** ..... **51**
**2.10. DSB popravci (popravci dvolančanih lomova)** ..... **52**
**2.11. *PRDM9* neovisna rekombinacija** ..... **59**
**2.12. Brza evolucija *PRDM9*** ..... **60**
**2.13. *PRDM9* i sterilnost hibrida** ..... **65**
**2.14. Medicinske implikacije funkcije *PRDM9* te uočena problematika ekspresije u čovjeka i drugih vrsta životinja** ..... **68**
**3. ZAKLJUČAK** ..... **76**
**4. POPIS LITERATURE** ..... **78**
**5.PRILOG** ..... **86**
**5.1. Popis slika** ..... **86**
**5.2. Popis tablica** ..... **89**
**ŽIVOTOPIS AUTORA** ..... **90**

# Sažetak


Diplomskog rada studenta/ice **Magdalene Matijević**, naslova

## ULOGA *PRDM9* GENA U PROCESU REKOMBINACIJE DNA

Pojava rekombinacije između dvaju homolognih kromosoma u mejozi je, skupa sa mutacijama, signifikantan parametar varijabilnosti u prirodi te same selekcije (njene efektivnosti i uspjeha). Frekvencija rekombinacije utječe na mnoge različite parametre populacijske genetike, poput strukture inbreedinga te pojave linkage disequilibriuma (LD).
*PRDM9* protein je koji sadrži 'zinc finger' domenu kojom se veže na DNA na specifičnim lokacijama unutar genoma, determinirajući time rekombinacijske hotspotove tijekom mejoze u mnogih vrsta. Na istima vrši trimetilaciju H3K4 i H3K36, reorganizirajući time nukleosomsku strukturu i stvarajući mjesto za formaciju DNA DSBa, potrebnog za razmjenu genetske informacije između homologa. Unatoč tomu što ovaj mehanizam nije u potpunosti objašnjen, najnovije tehnologije pomogle su razotkriti neke njegove dijelove te samim time sugerirati da je navedeni proces mnogo kompleksniji nego što se smatralo.
Mnoge stvari još su nerazjašnjene u procesu mejotske rekombinacije, no sa brzim razvojem tehnologije više će pitanja biti postavljeno i odgovoreno daljnjim istraživanjima.
Nadalje, *PRDM9* gen ima veliku ulogu u nasljeđivanju te frekvencijama rekombinacija. Za primjer, *PRDM9* aleli mogu utjecati na kromosomski razmještaj u ljudi, uzrokujući neke nasljedne bolesti.



**Ključne riječi**: *PRDM9*, genetska rekombinacija, mejoza, varijabilnost, kromosomi

## Summary

Of the master's thesis – student **Magdalena Matijević,** entitled

### THE ROLE OF *PRDM9* GENE IN THE PROCESS OF DNA RECOMBINATION

The appearance of recombination between homologous chromosomes in meiosis is, along with mutations, a significant parameter of the variability in nature, and furthermore, selection itself (and its efficiency and success). The frequency of recombination affects many different population-wise genetic parameters like genome inbreeding structure and the appearance of LD (linkage disequilibrium). *PRDM9* is a zinc finger protein that binds DNA at specific locations in the genome where it trimethylates H3K4 and H3K36 at surrounding nucleosomes. During meiosis in many species, these actions determine the location of recombination hotspots. It also reorganizes local nucleosomal structure, creating a nucleosome-free center where the DNA DSB required for DNA exchange between chromosomes is formed. Although this mechanism wasn't completely clarified, the newest technologies helped discover parts of it and therefore suggest that this process is more complex than what was previously thought. A lot of things yet remain unknown in the process of meiotic recombination, but with rapid development of technology more questions will be asked and hopefully answers unveiled with further research. Furthermore, *PRDM9* gene has a big role in inheritance and recombination frequencies. As an example, *PRDM9* alleles influence human chromosomal rearrangements, causing hereditary diseases.



**Keywords**: *PRDM9*, genetic recombination, meiosis, variability, chromosome

# 1. UVOD

Varijabilnost je različitost između jedinki iste vrste, a posljedica je naslijednih (geni) i okolišnih čimbenika (unutarnji i vanjski okoliš). No, koji to genski čimbenici utječu na varijabilnost vrsta? Razvojem moderne genetike i tehnologije krajem 20. stoljeća, znanstvenici sve više pažnje posvećuju mejozi te procesima uključenima u nju. Uočavaju kako je za razmjenu genetskog materijala između kromosoma, odnosno crossing over, odgovoran velik broj gena i proteina. Još 2005. godine Hayashi i sur. uočavaju kako u izostanku gena kojeg su tada nazvali Meisetz, miševi pokazuju smanjenu ili potpuno izostalu reproduktivnu sposobnost, zaključivši kako navedeni gen mora imati određenu ulogu u mejotskoj diobi. Daljnja istraživanja samo su potvrdila njihova otkrića, no sam mehanizam gena ostao je nepoznat, sve do nedavnih godina, kad je napokon postavljen model rada i funkcije *PRDM9* gena, uz još jako puno neodgovorenih pitanja.

*PRDM9* gen posjeduju svi sisavci, osim pasa . Nalazimo ga i u nekih drugih vrsta životinja poput riba i gmazova. Posjeduje četiri bitne domene: KRAB, SSXRD, PR/SET, te ZF (zinc finger), što ga čini posebnim jer vrlo mali broj danas otkrivenih gena ima sve četiri navedene. Danas je dokazano kako *PRDM9* ne radi sam te on ovisi o brojnim faktorima i proteinima, baš kao što oni ovise o njemu, a nedostatak bilo koje od njegove četiri domene znatno utječe na tijek i uspješnost mejoze, a time i same rekombinacije.

U ovom radu dan je osvrt na sva dosadašnja istraživanja o *PRDM9* genu i na rezultate koji su dobiveni istima. Opisane su sve četiri domene navedenog gena te razlozi zbog kojih on ne bi mogao funkcionirati bez njih. Cilj ovog rada bio je dati pregled na sve do sad otkriveno o *PRDM9* genu te ga opisati u različitih vrsta životinja u kojih je pronađen ili pak onih u kojih je odsutan, što je i prikazano u rezultatima.

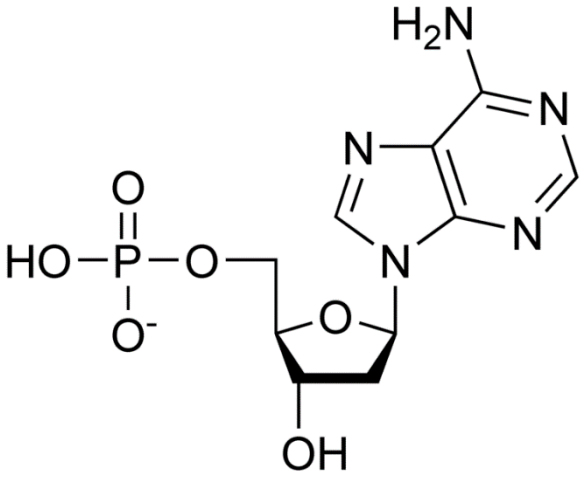
Mejotska dioba još je uvijek neistraženo područje, što zbog nedovoljno razvijene tehnologije, a što zbog manjka znanstvenika koji bi se njome bavili. Velik broj današnjih znanstvenika orijentira se upravo na mitozu, u potrazi za načinima zaustavljanja starenja ili sprječavanjem raka. Unatoč tome što mejoza nije područje istraživanja tih ‘goruć ih’ tema u znanosti, treba imati na umu da smo svi mi različiti upravo zahvaljujući mejozi te da je taj proces sam za sebe iznimno kompleksan upravo zbog toga što se sastoji od ne jedne, već dvije uzastopne diobe. *PRDM9* gen samo je jedan mali čimbenik u tom velikom mejotskom mehanizmu.

# 2. PREGLED LITERATURE

## 2.1. DNA i kromosomi

### 2.1.1. DNA

Deoksiribonukleinska kiselina (DNA) je (u prokariota i eukariota) građena od dva polinukleotidna lanca omotana oko zamišljene osi u zavojnicu (heliks). Svaki polinukleotidni lanac građen je od 4 (moguća) različita nukleotida. Nukleotid je građen od: šećera deoksiriboze, fosfatne skupine i dušične baze (Slika 1). Dušične baze su purini: adenin i gvanin; te pirimidini: timin i citozin (Alberts i sur. 2002.).




Slika 1: Nukleotid je građen od šećera deoksiriboze, fosfatne skupine i dušične baze (purinske: adenin ili gvanin i pirimidinske: citozin ili timin).
Izvor: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/cb/DAMP_chemical_structure.png/1200px-DAMP_chemical_structure.png

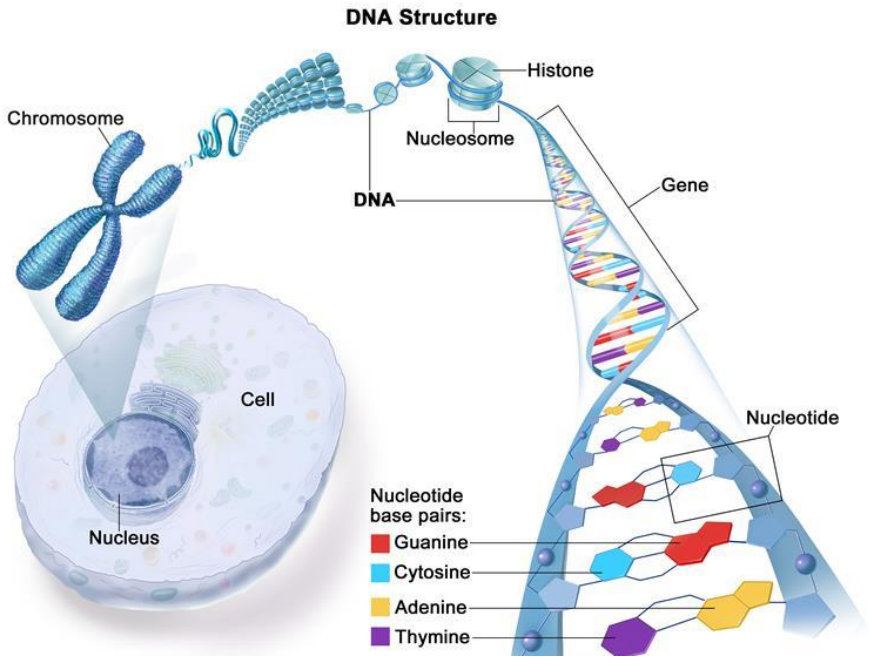
Polinukleotidne lance vežu vodikove veze između dušičnih baza u nukleotidima. Postoji specifičnost sparivanja baza tako da se baza adenin jednog lanca sparuje s bazom timin u drugom lancu (dvostruka vodikova veza), a baza gvanin s bazom citozin (trostruka vodikova veza). Slijed baza u jednom polinukleotidnom lancu komplementaran je slijedu baza u drugom. Nasljeđivanje ima kemijsku osnovu u replikaciji DNA pri čemu nastaju kopije gena koje se prenose s roditelja na potomke. Stanični prenosioci gena su gamete (jajna stanica i spermij), a geni roditelja se kombiniraju u jezgri oplođenog jajeta (zigoti). Fizička osnova nasljeđivanja (prijenos gena s roditelja na potomke) ovisi o ponašanju kromosoma za vrijeme spolnog razmnožavanja koji uključuje mejozu.

### 2.1.2. Kromosomi

Kromosomi su dijelovi DNA koji u sebi sadrže dio ili kompletni genetski materijal (genom) nekog organizma. Originalni kromosom i njegova kopija zovu se sestrinske kromatide. Tijekom metafaze (koja će biti detaljnije objašnjena u daljnjem tekstu), poprimaju poznatu strukturu u obliku slova X (metafazni kromosomi), a u toj visoko kondenziranoj formi najvidljiviji su i

najlakši za proučavanje (Slika 2). Njihova struktura i broj uvelike variraju između različitih organizama. Nadalje, neke vrste poput prokariota i virusa posjeduju nukleoid i ostalu vanjezgrenu DNA koja je zbijena, visoko kondenzirana i organizirana. Riječ je o cirkularnim I linearnim strukturama u citoplazmi koje sadrže staničnu DNA .

Kromosomske rekombinacije tijekom mejoze te seksualna reprodukcija imaju značajnu ulogu u genetskoj raznolikosti.

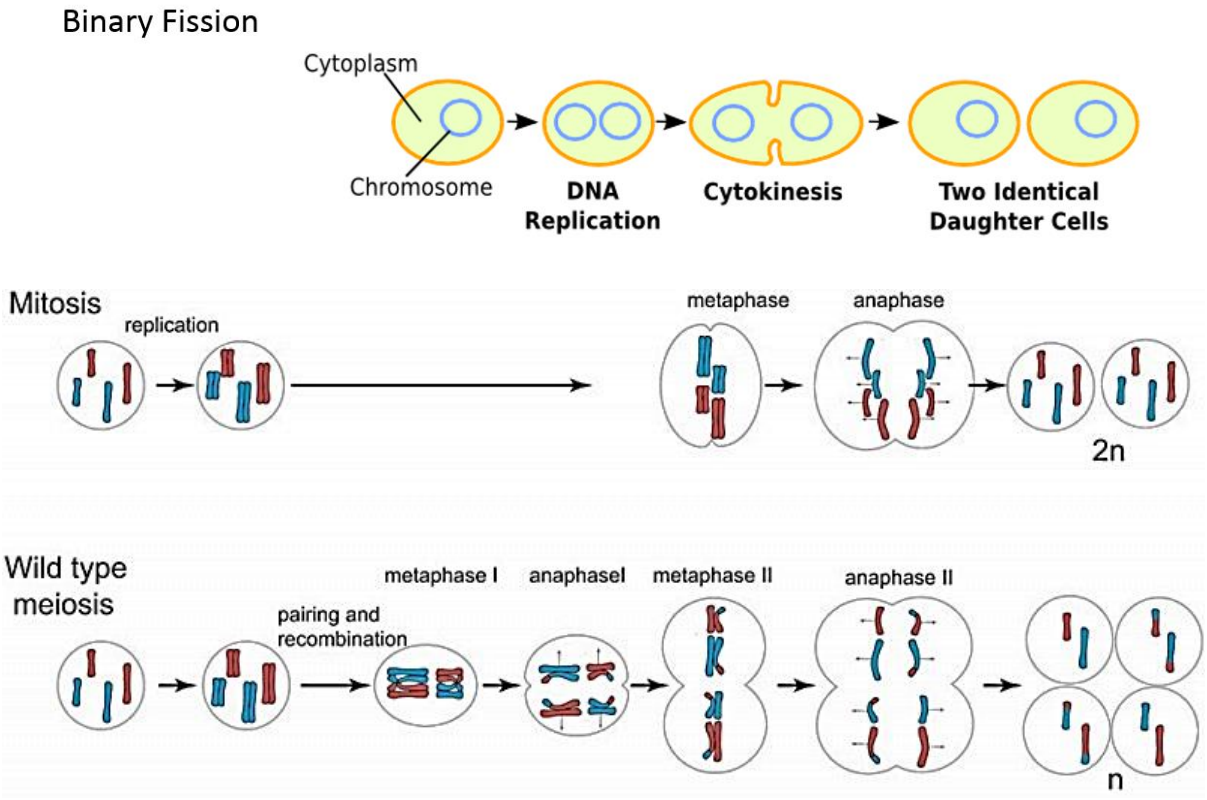



Slika 2: Prikaz strukture DNA te kromosoma unutar jezgre stanice.
Izvor: https://www.cancer.gov/images/cdr/live/CDR761781-750.jpg

## 2.2. Stanična dioba

Stanična dioba proces je u kojem se roditeljska stanica dijeli na dvije ili više stanica kćeri te je dio staničnog ciklusa. U eukariota postoje dva tipa stanične diobe: vegetativna dioba, u kojoj je svaka stanica kćeri genetski identična roditeljskoj stanici ili mitoza (Slika 3); te reproduktivna dioba u kojoj je broj kromosoma u stanicama kćeri reduciran za pola, za proizvodnju haploidnih gameta ili mejoza (Slika 3). Prokarioti podliježu vegetativnoj diobi stanice poznatijoj pod nazivom ‘’binarna fizija’’, u kojoj se njihov genetski materijal jednako podijeli u dvije stanice kćeri (Slika 3). Svim staničnim diobama, neovisno o organizmu, prethodi replikacija DNA.

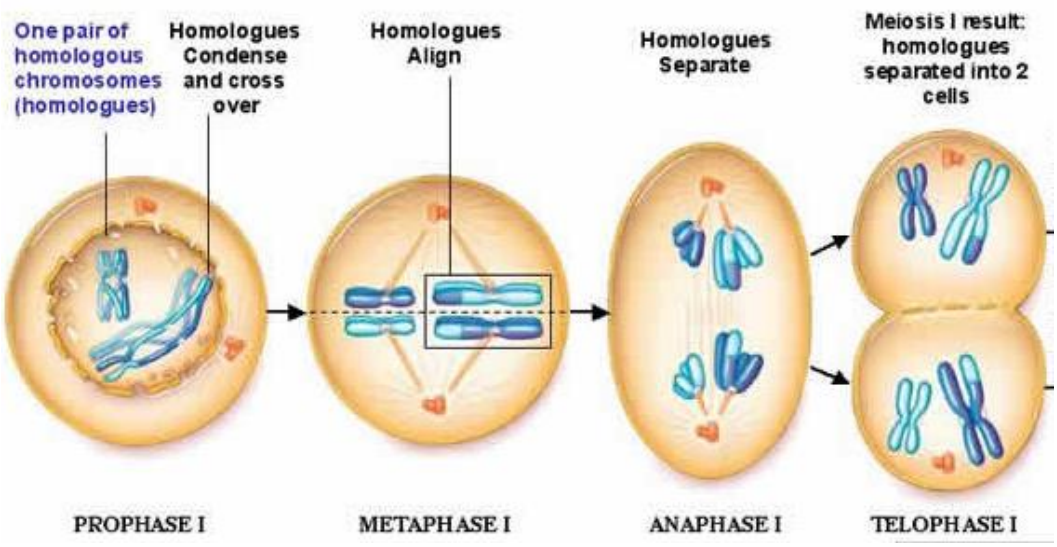
Prije nego što dioba može započeti, genetska informacija sadržana u kromosomima mora biti replicirana, a duplicirani genom mora biti pravilno podijeljen između stanica. Velik dio stanične infrastrukture uključen je u očuvanje konzistentnosti genetske informacije između generacija (Maton, 1997.).




Slika 3: Prikaz razlika između binarne fizije, mitoze te mejoze.
Prva slika gore: Prikaz diobe prokariotske stanice (Binarna fizija).
Izvor: https://study.com/academy/lesson/binary-fission-definition-steps-examples.html
Druga slika u sredini: Prikaz mitoze.
Treća slika dolje: Prikaz mejoze.
Izvor: https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/File:Mitosis_and_meiosis.jpg

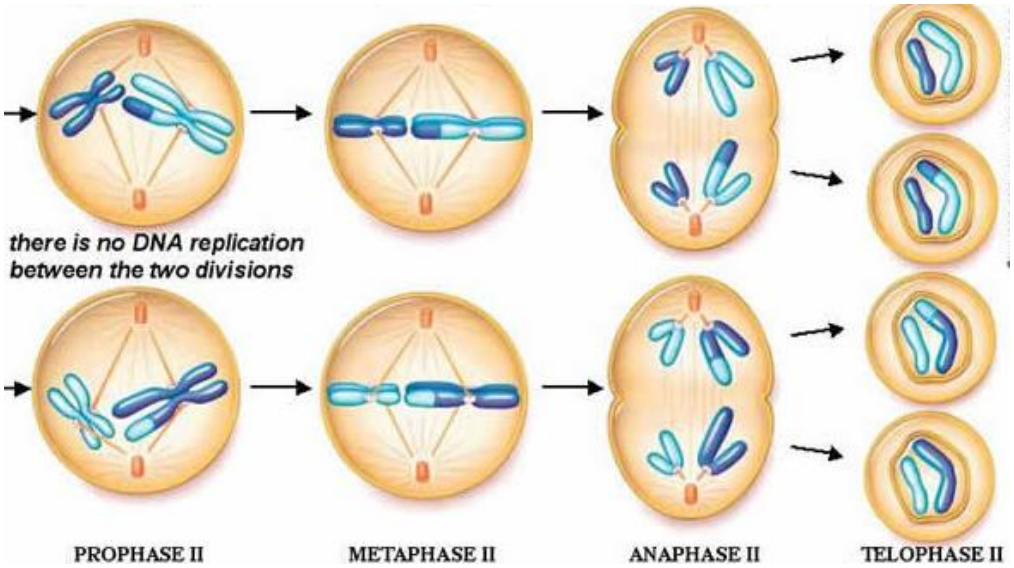
Spolno razmnožavanje daje varijabilnost – potomci nastali spolnim razmnožavanjem genetički se razlikuju od svoje braće i od roditelja. Razlog tomu je ponašanje kromosoma tijekom spolnog ciklusa (gametogeneza) koji uključuje i mejozu.

Mejoza je dioba kojom nastaju spolne stanice ili gamete, a odvija se u dvije faze. Prva mejoza je redukcijska dioba jer se u anafazi I broj kromosoma reducira s diploidnog (2n) na haploidni (n). U profazi I sparuju se homologni kromosomi u bivalente. U bivalentu dolazi do crossing overa tj. do izmjene homolognih dijelova nesestrinskih kromatida homolognih kromosoma što rezultira novim kombinacijama (Slika 4) (Pavlica, 2012.).




Slika 4: Mejoza I – redukcijska dioba
Izvor: https://www.biology.iupui.edu/biocourses/N100/2k4ch9meiosisnotes.html

Mejoza II je ekvacijska dioba i slična je mitozi (Slika 5). Mejozom iz jedne diploidne stanice nastaju 4 haploidne gamete koje su genetički potpuno različite uz pretpostavku da se dogodio barem jedan crossing over. Detaljnije o mejozi će biti rečeno u daljnjim poglavljima.




Slika 5: Prikaz mejoze II.
Izvor: https://www.biology.iupui.edu/biocourses/N100/2k4ch9meiosisnotes.html

## 2.3. Varijabilnost i izvori varijabilnosti

Varijabilnost je različitost između jedinki iste vrste, a posljedica je naslijednih (geni) i okolišnih čimbenika (unutarnji i vanjski okoliš). Ponekad je nemoguće reći koja je karakteristika nasljedna, a koja je poslijedica okolišnih čimbenika; što posebno vrijedi kada su razlike među jedinkama vrlo male, a varijabilnost populacije stalna (npr. inteligencija u ljudi). O nasljednoj varijabilnosti možemo govoriti u slučaju znatnih razlika među jedinkama kroz generacije (npr. patuljasti rast ili polidaktilija) (Pavlica, 2012.).

Govoreći o varijabilnosti, treba imati na umu da izvore iste možemo tražiti na više različitih razina. Teorija varijabilnosti koja stvara evoluciju je dosta neobična. Ako se evolucija sama po sebi odvija reprodukcijom različitih genotipova (varijanti), očekivat će se da će u jednom trenutku najjači nastali genotip na kraju preuzeti populaciju, a svi ostali genotipovi će nestati. Nadalje, tada neće više postojati varijabilnost za daljnju evoluciju. Mogućnost kontinuirane evolucije ovisna je o neprestanoj obnovi varijabilnosti u populacijama. (Griffiths, Miller i Suzuki, 2000.)

Općenito, ako govorimo neovisno o načinu razmnožavanja, tri su izbora varijabilnosti: mutacije, rekombinacije te migracija ili protok gena (prelazak gena iz populacija različitith frekvencija – prelazak iz jedne populacije u drugu).

Treba imati na umu da rekombinacija sama po sebi ne stvara varijabilnost ukoliko aleli već segregiraju na različitim lokusima, jer tada nema ničega što bi se rekombiniralo. Slično tomu, migracije gena ne mogu biti uzrok varijabilnosti ukoliko je cijela populacija ili vrsta homozigotna za isti alel. Sukladno tomu, stvara se zaključak da bi uzrok svih varijabilnosti trebale biti mutacije. (Griffiths, Miller i Suzuki, 2000.)

Mutacije se smatraju izvorom varijabilnosti, no proces mutacija sam po sebi ne pokreće evoluciju. Stopa promjene frekvencija gena nastalih procesom mutacija vrlo je niska, zbog toga što je stopa spontanih mutacija koje se događaju, također vrlo niska. Stopa mutacija određena je vjerojatnošću da se kopija nekog alela promijeni u neku drugu alelnu formu, unutar jedne generacije. Zaključno tomu, stope mutacija vrlo su niske te kao takve ne mogu same biti odgovorne za brzinu evolucije populacija i vrsta. (Griffiths, Miller i Suzuki, 2000.)

Tablica 1: Različite stope mutacija u jednoj generaciji u različitih organizama.

| Organizam | Gen | Mutacija po generaciji |
|---|---|---|
| Bakteriofag | *Host range* | $2.5 \times 10^{-9}$ |
| *Escherichia coli* | *Phage resistance* | $2 \times 10^{-8}$ |
| *Zea mays* (Kukuruz) | *R (color factor)* | $2.9 \times 10^{-4}$ |
| | *Y (yellow seeds)* | $2 \times 10^{-6}$ |
| *Drosophila melanogaster* | *Average lethal* | $2.6 \times 10^{-5}$ |

Izvor: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22012/table/A3873/?report=objectonly

Genetske varijabilnosti mogu nastati mnogo brže kao rezultat rekombinacija, nego mutacija. Tijekom mejoze, dva homologna kromosoma u crossing overu mogu rekombinirati beskonačnim brojem različitih rekombinantnih kromosoma (mogu dati beskonačan broj različitih kombinacija). Nadalje, i samo jedan crossing over između homolognih kromosoma u jednoj generaciji može pružiti varijaciju genotipa novonastale jedinke. Ukoliko su

heterozigotni lokusi raširenи na kromosomima, stvaranje novih genotipova bit će učestalo te će u populaciji postojati kontinuirana genetska varijabilnost. (King i Stransfield, 1998.)

Još jedan navedeni izvor genetske varijabilnosti je migracija ili protok gena iz jedne populacije u drugu, obje različitih frekvencija gena. Rezultat takvog prijelaza miješana je populacija različitih alelnih frekvencija, koje su vrijednostima negdje između onih od kojih su potekle. Na primjer, geni europske populacije su ''migrirali'' u populaciju afričkog podrijetla u Sjevernoj Americi, zbog robovlasništva tijekom povijesti. Danas se mogu odrediti stope migracija tih gena putem frekvencije alela koju posjeduju afričke populacije u Sjevernoj Americi, uspoređujući njegovu frekvenciju sa europskima te onima koji ga uopće ne posjeduju – afričkim populacijama. (Griffiths, Miller i Suzuki, 2000.)

Ako govorimo o varijabilnosti koja ovisi o načinu razmnožavanja, u organizama koji se spolno razmnožavaju tri su glavna izvora genetičke varijabilnosti: slučajna oplodnja ili slučajno sparivanje, slučajna orijentacija homolognih kromosoma u mejozi I; te crossing over između nesestrinskih kromatida homologa u mejozi I (Pavlica, 2012.).

Slučajna oplodnja ili slučajno sparivanje može značiti nekoliko različitih pojmova. Ako o slučajnoj oplodnji ili sparivanju govorimo kao o panmiksiji, tada je to izvor varijabilnosti koji opisuje idealnu situaciju u kojoj su sve jedinke jednog spola jednako potencijalni partneri svim jedinkama suprotnog spola, unutar populacije (Griffiths, Miller i Suzuki, 2000.). Navedeno pravilo nije univerzalno, te je u prirodi gotovo neostvarivo, zbog toga što pretpostavlja nepostojanje restrikcija, bilo genetskih bilo bihevioralnih, unutar populacije. Drugim riječima, sparivanje dva organizma nije pod utjecajem bilo kakve ekološke, nasljedne ili društvene interakcije, stoga svi potencijalni partneri imaju jednaku šansu biti odabrani (King & Stransfield, 1998.). Panmiksija u prirodi nije raširena te se mali broj vrsta (većinom kukci i neki jednostanični organizmi) sparuje na taj način (Bast, Kubota i Okuda, 2014.; Beveridge i Simmons, 2006.; Troast i sur., 2016.)

Nadalje, ako o slučajnoj oplodnji ili sparivanju govorimo u okviru seksualne selekcije, tada govorimo o asortativnom parenju ili sparivanju. Riječ je o pojmu suprotnom od panmiksije, koji govori da se jedinke sličnih fenotipova sparuju većom stopom od očekivane, unutar neke populacije. Riječ je o fenotipovima slične tjelesne mase i veličine, pigmentacije dlake ili kože, dobi, i slično. Takva pristranost međusobnom sparivanju jedinki sličnih svojstava naziva se pozitivno asortativno parenje, dok je u suprotnom slučaju riječ o negativnom asortativnom parenju (sparivanje jedinki za koje nije vjerojatno da bi se međusobno izabrale, zbog razlika u npr. visini, boji, veličini, itd.)

Treba i spomenuti da se jedinke mogu međusobno sparivati zbog toga što su nekim postotkom međusobno genetski srodne. Ukoliko se takvo sparivanje javlja u većem postotku od čiste slučajnosti, tada je populacija u inbreedingu. Govoreći o inbreedingu, treba razumijeti da inbreeding nije isto što i pozitivno asortativno parenje. Istina je da oboje ima za posljedicu povećanje homozigotnosti u populaciji, iznad razine očekivane Hardy-Weinbergovim ekvilibrijumom. Unatoč tomu, važno je napomenuti da je pozitivno asortativno parenje specifično za neko svojstvo, dok se inbreeding odnosi na cijeli genom. Srodne jedinke mogu dijeliti neke zajedničke fenotipske osobine više od nesrodnih jedinki, no to ne mora biti pravilo. Makar fenotipski različite, jedinke u srodstvu će na genetskoj razini biti vrlo slične (u istom stupnju na velikom broju lokusa), dok će nesrodne fenotipski slične jedinke posjedovati potpuno različite genome, eventualno se poklapajući za samo neka svojstva (Griffiths, Miller i Suzuki, 2000.)

### 2.3.1. Slučajna orijentacija homolognih kromosoma u mejozi I

O genetskoj segregaciji (u ovom slučaju, u okviru slučajne orijentacije homolognih kromosoma u mejozi I) ne možemo govoriti bez spominjanja Gregora Mendela, oca moderne genetike (Nirenberg, 2013.). Principe naslijeđivanja po Mendelu prve je izveo Gregor Johann Mendel, austrijski redovnik iz 19.stoljeća (Ford, 1960.), formulirajući svoje ideje nakon izvođenja jednostavnih hibridizacijskih eksperimenata sa biljkama graška (Pisum sativum) koje je bio posadio u vrtu svoga samostana (Henig, 2009.). Između 1856. i 1863. godine, Mendel je uzgojio i testirao oko 5000 sadnica graška. Pomoću tih eksperimenata je izveo zaključke koji su kasnije postali poznati kao principi Mendelovog naslijeđivanja ili Mendelovi zakoni. Iste je opisao u svom radu, originalnog naziva ''Versuche über Pflanzen-Hybriden'' (engl. *Experiments on Plant Hybridization*; hrv. *Eksperimenti u hibridizaciji biljaka*) objavljenog 1866. godine (Mendel, 1865.)

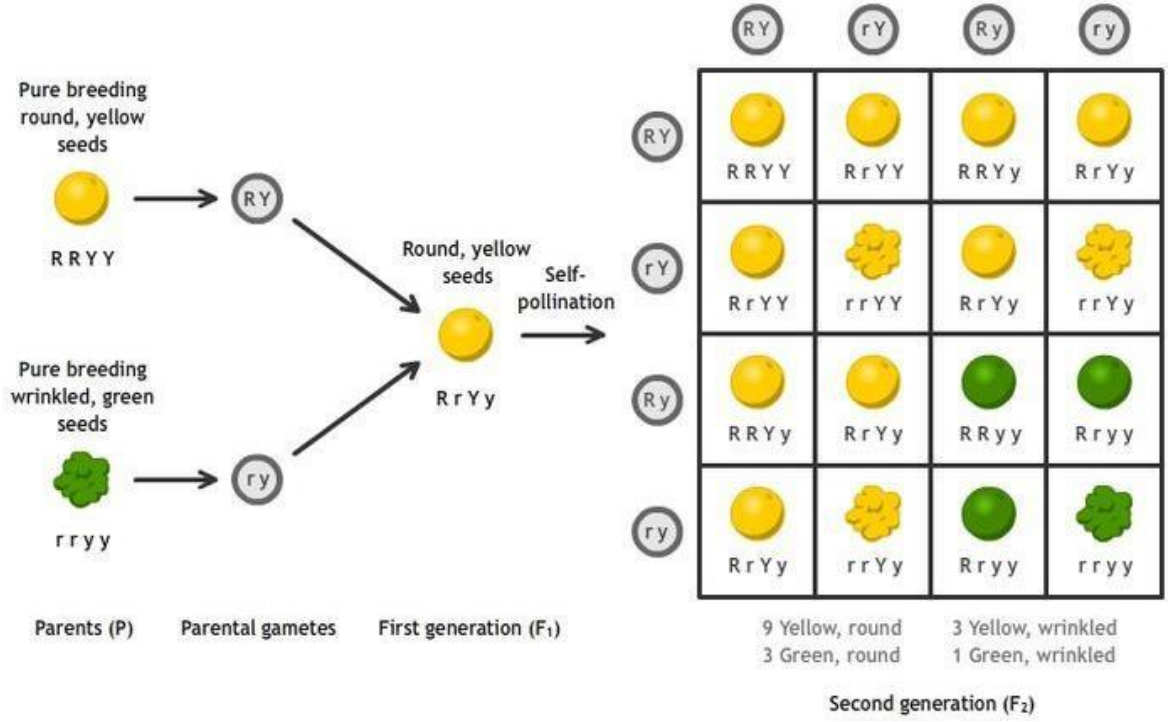
Zakon genetske segregacije ili Mendelov prvi zakon govori da svaki pojedini organizam sadrži dva alela za neko svojstvo te da ti aleli segregiraju tijekom mejoze, tako da svaka novonastala gameta sadrži samo jedan alel. Nadalje, potomstvo će od svakog roditelja dobiti po jedan alel za neko svojstvo, što će u konačnici ponovno rezultirati novim parom alela (spojit će se dvije gamete, svaka sa po jednim alelom, dakle potomak će imati dva alela).

Homozigotni lokus ima identični par alela, heterozigotni lokus ima dva različita alela od kojih je jedan dominantan (vidljiv je), a drugi je recesivan (nema vidljivi učinak).
Par alela za svaku osobinu segregira (razdvaja se) tijekom mejoze; homozigot stvara uvijek samo jednu vrstu gameta jer nosi identične alele za neko svojstvo; heterozigot stvara dvije vrste gameta s jednakom učestalošću (1/2 ili 50% za svaki) (Pavlica, 2012.).

Treba napomenuti da je segregacija samo vjerojatnost te je ona neodređena ili neuvjetovana, tj. ne slijedi nikakva pravila. Ako heterozigotna visoka biljka (Tt), na primjer, proizvodi gamete, samo će jedna gameta dobiti dominantni alel (T), dok će druga dobiti recesivni alel (t). Na koju će gametu otići T ili t, neuvjetovan je slučajan proces. Ako se proizvede 1000 gameta, njih 500 će dobiti dominantni alel T, a ostalih 500, recesivan (t). Dakle, zaključujemo da je segregacija slučajna, ali u jednakim omjerima (Kantharaj, 2015.; Bailey, 2015.).

Naravno, treba imati na umu da tu nije riječ o vjerojatnosti u kojoj će se neki fenotip pojaviti kod potomaka, nakon križanja. Zakon segregacije također govori da će se pri monohibridnom križanju s dominacijom u generaciji F1 pojaviti samo dominantna svojstva/fenotip, dok će u generaciji F2 isti biti u omjeru 3:1 (Mendel, 1865.).
Sljedeći Mendelov zakon bitan spomena je Mendelov drugi zakon ili zakon nezavisne segregacije (Bailey, 2015.; Pavlica, 2012.; Pearson, 2017.). Poznat je još kao zakon nezavisnog odvajanja alela ili neovisnog naslijeđivanja, jer govori o tome da se aleli za jedno svojstvo razdvajaju u gamete nezavisno od alela za neko drugo svojstvo. Također je opisao i kako se svojstva ispoljavaju u jedinkama. Mendel je došao do tog zaključka dihibridnim križanjima graška, uzimajući u obzir dva svojstva. U takvom križanju, Mendel je križao grašak dominantnih svojstava za okruglo zrno (RR) i žutu boju zrna (YY), sa graškom recesivnih svojstava za smežurano zrno (rr) te zelenu boju zrna (yy). Otkrio je da će potomci (F1 generacija) takvog križanja okruglog žutog zrna (RRYY) sa smežuranim zelenim zrnom (rryy) svi biti heterozigoti okruglog žutog zrna (RrYy). Nakon proučavanja dobivenih rezultata, Mendel je križao heterozigote iz F1 generacije, te je u F2 generaciji uočio omjer 9:3:3:1 dobivenih fenotipova. 9/16 biljaka je imalo okrugle, žute sjemenke; 3/16 okrugle, zelene sjemenke; 3/16 je imalo smežurane, žute sjemenke; a samo 1/16 je imalo smežurane, zelene

sjemenke (Slika 6). Mendel je nakon toga izveo još pokusa, uzimajući u obzir različita svojstva, no na kraju svakoga dobivši jednake omjere. Iz toga je zaključio, kao što je već navedeno, da se aleli odvajaju nezavisno jedan od drugoga tijekom formacije gameta, te se svojstva prenose na potomstvo neovisno jedno od drugoga (Mendel, 1865.; Bailey, 2015.; Miko, 2008.; Pearson, 2017.).




Slika 6: Shematski prikaz Mendelovog dihibridnog križanja graška. Mendel je križao heterozigote iz F1 generacije, te je u F2 generaciji uočio omjer 9:3:3:1 dobivenih fenotipova. 9/16 biljaka je imalo okrugle, žute sjemenke; 3/16 okrugle, zelene sjemenke; 3/16 je imalo smežurane, žute sjemenke; a samo 1/16 je imalo smežurane, zelene sjemenke.
Izvor: https://www.sciencelearn.org.nz/resources/2000-mendel-s-principles-of-inheritance

Nezavisna se segregacija odvija u eukariotskim organizmima tijekom mejotske profaze I, stvarajući tako gamete sa različitim kombinacijama kromosoma. Fizička baza nezavisne segregacije kromosoma upravo je slučajna orijentacija homolognih kromosoma (bivalenata) u metafaznoj ravnini. Skupa sa crossing overom, upravo je ta slučajna orijentacija homologa te njihova segregacija jedan od bitnih čimbenika povećanja genetske varijabilnosti, putem stvaranja novih genetskih kombinacija.

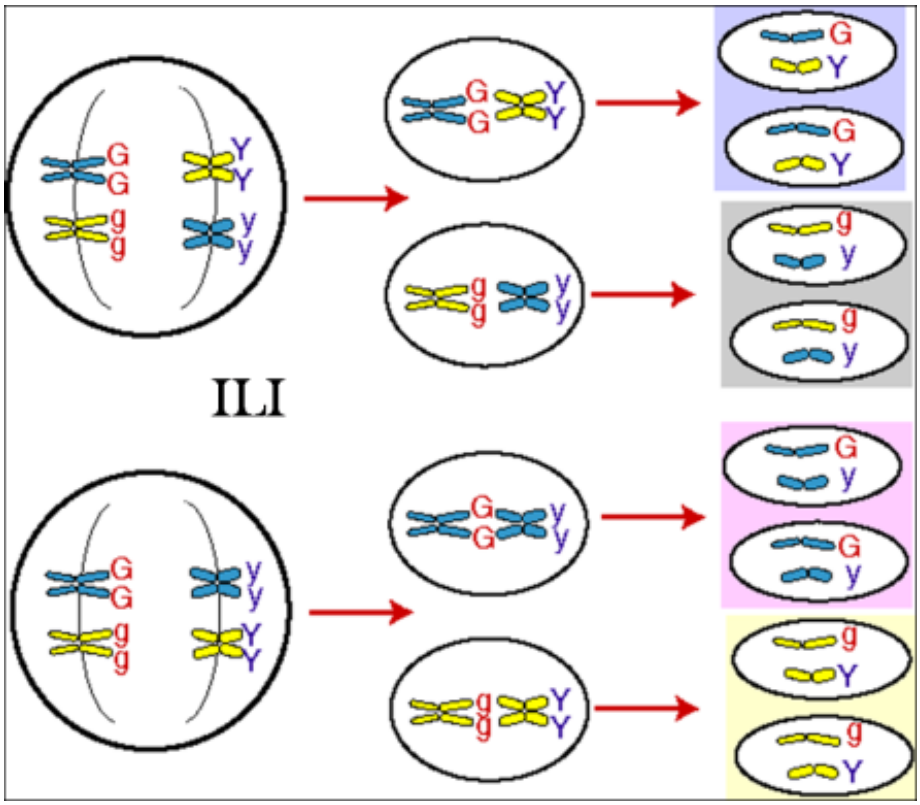
Treba napomenuti da postoje iznimke Mendelovim principima, otkrivene napretkom i razvojem modern genetike te stjecanjem sve više znanja o nasljeđivanju i genima. Princip nezavisne segregacije ne odnosi se na gene koji su blizu jedni drugima (ili vezani) na kromosomu. Nadalje, aleli uvijek međusobno ne djeluju na standardan dominantno – recesivan način, pogotovo ako su kodominantni ili postoje razlike u ekspresiji ili njihovoj jačini (Miko, 2008.).

Od 46 kromosoma u ljudskoj tjelesnoj stanici, 23 su potekla od majke, a 23 od oca. Spajanjem dviju haploidnih gameta, (jajne stanice i spermija), stvara se novi, diploidni organizam sa punim setom kromosoma. Tijekom gametogeneze (proizvodnje novih gameta), diploidna stanica od 46 kromosoma (u slučaju čovjeka) mora biti podijeljena na 23 kako bi se osigurala mogućnost spajanja novonastale gamete s nekom drugom; u svrhu nastanka novog

organizma. Upravo kromosomi nastali pri gametogenezi biti će rezultat svih mogućih kombinacija majčinskih i očinskih kromosoma pri nezavisnoj segregaciji tijekom mejoze. Zbog toga što zigota ima mogućnost dobiti bilo kakav nezavisan kromosomski set od svakog roditelja, kromosomi se stoga smatraju nezavisno segregiranima.

Kao što je opisano u dosadašnjem poglavlju, bilo koja moguća varijanta zigote dobivena spajanjem majčinskih i očinskih kromosoma, dogodit će se jednakom vjerojatnošću ili frekvencijom. U slučaju ljudskih stanica, sa 23 para kromosoma, tijekom gametogeneze će se moći dogoditi $2^{23}$ ili 8,388,608 moguće kombinacije kromosoma (Perez, 2007.). Zigota će u konačnici imati 23 para kromosoma (46 kromosoma sveukupno), ali podrijetlo svakog pojedinog biti će nasumično odabrano od majčinskih ili očinskih kromosoma (Perez, 2007.).

Zaključno s rečenim u ovom poglavlju, na kojoj god razini gledali genetsku segregaciju; na razini alela, gena, kromosoma, ona će u svakom slučaju biti potpuno slučajna i nasumična te će stavaranje gameta biti prepušteno slučajnom odabiru (u koju će gametu koje svojstvo/alel/kromosom otići) (Slika 7). Unatoč tomu, treba napomenuti da će se upravo ta segregacija uvijek odvijati u nekom omjeru, te će vjerojatnosti za novonastale moguće genotipove (pa s time i fenotipove) uvijek postojati (kao što je objašnjeno na primjerima). Zbog te slučajnosti orijentacije homolognih kromosoma u mejozi I te crossing overa, danas zahvaljujemo veliku genetsku varijabilnost vrsta.




Slika 7: Primjer slučajne orijentacije homolognih kromosoma u mejozi I.
Izvor: http://preuniversity.grkraj.org/html/9_GENETICS.htm

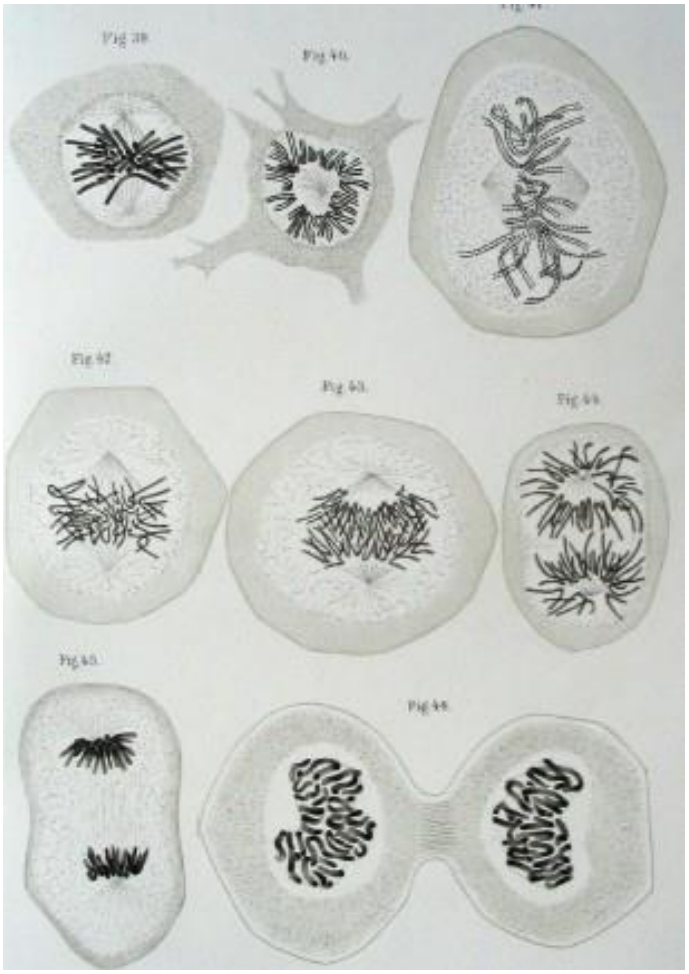
## 2.4. Kromatin i njegova organizacija unutar jezgre

Kako bismo bolje razumjeli procese koji se odvijaju u mejozi, a pogotovo sam proces kromosomskog crossing overa, potrebno je opisati DNA, kromatin te njegovu organizaciju unutar jezgre, a zatim i neke od ostalih komponenti koje su uključene u navedene procese. Razumijevanje strukture kromatina, a zatim i kromosoma od velike je važnosti za daljnje shvaćanje procesa i mehanizama uključenih u crossing over, tj. izmjenu genetskog materijala između kromosoma.

### 2.4.1. Otkriće kromatina i kromosoma

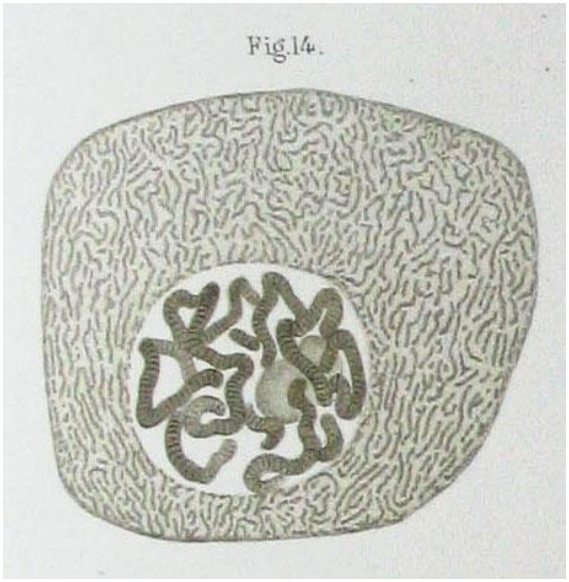
Riječ kromosom dolazi od grčkih riječi 'chroma', boja; te 'soma', što znači tijelo, opisujući njihovu sposobnost jakom obojenju određenim bojama (Merriam-Webster, 2018.; Coxx, 1925.).

Smatra se da je riječ prvu koristio Heinrich Wilhelm Gottfried von Waldeyer-Hartz (Waldeyer-Hartz, 1888.), referirajući se pritom na kromatin, kojeg je prvi otkrio i u svoje radove uveo Walther Flemming, otac moderne citogenetike (Slike 8 i 9) (Flemming, 1878.; Gall i Nye, 2005.).



Slika 8: Flemmingove ilustracije stanice tijekom diobe, sa slikama kromosoma; iz njegovog rada *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung*, 1882.
Izvor: https://en.wikipedia.org/wiki/Walther_Flemming#/media/File:Zellsubstanz-Kern-Kerntheilung.jpg

Shleyden, Virchow i Bütschli bili su među prvim znanstvenicima koji su prepoznali strukture koje danas nazivamo kromosomima (Schleyden, 1847.; Fokin, 2013.).
Serijama eksperimenata sredinom 80ih godina 19.stoljeća, Theodor Boveri otkriva da su kromosomi vektori naslijeđivanja, pripisujući kromosomima principe individualnosti i kontinuiranosti. Pomoću ponovnog otkrića Mendelovih eksperimenata, Boveri je uspio ukazati na povezanost zakona o naslijeđivanju i ponašanja kromosoma. Istovremeno, američki citolog Walter Sutton, do sličnih je zaključaka došao neovisno o Boveriju, te su obojica razvili kromosomsku teoriju naslijeđivanja 1902. godine (Carlson E. A., 2004.). U svojoj poznatoj knjizi '*The Cell in Development and Heredity*', Edmund Beecher Wilson povezuje Boverijeve i Suttonove radove, te naziva kromosomsku teoriju naslijeđivanja 'Boveri-Sutton kromosomskom teorijom' (*Boveri-Sutton chromosome theory*) (Wilson, 1925.).




Slika 9: Kromosomi u stanici žlijezde slinovnice, jedan od više od 100 Flemmingovih crteža iz rada *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung*, 1885.
Izvor: https://en.wikipedia.org/wiki/Walther_Flemming#/media/File:Flemming1882Tafel1Fig14.jpg

Broj ljudskih kromosoma prvi je put objavio Theophilius Painter 1923. godine. Pomnim proučavanjem mikroskopom, uočio je 24 para kromosoma, te zaključio da ih je sveukupno 48. Njegovu grešku ispravio je citogeneričar Joe Hin Tjio 1956. godine, uočivši da ljudska stanica ipak ima 23 para kromosoma (Matthews, 2013.).

## 2.4.2. Kromatin

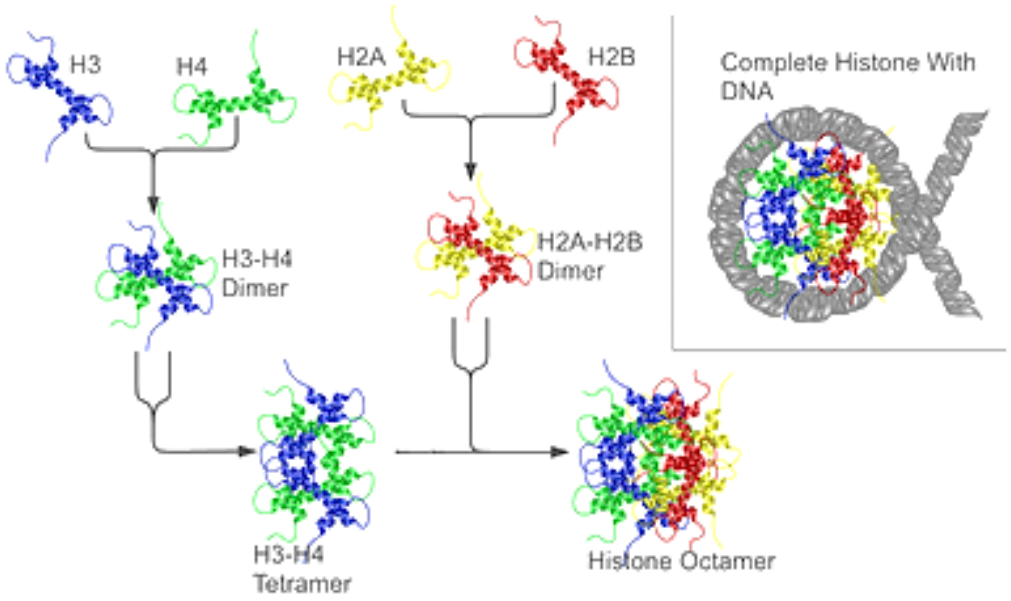
Kromatin je, kao glavni sastojak kromosoma, kompleks makromolekula u jezgri eukariotskih stanica, a sastoji se od DNA, RNA i proteina (histona). Njegove primarne funkcije su pakiranje DNA u kompaktniji, gušći oblik (kromosomi), pojačanje makromolekula DNA kako bi se omogućila mitoza; sprečavanje oštećenja DNA te kontrola ekspresije gena i replikacije DNA (Monday, 2010.). Ne samo da su genomi većine eukariota daleko složeniji od onih u prokariota, nego je također DNA eukariotskih stanica organizirana drugačije od prokariotskih. Dok je genom prokariota sadržan u kružnoj molekuli DNA ili nukleoidu (ne posjeduju jezgru), genom eukariota sastavljen je od više kromosoma od kojih svaki sadržava linearnu molekulu

DNA (unutar jezgre). Iako broj i veličina kromosoma značajno varira između vrsta, osnovna im je struktura u svih eukariota, jednaka.

### 2.4.3. Histoni

DNA eukariotskih stanica čvrsto je vezana na male bazične proteine – histone, koji u staničnoj jezgri pravilno pakiraju DNA stvarajući time kromatinsko vlakno. To je poprilična zadaća s obzirom na količinu DNA većine eukariota. Primjerice, ukupna duljina DNA u ljudskoj stanici iznosi oko 1,8 – 2 m, a mora se uklopiti u jezgru promjera svega 5-10 µm (Cooper i Hausman, 2010.).

Histoni su mali proteini koji sadrže veliku količinu bazičnih aminokiselina (arginin i lizin) koje olakšavaju vezanje na negativno nabijenu molekulu DNA. Postoji pet velikih tipova histona koji se zovu H1, H2A, H2B, H3 i H4; te su vrlo slični u različitih eukariotskih vrsta. Histona u eukariotskoj stanici ima neobično mnogo te je njihova zajednička ukupna masa otprilike jednaka masi stanične DNA. Uz to, kromatin sadrži približno jednaku masu velikog broja nehistonskih kromosomalnih proteina, koji su uključeni u cijeli niz aktivnosti, uključujući replikaciju DNA te gensku ekspresiju (Cooper i Hausman, 2010.).




Slika 10: Prikaz slaganja histonskog oktamera te namatanja DNA oko istoga.

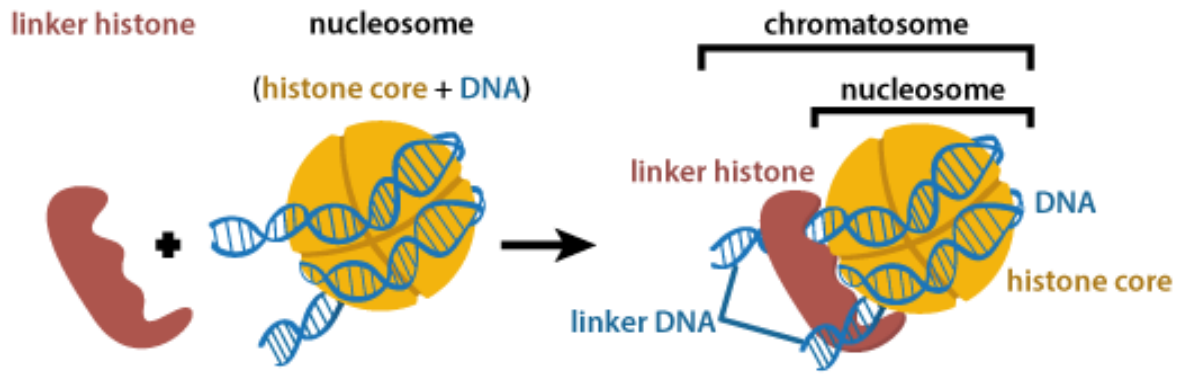
Izvor: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/4a/Nucleosome_structure-2.png/400px-Nucleosome_structure-2.png

### 2.4.4. Nukleosomi i kromatosomi

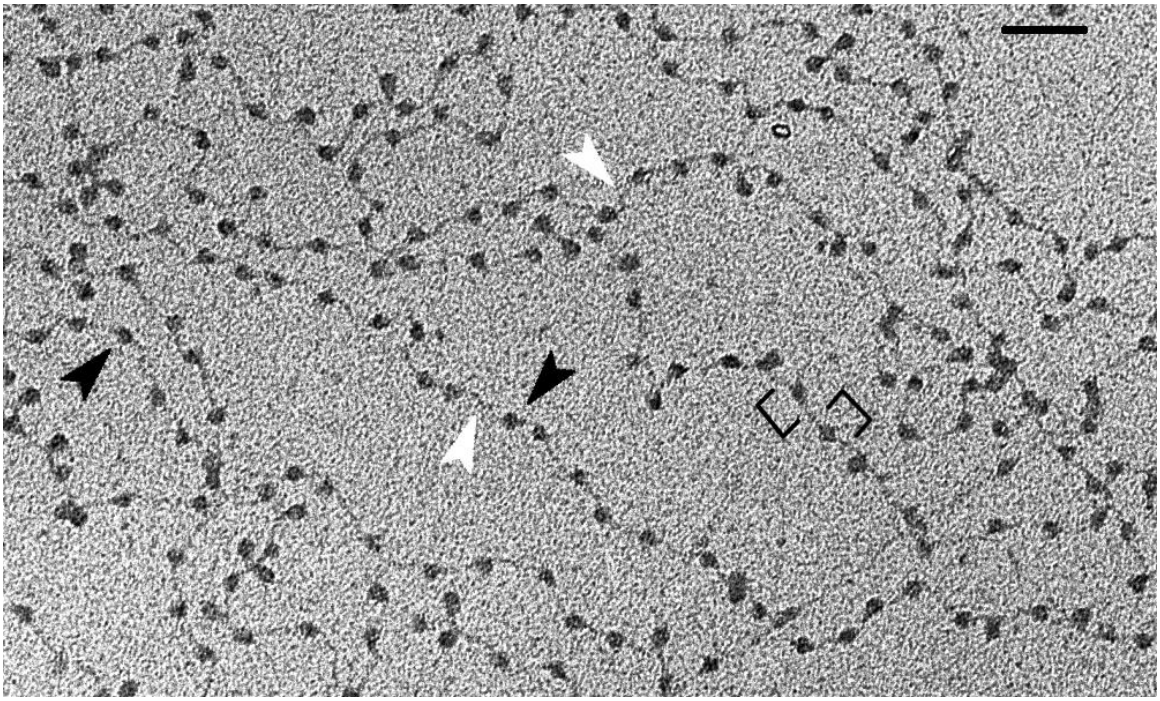
Osnovnu strukturnu jedinicu kromatina, nukleosom, opisao je 1974. godine Roger Kornberg (Kornberg, 1974.). Daljnjim analizama ustanovilo se da pakiranje DNA pomoću histona daje kromatinsko vlakno. Nukleosomi su, kao osnovne strukturne jedinice, primarna kromatinska struktura, najmanje kondenzirana, debljine od 11 nm (Thoma, Koller i Klug, 1979.) (Slika 13).

Nukleosomi su osnovni oblik pakiranja DNA u eukariota, koji se sastoje od DNA segmenta dužine od oko 146 parova baza, omotanog oko oktamera histona koji čine po dvije molekule histona H2A, H2B, H3 i H4 (*''core histones''*) (Slike 10 i 11). Susjedni nukleosomi međusobno su povezani slijedom DNA nazvanom ''linker DNA'', čija dužina varira od 10 do 80 parova baza, ovisno o vrsti organizma te tkivu (Cooper i Hausman, 2010.; Luger K., 1997.; Alberts i sur., 2002.).

Kada se H1 histon veže za nukleosom, dobiva se struktura poznatija kao kromatosom (Bharath, Chandra i Rao, 2003.) (Slika 12). Kromatosom sadrži 166 DNA parova baza; 146 od nukleosoma te još 20 od DNA H1 histona vezanog za nukleosom (Bednar i Dimitrov, 2011.). Kromatosomi se međusobno vežu kad se *''linker DNA''* jednog kromatosoma, poveže sa H1 histonom (*''linker* histonom'') drugog kromatosoma.




Slika 11: Prikaz spajanja nukleosoma sa H1 histonom i nastanka kromatosoma.
Izvor: http://biosocialmethods.isr.umich.edu/wp-content/uploads/2014/10/corepluslinker.png



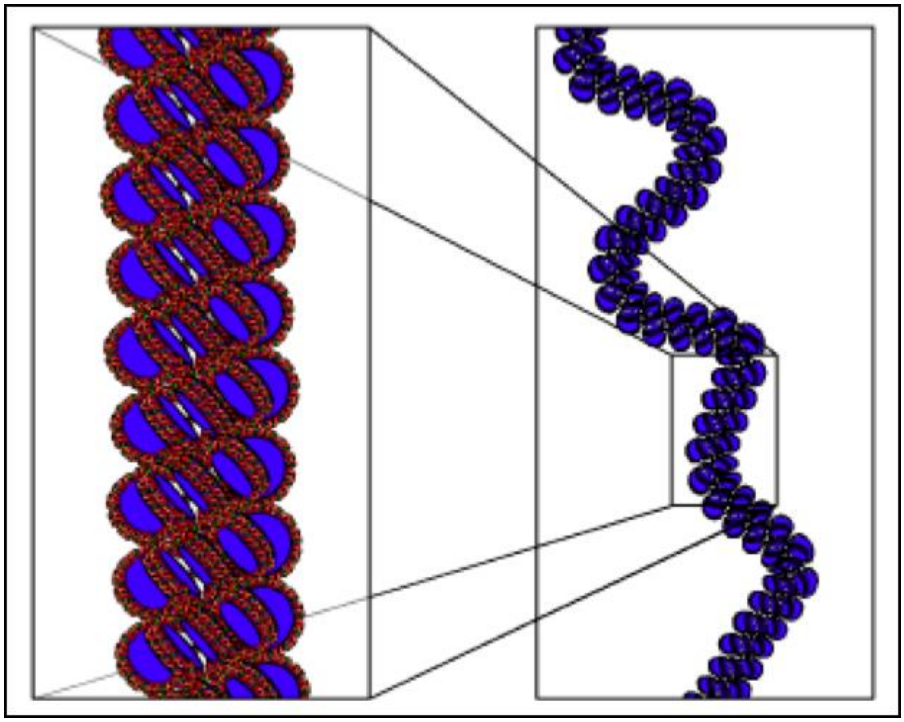
Slika 12: Kromatin u obliku nukleosoma: primarna kromatinska struktura, najmanje kondenzirana, debljine od 11 nm. Bijele strelice prikazuju slobodnu ''linker'' DNA, a crne strelice prikazuju nukleosome.

Izvor:
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b5/Chromatin_nucleofilaments_%28detail%29.png

## 2.4.5. Solenoid

Namatanjem nukleosoma u zavojnicu ili heliks, nastaje solenoid – model strukture kromatina u vlaknu veličine 30 nm (Slika 13). Riječ je o strukturi koja pomaže pakiranju eukariotske DNA unutar jezgre.

Nukleosomi su unutar solenoida poredani tako da su histonski H1 proteini pozicionirani prema centru zavojnice, formirajući polimer (Thoma, Koller i Klug, 1979.).
U jedan navoj solenoida ulazi oko šest (6) nukleosoma (Finch i Klug, 1976.), a DNA u toj sekundarnoj strukturi nije transkripcijski aktivna.

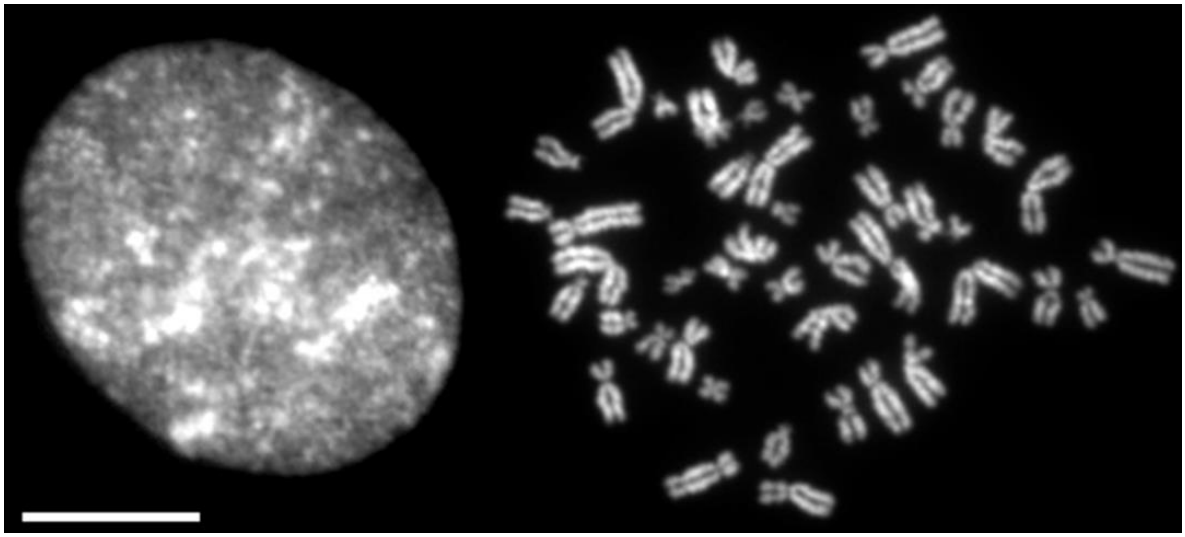


Slika 13: Kromatinsko vlakno debljine 30 nm – struktura solenoida.
Izvor:
https://en.wikipedia.org/wiki/Solenoid_(DNA)#/media/File:Solenoid_30_nm_fibre_structure_closer_and_farther_away.png

## 2.4.6. Kondenzini i kohezini

Kondenzacija interfaznog kromatina u svrhu kompakcije kromosoma u stanici u diobi ključni je događaj koji omogućuje kretanje kromosoma po diobenom vretenu, a da ne dođe do nepoželjnih lomova istih ili zaplitanja kromatinskih niti. Kompaktnost metafaznih kromosoma skoro je tisuću puta veća od interfaznog kromatina. Kromosom izgrađen od kromatina visokog stupnja organizacije ne može se prepisivati pa transkripcija prestaje tijekom kondenzacije kromatina. Poznato je da su za kondenzaciju kromatina odgovorni proteinski kompleksi nazvani kondenzini, koji su članovi porodice proteina strukturnog održavanja kromatina (engl. SMC – Structural Maintenance of Chromatin), ključni u organizaciji eukariotskih kromosoma (Slika 15) (Jeppsson i Kanno, 2014.).

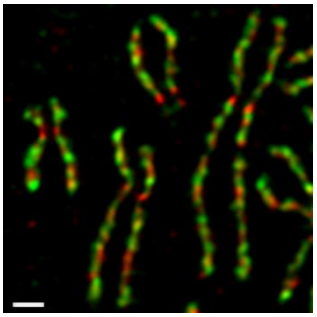
Kondenzini, zajedno s članovima druge proteinske porodice proteina zvanih kohezini, sudjeluju u kromosomskoj segregaciji tijekom mitoze. Kohezini se vežu za molekuku DNA tijekom S-faze i održavaju vezu između replikacijom nastalih sestrinskih kromatida.
Kada stanica uđe u M-fazu (fazu stanične diobe – mitoze ili mejoze) kondenzine aktivira fosforilacija kompleksa Cdk1/ciklin B. Kondenzini zatim zamijene kohezine gotovo cijelom duljinom kromosoma, a kohezini još drže zajedno sestrinske kromatide jedino u području centromera. Kondenzini također induciraju kondenzaciju kromosoma i vode formiranju najkompaktnijeg oblika metafaznog kromosoma (Cooper i Hausman, 2010.; Hirano, 2016.).



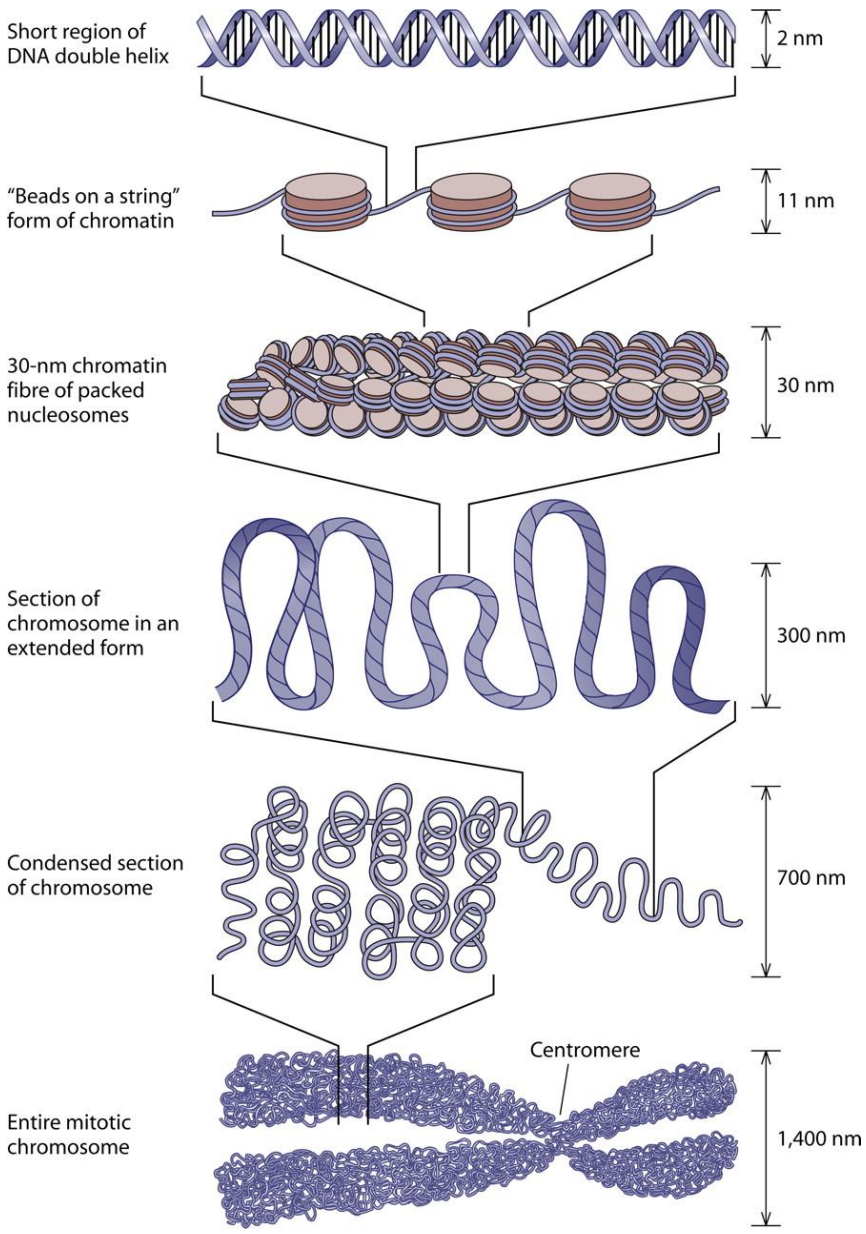
Slika 14: Prikaz razlike između interfazne jezgre (lijevo) i kromosoma (desno) u tjelesnoj stanici čovjeka.
Izvor: https://en.wikipedia.org/wiki/Condensin#/media/File:Condensation1.png

Stupanj kondenzacije kromatina mijenja se tijekom životnog ciklusa stanice te igra značajnu ulogu u regulaciji genske ekspresije. U interfaznim stanicama (stanicama koje se ne dijele) većina kromatina (nazvanog eukromatin) relativno je dekondenzirana i proširena kroz cijelu jezgru (Slika 14, lijevo; Slika 16). Tijekom ove faze staničnog ciklusa geni se prepisuju, a DNA se udvostručuje u sklopu pripreme za diobu stanice. Većina kromatina interfazne jezgre prisutna je, izgleda, u obliku vlakana debljine 30 nm (solenoid) ili u nešto kondenziranijem kromatinskom vlaknu od 60 do 130 nm (Slika 16). Geni koji se aktivno prepisuju dekondenziraniji su, što čini molekulu DNA pristupačnijom transkripcijskom mehanizmu. Za razliku od eurokromatina, otprilike 10% interfaznog kromatina, zvanog heterokromatin, nalazi se u vrlo kondenziranom stanju nalik na kromatin tijekom stanične diobe. Heterokromatin je transkripcijski neaktivan i sadržava visokoponavljajuće sljedove DNA poput onih prisutnih u centromerama i telomerama.

Kako stanica ulazi u diobu, njeni kromosomi postaju visokokondenzirani kako bi se mogli prenositi u stanice kćeri. Smatra se da se petlje kromatinskog vlakna debljine 30 nm (solenoida) dalje presavijaju kako bi oblikovale zgusnute metafazne kromosome mitotičkih ili mejotičkih stanica u kojima se DNA kondenzira skoro 10000 puta (Slika 14, desno; Slika 16). Ovako zgusnuti kromatin više ne može poslužiti kao kalup za sintezu RNA, pa transkripcija prestaje za vrijeme diobe. Metafazni kromosomi su toliko visokokondenzirani da se njihova struktura može dalje proučavati svjetlosnom mikroskopijom. Nekoliko tehnika bojenja daje karakteristične obrasce naizmjeničnih svijetlih i tamnih kromosomskih pruga, koje su rezultat razlike vezanja običnih ili fluorescentnih boja na slijedove DNA bogatije AT ili CG bazama. Navedene su pruge specifične za svaki kromosom te predstavljaju određene kromosomske regije, unutar kojih se hibridizacijom in situ mogu lokalizirati geni; a to upućuje na to da je pakiranje DNA u kromosome jako uredan i reproducibilan proces.



Slika 15: Distribucija različitih vrsta kondenzina – kondenzina I (zelenog) i kondenzina II (crvenog) u ljudskih metafaznih kromosoma.
Izvor: https://en.wikipedia.org/wiki/Condensin#/media/File:CondensinI%26II.png




Slika 16: Razine pakiranja DNA, od dvostruke zavojnice, do kromosoma.
Izvor: http://mmbr.asm.org/content/75/2/301/F3.large.jpg

## 2.4.7. Centromere i kinetohore

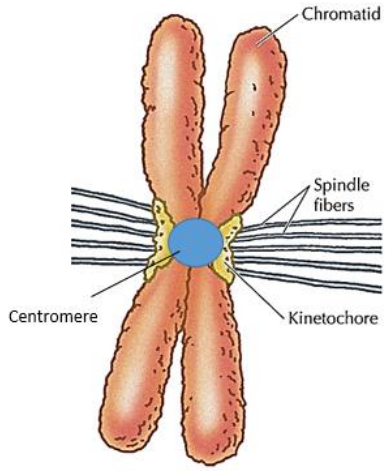
Centromere su specijalizirane regije kromosoma koje igraju glavnu ulogu u osiguranju pravilne raspodjele, tj. kretanja udvostručenih kromosoma u stanice kćeri, tijekom diobe. Kondenzacijom kromatina stvaraju se kromosomi koji se sastoje od dviju identičnih sestrinskih kromatida, držeći se zajedno na centromeri (Alberts i sur., 2002.).

Centromere zapravo imaju dvostruku ulogu, prvu kao mjesta udruživanja sestrinskih kromatida, a drugu kao mjesta prihvaćanja mikrotubula diobenog vretena (Slika 17). Navedena mjesta nazivamo kinetohore, a riječ je o specifičnim slijedovima DNA na koje se mogu vezati proteini te niti diobenog vretena. Proteini vezani na kinetohore tada djeluju kao ''molekularni motori'' koji upravljaju kretanajem kromosoma duž vlakana diobenog vretena, razdvajajući tako kromosome (Cooper i Hausman, 2010.).

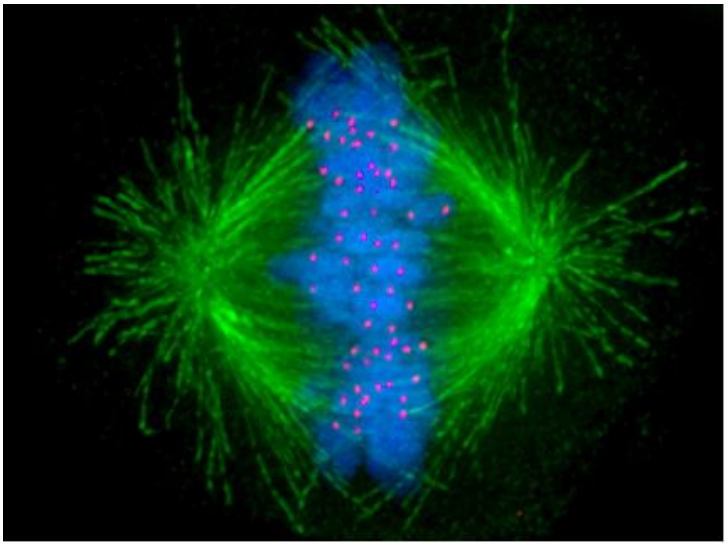
Ukratko, centromera je područje kromosoma na kojemu su dvije sestrinske kromatide spojene tijekom stanične diobe. Na centromernu DNA vežu se specifični proteini koji tvore kintetohoru, služeći kao mjesto vezanja niti diobenog vretena (Slike 18 i 19).

## 2.4.8. Telomere

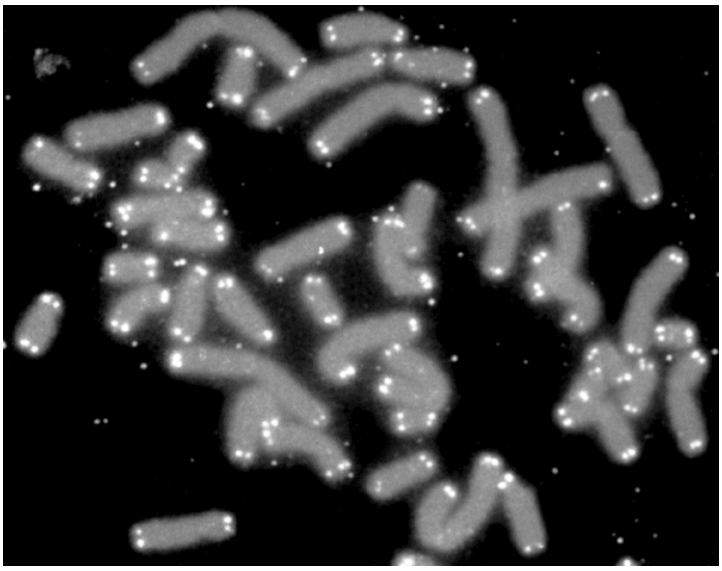
Sljedove na krajevima eukariotskih kromosoma nazivamo telomerama (Slika 20).
Telomere igraju značajnu ulogu u replikaciji i održanju kromosoma, a najbitnije funkcije su im sprečavanje sljepljivanja krajeva kromosoma, sprečavanje razgradnje kromosoma (egzonukleazama) te omogućavanje pravilne replikacije krajeva kromosoma (Cooper i Hausman, 2010.).
Telomere su prepoznate kao posebne strukture jer su u eukariotskim stanicama kromosomi nakon lomljenja vrlo nestabilni, pa se pretpostavilo da su na njihovim krajevima potrebni neki specifični sljedovi. Telomere u eukariota sadrže ponavljajuće (repetitivne) jednostavne sljedove DNA (od 5 do 8 baza), koji su ponovljeni stotinama ili tisućama puta.
Ponavljajući sljedovi telomerne DNA u nekih organizama čine omče na krajevima kromosoma te vežu na sebe proteinski kompleks čuvajući time kromatinske krajeve od razgradnje (Alberts i sur., 2002.; Pavlica, 2012.).




Slika 17: Prikaz položaja centromere i kinetohora na metafaznom kromosomu.
Izvor: http://oregonstate.edu/instruction/bi314/summer09/Fig-05-19.jpg



Slika 18: Ljudska stanica prikazujući mikrotubule (zeleno), kromosome (plavo) te kinetohore (ružičaste točkice) kao mjesta vezanja mikrotubula.
Izvor: https://en.wikipedia.org/wiki/Kinetochore#/media/File:Kinetochore.jpg



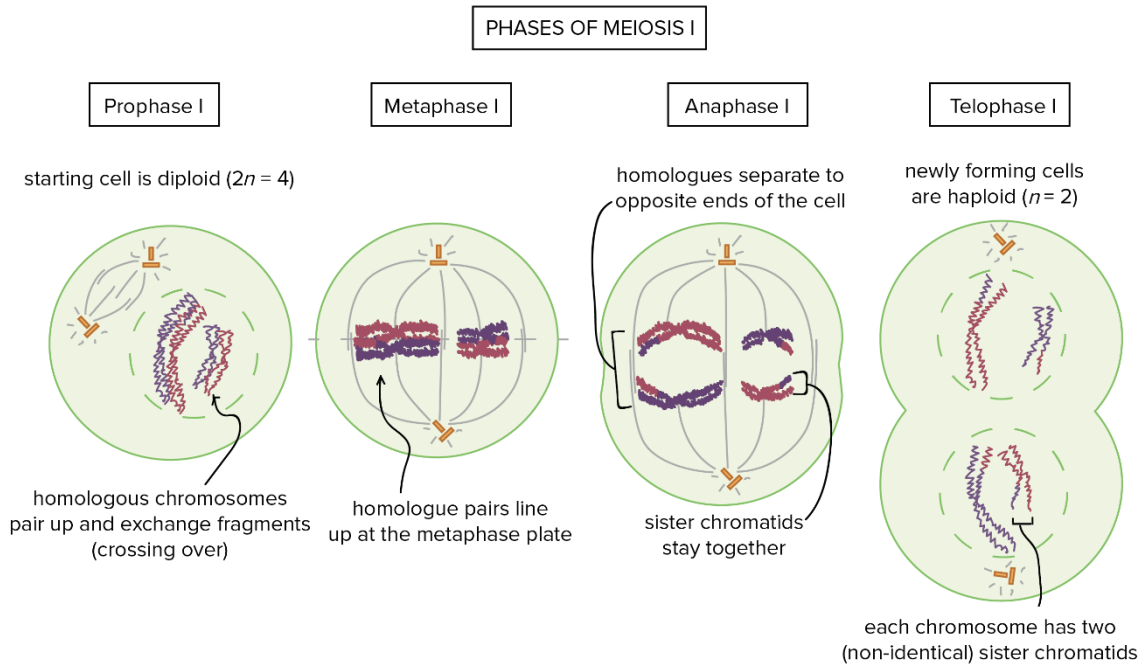
Slika 19: Prikaz telomera (bijelo) na vrhovima ljudskih kromosoma.
Izvor: https://en.wikipedia.org/wiki/Telomere#/media/File:Telomere_caps.gif

## 2.5. Mejoza

Za razliku od mitoze, u mejozi se diploidna (2n) roditeljska stanica dijeli na dvije haploidne (n) stanice (potomke), a svaka od njih sadrži samo jedan član para homolognih kromosoma koji su bili prisutni u diploidnoj roditeljskoj stanici. Riječ je o redukciji broja kromosoma koja se događa tijekom dvaju uzastopnih dioba jezgre i stanice (mejoze I i mejoze II), slijedeći samo jednu replikaciju DNA. Kao i mitoza, mejoza I započinje nakon završene S-faze, odnosno završene replikacije DNA roditeljskih kromosoma, čime nastaju identične sestrinske kromatide za svaki kromosom komplementa. Međutim, u mejozi I obrazac odvajanja kromosoma sasvim je drugačiji od onog u mitozi.

Tijekom mejoze I, homologni se kromosomi (majčin i očev) najprije sparuju, a zatim odvajaju u različite stanice-kćeri. Sestrinske kromatide ostaju zajedno i dovršenjem mejoze I nastaju stanice-kćeri koje sadrže po jedan član od svakog kromosomskog para, a svaki se kromosom još uvijek sastoji od dviju sestrinskih kromatida (Slika 20).

Rekombinacija između homolognih kromosoma odvija se za vrijeme proširene profaze mejoze I, koja je podijeljena na pet dijelova, s obzirom na morfologiju kromosoma; a riječ je o leptotenu, zigotenu, pahitenu, diplotenu te dijakinezi.




Slika 20: Prikaz Mejoze I po fazama (profaza I, metafaza I, anafaza I te telofaza I).
Izvor: https://www.khanacademy.org/science/biology/cellular-molecular-biology/meiosis/a/phases-of-meiosis

U metafazi I, bivalenti (homologni kromosomi) su poredani u ekvatorijalnoj ravnini prihvaćeni za diobeno vreteno. Različito od mitoze, u metafazi mejoze kinetohore sestrinskih kromatida orijentirane su u istom smjeru (monopolarna orijentacija sestrinskih kinetohora), dok su kinetohore homologa usmjerene prema suprotnim polovima diobenog vretena (bipolarna orijentacija). Posljedica toga je vezanje mikrotubula sa istoga pola diobenog vretena za sestrinske kromatide, dok se mikrotubuli suprotnih polova vežu sa po jednim homologom.

Nakon mejoze I slijedi mejoza II koja je slična mitozi po tome što se sestrinske kromatide svakog kromosoma razdvajaju i segregiraju u različite stanice kćeri. Dovršenjem mejoze II nastaju četiri haploidne stanice kćeri, od kojih svaka sadrži samo jednu kopiju svakog kromosomskog komplementa (Slika 5).

### 2.5.1. Profaza I mejoze

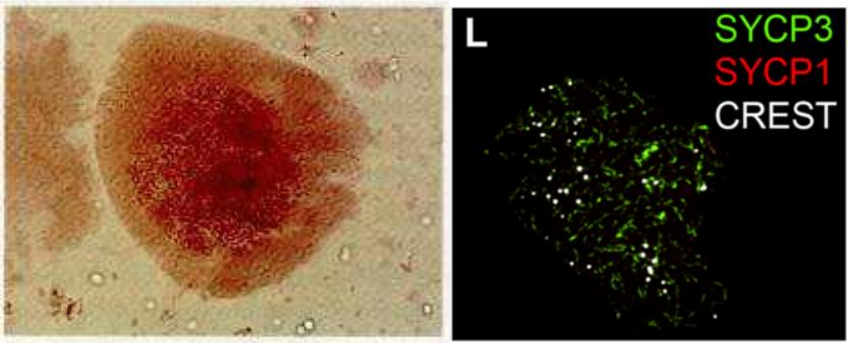
Profaza I tipično je najduža faza mejoze tijekom koje dolazi do crossing overa između homolognih kromosoma. Taj proces od velike je važnosti za sparivanje homologa te pravilnu segregaciju istih tijekom prve mejotske diobe. Nove kombinacije DNA stvorene crossing overom značajan su izvor genetske varijacije, rezultirajući novim kombinacijama alela. Uz to, bitno je napomenuti da u profazi I dolazi i do sastavljanja sinaptonemskog ili sinaptonemalnog kompleksa te diobenog vretena.

Kao što je već rečeno, profaza I podijeljena je na pet (5) dijelova, koji će biti objašnjeni u daljnjem tekstu.

*Leptoten*

Prvi stadij profaze I naziva se leptoten ili leptonem (grč. *Leptonema* - ''tanke niti'') (Snustad i Simmons, 2008.). U navedenom stadiju profaze I dolazi do kondenzacije kromatina te kromosomi počinju dobivati svoj oblik, unutar jezgre (Slika 21). Sestrinske se kromatide blisko povezuju te postaju vidljive, ali se vizualno ne razlikuju jedna od druge (Alberts i sur., 2002.). Tijekom leptotena također počinje stvaranje lateralnih elemenata sinaptonemskog ili sinaptonemalnog kompleksa, o kojem će biti riječi u daljnjem tekstu .

Zaključno s rečenim, leptoten je vrlo kratkog trajanja te u njemu dolazi do progresivne kondenzacije i namatanja kromosomskih vlakana u kromosome.




Slika 21: Leptoten profaze I mejoze
Slika lijevo: Morfologija kromatina stanice ljiljana u leptotenu profaze I
Izvor: http://www.biologija.rs/mejoza.html
Slika desno: Morfologija kromatina mišje stanice u leptotenu profaze I
Izvor: https://en.wikipedia.org/wiki/Meiosis#/media/File:Meiosis_Prophase_I.png

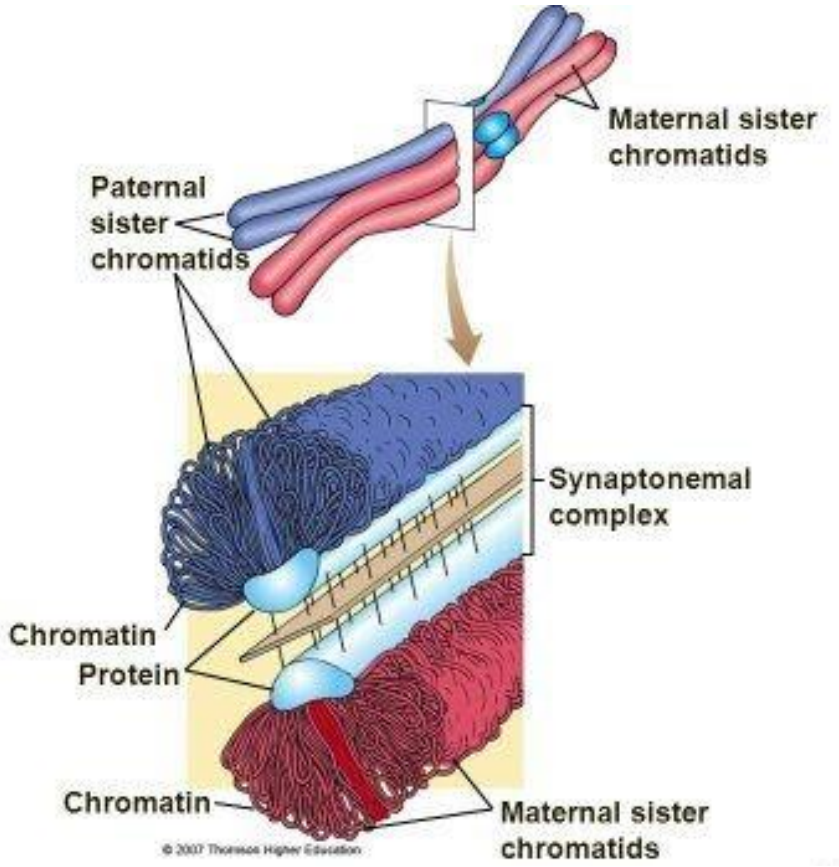
*Sinaptonemski ili sinaptonemalni kompleks (SC)*

Sinaptonemski ili sinaptonemalni kompleks (SC) proteinska je struktura koja se formira između homolognih kromosoma (između dva para sestrinskih kromatida) u zigotenu profaze

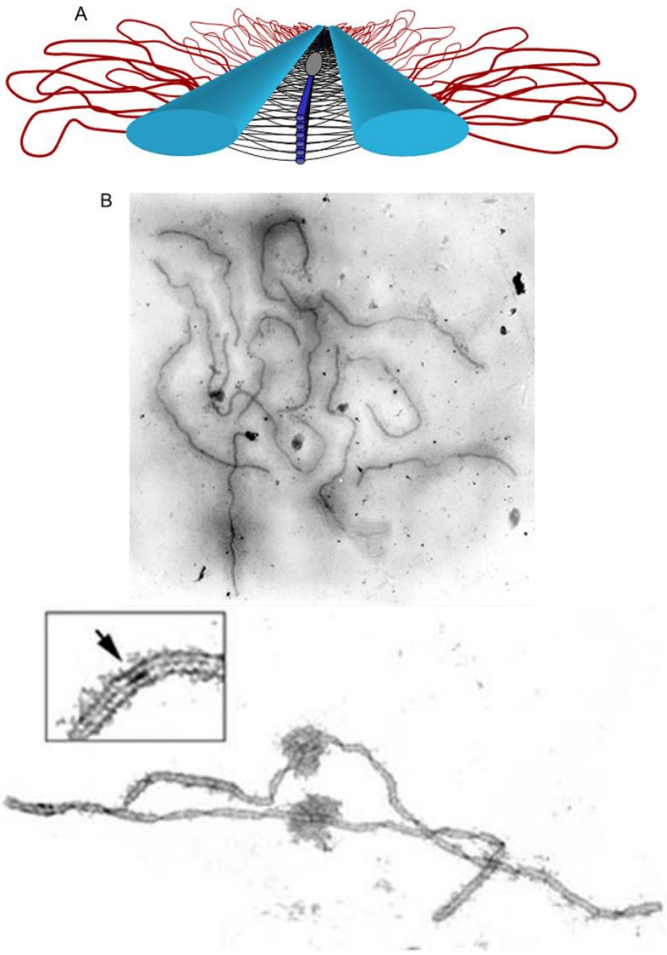
I mejoze (započinje svoju formaciju u leptotenu), a slična je patentnom zatvaraču. Smatra se da posreduje u povezivanju kromosoma držeći ih tijesno povezanima tijekom pahitena koji može trajati i po nekoliko dana (Slike 22 i 23). Rekombinacija između homologa završava krajem pahitena, a kromosomi ostaju vezani na mjestima gdje se dogodio crossing over – kijazmama. Sinaptonemski kompleks razgradi se krajem pahitena (početkom diplotena) te se homologni kromosomi tada odvajaju cijelom svojom dužinom, ali ostaju vezani u području kijazmi što je izuzetno važno za njihovu pravilnu orijentaciju u metafazi I mejoze (Cooper i Hausman, 2010.).

Danas je evidentno da neki organizmi ne posjeduju SC jer im nije potreban za proces genetske rekombinacije (Chi i sur., 2014.). Zbog toga se smatra se da SC funkcionira prvenstveno kao posrednik koji omogućava kromatidama da dovrše procese vezane uz rekombinaciju i crossing over, no treba uzeti u obzir da nije neophodan (Chi i sur., 2014.).

Riječ je o trodijelnoj strukturi koja se sastoji od dvije paralelne lateralne regije te središnjeg elementa. Tri su proteina uključena u SC: SC protein-1 (*SYCP1*), SC protein-2 (*SYCP2*) te SC protein-3 (*SYCP3*). Lateralne elemente većinom čine *SYCP3* i u nešto manjoj količini *SYCP2*, dok se centralni element sastoji od *SYCP1* (Chi i sur., 2014.; Cooper i Hausman, 2010.).



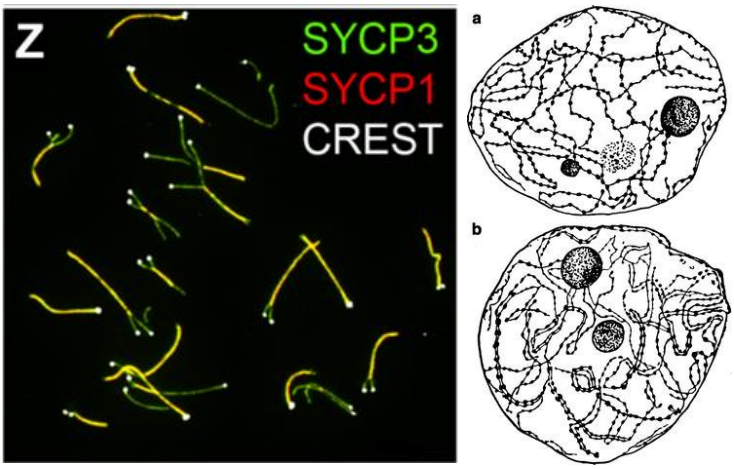

Slika 22: Prikaz sinaptonemskog kompleksa u presjeku homolognih kromosoma.
Izvor: https://www.quora.com/What-is-difference-between-chiasmata-and-synaptonemal-complex




Slika 23: A: Shematski prikaz SCa. Homolozi (svjetlo plavo) povezani transverzalnim (crne linije) i longitudinalnim (tamno plave linije) filamentima. Kromatin (crvene linije) povezan je na odgovarajuća mjesta na kromosomima, protežući se od sestrinskih kromatida. Smatra se da rekombinacijski noduli (čvorovi)(sivi elipsoid) u centralnoj regiji pomažu rekombinaciji. B slika gore: Set SCa rajčice. Kromatin je vidljiv kao mutne sive mrlje, oko crnih linija koje predstavljaju SC. B slika dolje: Dva SCa rajčice sa uklonjenim kromatinom, sa vidljivim kinetohorama i centromerama u sredini (okrugle strukture u sredini).
Izvor:
https://en.wikipedia.org/wiki/Synaptonemal_complex#/media/File:Synaptonemal_complex.png

*Zigoten*

Zigoten (grč. *Zygonema* – 'uparene niti') druga je faza profaze I mejoze, a nastaje kada se kromosomi stanice spoje svaki sa svojim homolognim parom (Snustad i Simmons, 2008.). U ovoj fazi dolazi do sparivanja homolognih kromosoma, olakšanog sastavljanjem sinaptonemskog kompleksa. Navedeno sparivanje ima izgled patentnog zatvarača, kao što je već rečeno u prethodnom potpoglavlju. Ono može započeti u regiji centromera, na krajevima kromosoma ili u bilo kojem drugom centralnom dijelu. Svaki kromosom unutar homolognog para jednake je dužine i veličine te položaja centromera, te je zbog toga sparivanje visoko specifično sa velikom točnosti (Slika24). Ovako sparene kromosome nazivamo bivalentima ili tetradama (Snustad i Simmons, 2008.; Cooper i Hausman, 2010.; Pavlica, 2012.)

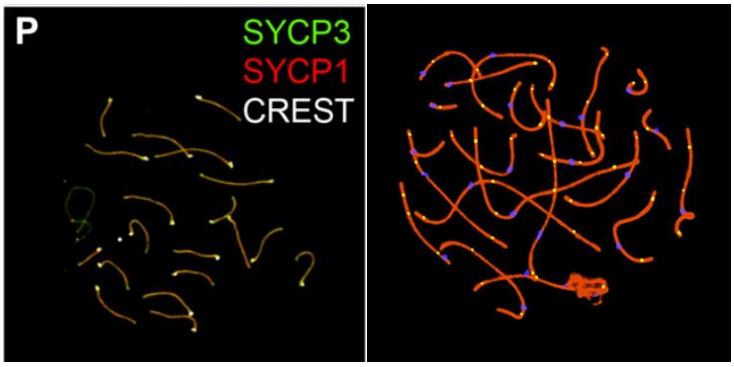



Slika 24: Prikaz zigotena profaze I.
Slika lijevo: Mikroskopski prikaz homolognih kromosoma u zigotenu profaze I. Jasno su vidljivi protein SCa (zeleno), telomere na krajevima kromosoma (bijelo) te kromatin (žuto).
Izvor: https://en.wikipedia.org/wiki/Meiosis#/media/File:Meiosis_Prophase_I.png
Slika desno: a: Prikaz biljne stanice u leptotenu profaze I mejoze.
b: Prikaz biljne stanice u zigotenu profaze I mejoze. Homologni kromosomi su spareni i jasno vidljivi, u odnosu na sliku a.
Izvor: https://www.researchgate.net/figure/36-Leptotene-a-and-zygotene-b-in-a-pollen-mother-cell-of-Trillium-erectum-1-500_fig68_278659254

*Pahiten*

Pahiten (grč. *Pachynema* – ''debele niti'') (Snustad i Simmons, 2008.) treća je faza profaze I mejoze, u kojoj dolazi do homologne rekombinacije između bivalenata ili tetrada, koja uključuje i crossing over (Pavlica, 2012.). Kromosomi su u pahitenu u sinapsi, pod čime se misli na položaj u kojem su dva homologa usklađena i uparena, čime se omogućuje njihova daljna zamjena segmenata te na kraju, segregacija (Slika 25) (Cooper i Hausman, 2010.; Revenkova i Jessberger, 2006.). Sve točke u kojima dolazi do zamjene segmenata nazivaju se kijazme, a izmjena segmenata između nesestrinskih kromatida homolognih kromosoma, crossing over. Navedena razmjena genetske informacije između nesestrinskih kromatida jedan je od bitnih izvora genetske varijabilnosti u prirodi (Pavlica, 2012.). Treba napomenuti da sam proces crossing overa do sad nije viđen u stvarnom vremenu na živim stanicama, pošto do danas nije moguće *in vitro* potaknuti mejotsku diobu stanica. Nadalje, zbog toga što je kromosome teško razlikovati vezane SCom, sam crossing over nije vidljiv unutar istoga, sve do diplotena profaze I (Snustad i Simmons, 2008.). Kao što je rečeno u potpoglavlju o SCu, SC je u pahitenu dovršen i veoma stabilan te kromosomi u ovom stadiju mogu ostati i po nekoliko dana (Cooper i Hausman, 2010.; Hill, 2018.).

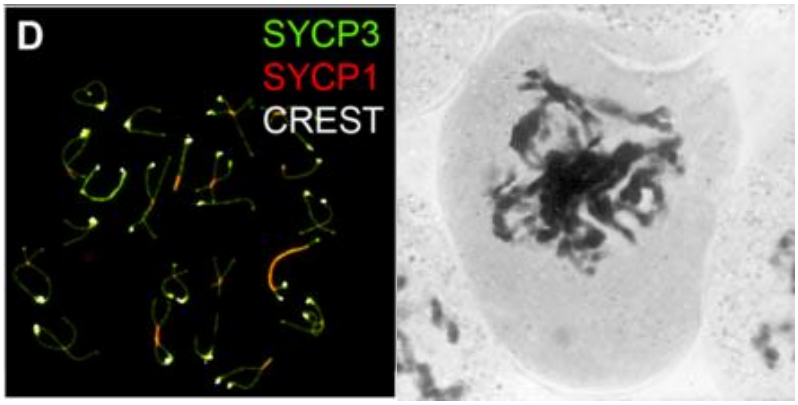
O detaljnijem procesu samog crossing overa biti će više riječi u sljedećim poglavljima, zbog toga što je pahiten profaze I temeljno mjesto odvijanja mehanizama rada *PRDM9* gena, a time i genetske rekombinacije (crossing overa).




Slika 25: Prikaz pahitena profaze I.
Slika lijevo: Mikroskopski prikaz homolognih kromosoma u pahitenu profaze I. Homologe je teško razlikovati čvrsto vezane SCom. Vidljivi su proteini SCa (zeleno) pomiješani sa kondenziranim kromatinom (žuto); te telomere na krajevima kromosoma (bijelo).
Izvor: https://en.wikipedia.org/wiki/Meiosis#/media/File:Meiosis_Prophase_I.png
Slika desno: Prikaz SCa (crveno) tijekom pahitena profaze I. Vidljiva su mjesta rekombinacije (žuto) te centromere (plavo).
Izvor: https://www.jacksonimmuno.com/technical/gallery/Human-Spermatocyte-at-the-Pachytene-Stage

*Diploten*

Diploten (grč. *Diplonema* – ''dvije niti'') (Snustad i Simmons, 2008.) je četvrta faza profaze I u kojoj dolazi do degradacije SCa te laganog odvajanja homolognih kromosoma jednog od drugoga (Slika 26). Također dolazi i do lagane dekondenzacije kromatina, što rezultira omogućavanjem mjestimične transkripcije DNA (Cooper i Hausman, 2010.). Međutim, treba napomenuti da homologni kromosomi i dalje ostaju čvrsto vezani u kijazmama, točkama u kojima je došlo do rekombinacije, tj. crossing overa. Homolozi ostaju vezani kijazmama sve do kasne metafaze I, u prijelazu na anafazu I mejoze (Alberts i sur., 2002.; Hill, 2018.). U jajnika ženskog ljudskog embrija, oocite ostaju u fazi diplotena tijekom cijele fetalne faze razvoja pa do postnatalnog djetinjstva, sve do puberteta kad LH svojim djelovanjem nastavlja proces mejoze (Hill, 2018.).




Slika 26: Mikroskopski prikaz diplotena profaze I.
Slika Lijevo: Mikroskopski prikaz homolognih kromosoma u diplotenu profaze I. Vidljivi su proteini SCa (zeleno), telomere (bijelo) na krajevima kromosoma te kromatin (žuto).
Izvor: https://en.wikipedia.org/wiki/Meiosis#/media/File:Meiosis_Prophase_I.png

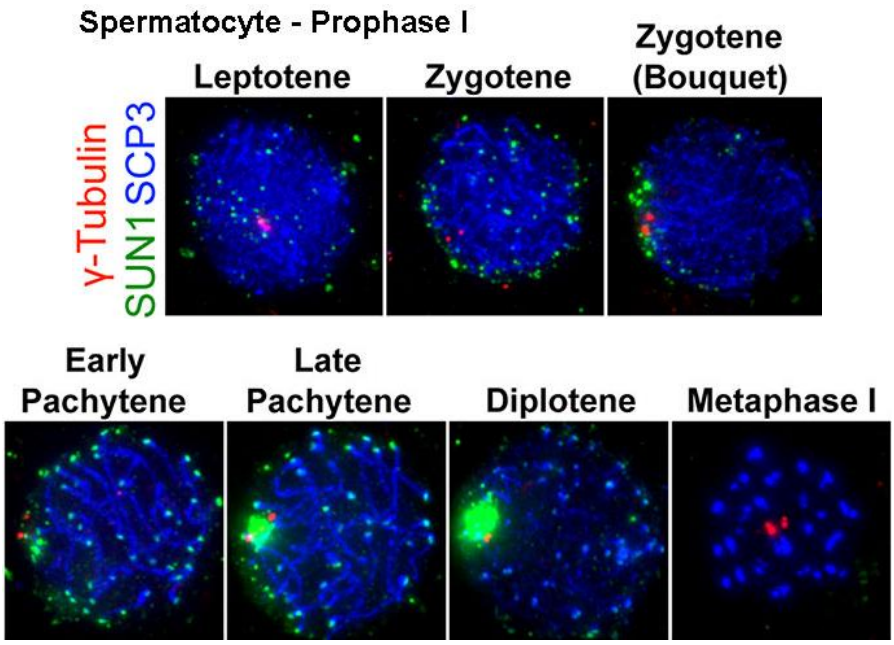
Slika desno: Mikroskopski prikaz homologa u diplotenu profaze I u stanici ljiljana.
Izvor: http://www.vcbio.science.ru.nl/en/virtuallessons/cellcycle/meiostage/diplotene/

*Dijakineza*

Dijakineza (grč. *Diakinesis* – 'kretanje') označava zadnju fazu profaze I. U dijakinezi profaze I su sva četiri dijela tetrada vidljiva prvi puta u okviru mejotske diobe. Mjesta na kojima se dogodio crossing over još su uvijek spojena skupa, a kijazme jasno izražene (Slika 27). Kromosomi se rekondenziraju, staje sva transkripcija pripremajući stanicu za ulazak u metafazu I. Ostatak dijakineze sličan je prometafazi mitoze, jezgre nestaju, a nuklearne membrane se raspadaju stvarajući vezikule te naposlijetku dolazi do stvaranja diobenog vretena.



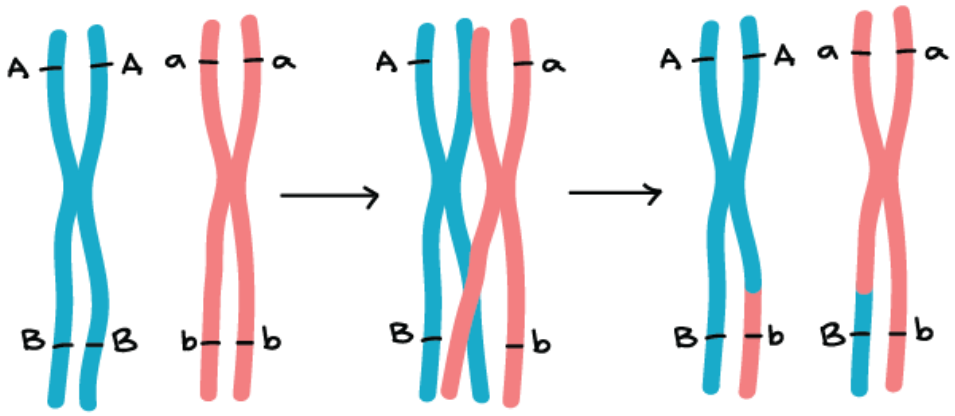
Slika 27: Mikroskopski prikaz dijakineze profaze I u biljnoj stanici.
Izvor: http://www.vcbio.science.ru.nl/en/virtuallessons/cellcycle/meiostage/diakinesis/




Slika 28: Profaza I spermatocita.
Izvor:
https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/File:Spermatocyte_prophase_1_stages_01.jpg#/media/File:Spermatocyte_prophase_1_stages_01.jpg

## 2.5.2.Kromosomalni crossing over

Kromosomalni crossover ili crossing over (CO), razmjena je genetskog materijala između homolognih kromosoma tijekom seksualne reproduckije, točnije, mejoze.
Riječ je o vrsti genetske rekombinacije koja se odvija u pahitenu profaze I mejoze I, dok su homolozi čvrsto međusobno spojeni sinapsom.
Jednostavno rečeno, tijekom kromosomalnog crossing overa dolazi do zamjene dijelova kromosoma oca sa dijelovima kromosoma majke i obrnuto. Naravno, u navedeni je proces uključeno mnogo različitih mehanizama i drugih komponenti koji istime upravljaju, a o kojima će biti riječi u ovome poglavlju.




Slika 29: Pojednostavljeni shematski prikaz crossing overa između homologa.
Izvor: https://www.khanacademy.org/science/biology/classical-genetics/chromosomal-basis-of-genetics/a/linkage-mapping

*Povijest*

Crossing over prvi je u teoriji opisao Thomas Hunt Morgan (Slike 30 i 31), oslanjajući se na otkriće Fransa Alfonsa Janssensa koji je 1909. godine opisao navedeni fenomen, nazvavši ga *''chiasmatypie''* (Carlson E. A., 2004.; Schwartz J. , 2008.; Griffiths i sur., 2012.).

Pojam kijazma (*chiasma*) do danas je ostao u upotrebi, označavajući točku ili mjesto fizičkog kontakta između dvaju nesestrinskih kromatida dvaju homologa. Samim time kijazma označava mjesto moguće razmjene genetskog materijala između homologa, to jest mogućeg crossing overa. Morgan je uočio veliki potencijal Janssensovih radova te na temelju toga napravio eksperimentalna istraživanja o nasljeđivanju u vinskih mušica (*Drosophila*).
Fizičku osnovu crossing overa prvi puta su demonstrirali Harriet Creighton i Barbara McClintock 1931. godine, pokusima na dva lokusa kromosoma 9 kukuruza (Creighton i McClintock, 1931.).

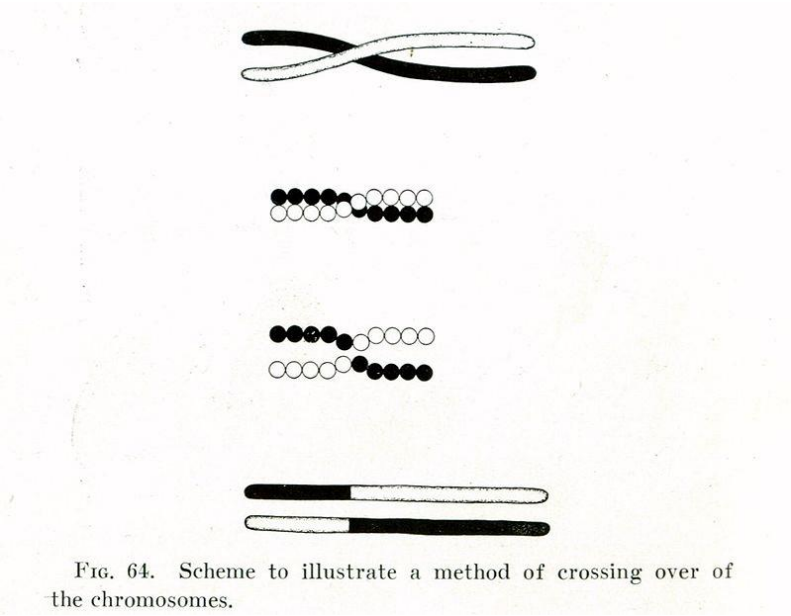


FIG. 64. Scheme to illustrate a method of crossing over of the chromosomes.

Slika 30: Ilustracije crossing overa Thomasa Hunta Morgana (1916, *A Critique of the Theory of Evolution,* strana 132).
Izvor: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Morgan_crossover_1.jpg

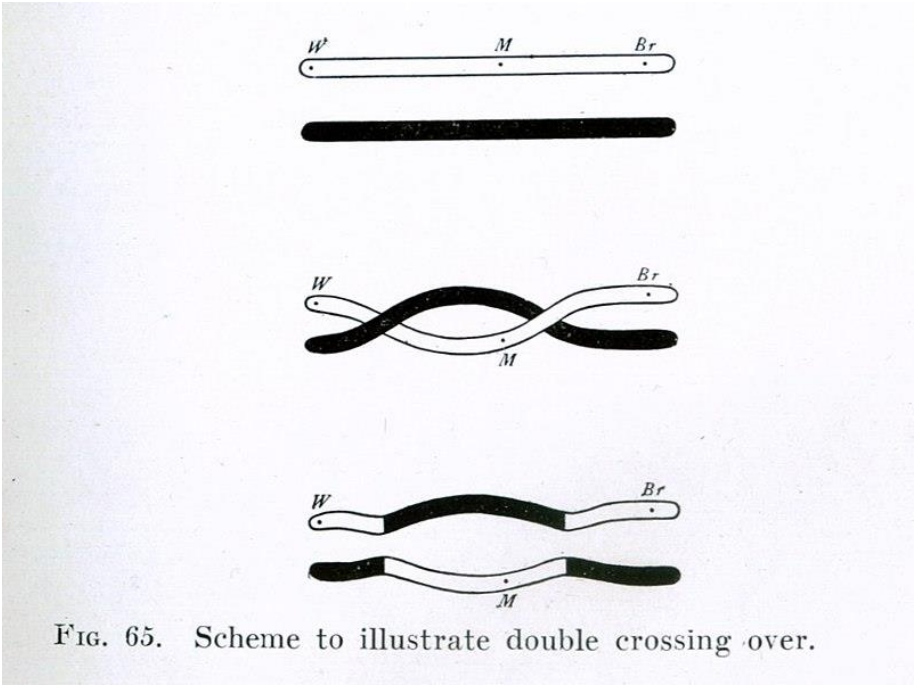



FIG. 65. Scheme to illustrate double crossing over.

Slika 31: Prikaz dvostrukog crossing overa Thomasa Hunta Morgana (1916, *A Critique of the Theory of Evolution*).
Izvor: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Morgan_crossover_2.jpg

*Teorije podrijetla crossing overa*

Danas postoje dvije teorije o podrijetlu izmjene genetskog materijala, to jest crossing overa, proizlazeći iz različitih teorija o podrijetlu mejoze. Prva teorija temelji se na ideji da je

mejoza nastala kao alternativna metoda popravka DNA te je samim time crossing over postao novi način zamjene oštećenih dijelova DNA (Bernstein, Bernstein, i Michod, 2011.). Druga teorija dolazi od ideje da je mejoza evolvirala od transformacije, genetske alteracije u bakterijskih stanica koja rezultira inkorporacijom egzogenog genetskog materijala (iz bakterijske okoline, npr. od druge bakterije) kroz staničnu membranu, a riječ je o horizontalnom transferu gena u svrhu povećanja genetske raznolikosti (Bernstein i Bernstein, 2010.).

## 2.6. Mejotska rekombinacija

### 2.6.1. Inicijacija mejotske rekombinacije u sisavaca

Kao što je već ranije rečeno, mejotska profaza I uključuje genetski remodeling kromatina koji omogućuje spajanje, sinapsu te rekombinaciju između dva homologa. U muških sisavaca, mejoza započinje u post-mitotskim spolnim stanicama, to jest spermatocitima. Period pre-leptoten S-faze koja kulminira homolognom sinapsom početkom pahitena, označen je dramatičnim remodelingom i kondenzacijom kromatina te sastavljanjem ostalih kromosomskih proteina i mehanizama. Nakon selekcije i aktivacije hotspotova ili mjesta rekombinacije, mejotski DSBovi nastaju pod utjecajem *SPO11* i ostalih proteina (Sun i sur., 2015.).

U pahitenu, citološki definiranom kromosomima u punoj sinapsi, dolazi do COa između homolognih nesestrinskih kromatida, a rekombinacijski događaji se razrješuju krajem mejotske profaze, još većom kondenzacijom kromatina sa vidljivim kijazmama između homologa. Ovi koraci događaju se u različitih razvojnih stadija u muških i ženskih spolnih stanica sisavaca. U ženskih sisavaca, sve oogonijske stanice sinkronizirano ulaze u mejozu tijekom razvoja embrija. Svi stadiji rekombinacije su dovršeni prije rođenja, a oocite zaustavljaju s razvojem u diplotenu (da bi ga kasnije mogle nastaviti). Suprotno tomu u muških sisavaca prvi dio razvoja spermatogonija ulazi u mejozu nakon rođenja, napredujući do profaze I (u miševa, stanice u leptoten ulaze 10.dan nakon rođenja, a 19.dan u diploten). Nakon toga stanice diferenciraju tijekom druge mejotske diobe te tijekom spermatogeneze, da bi na kraju nastale zrele stanice spermija. Dodatna mejotska diferencijacija spermatogonija se nastavlja odvijati tijekom cijelog reproduktivno zrelog dijela života (Sun i sur., 2015.).

Izravan dokaz mejotski specifičnih DSBova u sisavaca teže je dokazati nego u kvasaca, zbog heterogenosti spolnih stanica i kompleksnijeg genoma (unatoč tomu što je manji, to jest kraći od kvašćeva). DNA lomovi, ne samo DSBovi, otkriveni su u mišjim spermaticitima putem PCR analiza i *in situ* označavanja različitih dijelova testisa. Neizravan dokaz nastanku DSBa sugerira visoka razina fosforilacije na serinu 139 histonske varijante H2AX (referirane kao γH2AX), poznate po tome što označava DSB  i neke druge DNA lomove i oštećenja. γH2AX detektiran je u leptotenu, a nešto manje u zigotenu profaze I; kako u oocitama tako i u spermatocitima. U miševa, H2AX fosforilacija je *SPO11*-ovisna te je zbog toga uvjerljiv pokazatelj mejotske DSB formacije. Nadalje, dokazana je prisutnost *SPO11* proteinskih-DNA kovalentnih kompleksa u mišjih spermatocita što je samo osnažilo dokaz uloge tog proteina za sam nastanak DSBa (Sun i sur., 2015.; de Massy, 2013.).

### 2.6.2. Proteini potrebni za rekombinaciju

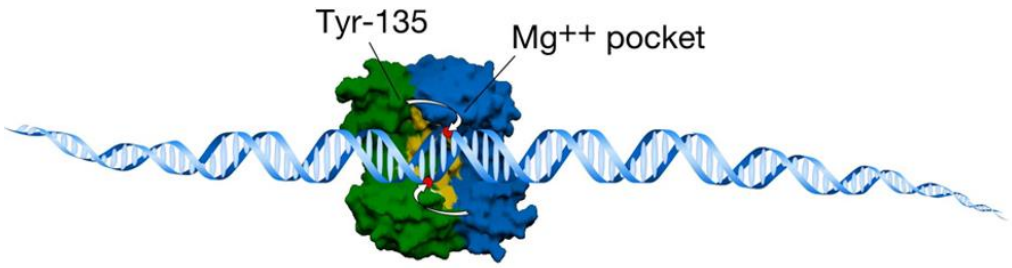
*SPO11*

*SPO11* univerzalni je katalitički poticatelj mejotskog DSBa, evolucijski očuvan mejotski protein prisutan u većini eukariotskih genoma. *SPO11* posjeduje katalitičku tirozinsku domenu, nazvanu krilata-heliks DNA-vezujuća domena (engl, *winged-helix DNA-binding domain,* WHD) te topoizomeraza/primaza (TOPRIM) domenu, u kojoj su očuvani kiselinski ostaci bitni za koordinaciju vezanja iona magnezija (Keeney, 2008.). Rađena su brojna istraživanja da bi se biokemijski dokazala in vitro katalitička aktivnost *SPO11*, a danas su napravljeni modeli mehanizama cijepanja DNA putem istoga.

RT-PCR produkti ljudskog *SPO11* proteina također su bili predmetom istraživanja u nekoliko tipova stanica različitih vrsta raka: prostate, crijeva te jajnika, a već je od ranije poznato da je *SPO11* antigen raku testisa (Keeney, 2008.).

*SPO11* detektiran je već 7 dana nakon rođenja u muških miševa što je utvrđeno RT-PCR analizom. Northern blottingom, slaba *SPO11* ekspresija uočena je i 12. dana tijekom formacije DSBa te povećanje ekspresije 17. dana napredovanjem profaze I u pahiten i diploten. Nadalje, konstantna visoka razina *SPO11* uočena je u spermatocitima u pahitenu, ali niska u leptotenu i zigotenu (Kumar i de Massy, 2010.).

Ljudski i mišji *SPO11* veličine je 14.0 Kb te sadrži 13 eksona i kodira nekoliko alternativnih splice varijanti te ima dvije izoforme. *SPO11*α te *SPO11*β uspoređene su u različitih tipova stanica testisa u mladih miševa, u kojih spermatociti sinkronizirano ulaze u mejozu. Uočeno je da je *SPO11*β bio predominantno ekspresiran u ranim spermatocitima, dok se *SPO11*α akumulirao od sredine pahitena pa do kasne profaze I (Kumar i de Massy, 2010.). Disrupcija *SPO11* putem delecije 4. i 6. eksona u miševa izaziva sterilitet i u ženskih i u muških miševa. U *SPO11*$^{-/-}$ muških miševa, testisi su manji, a histološka analiza otkriva prekinutu spermatogenezu u pahitenu i apoptozu spermatocita (nema nastanka haploidnih stanica). U *SPO11*$^{-/-}$ ženskih miševa, reduciran broj oocita završi profazu I, no u njih nakon rođenja dolazi do zatajenja jajnika i masivne eliminacije oocita (Kumar i de Massy, 2010.). U *SPO11*$^{+/+}$ miševa, to jest u divljeg tipa, *SPO11*-generirani DSB potiče ATM (serin/treonin kinaza; engl. serine/threonine kinase) -ovisnu fosforilaciju H2AX u leptotenu. Jednkom kad je nastao DSB, proteini *RAD51* i *DMC1* se spajaju na isti te započinju formaciju sinapse između homologa. Nedostatak *RAD51*/*DMC1* veznih mjesta u *SPO11*$^{-/-}$ miševa samo još više dokazuje defekt u formaciji njihovih mejotskih DSBa (Keeney, 2008.; Kumar i de Massy, 2010.).




Slika 32: Predloženi model vezanja *SPO11* proteina na DNA prije cijepanja iste. Katalitički tirozinski ostatak jednog monomera reagira sa metalnim veznim mjestom drugog monomera te se formiraju dva hibridna aktivna mjesta na obje strane dupleksa. Nukleofilna reakcija tirozinskih ostataka siječe DNA generirajući DSB sa *SPO11* kovalentno vezanim za svaki 5' kraj.
Izvor: Keeney, S., 2008.

### *MEI1 i REC114*

Dva proteina evolucijski očuvana od kvasaca pa do miševa su *MEI1* te *REC114*, a biokemijskim i citološkim studijama utvrđeno je da oba proteina imaju snažnu međusobnu interakciju te su ko-lokalizirani na homolozima tvoreći kompleks različit od *SPO11* kompleksa. Ortolozi *MEI1* i *REC114* u miševa i drugih viših eukariota pokazali su veći fokus na kratke dijelove konzerviranih sekvenci DNA, umjesto na kompletnu sekvencu.

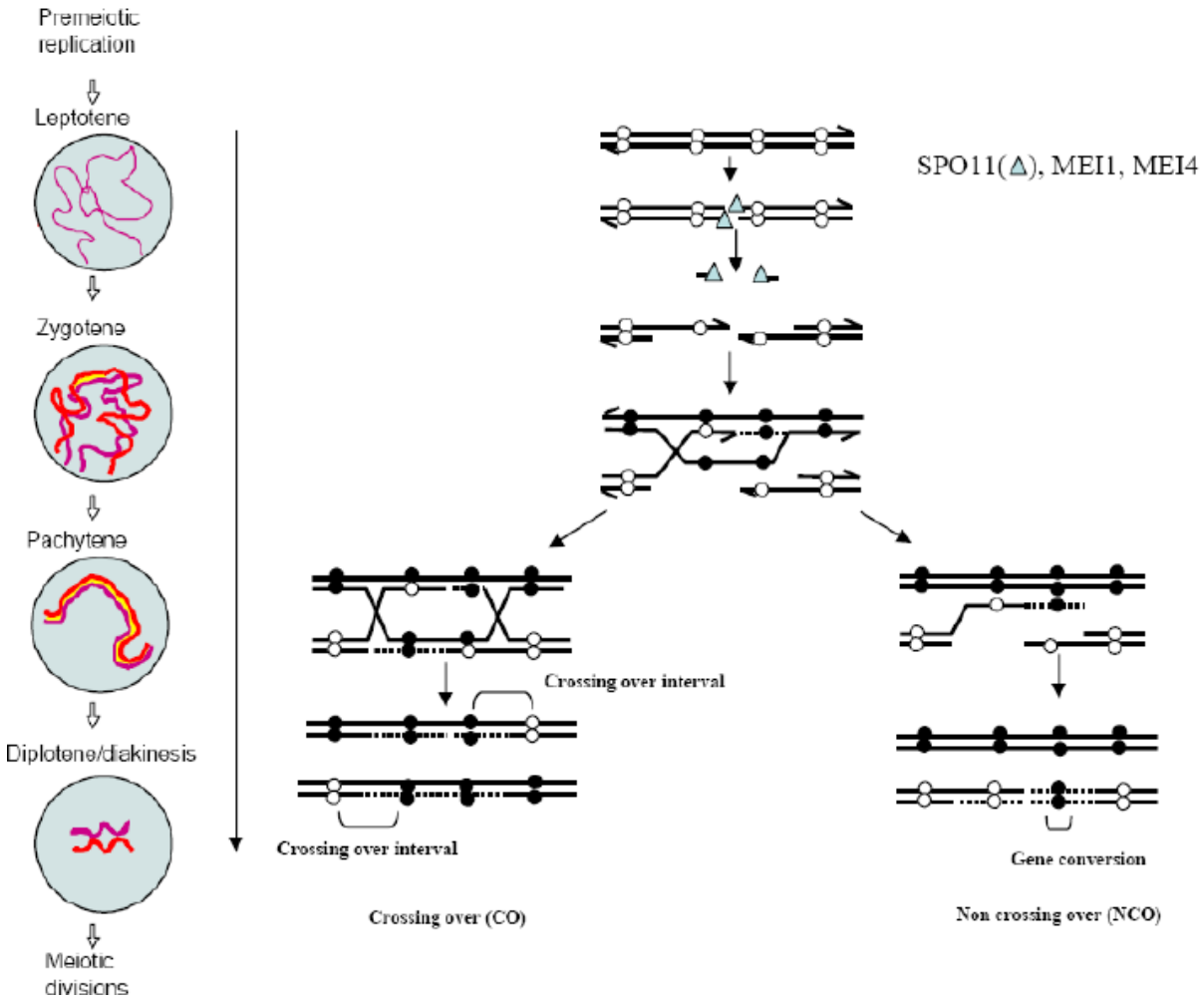
*MEI1* transkripti u muških miševa detektirani su već 5. dana nakon rođenja, u testisima; a u ženskih miševa u fazi embrija, ali ne i u zrelih jajnika nakon rođenja, što ukazuje na to da je ekspresija *MEI1* ograničena samo na vrijeme početka mejotske rekombinacije. Homolozi *MEI1* proteina nađeni su u sisavaca, peradi, riba te nekih biljaka (Keeney, 2008.).

*WDR61 (Ski8)*

*Ski8* protein uključen je u DSB formaciju u pivskog kvasca (S.cerevisiae), ali do sad nije utvrđena njegova uloga u sisavaca. *Ski8* se lokalizira u jezgri tijekom mejoze te potpomaže nastanak mejotske DSB formacije putem direktne interakcije sa *SPO11* (Keeney, 2008.).

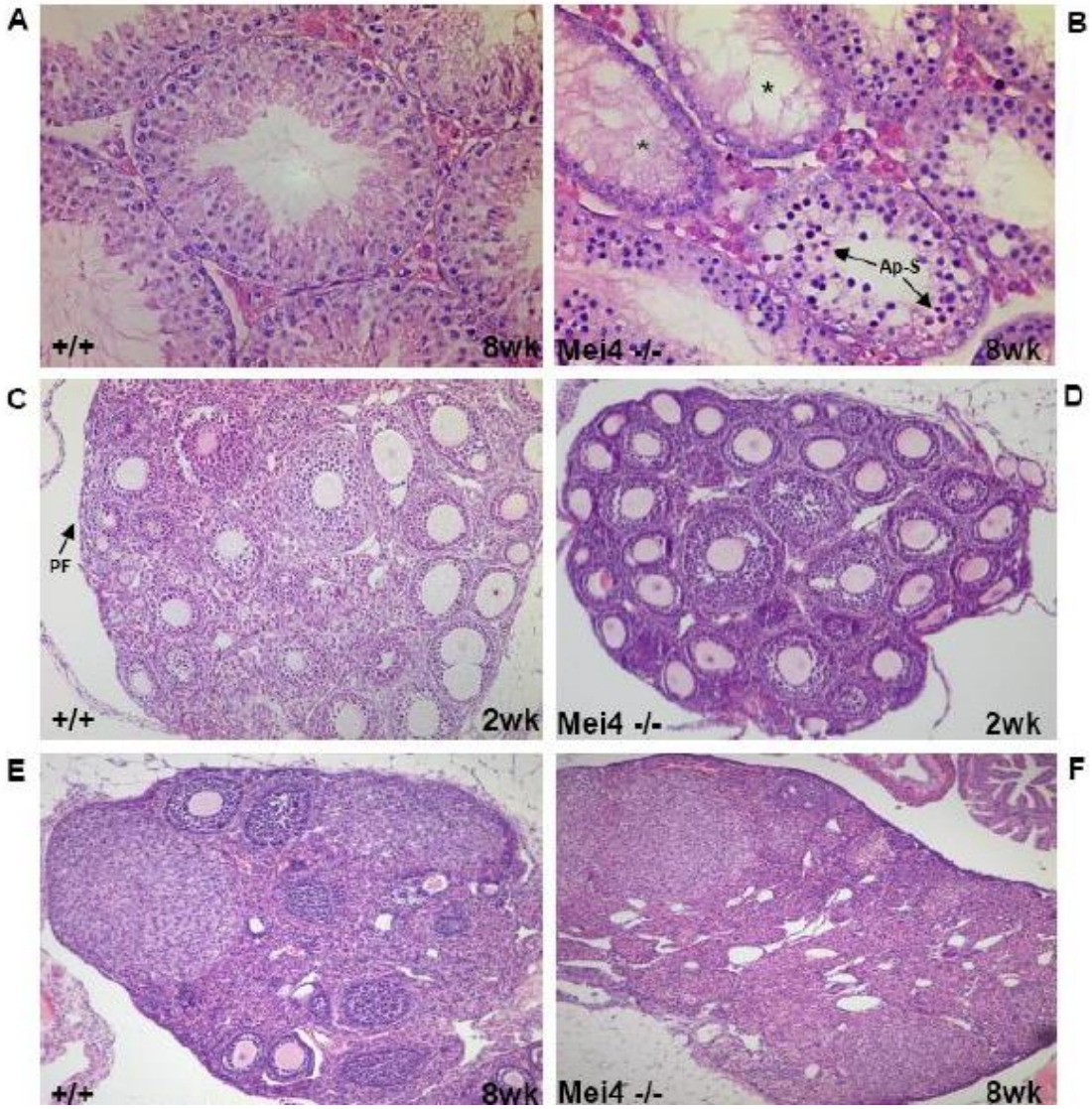
*MRE11/RAD50/NBS1 (MRN kompleks)*

*MRE11/RAD50/NBS1* ili *MRN* kompleks evolucijski je očuvan kompleks esencijalan za DSB popravke, no njegova uloga u formaciji DSBa je dokazana samo u kvasaca.
U miševa su *MRN* geni snažno ekspresirani u testisima, a *MRN* kompleks lokaloziran u jezgrama spermatocita od leptotena do diplotena profaze I (Keeney, 2008.; Kumar i de Massy, 2010.). Zbog toga što je *MRN* kompleks esencijalan za život u miševa, inaktivacija bilo kojeg *MRN* gena uzrokuje smrt embrija, samim time onemogućavajući daljnje istraživanje istih. Zbog tog razloga, križani miševi koji nose mutaciju *MRN* gena korišteni su za daljnja istraživanja same funkcije *MRN* kompleksa tijekom mejoze. Miševi s mutacijom *MRE11* i *NBS1* pokazali su usporen mejotski napredak tijekom profaze I, nedovršenu i abnormalnu sinapsu homologa te alteracije u frekvenciji lokalizacije *MLH1* proteina, markera za formaciju COa. Ove studije upućuju na bitnu ulogu *MRN* kompleksa za DSB poprakve, novisno i tome jesu li DSBi *SPO11*-ovisni ili ne (Keeney, 2008.; Kumar i de Massy, 2010.).




Slika 33: Molekularni mehanizam CO i NCO formacije putem različitih modela DSB popravka. DSB formacija nastaje u leptotenu i zahtijeva *SPO11* i *MEI1* (i *MEI4* u kvasaca). DSB popravak napreduje do kraja pahitena u kojem su formirani rekombinantni produkti (CO ili NCO). Crne i bijele točke označavaju polimorfizme.

Izvor: Kumar, R., & de Massy, B., 2010.




Slika 34: Prikaz obustave gametogeneze zbog nedostatka mejotskih DSBova u mišjih testisa. Vidi se razlika u spermatogenezi divljeg tipa (A) i Mei4$^{-/-}$ tipa miševa (B) 8 tjedana nakon rođenja. Razlika oogeneza u divljeg tipa (C,E) i Mei$^{-/-}$ (D,F) miševa prikazana je 2 i 8 tjedana nakon rođenja. Ap-S na slici B prikazuje potpunu ili djelomičnu depleciju spermatocita. PF na C slici označava primordijalne folikule.

Izvor: Kumar, R., & de Massy, B., 2010.

### 2.6.3. Mjesta odvijanja rekombinacije - Rekombinacijski 'hotspotovi'

Prvi rekombinacijski hotspotovi u sisavaca otkriveni su 1982. godine u H2 regiji mišjeg 17. kromosoma. Ovo otkriće proizašlo je iz jednog od prvih pokušaja da se genetski podaci približe i povežu s molekularnom strukturom kromosomskih regija, u ovom slučaju segmentom dužine 200-kb. Ljudski hotspotovi otkriveni su nekoliko godina kasnije u β-globinu i inzulinskim regijama tijekom analize uzoraka obiteljskog nasljeđivanja (Paigen i Petkov, 2010.).

Rekombinacijski hotspotovi ili žarišta regije su genoma koje pokazuju povišene rate rekombinacije u odnosu na očekivanje. Brzina rekombinacije unutar hotspotova može biti stotine puta veća od one u okolnih regija. Rekombinacijski hotspotovi rezultiraju većim postotkom DNA lomova unutar svojih regija te ih nalazimo kako u mitotskim tako i u mejotskim stanicama (Alberts i sur., 2002.). Veličine su 1-2 Kb, međusobno razmaknuti 50 – 100 Kb, a preferabilno leže izvan genskih regija (Kumar i de Massy, 2010.; Alberts i sur., 2002.; Baudat, Imai i de Massy, 2013.).

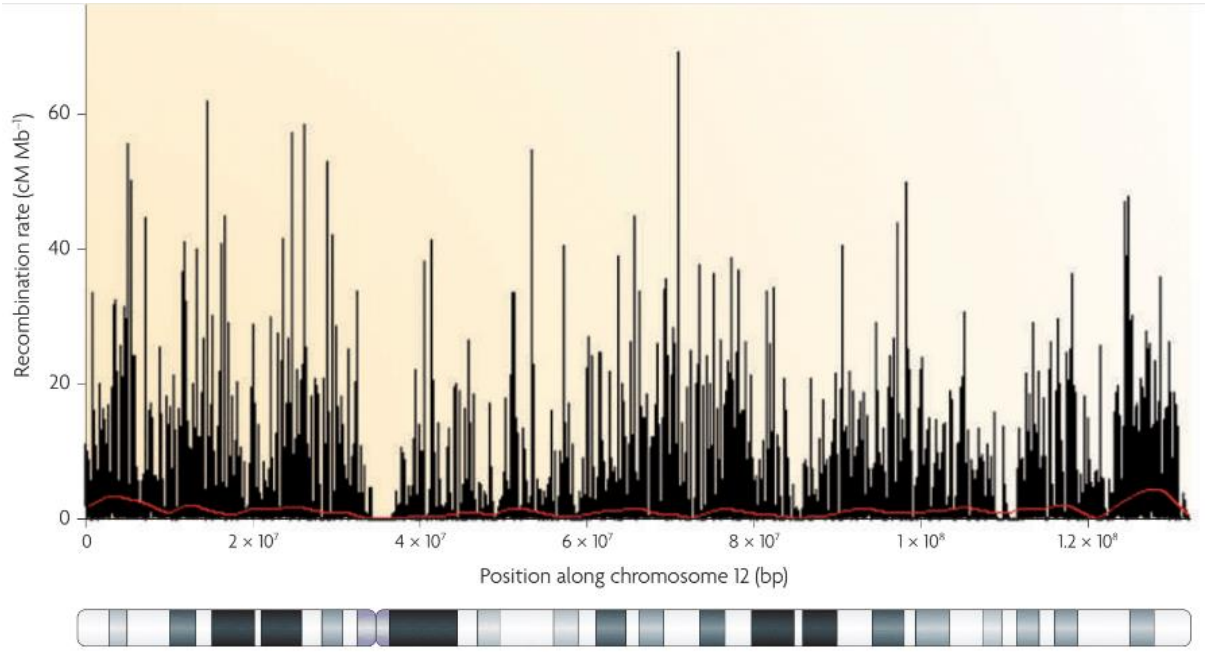
Smatra se da je mejotska rekombinacija putem COa promiče ispravnu segregaciju homologa te popravak oštećenja DNA (DSB popravke). CO zahtijeva dvolančani lom DNA praćen inkluzijom ili zalaskom jednog lanca homologa u drugi homolog te naknadnog popravka, tj. razrješenja dvolančanog loma (Baudat i sur., 2010.). Hoće li se dvolančani lom razriješiti putem COa ili ne, ovisi o samom položaju i orijentaciji homologa te drugim čimbenicima poput proteina i gena, ovisno o vrsti.

Početne točke rekombinacije (*intiation sites*) obično se identificiraju mapiranjem COa putem analize pedigrea ili češće, putem linkage disequilibriuma (LDa). LDom je do danas identificirano više od 30 000 hotspotova unutar ljudskog genoma (Baudat i sur., 2010.). Nadalje, otkriveno je da je u ljudi prosječan broj COa po hotspotu jedan CO u 1300 mejoza; a u najekstremnijem hotspotu taj broj iznosi jedan CO na svakih 110 mejoza (Myers, Spencer, i Auton, 2006.). Frekvencija COa je visoko varijabilna, te rangira od 0,0005 cM pa sve do 2cM. Udaljenost između točaka recipročnih CO produkata može biti izračunata te nam pokazuje da je prosječna veličina konverzije gena uključene u DSB popravak između 220 i 540 parova baza. Suprotno tomu, NCO (engl. *non – crossing over*) sekvence su mnogo kraće, između 20 i 290 parova baza. Navedeni podaci sukladni su teorijama da su COi i NCOi rezultat dvaju različitih modela DSB popravka (Kumar i de Massy, 2010.).

Smatra se da se rekombinacijski hotspotovi javljaju zbog same strukture i organizacije kromosoma u kojoj se neki njegovi dijelovi čine dostupnijima za rekombinaciju od ostalih (Lichten i Goldman, 1995.). Riječ je o samoj strukturi kromatina unutar kromosoma, koji može olabaviti i odmotati se (stvoriti početnu točku dvolančanog loma – engl. *initiation site*) trimetilacijom lizina 4 H3 histona (H3K4me3) (Baudat i sur., 2010.), što će biti detaljnije objašnjeno u daljnjem tekstu. Ipak, čini se da rekombinacijski hotspotovi nisu uzrokovani samim slijedom DNA sekvenci ili samom kromosomskom strukturom, već se njihove početne točke (*initiation sites*) mogu kodirati u genomu. Jedan od dokaza za tu tvrdnju je upravo *PRDM9* gen koji kodira histonsku metiltransferazu u regiji mišjeg Dsbc1 hotspota, pružajući time dokaz neslučajne, genetske osnove za mjesta inicijacije rekombinacije u miševa (Baudat i sur., 2010.). Nadalje, brza evolucija *PRDM9* gena objašnjava veću pojavnost istog u čimpanze, a manju u ljudi, unatoč tomu što i ljudi i čimpanze dijele veliku sličnost same sekvence (Auton i sur., 2012.).

Ukratko rečeno, rekombinacijski hotspotovi mjesta su u genomu na kojima će vjerojatnije doći do COa, to jest genetske rekombinacije jer na sebi sadrže inicijacijske točke

(*initiation sites*) koje vezanjem različitih aktivatora rezultiraju nastankom dvolančanih lomova (engl. *double strand breaks*, DSB).




Slika 35: Prikaz rekombinacijskih rata na 12.kromosomu u čovjeka. Graf prikazuje rekombinacijske hotspotove koji su evidentni putem najviših crnih vrhova/crta, okruženih regijama bez ili niske rekombinacije. Treba obratiti pozornost na nedostatak rekombinacijske aktivnosti u području centromere.
Izvor: Paigen, K., & Petkov, P., 2010.

## 2.6.4. Hotspot motivi

Kao što je već rečeno, u sisavaca, većina mejotskih COa zgusnuta je u rekombinacijske hotspotove, u kojima je zapažena veća pojavnost određenih motiva te njihovo ponavljanje. Neki od danas identificiranih motiva veće pojavnosti u hotspotovima su CCTCCCT te CCNCCNTNNCCNC; odgovorni za crossing overe u bar 40% svih ljudskih hotspotova (Myers i sur., 2008.). Treba i uzeti u obzir gen *CXXC1*, CG (citozin i gvanin) vezajući protein još poznat pod nazivom *CXXC-ZF* protein 1 (engl. *CXXC-type zinc finger protein 1*), kojeg je također bitno spomenuti u okviru vezanja *PRDM9* na hotspotove bogate CG sekvencama, pošto je navedeni uključen u međusobnu interakciju proteina te nastanka DSBa, nakon vezanja *PRDM9* ZFa na određenu sekvencu hotspota.
Na koji su način specifične sekvence DNA prepoznate putem *PRDM9* ZF domene centralno je pitanje za razumijevanje specifičnosti rekombinacijskih evenata.

Istraživanja na miševima sa križanim, $PRDM9^{Cst}$ genom sa 11 prstiju (može vezati maksimalno 33 bazna para) te divljim tipom $PRDM9^{Dom}$ sa 12 prstiju (može vezati maksimalno 36 baznih parova); pokazala su da mišji DNA hotspotovi pokazuju minimalan broj vezujućih mjesta koji varira od 30 – 34 bazna para, ukazujući time na to da *PRDM9* koristi sve svoje ZFe da bi se vezao na DNA (Segurel, 2013.).

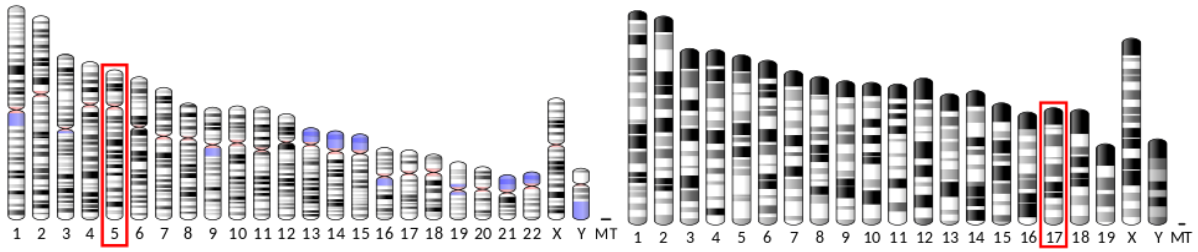
Tablica 2: Prikaz hipervarijabilnih ljudskih minisatelita i njihovih hotspot motiva. Podebljan je motiv koji se tandemski ponavlja unutar hotspota. Za MS1 motiv je dugačak samo 9 baznih parova, ali se tandemski ponavlja, s tim da su prikazana samo 2 ponavljanja.

| Minisatellite (reference) | Consensus repeat unit | Repeat unit contains motif | Mutation rate and array size correlation |
|---|---|---|---|
| MS1 (ref.16) | **CCACCCTAT**CCACCCTAT[a] | Yes | N/A |
| CEB1 (refs. 17, 18) | AGCCCAGGGACCTCCGCAGGCCAC**CCTCCCTCCCCCC**TC | Yes | Yes |
| B6.7 (ref.21) | CTCATGTCCTATAGAGACCC**CCTCACTGTCCAC**C | Yes | Yes |
| D7S22 (ref.15) | TCCTGCC**TCTCCCTGCCCAC**ACCGCCCGCCTTTCTAT[C] | Yes | Yes |
| MS32 (ref.8) | GAGCAGGTGGCCAGGGGTGACTCAGAATG | No | No |
| MS20 (ref.20) | GGCGGGTGAGTAGACGGCGTGCGTAGGGGCCGGAGGCGGGGTGTGTACGG | No | No |
| MS31 (ref.19) | CCACCTCCCACAGACACTGC | No | N/A |
| Insulin (INS-VNTR) (ref. 22) | ACAGGGGTGTGGGG | No | No |

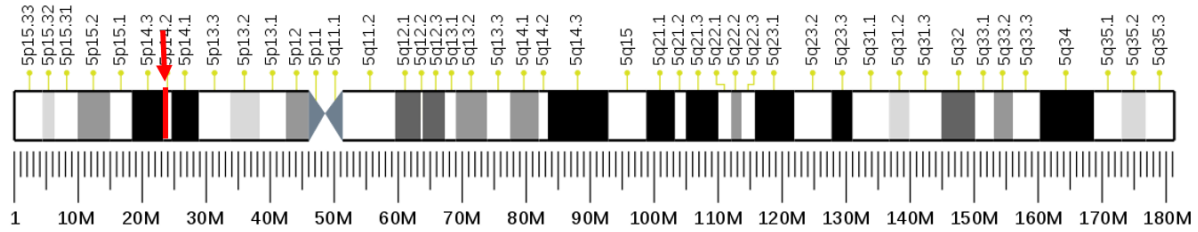
Izvor: Myers et al., 2008.

## 2.7. *PRDM9* gen

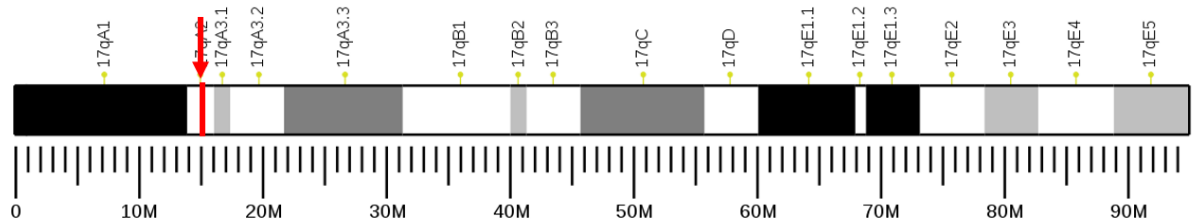
*PRDM9* gen naziv je za pozitivnu regulatornu (PR) domenu 9; znanu još kao PR/SET domena 9 ili PR domenu cinkovih prstiju (*'zinc finger'*, ZF) 9. Od kad je otkriven, *PRDM9* je bio poznat pod različitim imenima, poput: *Meisetz*, histonska metiltransferaza, histonska lizinska N-metiltransferaza *PRDM9, ZNF899, KMT8B, PFM6*, itd. Odgovoran je za pozicioniranje rekombinacijskih hotspotova (recombination hotspots) ili žarišta tijekom mejoze, vezanjem cinkove 'zinc finger' domene na DNA te samim time o crossing overima između homologa, o čemu će više riječi biti u daljnjem tekstu. Riječ je o jedinom do sad nađenom specijacijskom genu u sisavaca te je uz to jedan od najbrže evolvirajućih gena u genomu.




Slika 36: Lijevo: *PRDM9* se u ljudi nalazi na 5.kromosomu.
Desno: U miševa se *PRDM9* nalazi na 17.kromosomu.
Izvori: https://en.wikipedia.org/wiki/*PRDM9*#/media/File:Ideogram_human_chromosome_5.svg
https://en.wikipedia.org/wiki/*PRDM9*#/media/File:Ideogram_house_mouse_chromosome_17.svg




Slika 37: Pozicija *PRDM9* na 5.kromosomu u ljudi.
Izvor: https://en.wikipedia.org/wiki/*PRDM9*#/media/File:Human_chromosome_5_ideogram.svg

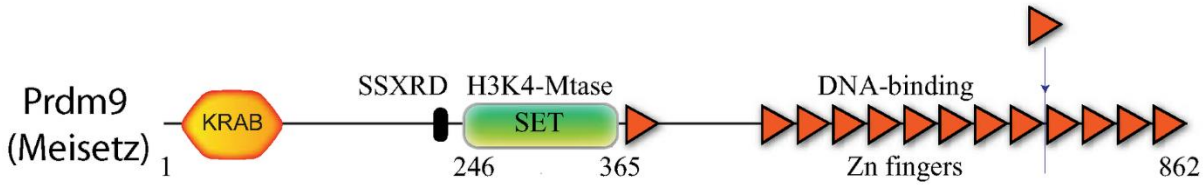



Slika 38: Pozicija *PRDM9* na 17. mišjem kromosomu.
Izvor:
https://en.wikipedia.org/wiki/*PRDM9*#/media/File:Ideogram_of_house_mouse_chromosome_17.svg

Mejotska homologna rekombinacija prvenstveno se odvija, kao što je već prije rečeno, u lokaliziranim regijama znanim kao rekombinacijski hotspotovi (engl. *recombination hotspots*). U mnogih sisavaca uključujući ljude i miševe pokazalo se da su rekombinacijski

hotspotovi povezani sa aktivnošću PR domene 9, poznatije pod nazivom *PRDM9* (Berg i sur., 2010.).

*PRDM9* mejotski je specifičan protein koji se javlja u muških i ženskih spolnih stanica u profazi I, a sastoji se od nekoliko (4) različitih funkcionalnih domena (Slika 39): na njegovom N-terminalnom kraju nalazi se KRAB (engl. *Kruppel associated-box*) domena, zatim SSX represijska domena ili SSXRD (engl. *synovial sarcoma X repression domain*) iza koje slijedi PR/SET domena metiltransferazne aktivnosti (*H3K4-Mtase*). Na kraju se nalazi '*zinc finger*' (ZnF ili ZF) domena na C-terminalnom kraju proteina, sastojeći se od jednog proksimalnog ZFa, odvojenog od ostatka tandemskog niza ZFa koji može sadržavati od 8 do 20 'fingera' ili prstiju. O svakoj od spomenutih domena biti će više govora u daljnjem tektu, zbog toga što svaka ima posebnu ulogu za početak rekombinacije, a tako i cjelokupan proces mejoze.




Slika 39: Shematski prikaz domena *PRDM9* gena u miša.
Na N-terminalnom kraju se nalazi KRAB domena, zatim SSXRD, pa PR/SET domena te na C-terminalnom kraju ZF domena.
Izvor: https://en.wikipedia.org/wiki/*PRDM9*#/media/File:*PRDM9*_Domain_Architechture.png

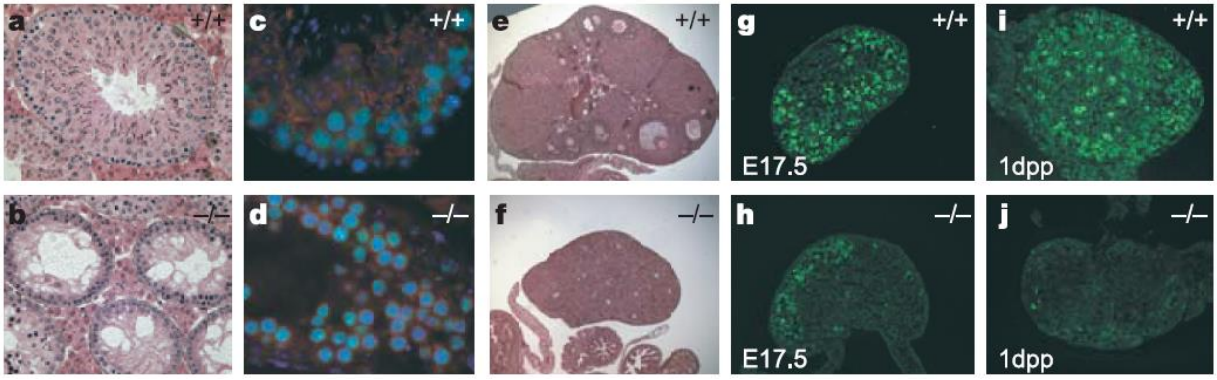
## 2.7.1. Povijest

Zanimanje za bolji uvid u samu mejozu i događanja u profazi I (CO) povećalo se početkom 21. stoljeća razvojem novih analitičkih metoda i tehnologija. Povećava se i zanimanje za epigenetiku te epigenetska događanja te modifikacije u mejozi. Za postizanje mejoze, transkripcija nekoliko mejotskih gena treba biti pravilno vremenski programirana, a transkripcijska kontrola genske ekspresije uvelike ovisi o pristupačnosti DNA. Istraživanja procesa koji se odvijaju tijekom profaze I mejoze, dovela su do otkrića epigenetskih modifikacija histona koji reguliraju gensku ekspresiju te kromatinsku strukturu.
Otkrilo se da je metilacija lizina 4 histona 3 (H3K4 metilacija) karakteristično svojstvo transkripcijski aktivnih gena, ukazujući time da histonska metiltransferaza (HMTaza) H3K4 označava gene za aktivaciju transkripcije, no epigenetske regulacije tih modifikacija u mejozi su i dalje ostajale nejasne.

Hayashi i sur. su 2005. tražili i identificirali gene povećane ekspresije prilikom ulaska u mejozu te izdvojili i imenovali gen odgovoran za napredak rane mejotske profaze, nazvavši ga *Meisetz*: mejotski induciran faktor koji sadrži PR/SET domenu i ZF motiv (engl. *meiotic induced factor containing a PR/SET domain and zinc-finger motif*), utvrdivši da se radi o histonskoj metiltransferazi (Hayashi, Yoshida i Matsui, 2005.).
Provodeći pokuse na miševima, *Meisetz*ovi transkripti tada su pronađeni samo u muških i ženskih spolnih stanica na početku mejotske profaze, u ženskih fetalnih gonada te muških postnatalnih testisa. Nadalje, otkriveno je da *Meisetz* posjeduje sposobnost trimetilacije, no ne i mono- ili dimetilacije H3K4 te da o navedenoj sposobnosti uvelike ovisi njegova transaktivacijska aktivnost. Pokusima je utvrđeno da su miševi oba spola sa poremećajem funkcije *Meisetz*a bili sterilni zbog smanjenog i manjkavog sparivanja homologa u profazi I, teških oštećenja za vrijeme DSB popravaka te nedovoljno razvijenih spolnih organa (Slike 40 i

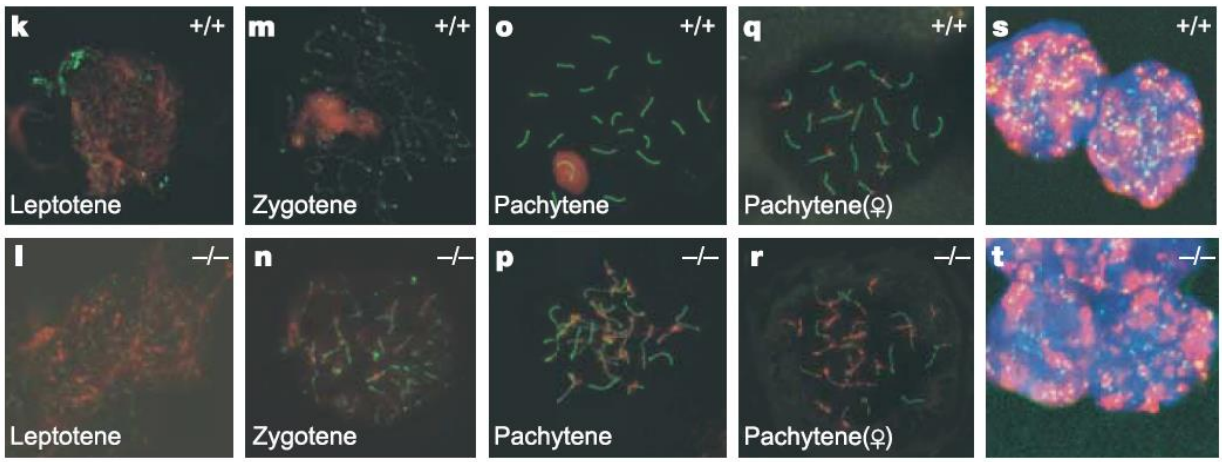
41). U testisu sa nedostatkom *Meisetz* gena pokazalo se da ne dolazi do trimetilacije H3K4 te da je došlo do promjene mejotske transkripcije gena (Hayashi, Yoshida i Matsui, 2005.).

Ovim novim otkrićima Hayashi i sur. dokazali su da su mejotski specifični epigenetski eventi u sisavaca ključni za ispravan tijek mejoze, a time i razvoja spolnih organa. Unatoč tomu što je na mnogo pitanja tada ostalo neodgovoreno, otvorili su vrata daljnjim istraživanjima kompleksnosti, funkcija, domena i rada *Meisetz* gena, danas poznatijeg pod imenom *PRDM9*.




Slika 40: Prikaz razlika u mejotskoj progresiji u *Meisetz*$^{-/-}$ miševa. Proučavane su sekcije divljeg tipa (a) te *Meisetz*$^{-/-}$ (b) mišjih testisa koji su u b slučaju prikazivali poremećaj u radu. Sekcije (bojane metodom imunofluorescencije) divljeg tipa (c) i *Meisetz*$^{-/-}$ (d) potvrdile su obustavu spermatogeneze u pahitenu. Obojane sekcije divljeg tipa (e) i *Meisetz*$^{-/-}$ (f) jajnika te prikaz ispod fluorescentnog mikroskopa (divljeg tipa – g, i; te *Meisetz*$^{-/-}$ -h, j). Oznake E17.5 označava starost embrija, a 1dpp jedan dan post partum.

Izvor: Hayashi, K., Yoshida, K., & Matsui, Y., 2005.




Slika 41: Razvojne faze mejotske profaze u stanicama testisa divljeg tipa i *Meisetz*$^{-/-}$ miševa.

Izvor: Hayashi, K., Yoshida, K., & Matsui, Y., 2005.

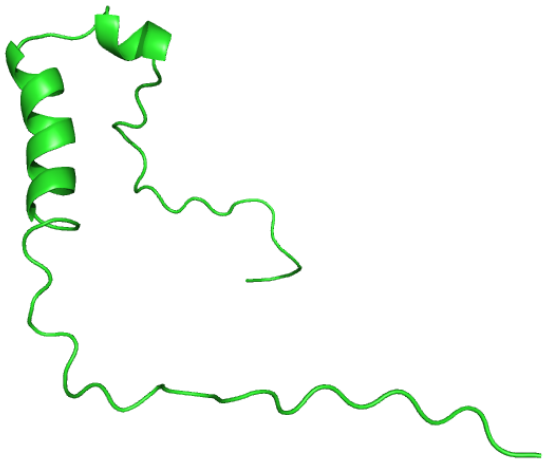
## 2.8. Funkcionalne domene *PRDM9* gena

### 2.8.1. KRAB (*Krüppel-associated box*)

KRAB domena naziv je za transkripcijske represijske ili suzbijajuće domene, prisutne u oko 400 ljudskih cinkovih *'zinc finger'* proteinskih transkripcijskih faktora (*KRAB zinc finger*

*proteins*) (Huntley i sur., 2006.). KRAB domena koja sadržava C2H2 cinkove '*zinc finger*' (C2H2-ZnF) proteine tvori najveći red cinkovih *'zinc finger*' gena, a više od polovice ih je povezano sa istom u ljudskom genomu; te su podložni nakupljanju u velike skupine (Rousseau-Merck i sur., 2002.), što nam je sve bitno za bolje shvaćanje same ZF *PRDM9* domene.

Do danas se pokazalo da je više od 10 nezavisno kodiranih KRAB domena uspješan represor transkripcije, sugerirajući time da je navedena represija transkripcije zajedničko uobičajeno svojstvo ove domene. Ona predstavlja jednu od najjačih represora u humanom genomu, a nalazimo ju samo u tetrapodnim organizmima (Margolin i sur., 1994.).
*PRDM9* član je velike obitelji PRDM transkripcijskih regulatora, no za razliku od ostalih, jedino on uz PRDM7 sadrži KRAB domenu koju se smatra odgovornom za proteinske interakcije (Hohenhauer i Moore, 2012.).



Slika 42: 3D model KRAB (*Krüppel-associated box*) domene.
Izvor: https://en.wikipedia.org/wiki/Kr%C3%BCppel_associated_box#/media/File:KRAB_Domain.png

*KRAB PRDM9 domena nužna je za pravilan tijek mejoze*

Mejotske rekombinacije inicirane su programiranim dvolančanim lomovima DNA (engl. *double strand breaks*, DSB), posredovanih međudjelovanjem raznih proteina, od kojih je možda najbitnije spomenuti protein *SPO11* (de Massy, 2013.). Mejotski DSBovi nisu slučajno raspoređeni unutar genoma, već su lokalizirani na, kao što je već ranije rečeno, rekombinacijskim hotspotovima (Baudat, Imai i de Massy, 2013.) Nadalje, molekularni mehanizmi zaslužni za raspodjelu i učestalost mejotskih DSBova unutar genoma razlikuju se od vrste do vrste, a za sad postoje dva predložena modela navedenih molekularnih mehanizama. Prvi model, proučavan u kvasaca, uglavnom se oslanjajući na samu kromatinsku strukturu te njenu aktivnost, dok je drugi model, proučavan najviše u miševa i viših eukariota, zasnovan na teoriji proteinskih regulatornih domena koje sadrže određene gene; u ovom slučaju misleći na *PRDM9*.

Detaljnjijim proučavanjem domena *PRDM9* gena te razvojem tehnologije, dobiveni su bolji uvidi u molekularne mehanizme rada te uloge svake od spomenutih. Prvotnim otkrićem i analizama *PRDM9* gena, u to vrijeme zvanog *Meisetz*, najveći broj istraživanja rađen je na PR/SET domeni odgovornoj za H3K4 trimetilacije DNA, jer je upravo zahvaljujući tomu isti i otkriven. Manje pažnje posvetilo se KRAB domeni, za koju se uskoro pokazalo da je jednako bitna u okviru mejotske rekombinacije. Počelo se sumnjati da H3K4 trimetilacija DNA nije

dovoljna za specifično vezanje promotora za početak DSB formacija. Nadalje, znalo se da *PRDM9* posjeduje KRAB domenu koja generalno posreduje interakcije između proteina (engl. *protein-protein interactions*), a kao što je ranije rečeno, jedino je on uz *PRDM7* posjedovao navedenu domenu. Te činjenice kasnije dovode znanstvenike do hipoteza o mogućnosti da bi KRAB domena mogla biti uključena u izravnu interakciju samog *PRDM9* gena sa komponentama hotspotova te DSB proteina na kromosomima.

Da bi testirali navedenu hipotezu i pokazali da je *PRDM9* KRAB domena esencijalna za odvijanje mejoze, DSB popravke te sinapse među kromosomima; Imai, Baudat i sur. su generirali deleciju unutar *PRDM9* u muških i ženskih miševa, koja vodi sakaćenju, tj. skraćivanju iste (Slika 43). Navedena modifikacija dovela je do pomaka komponenti unutar *PRDM9* te delecije, odnosno brisanja prve 42 aminokiseline (AK) skupa sa nekolicinom AK ostataka KRAB A domene. Takav modificirani novonastali *PRDM9* nazvan je *PRDM9*ΔKB1, a pokusi su izvedeni na 4 različite grupe miševa: divljem tipu $PRDM9^{+/+}$, križancima $PRDM9^{+/\Delta KB1}$ (divlji tip x modificirani *PRDM9*ΔKB1) i $PRDM9^{\Delta KB1/\Delta KB1}$ (modificirani x modificirani); te $PRDM9^{-/-}$ koji je služio kao negativna kontrola (Imai i sur., 2017.).

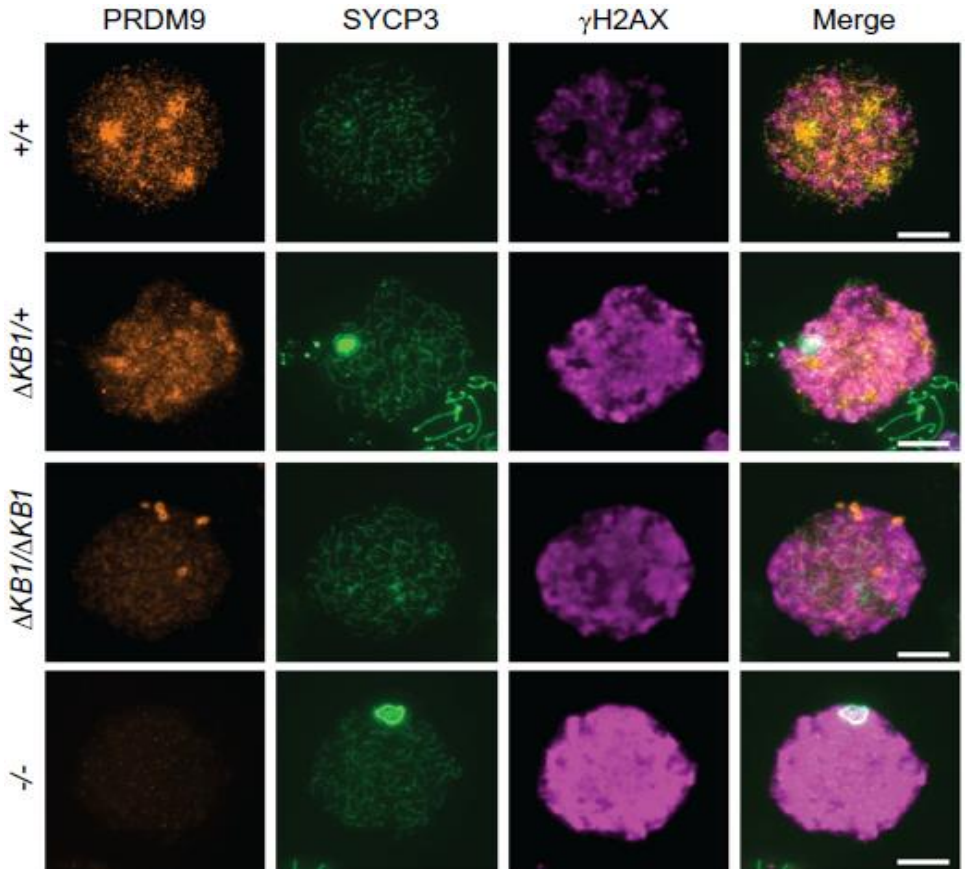
Identificirani su defekti u oogenezi i spermatogenezi $PRDM9^{\Delta KB1/\Delta KB1}$ miševa, a histološka analiza pokazala je da su razvoj jajnika i testisa bili kompromitirani, no nije pronađena nikakva signifikantna razlika u spermatogenezi i razvoju testisa u divljem, $PRDM9^{+/+}$; te križancima $PRDM9^{+/\Delta KB1}$. Nadalje, uočena je normalna formacija DSBa u spermatocitima tijekom leptotena i zigotena u $PRDM9^{\Delta KB1/\Delta KB1}$ miševa, no spermatociti nikad nisu uspjeli doseći pahiten profaze I (Slike 44 i 45) (Imai i sur., 2017.).

Ovim istraživanjem dokazana je važnost KRAB domene u okviru aktivnosti *PRDM9* gena te da su fenotipovi opaženi u spermatocitima $PRDM9^{\Delta KB1/\Delta KB1}$ miševa vrlo vjerojatno bili rezultat već spomenute delecije, čime je *PRDM9* izgubio dio svojih specifičnih aktivnosti poput vezanja za DNA, proteinskih interakcija te metiltransferazne aktivnosti. Sve to dovodi do nemogućnosti formacije DSBa, gubitka funkcije samog gena te nemogućnosti odvijanja gametogeneze (zbog izmijenjene mejotske profaze) (Imai i sur., 2017.). Uz to, identificirani su neki proteini uključeni u interakciju s KRAB domenom, poput *CXXC1*, proteina koji se u sisavaca veže za IHO1, esencijalnu komponentu molekularnog mehanizma mejotskog DSBa (Imai i sur., 2017.).



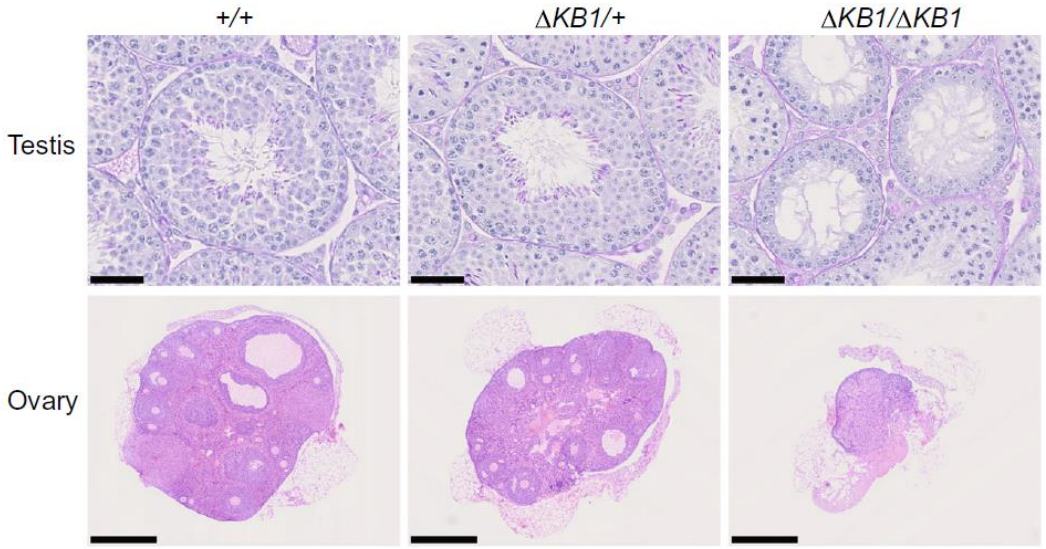

Slika 43: Prikaz *PRDM9* gena (gore) uz prikaz modificiranog *PRDM9*ΔKB1 sa delecijom unutar KRAB domene.

Izvor: Imai, et al., 2017.




Slika 44: *PRDM9*, SYCP3 (mejotski marker kromosomskih elemenata) i γH2AX (marker DSB formacije) ekspresija u kromosomskih uzorcima *PRDM9*$^{+/+}$ (B6), *PRDM9*$^{+/\Delta KB1}$, *PRDM9*$^{\Delta KB1/\Delta KB1}$ te *PRDM9*$^{-/-}$ spermatocita u leptotenu, ispod fluorescentnog mikroskopa.

Izvor: Imai, et al., 2017.




Slika 45: Defekti u spermatogenezi i oogenezi (u stanicama testisa i jajnika) u *PRDM9*$^{+/+}$ (B6), *PRDM9*$^{+/\Delta KB1}$, *PRDM9*$^{\Delta KB1/\Delta KB1}$ miševa.

Izvor: Imai, et al., 2017.

### 2.8.2. SSXRD (*Synovial Sarcoma X Repression Domain*) domena

SSXRD naziv je za represijsku domenu sinovijalnog X sarkoma, koja se obično povezuje sa KRAB domenom. Sinovijski sarkomi tj.sinovijalne ovojnice X, SSX, obuhvaćaju grupu od desetak gena (SSX1-SSX10) te njihovih pseudogena (Valmori, Qian i Ayyoub, 2006.). Većina ima funkciju regulatora transkripcije putem proteinskih (protein – protein) interakcija. Imaju sposobnost spontanog izazivanja humoralnih i staničnih imunih odgovora u pacijenata s rakom te su potencijalne mete imunoterapije protiv raka (Güre i sur, 2002.). SSX geni od velikog su zanimanja onkolozima, zbog raznih uloga koje igraju u identifikacijama i nastancima tumorskih stanica, kromosomskih translokacija te raka.

SSX1 protein može potisnuti transkripciju te se obično povezuje sa KRAB domenom na njenom N-terminalnom kraju, no isto tako i na C-terminalnom kraju; te je cijelo to područje zbog toga dobilo naziv SSX represijska domena (Lim i sur., 1998.).

### 2.8.3. PR/SET domena

Sve članove *PRDM* obitelji na N-terminalnom kraju karakterizira konzervirana PR (*PRDI-BF1* i *RIZ1* homologna) domena praćena varijabilnim brojem ZF ponavljanja. Makar je PR domena srodna katalitičnoj SET (engl. *Supressor of variegation 3-9, Enhancer of zeste and Trithorax*) domeni velike grupe histonskih lizinskih metiltransferaza, aktivnost PRDM proteina može biti izražena na dva načina: putem regrutacije histonskih modificirajućih (engl. histone – modifying) enzima (poput *PRDM1* ili *PRDM6*) ili putem direktne histonske lizinske metilacije (poput *PRDM2*, *PRDM8*, *PRDM9*) (Koh-Senta i sur., 2014.).

Kao što je već ranije rečeno, istraživanja procesa koji se odvijaju tijekom profaze I mejoze, dovela su do otkrića epigenetskih modifikacija histona koji reguliraju gensku ekspresiju te kromatinsku strukturu, a metilacija lizina 4 histona 3 (H3K4 metilacija) karakteristično je svojstvo transkripcijski aktivnih gena u sisavaca, ukazujući time da histonska metiltransferaza (HMTaza) H3K4 označava gene za aktivaciju transkripcije (Hayashi, Yoshida i Matsui, 2005.).

Identifikacijom *Meisetz* gena, Hayashi i sur. su 2005. godine prvi uočili da *PRDM9* posjeduje H3K4 metiltransferaznu aktivnost, štoviše, da histonska H3 metiltransferaza kontrolira epigenetske događaje odgovorne za mejotsku profazu. Time su prvi pružili opis jedne od domena *PRDM9* gena (dok su istraživanja ostalih uslijedila tek kasnije), no otkrivši golem još neistraženi potencijal navedenog, otvorili vrata daljnjim istraživanjima.

Kao što je već navedeno pokazalo se da *PRDM2*, -3, -8, -9 i -16 posjeduju histonsku metiltransferaznu aktivnost te da su PR domene samo daleko srodne klasičnim SET metiltransferaznim domenama. *PRDM9* je uz *PRDM7*, jedini član PRDM obitelji koji sadrži tri velike domene: KRAB, PR/SET te ZF domenu.

Kao što je predviđeno nazivom same domene, ova H3K4 trimetiltransferazna aktivnost odgovorna je za označavanje hotspotova na DNA tijekom mejoze te razmještaj formacije nukleosoma koji slijedi nakon toga (Sun i sur., 2015.).

PR/SET domena vrši lokalnu trimetilaciju H3K4 (H3K4me3), rezultirajući razmještajem nukleosoma, stvarajući centralnu regiju bez nukleosoma (engl. *nucleosome – depleted region*) stvarajući time DSB potreban za izmjenu genetskog materijala između dvaju homologa, odnosno CO (Baker i sur, 2014.; Brick i sur., 2012.; Parvanov i sur., 2017.).

Sam opseg trimetilacije lokalnih nukleosoma određuje širinu ili razmak u kojem se konačni COi mogu dogoditi. U odsutsvu *PRDM9*, DSBi se mogu formirati na drugim dostupnim H3K4me3 mjestima, uglavnom promotorima, ali se ne mogu pravilno popraviti; te

naposlijetku spolne stanice podliježu apoptozi (Smagulova i sur., 2011.; Parvanov i sur., 2017.).

*Metiltransferazna aktivnost esencijalna je za funkciju PRDM9*

Već je ranije rečeno da je u otkriveno da je *PRDM9* neophodan za specifikaciju hotspotova mejotskih DSBa, kompletan DSB popravak te sinapsu između homolognih komosoma, kao i napredovanje oocita i spermatovita kroz mejotsku profazu (Brick i sur., 2012.; Hayashi, Yoshida i Matsui, 2005.; Sun i al., 2015.). Mutacije koje uzrokuju oštećenja na *PRDM9* domenama poput onih na KRAB domeni (Imai i sur., 2017.; Sun i sur., 2015.) rezultiraju jednakim defektima DSB popravaka te nemogućnosti sparivanja homologa sinapsom.

Najnovija istraživanja otkrivaju da je *PRDM9* metiltransferazna aktivnost potrebna za odvijanje H3K4me3 te H3K36me3, što samo osnažuje hipotezu da *PRDM9* katalizira post-transkripcijske modifikacije. Favorizira se uloga H3K4me3 u određivanju to jest specificiranju DSBova, zbog toga što su isti lokalizirani i na H3K4me3 obogaćenim mjestima u *PRDM9*$^{-/-}$ miševa (Brick i sur., 2012.) te zbog mogućeg uključivanja *CXXC1* proteina u funkciju *PRDM9*.

*Metilacija histona*

Metiliranje histona proces je kojim se metilne skupine prenose na AK proteina histona koji tvore nukleosome. Metilacija histona može ili povećati ili smanjiti transkripciju gena, ovisno tome koje su AK u histonima metilirane i koliko je metilnih skupina vezano. Metilacijski procesi koji oslabljuju kemijske veze između repova histona i DNA povećavaju transkripciju, jer omogućuju odmak DNA od nukleosoma, tako da transkripcijski proteini i RNA mogu imati pristup DNA. Ovaj proces ključan je za regulaciju ekspresije gena, omogućujući različitim stanicama ekspresirati različite gene.

Kao što je već ranije rečeno, temeljna jedinica kromatina, nukleosom, sadrži DNA namotanu oko oktamera histona koji se sastoji od po dvije molekule svakog od četiri histonska proteina H2A, H2B, H3 i H4. Svaki od navedenih ima produžetak ili ''rep'', a upravo su oni glavne mete modifikacija nastalih metilacijom. DNA aktivacija ili inaktivacija uvelike ovisi o specifičnom ostatku te stupnju metilacije metiliranog repa. Histoni mogu biti metilirani na lizinske (K) i argininske (R) ostatke, a metilacija se najčešće opaža na lizinskim ostacima repa histona H3 i H4. Uobičajena mjesta metilacije povezana sa aktivacijom gena uključuju H3K4, H3K8 i H3K79, a suprotno tomu, postoje i mjesta inaktivacije, poput npr. H3K9 te H3K27. Studije su pokazale da mjesta metilacije na histonskim ''repovima'' sa različitim (lizinskim ili argininskim) ostatkom služe kao marker za sklapanje različitih proteina te proteinskih kompleksa, regulirajući time aktivaciju ili inaktivaciju kromatina (Cooper i Hausman, 2010.).

Lizinski i argininski ostaci sadrže amino-skupine. Lizin se može mono-, di- ili tri-metilirati, čime će metilna skupina zamijeniti svaki vodik u lizinskoj NH3+ grupi. Suprotno tomu, arginin može biti samo mono- ili di-metiliran. Generalno, metilacija argininskih ostataka zahtijeva proteinski kompleks koji uključuje proteinsku argininsku metiltransferazu ili PRMT (engl. *protein arginine methyltransferase*), dok je to u slučaju lizina specifična histonska metiltransferaza ili HMT (engl. *histone methyltransferase*) koja, kao što je već ranije rečeno, obično sadržava evolucijski očuvanu SET domenu (poput *PRDM9*) (Cooper i Hausman, 2010.).

Ukratko, bez metilacije histona ne bi bio moguć nastanak rekombinacijskih DSBova, pošto je ovaj proces proces potreban za odmatanje kromatina namotanog oko nukleosoma. Nakon vezanja *PRDM9* gena za rekombinacijski hotspot na DNA, *PRDM9* metiltransferaze trimetiliraju okolne histone kako bi se uz vezanje drugih proteina (*SPO11* i drugih) omogućio nastanak DSBa.

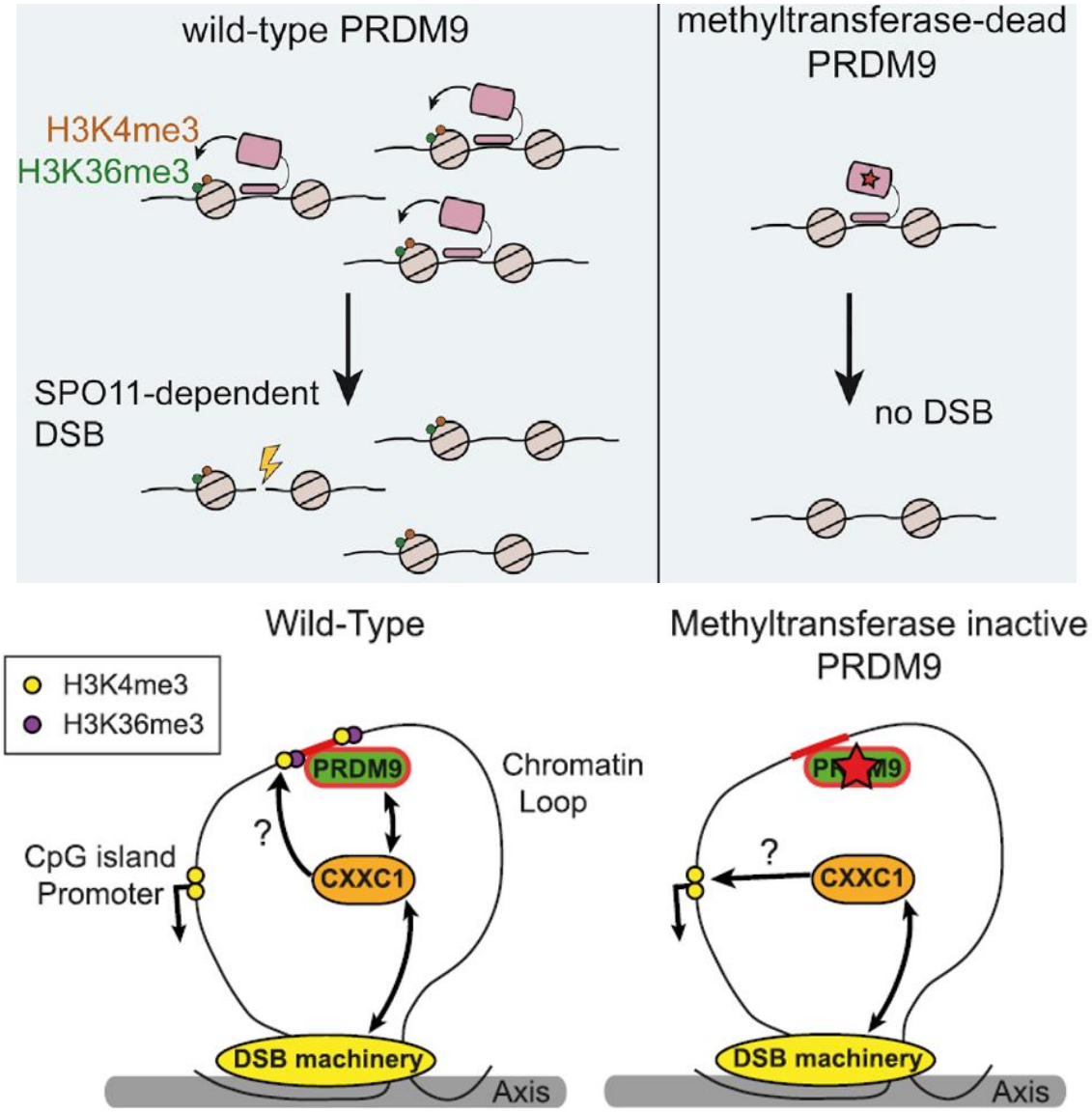
*CXXC1 gen*

*CXXC1* gen naziv je za CG (citozin i gvanin) vezajući protein još poznat pod nazivom *CXXC*-ZF protein 1 (engl. *CXXC-type zinc finger protein 1*) ili PHD prst i *CXXC* domena koja sadrži protein 1 (engl. *PHD finger and CXXC domain – containing protein 1*), zbog toga što sadrži i PHD prst (engl. *PHD finger*). PHD prsti nađeni su u više od 100 proteina u ljudi, a dužine su oko 50-80 AK. Nekolicina navedenih nađeni su u jezgri te su uključeni u kromatinom posredovanu gensku regulaciju (Boubou i sur., 2018.; Keeney, 2008.).

Proteini koji sadrže *CXXC* motiv unutar svoje domene, poput *CXXC1*, prepoznaju CG sekvence, odnosno sekvence citozina i gvanina unutar DNA te reguliraju gensku ekspresiju (Fujino i sur., 2000.; Voo i sur., 2000.). Regije koje sadrže dugačke nizove uzastopnih CG nukleotida nazivaju se CG otocima (engl. *CG islands*).

*CXXC1* komponenta je SETD1A i SETD1B H3K4 metiltransferaznih kompleksa u sisavaca, a može povezivati navedene komplekse sa nemetiliranim CG otocima putem ZF domene; te sa H3K4me3 mjestima putem PHD1 prsta. Smatra se da je protein Spp1, ortolog proteinu *CXXC1* u kvasaca, veza između samog mjesta DSBa te samog mehanizma istog, putem PHD prsta. Analogno tomu, *CXXC1* može povezati *PRDM9* mjesta sa mehanizmima DSBa putem interakcije sa *PRDM9* H3K4me3 i drugim proteinima uključenima u ovaj proces (Imai i sur., 2017.; Parvanov i sur., 2017.; Boubou i sur., 2018.; Keeney, 2008.).

Uz gore navedeno, napravljene su studije koje su dokazale da nema razlike između *PRDM9* varijanti za H3K4 metilaciju, pri tome misleći na H3K4me3 aktivnost pri različitim genotipovima *PRDM9* (divljim tipom, križancima te onima koji ne posjeduju *PRDM9*). Svi navedeni genotipovi u studijama na miševima pokazali su sličan broj *PRDM9* ovisnih DSB hotspotova, upravo zbog navedene sposobnosti metilacije (Boubou i sur., 2018.).




Slika 46: Gore: Pojednostavljeni prikaz razlike između *PRDM9* sa metiltransferaznom aktivnošću (lijevo) te istoga bez metiltransferazne aktivnosti (desno). U drugom slučaju vidljivo je da nije došlo do nastanka DSBa.
Dolje: Detaljniji prikaz gornje slike. Model uloge metiltransferazne aktivnosti *PRDM9* gena pomoću *CXXC1* posredovanog vezanja na hotspotove lokalizirane na DSB veznim mjestima. U divljeg tipa (lijevo) *PRDM9* veže se na DNA (crveno) te se H3K4me3 i H3K36me3 počinju odvijati, vršeći modifikacije na histonima i njihov prerazmještaj. Interakcija *CXXC1* sa *PRDM9* genom (te H3K4me3 *PRDM9*) promovira njegovu regrutaciju na *PRDM9* lokuse. Putem interakcije *CXXC1* i mehanizama DSBa, lokusi vezani na *PRDM9* dovode se u blizinu mehanizama DSBa, omogućavajući nastanak DSBa.
U slučaju metiltransferaznog inaktivnog *PRDM9* tipa (desno), sama interakcija *CXXC1* sa *PRDM9* nije dovoljna za regrutaciju na CG otoke i H3K4me3; te nema usmjerenja DSB mehanizama i formacije prema *PRDM9* lokusima. Interakcije *CXXC1* sa *PRDM9* lokusima (lijevo) te sa CG otocima (desno) još uvijek su samo hipoteze, te su zbog toga označene upitnicima.
Izvor: Boubou, et al., 2018.

## 2.8.4. ZF (*Zinc finger*) domena

Cinkove (*Zinc finger*) domene relativno su mali proteinski motivi koji sadrže multiple ispružene motive slične prstima koji stvaraju tandemske kontakte sa ciljanom molekulom. Neke od navedenih domena vežu cink, no većina umjesto toga veže neke druge molekule (poput npr. željeza). ZF prvotno su identificirani kao DNA – vezujući motivi za transkripcijeske faktore u jedne vrste afričke žabe (*Xenopus laevis*), no danas se zna da se vežu na DNA, RNA, proteine i/ili lipidne supstrate (Klug, 1999.; Hall, 2005.; Gamsjaeger i sur., 2007.).

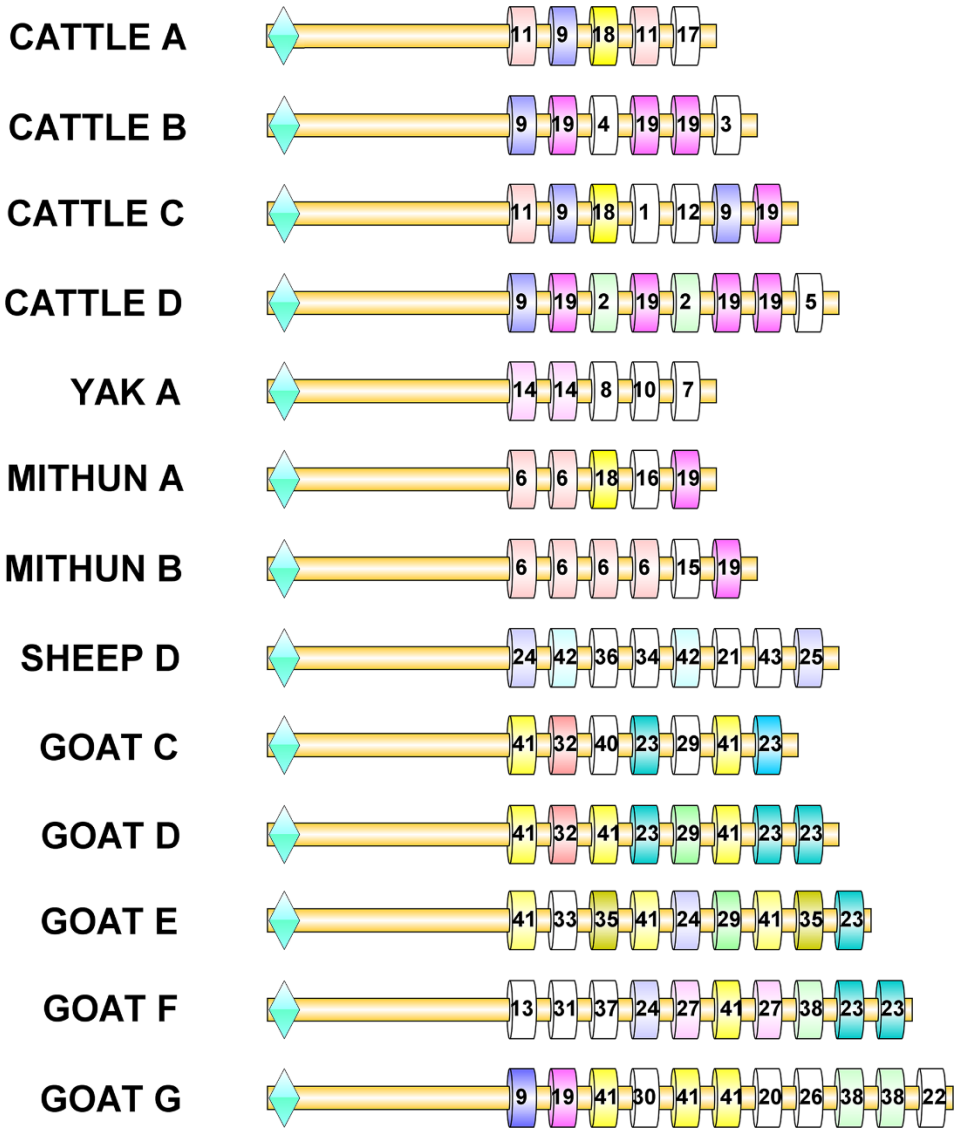
Svojstva povezivanja ZFa sa određenom sekvencom ovise o njihovom AK slijedu, njihovim strukturama te samom broju cinkovih ''prstiju'' unutar određene domene. ZF domene često se nalaze u klasterima (engl. *clusters*) u kojima "prsti" mogu imati različite specifičnosti vezanja. ZF motivi pojavljuju se u nekoliko nepovezanih proteinskih grupa, varirajući strukturom i slijedom sekvenci. Navedeni motivi pokazuju znatnu svestranost u načinu povezivanja za supstrate, čak i između članova iste porodice ZFa (neki se vežu na DNA, a neki na proteine), ukazujući time na to da su ZF motivi stabilne forme koje su se specijalizirale za različite funkcije. Primjerice, proteini koji sadrže ZF sudjeluju u genskoj transkripciji, translaciji, organizaciji citoskeleta, razvoju epitela, staničnoj adheziji te modifikacijima kromatina, što je samo nekolicina od brojnih ostalih funkcija koje imaju.
Kao što je već ranije rečeno, ZF motivi stabilne su strukture te nije uobičajeno da prolaze konformacijske promjene radi vezanja na ciljni supstrat (Laity, Lee i Wright, 2001.; Hall, 2005.).

*Varijabilnost i evolucija ZF domene*

Možda najfascinantnija značajka *PRDM9* upravo je ZF domena koja posjeduje minisatelitima-sličnu genomsku strukturu te je kodirana unutar jednog eksona. Svaki ZF se, s gotovo savršenom homologijom (Baudat i sur., 2010.) tandemski ponavlja na kako proteinskoj tako i DNA razini.

Svaki trinukleotid ZFa u sekvenci veže se na ciljanu molekulu DNA, lokalizirajući time rekombinacijske hotspotove (Neale, 2010.). Uočena je velika varijabilnost broja kodiranih ZFa u *PRDM9*, ne samo u različitih vrsta već i unutar jedne vrste. Navedena varijabilnost *PRDM9* ZFa stoga može mijenjati lokacije to jest položaje rekombinacijskih hotspotova unutar genoma. Rekombinacijski hotspotovi rijetko su očuvani čak i između usko srodnih vrsta, poput na primjer čimpanze i čovjeka, usprkos gotovo 99% sličnosti (Winckler i sur., 2005.). Također je utvrđeno da je *PRDM9* ZF najdivergentniji od svih ortolognih parova ZF proteina u čovjeka i čimpanze te zbog toga i aktivira različite rekombinacijske hotspotove u te dvije vrste (Myers i sur., 2010.). Nadalje, u okviru evolucije, otkriveno je da *PRDM9* ZF domena evoluira putem pozitivne selekcije u mnogih vrsta, osobito u mjesta uključenih u sposobnost povezivanja sa DNA (Oliver i sur., 2009.).

Ostaci na mjestima -1, 2, 3 i 6 svakog ZFa određuju specifičnost povezivanja sa DNA te je otkriveno da su isti rezultat pozitivne selekcije u čovjeka (Thomas, Emerson i Shendure, 2009.), čimpanze (Groeneveld i sur, 2012.), konja (Steiner i Ryder, 2013.) i miševa (Buard i sur., 2014.; Kono i sur., 2014.).
Interesantno, *PRDM9* gen odsutan je u nekih vrsta životinja poput ptica, vodozemaca i kukaca, a prisutan ali ne-funkcionalan u vrsta poput oposuma, nematoda i pasa. Novija istraživanja ukazuju na to da plaštenjaci (*Tunicata*) te neke vrste riba koštunjača poput zrakoperki (engl. *ray-finned fish*) posjeduju *PRDM9* gen, ali bez znakova pozitivne selekcije i/ili usklađene evolucije. Više o brzoj evoluciji *PRDM9* ZF domene te različitostima između i unutar vrsta biti će rečeno u kasnijim poglavljima (Oliver i sur., 2009.; Ahlawat i sur., 2016.).



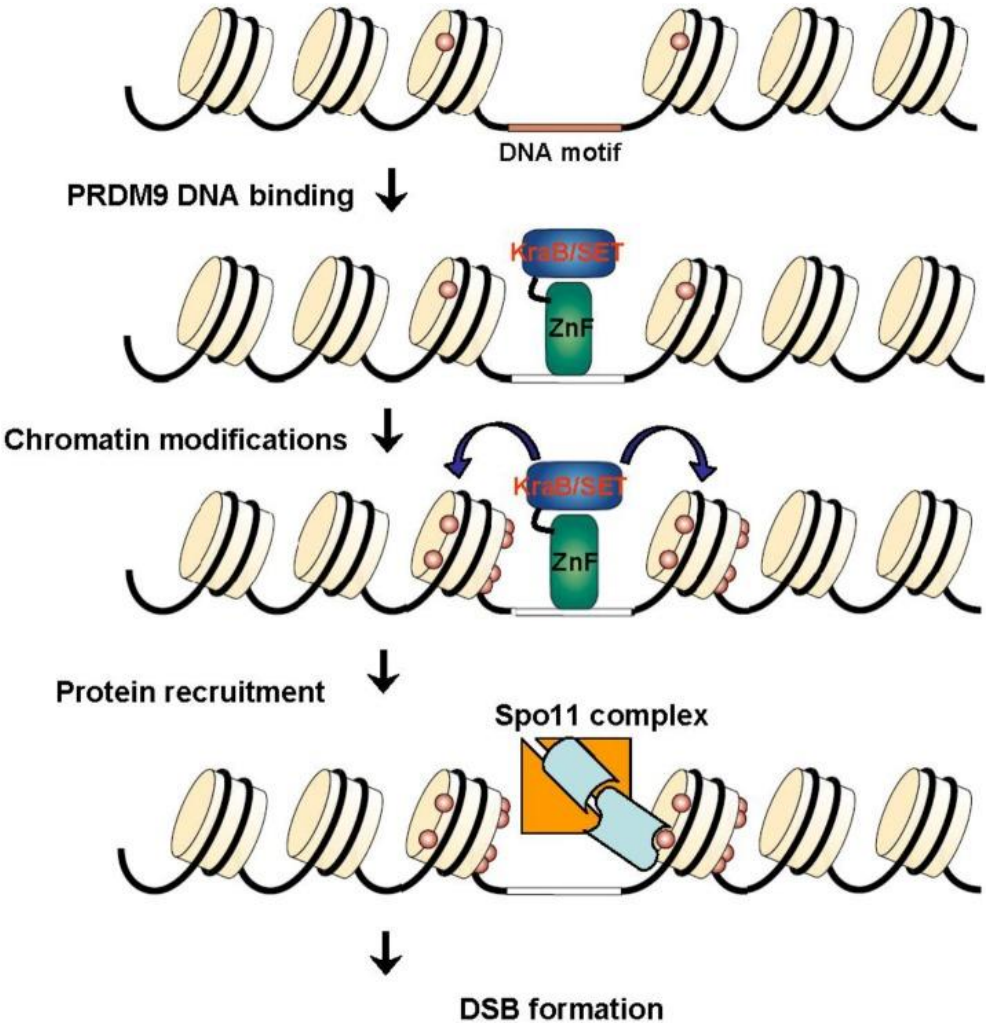

Slika 47: Prikaz varijabilnosti ZF domene u različitih vrsta ruminanta. Različita ponavljanja alela na ZF domeni ukazuju na veliku varijabilnost čak i unutar vrsta. Prvi ZF (plavi romb lijevo) je očuvan i jednak u svih prikazanih vrsta.

Izvor: Ahlawat i sur., 2016.

## 2.9. Mehanizam rada *PRDM9* gena

Rekombinacija započinje kada C-terminalni kraj ZF domene *PRDM9* proteina prepozna te se veže za specifičnu DNA sekvencu na hotspotu (slika 46, različiti hotspot motivi). PR/SET domena tad lokalno trimetilira H3K4 što rezultira razmještajem lokalnog kromatina, odnosno lokalnih nukleosoma, stvarajući centralnu regiju bez nukleosoma, što je zapravo nastanak DSBa potrebnog za razmjenu DNA između homologa (CO), uz uključivanje *CXXC1* (koji može povezati *PRDM9* mjesta sa mehanizmima DSBa putem interakcije sa *PRDM9* H3K4me3 i drugim proteinima).

Nakon selekcije i aktivacije hotspotova ili mjesta rekombinacije, mejotski DSBovi nastaju pod utjecajem *SPO11* i ostalih proteina. O daljnjem procesu popravaka dvolančanih lomova koji nastaju ovim procesom, biti će više riječi u idućem poglavlju.




Slika 48: Shematski prikaz rada *PRDM9* gena. *PRDM9* se ZF domenom veže na određeni hotspot motiv, nakon čega PR/SET domene trimetiliraju histone i vrše kromatinske modifikacije. Zatim dolazi do vezanja proteina potrebnih za nastanak DSBa (*SPO11*) do čega na kraju i dolazi.

Izvor: Kumar i Massy, 2010.

## 2.10. DSB popravci (popravci dvolančanih lomova)

Dvolančani su lomovi iznimno opasan oblik oštenja DNA zbog toga što je kontinuitet molekula DNA narušen prekidima (lomovima) u oba lanca. S obzirom na to da DSBovi djeluju na oba lanca DNA (kao što im i samo ime govori), oni se ne mogu popraviti mehanizmima koji zahtijevaju sintezu DNA preko oštećenog mjesta, već se popravljaju zasebnim mehanizmom, rekombinacijskim popravkom (Cooper i Hausman, 2010.).
Postoje tri mehanizma popravka DSBa: nehomologno spajanje krajeva (*non-homologous end joining, NHEJ*), mikrohomologijom posredovano spajanje krajeva (*microhomology-mediated end joining, MMEJ*) te homologna rekombinacija (Sung i Klein, 2006.) ; o kojoj će biti riječi u daljnjem tekstu.

Rekombinacija s homolognim slijedovima DNA na neoštećenom kromosomu jedan je od mehanizama popravka DSBa i obnove normalnog slijeda DNA, a precizna replikacija i popravak oštećenja nužni su za održanje genetske informacije te osiguranje njezina točnog prijenosa s roditelja na potomstvo. Kao što je spomenuto u prethodnom tekstu, rekombinacija je važan mehanizam za popravak oštećene DNA, a uz to, ključna je za stvaranje genetske raznolikosti, osobito važne s evolucijskog gledišta (Cooper i Hausman, 2010.; Sung i Klein, 2006.).

Genetske raznolikosti među jedinkama pružaju osnovni startni materijal prirodne selekcije koji omogućuje vrstama da evoluiraju i prilagode se promjenjivim uvjetima okoliša. Rekombinacija ima središnju ulogu u tom procesu jer omogućuje genima da se preslože u različite kombinacije, kao u slučaju COa, koji rezultira izmjenom genetskog materijala u sparenim homolognim kromosomima za vrijeme mejoze I.
Nadalje, rekombinacija je uključena u preslagivanje specifičnih slijedova DNA koji mijenjaju ekspresiju i funkciju nekih gena tijekom razvoja i diferencijacije. Možemo zaključiti da rekombinacija igra važnu ulogu u životu pojedinačnih stanica i organizama, pridonoseći pritom genetskoj raznolikosti vrsta.

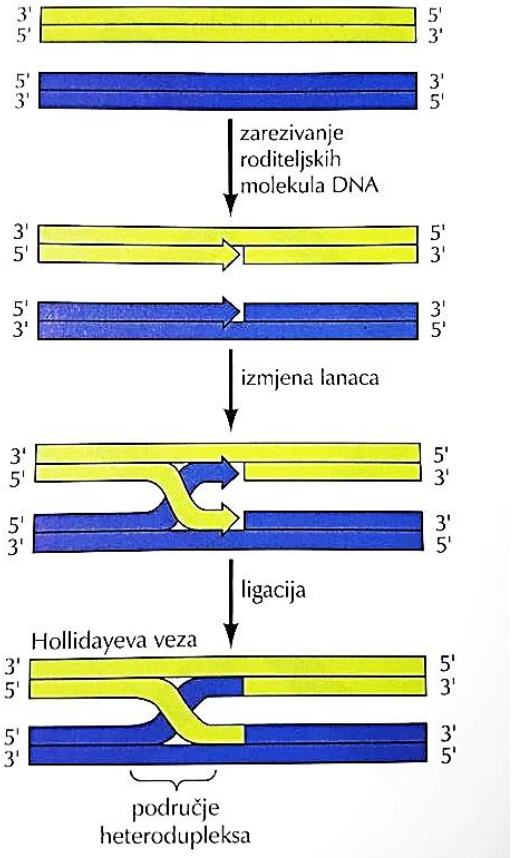
Rekombinacija je rezultat cijepanja i ponovnog spajanja dviju roditeljskih molekula DNA što dovodi do preraspodjele genetske informacije istih. Tijekom homologne rekombinacije navedeni se proces događa bez neke druge (npr. mutacija) promjene genetske informacije. Postavlja se ključno pitanje: kako dvije roditeljske molekule DNA mogu biti prekinute točno na istom mjestu tako da se mogu ponovno spojiti, a da pritom ne dođe do mutacija zbog delecija, odnosno adicija nukleotida na mjestu loma?

Za vrijeme rekombinacije homologa njihovo poravnavanje omogućeno je sparivanjem baza komplementarnih lanaca DNA te stvaranjem sinapse između homologa. Preklapajući jednolančani krajevi izmjenjuju se između homologa dovodeći do stvaranja heterodupleksa u kojem dva lanca rekombinantne dvolančane uzvojnice potječu od različitih roditelja (Slika 49). Kada se molekule DNA heterodupleksa genetski razlikuju, molekula DNA koja nastaje sadrži dva različita genetska biljega (Cooper i Hausman, 2010.; Lilley, 2000.). Pojednostavljeno, heterodupleks je naziv za područje na homolozima unutar kojeg se nalazi rekombinatorna DNA, to jest područje u kojem je došlo do izmjene genetskog materijala.

Proučavanje rekombinacije u gljiva i bakterija 1964. godine dovodi do razvoja molekularnog modela rekombinacije, nazvanog Hollidayev model (engl. *Holliday junction model*; prema znanstveniku Robertu Hollidayu). Premda modificiran stjecanjem novih spoznaja, ovaj model nastavlja pružati osnovu za današnje poimanje mehanizama rekombinacije (Hartel i Jones, 2009.; Liu i West, 2004.; Helleday, 2007.).

Izvorna verzija Hollidayeva modela predlaže početak rekombinacije uvođenjem ureza (engl. *nick*) u istom mjestu na oba homologa. Zarezani lanci DNA se tada djelomično razmotaju te svaki zalazi u molekulu onoga drugoga, na taj način da se spari s komplementarnim neprekinutim lancem. Spajanje tih prekinutih lanaca zatim stvara ukriženje poznato kao Hollidayev čvor ili Hollidayeva veza (engl. *Holliday junction*), predstavljajući time glavni međuprodukt rekombinacije (Cooper i Hausman, 2010.).

Izravni prikaz Hollidayeva čvora dobiven elektronskim mikroskopom dao je jasnu potporu ovom modelu rekombinacije, a jednom stvoren, isti može biti razriješen na više različitih načina, o koji će biti spomenuti u daljnjem tekstu.

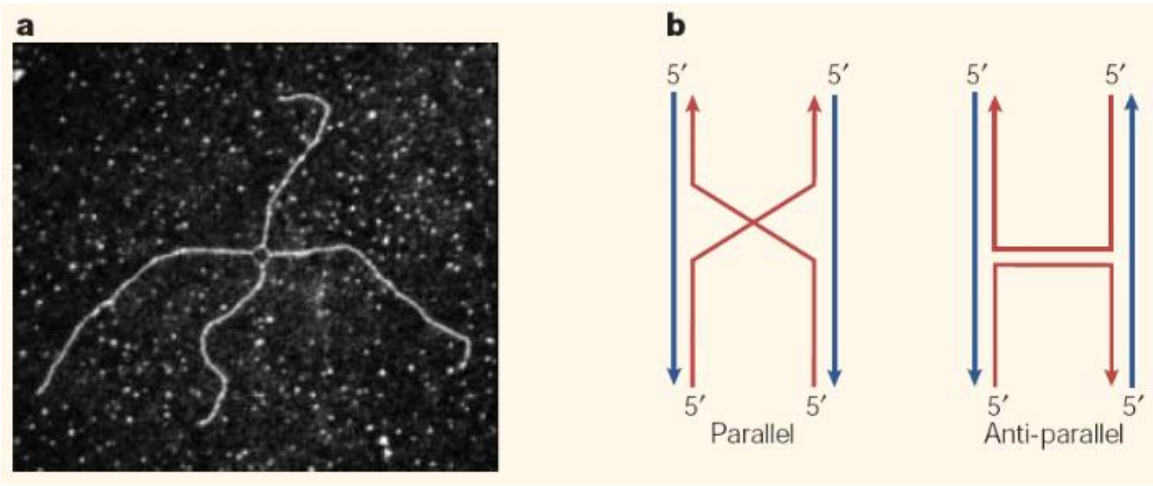



Slika 49: Hollidayev model homologne rekombinacije sa prikazom područja heterodupleksa. Jednolančani urezi uvedeni su na istim mjestima obiju roditeljskih molekula, a nakon toga dolazi do izmjene zarezanih lanaca komplementarnim sparivanjem baza te se ligacijom stvara ukriženje nazvano Hollidayev čvor.
Izvor: Cooper i Hausman, 2010.

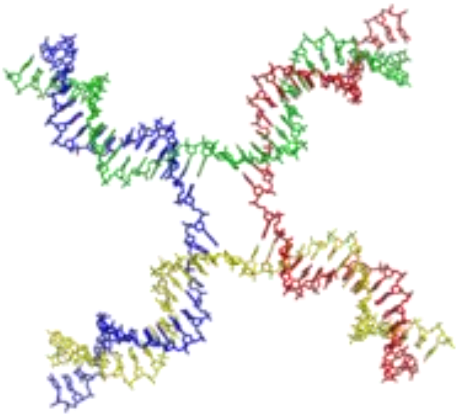
Ovisno o orijentaciji, Hollidayev čvor stvara dva različita izomera (Slika 54), što je bitno zbog načina razrješenja istih. Postoje dva primarna modela razrješenja Hollidayevog čvora (Sung i Klein, 2006.), od kojih jedan rezultira crossing overom, a drugi ne; a oba modela dijele prvih nekoliko koraka. Nadalje, oba modela mogu i ne moraju rezultirati crossing overom, samo što je u prvom slučaju vjerojatnije da će doći do COa, dok je u drugom slučaju upravo suprotno.

Oba lanca DNA na mjestu inicijacije (*initiation site*, gdje nastaje DSB) prvo se razgrade djelovanjem nukleaze koja razgrađuje DNA u 5’- 3’ smjeru stvarajući jednolančane krajeve,

koji zatim zalaze u drugu roditeljsku molekulu pri čemu dolazi do sparivanja komplementarnih baza. Pukotine se zatim popunjavaju DNA polimerazom, a lanci spajaju ligacijom stvarajući Hollidayev čvor (Cooper i Hausman, 2010.; Helleday, 2007.).




Slika 50: A: Hollidayev čvor prikazan elektronskim mikroskopom. B: Dvije moguće konfiguracije Hollidayeva čvora, sa DNA paralelne (lijevo) ili antiparalelne (desno) konfiguracije.
Izvor: https://www.nature.com/scitable/content/structure-of-the-holliday-junction-24458

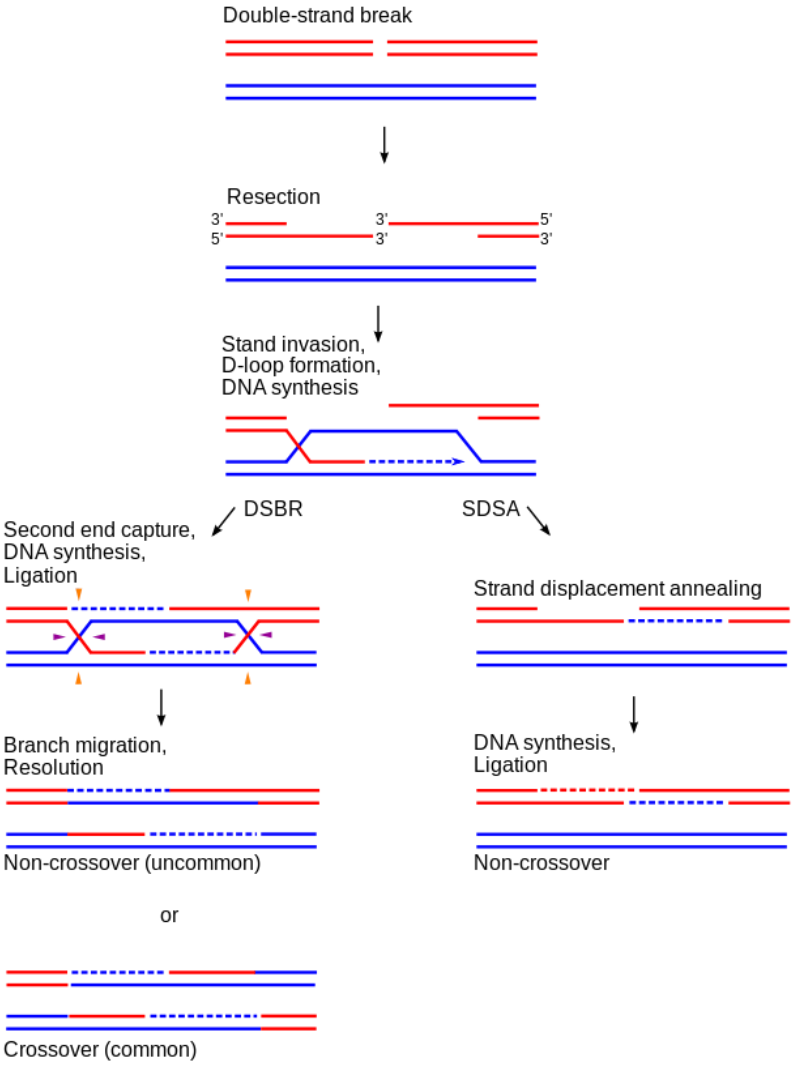


Slika 51: Molekularni prikaz strukture Hollidayevog čvora.
Izvor: https://en.wikipedia.org/wiki/Holliday_junction#/media/File:Holliday_junction_.png

DSBR (engl. *double strand break repair*) model je dvolančanog popravka koji najčešće rezultira crossing overom između homologa te se danas uzima kao primarni model homologne rekombinacije tijekom mejoze. Hoće li DSBR rezultirati crossing overom ili ne određeno je razrješenjem Hollidayevog čvora. Ako dođe do rotacija molekula Hollidayevog čvora, stvara se izomer sa ukriženim roditeljskim neprekinutim lancima, a ne onima inicijalno zarezanima. Kidanje i prespajanje ukriženih lanaca tih izomera daje rekombinantne lance, tj. rezultira kromosomalnim crossing overom (Slike 53 i 54) (Alberts i sur., 2002.; Cooper i Hausman, 2010.; Sung i Klein, 2006.).

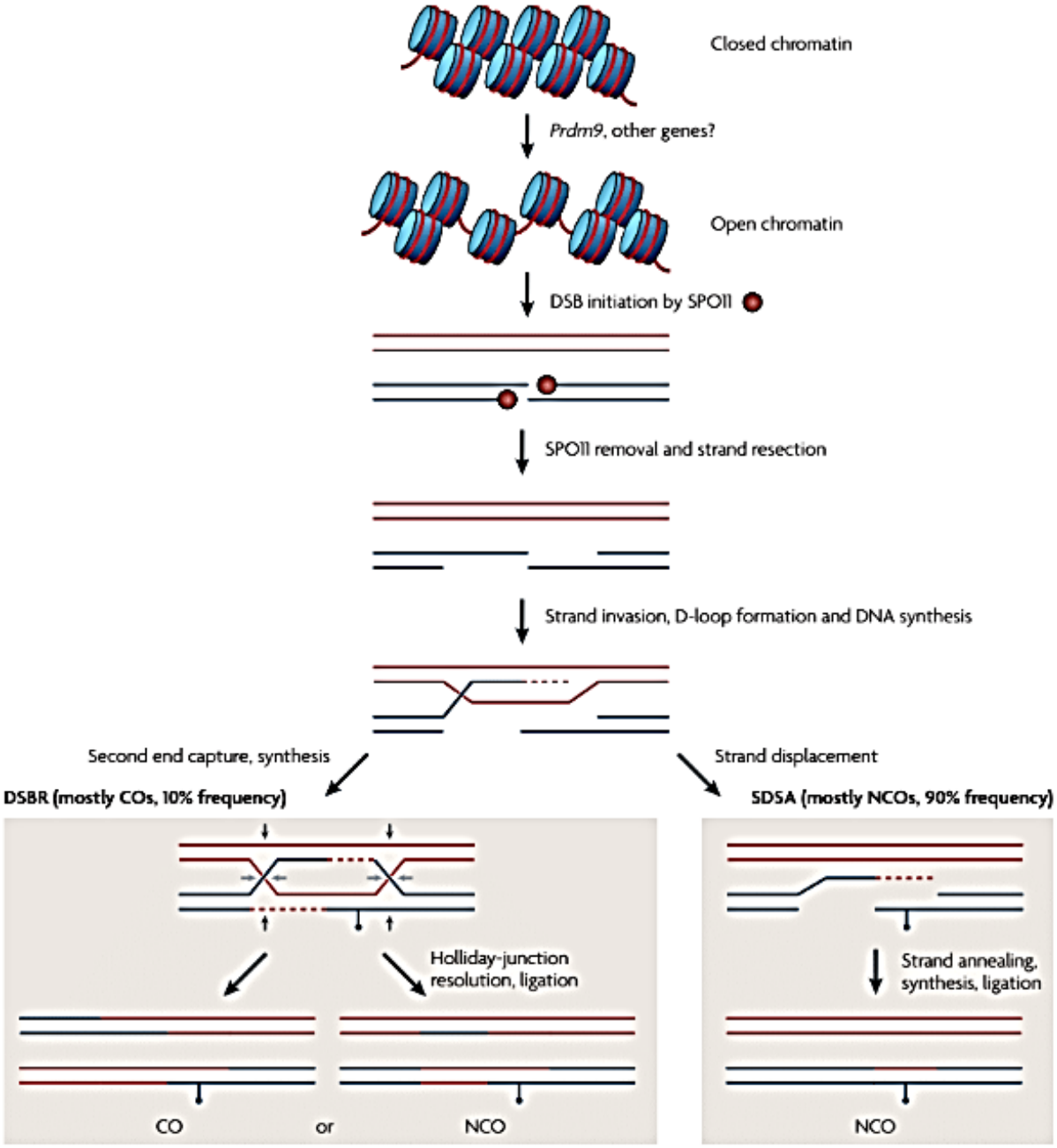
SDSA (engl. *synthesis-dependent strand annealing*) poravnavanje je lanaca ovisno o sintezi DNA, a navedeni model DSB popravka pojavljuje se u mejozi, ali i mitozi, zbog toga što

ne rezultira crossing overom. Štoviše, SDSA jedan je od ključnih modela homologne rekombinacije za popravak DSBa u mitozi (Andersen i Sekelsky, 2010.). U ovom modelu, Hollidayeva veza razrješuje se kidanjem i prespajanjem ukriženih lanaca. Lanci koji zalaze u drugu roditeljsku molekulu (pri čemu dolazi do sparivanja komplementarnih baza) produžuju se djelovanjem DNA polimeraze te se događa samo popravak DSBa, bez rotacije i ukriženja neprekinutih lanaca. Nakon poravnavanja, može se dogoditi da mali dio lanca jednog homologa ostane na drugom i obrnuto, no takva preklapanja uklanja DNA ligaza, skupa sa svim preostalim prazninama u lancima (*single-stranded gaps*) (Andersen i Sekelsky, 2010.; Cooper i Hausman, 2010.).

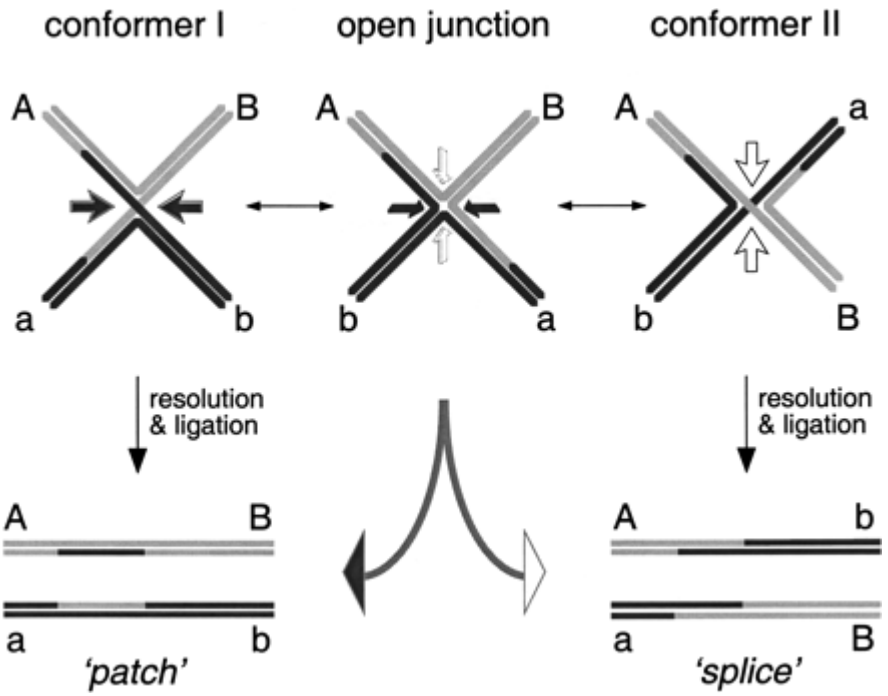



Slika 52: Prikaz DSBR i SDSA modela. Lijevo je prikazano razrješenje Hollidayeva čvora DSBRom koji najčešće rezultira crossing overom. Desno je prikazan SDSA model razrješenja Hollidayeva čvora, češći u mitozi, koji ne rezultira crossing overom.

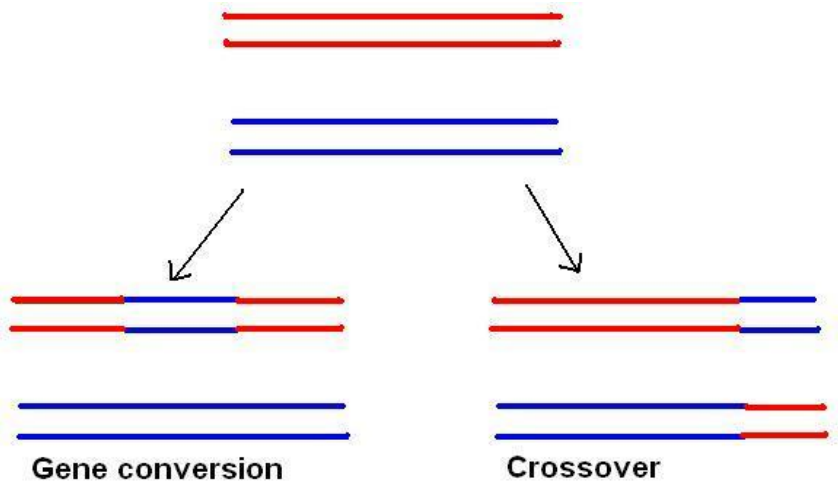
Izvor: https://en.wikipedia.org/wiki/Homologous_recombination#/media/File:HR_schematic_diagram.svg




Slika 53: Još jedan shematski prikaz DSB popravka.
Izvor: Paigen, K., i Petkov, P., 2010.




Slika 54: Prikaz dvaju različitih izomera Hollidayeva čvora te njihovih razrješenja, koja ukazuju na SDSA (lijevo) i DSBR (desno). Ovisno o orijentaciji i konformaciji CO može izostati (lijevo) ili se ipak dogoditi (desno).
Izvor: http://genesdev.cshlp.org/content/13/14/1861/F1.expansion.html




Slika 55: Prikaz razlike razrješenja SDSAom (lijevo) i DSBRom (desno). SDSA u većini slučajeva rezultira konverzijom gena i popravkom DSBa u kojem se oštećenja jednog homologa popravljaju komplementarnim slijedovima drugoga. Nakon poravnavanja, može se dogoditi da mali dio lanca jednog homologa ostane na drugom i obrnuto, no takva preklapanja se kasnije uklanjaju DNA ligazom. Suprotno s tim, DSBR će u većini slučajeva rezultirati COom kojim će doći do genetske rekombinacije između homologa.
Izvor: https://en.wikipedia.org/wiki/Chromosomal_crossover#/media/File:Conversion_and_crossover.jpg

Postoje još dva dodatna modela popravka DSBa, koje vrijedi navesti, ali nisu od velikog značaja za homolognu rekombinaciju u okviru razrješenja Hollidayeva čvora.

SSA model (engl. *single-strand annealing*) opisuje rekombinacijski homologni popravak DSBa između dviju ponavljajućih sekvenci te ne zahtijeva zasebne slične ili identične molekule DNA poput DSBRa ili SDSA. Umjesto toga, SSA model zahtijeva samo jedan DNA dupleks te koristi ponavljajuće sekvence potrebne za popravak. SSA model ne favorizira ispravnost popravka DSBa te se smatra mutagenim, zbog toga što rezultira delecijama genetskog materijala (Helleday i sur., 2007.).

BIR model (engl. *break-induced replication*) opisuje DSB popravak koji se ponekad javlja tijekom DNA replikacije u replikacijskoj viljušci tijekom odmotavanja DNA pomoću DNA helikaza. Takvi defekti popravljaju se BIR modelom homologne rekombinacije, no točni molekularni mehanizmi tog popravka do danas ostaju nejasni (McEachern i Haber, 2006.).

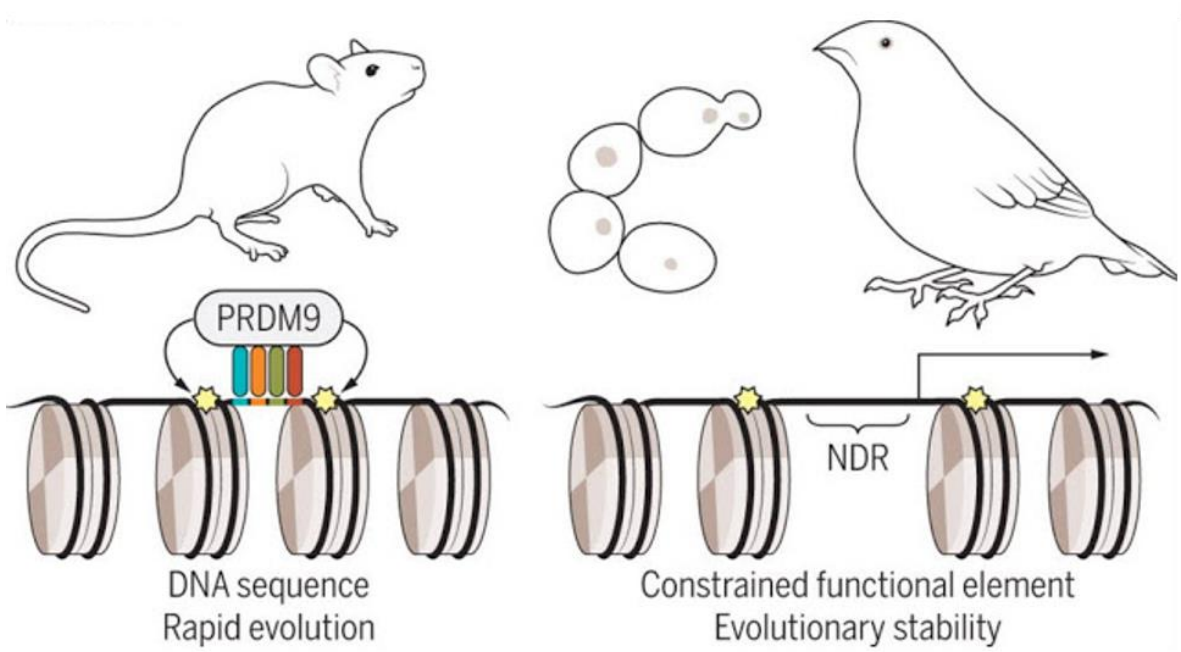
## 2.11. *PRDM9* neovisna rekombinacija

Unatoč tomu što je dokazano da *PRDM9* igra veliku ulogu u određivanju lokacije i daljnjem napretku rekombinacijskih hotspotova u brojnim vrstama sisavaca (čovjeku, primatima, miševima, glodavcima, ovcama, govedima, konjima, itd.), značajna iznimka ovom pravilu zamijećena je u obitelji kanida ili pasa (lat. *Canidae*) u koju spadaju psi, vukovi, kojoti te lisice, u kojih *PRDM9* postoji, ali samo kao pseudogen. Pseudogeni su segmenti DNA srodni pravim genima, ali su izgubili dio ili kompletnu funkcionalnost genske ekspresije ili sposobnosti kodiranja određenih proteina. Obično su rezultat nakupljanja višestrukih mutacija kroz generacije unutar gena čiji product nije potreban za opstanak organizma, no mogu biti i rezultatom jednokratnih mutacija poput delecija ili insercija.

Unatoč nedostatku *PRDM9*, psi posjeduju hotspotove sa stabilnim lokacijama kroz evoluciju, suprotno evolucijskoj eroziji hotspotova u sisavaca sa aktivnim *PRDM9* genom.
Pseći hotspotovi ne asociraju se sa H3K4 trimetilacijom DNA, već posjeduju CG-obogaćene regije u blizini mjesta početka transkripcije, sa preferencom za nemetilirane CG otoke. Ove karakteristike samo ojačavaju njihovu neovisnost o *PRDM9*. Psi se očito oslanjaju na alternativne puteve rekombinacije, koji uključuju rekombinacijske hotspotove no ne i *PRDM9*-ovisne mehanizme.

Nedavna otkrića sugeriraju da alternativni mehanizmi rekombinacije mogu postojati i u sisavaca sa aktivnim *PRDM9*, jer se u slučaju nedostatka ili oštećenja *PRDM9* mogu osloniti na navedene alternativne mehanizme. Jedno istraživanje identifiralo je žensku osobu homozigotnu na nul-mutaciju (engl. null mutation) u *PRDM9* genu (nefunkcionalan *PRDM9*) koja je unatoč tomu bila fertilna, sa troje zdrave djece.
U ptica je otkriveno da posjeduju rekombinacijske hotspotove, koji su obogaćeni određenim nukleotidima u blizini funkcionalnih genomskih elemenata. U istraživanju na zebama, otkriveno je da obje vrste dijele većinu hotspotova, kao što je slučaj u vrsta pasa, no nije slučaj u sisavaca poput čovjeka i miševa, a čini se da je njihova očuvanost ostala konstantna kroz desetke milijuna godina evolucije. Ova istraživanja sugeriraju da se u odsudstvu *PRDM9* gena rekombinacija oslanja na funkcionalne genomske elemente koji omogućavaju pristup genomu ograničavajući pritom brzu evoluciju hotspotova.

Proučavanje evolucije *PRDM9* u širem kontekstu sugerira da je način organizacije kromosoma prošao nekoliko velikih dopuna i dorada kroz povijest. Postoji velika razlika između organizama koji ne posjeduju rekombinacijske hotspotove u kojih DSB formacija slijedi sinapsu te nema potrebe za mejotskom rekombinacijom (npr. Drosophila i Caenorhabdis elegans) te organizama koji posjeduju hotspotove i u kojih dolazi do sinapse, formacije DSBa i mejotske rekombinacije između homologa (npr. kvasci, kralježnjaci).
U vrsta koje posjeduju hotspotove ali ne ovise o *PRDM9* (npr. kvasci, ptice, Arabidopsis), hotspotovi se pojavljuju na H3K4me3 mjestima otvorenog kromatina kao promotora tj. početnih mjesta rekombinacije. U organizama koji posjeduju hotspotove te aktivan *PRDM9* gen koji ih locira (npr. sisavci), hotspotovi su slučajno locirani unutar genoma i odvojeni od njegovih funkcionalnih dijelova.




Slika 56: Prikaz *PRDM9* ovisne rekombinacije u sisavaca (lijevo), dok je u kvasaca i ptica riječ o *PRDM9*-neovisnoj rekombinaciji (NDR, slika desno).
Izvor: http://science.sciencemag.org/content/350/6263/928

## 2.12. Brza evolucija *PRDM9*

U kontrastu sa ostalim domenama, *PRDM9* ZF domena pokazala se kao najbrže evolvirajuća kroz brojnih vrsta. Jedan od primjera je i usporedba *PRDM9* sekvenci te arhitekture domena dvije različite vrste, čovjeka te morskog crva (lat. *Lottia gigantea*), koje su se razdvojile prije oko 600 milijuna godina u životinjskom filogenetskom stablu. Između dvije navedene vrste, svaka domena pokazuje između 25% i 48% sličnosti sekvenci, ukazujući pritom na to da su se promjene unutar sekvenci dogodile polako u navedenom vremenskom okviru.

Varijacija brojnosti ZFa u *PRDM9* uočena je kroz filogeniju metazoa, sa 7-12 zinc fingera u glodavaca, pa do 9-15 u primata (Ponting, 2011.).
Ako govorimo o sličnostima *PRDM9* unutar vrsta, usporedba između *PRDM9* domena svih vrsta morskog crva pokazala je 85% sličnosti njihovih sekvenci, skoro pa duplo više od ranije navedene sličnosti između različitih vrsta (čovjeka i morskog crva). Sukladno tomu, kada se uspoređuju ljudske *PRDM9* ZF sekvence, njihova međusobna sličnost iznosi oko 86%. Zaključno s time, bilo koja dva ljudska *PRDM9* ZFa su sličnija jedan drugome nego isti u morskoga crva. Nadalje, znanstvenike je iznenadila činjenica da je otkriveno gotovo 100% sličnosti između parova ljudskih (i od čimpanzi) *PRDM9* ZFa u 19 od sveukupno 28 kodona; koji su bili skroz očuvani, bez insercija ili delecija. Ovakav velik broj identičnih nukleotida u ZFa istog gena u različitih jedinki iste vrste implicira da su te sekvence nedavno nastale, jer visoka stopa sličnosti u njima ukazuje na to da nije bilo dovoljno vremena da se bilo kakve substitucije u njima akumuliraju i manifestiraju.

Podjela vrsta životinja prema tome sadrže li ili ne (brzo evolvirajuć) *PRDM9* gen može se razdvojiti na tri predvidljive grupe. Vrste poput primata i glodavaca posjeduju kratko-živuće

rekombinacijske hotspotove predviđene su da imaju genome koji sadrže jedan ili više *PRDM9* gena koji kodiraju niz brzo-evolvirajućih ZFa. U drugu grupu spadaju vrste sa kontinuiranim rekombinacijskim hotspotovima za koje se smatra da imaju genome koji sadrže *PRDM9* gene svoje pune duljine, ali će isti kodirati sporije evolvirajuće ZFe.
Posljednja grupa opisuje vrste koje ili ne posjeduju rekombinacijske hotspotove ili; ako ih posjeduju, su isti ciljani drugim DNA-vezujućim faktorima. To ukazuje na to da u tu grupu spadaju organizmi u kojih je *PRDM9* (pa tako i njegova ZF domena), potpuno odsutan (Ponting, 2011.).

Daljnji dokazi za nedavnu brzu evoluciju *PRDM9* potekla je iz resekvenciranja istoga u čovjeka. Alelna kompozicija *PRDM9* uvelike varira u ljudskih populacija (Berg i sur., 2010.; Parvanov, Petkov i Paigen, 2010.; Berg i sur., 2011.; Fledel-Alon i sur., 2011.). Jedna studija pokazala je da su dva *PRDM9* alela (A i B) postojani u 95% od 105 nesrodnih individualaca europskog podrijetla, a navedena dva alela sadrže identičan broj ZFa. Ipak, rijetki *PRDM9* aleli u ljudi afričkog i europskog podrijetla sekvencirani u jednoj drugoj studiji pokazali su iznenađujuću varijaciju, sadržavajući između 8 i 18 ZFa na C-terminalnom kraju *PRDM9* ZF domene. Afričke populacije imaju oko 50% alela A te 13% alela C, sa širokim spektrom manjih alela, dok su ne-afričke populacije vizualno monomorfne sa oko 90% alela A i B (većinom A) (Berg i sur., 2011.) koji se jedino razlikuju u substitucijama serina/treonina, no one nemaju utjecaja na specifičnost vezivanja.
Neandertalski i Denisovijanski uzorci imaju *PRDM9* alele blisko povezane sa prvim rijetkim modernim alelima limitiranima samo na afričke populacije. Ostali primati su visoko divergentni (Schwartz i sur., 2014.; Hinch i sur., 2011.), sa ekstenzivnim varijacijama u aminokiselinskom sastavu koji određuju DNA-vezujuću specifičnost (Schwartz i sur., 2014.). Uzevši u obzir ekstremnu varijabilnost unutar *PRDM9* ZF domene, moguće je da je velik dio alela različitih kombinacija ZF sekvenci još ostao neotkriven u čovjeka.

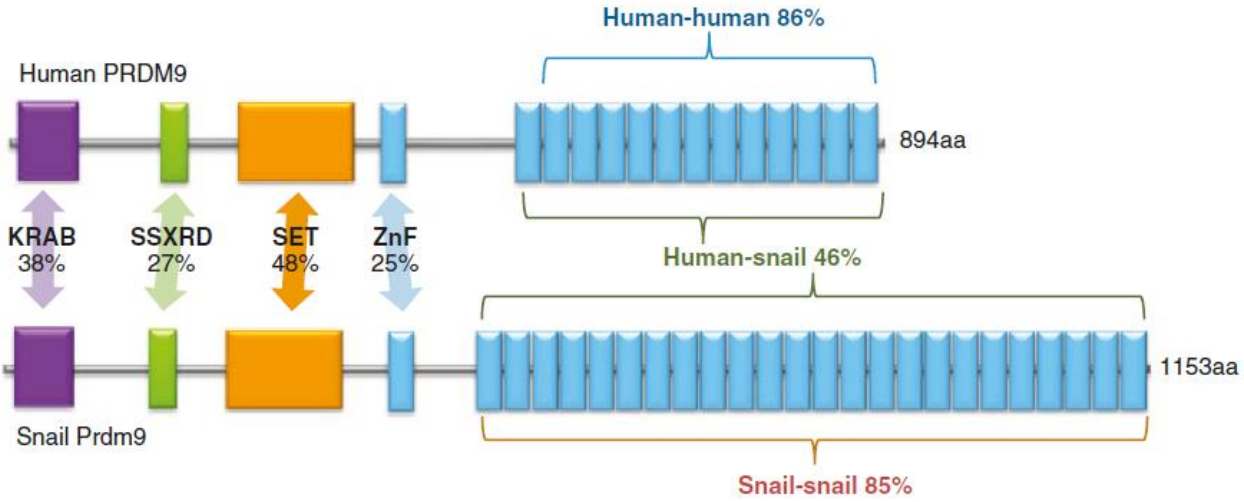
Novija istraživanja evolucije *PRDM9* iskoristila su uznimnu divergentnost *PRDM9* ZF domene nastale kao posljedicom potrebe za specifikacijom lokacija hotspotova tijekom evolucijske povijesti. Sve vrste čiji *PRDM9* ima aktivnu funckiju u rekombinaciji unutar istog u pravilu moraju posjedovati četiri funkcionalne domene: KRAB, SSXRD, PR/SET te ZF domenu (Baker i sur., 2017.; Latrille, Duret i Lartillot, 2017.). Nedostatak bilo koje od navedenih domena uzrokuje nemogućnost rekombinacijske funkcije, sugerirajući time da je svaka od domena od esencijalne važnosti.

Normalna struktura *PRDM9* sa visokom stopom ZF polimorfizama prisutna je i u modernih potomaka besčeljušnjača (lat. *Agnatha*, engl. *Jawless fish*), danas najprimitivnijih kralježnjaka. Nadalje, pristuna je i u nekih riba koštunjača (lat. *Osteichthyes*, engl. *Bony fish*), kornjača (lat. *Testudines*), zmija (lat. *Serpentes*), guštera (lat. *Lacertilia*), latimerija (lat. *Coelacanthiformes*) te u gotovo svih sisavaca sa izuzetkom pasa (lat. *Canidae*).
Navedena ipak, nije bila uočena u vodozemaca (lat. *Amphibia*), ptica (lat. *Aves*) te nekih gmazova.

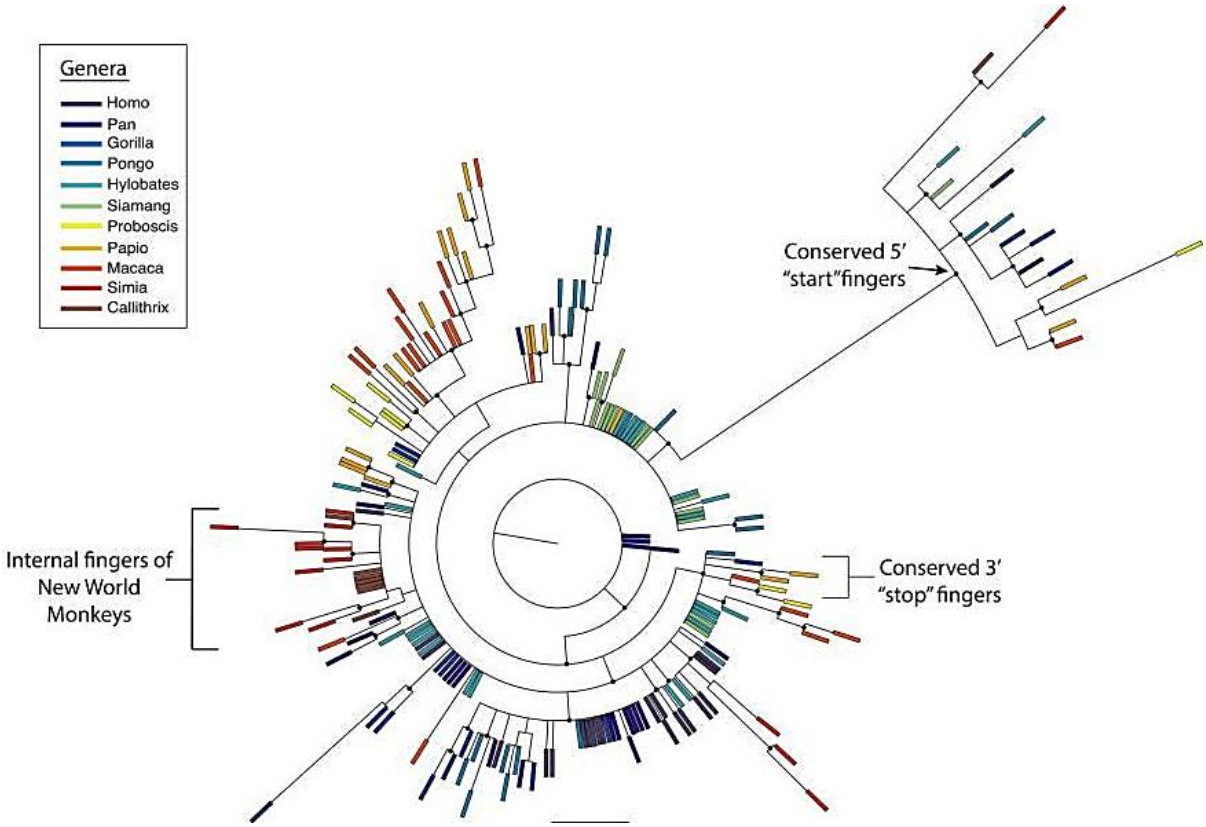
Ako je rekombinacijski aktivan *PRDM9* zaista bio prisutan u naših najprimitivnijih predaka kralježnjaka, njegova prisutnost u njihovom evolucijskom stablu ukazuje na naizmjeničan gubitak/dobitak njegove funkcije u rekombinaciji u više navrata tijekom evolucije. Jedan od primjera za to su gubitci/dobitci PRDM7 gena u primata, sa 3 substitucije AK u PR/SET domeni, od kojih jedna skoro pa uništava sposobnost metiliranja H3K4 i H3K36 skupa sa gubitkom većine ZFa. Drugi primjer za to su avetnjaci (lat. *Tarsiidae*) koji posjeduju 2 *frameshift* mutacije od kojih jedna poništava drugu da regenerira aktivnu sekvencu. U preživača (engl. *ruminants*) višestruke duplikacije gena uzrokovale su nastanak nekoliko

paraloga *PRDM9*, od kojih se najmanje dva javljaju kao rekombinacijski aktivni (Ahlawat i sur., 2016.; Ahlawat i sur., 2017.; Padhi i sur., 2017.).

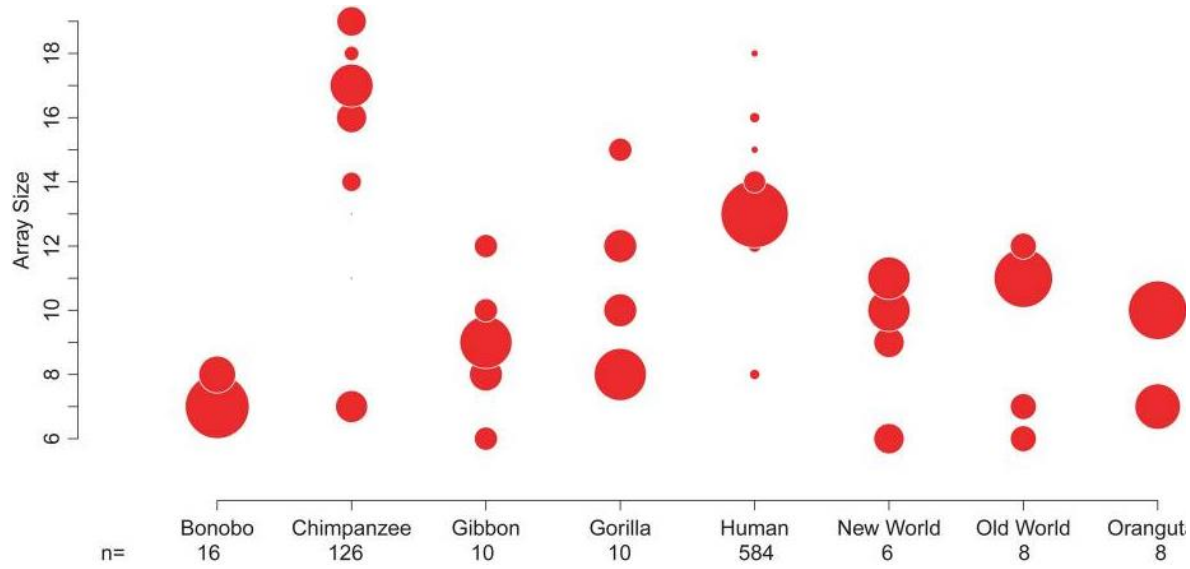
Još jedan izvanredan slučaj horizontalnog transfera gena primjećen je u malarijskom parazitu *Plasmodium berghei* koji posjeduje jedan ZF protein (PbZfp) kojem nedostaje PR/SET domena, ali je unatoč tome potreban za metilaciju histona H3 na K4, K27 i K36, pod pretpostavkom da stvara kompleks sa nekom drugom histonskom metiltransferazom.
Miševi inficirani parazitima koji nose knockout gen (engl. *knockout gene*) PbZfp preživljavaju duže od kontrolnih te pokazuju uvelike reduciranu infektivnost putem komarca. Paraziti sa nedostatkom PbZfp gena također su imali smanjenu sposobnost proizvodnje plazmodijskih oocista, implicirajući time ulogu u genetskoj rekombinaciji te mogućnost da je *PRDM9* u sisavaca poslužio kao uzorak i izvor ovog gena (Gopalakrishnana i sur., 2017.).



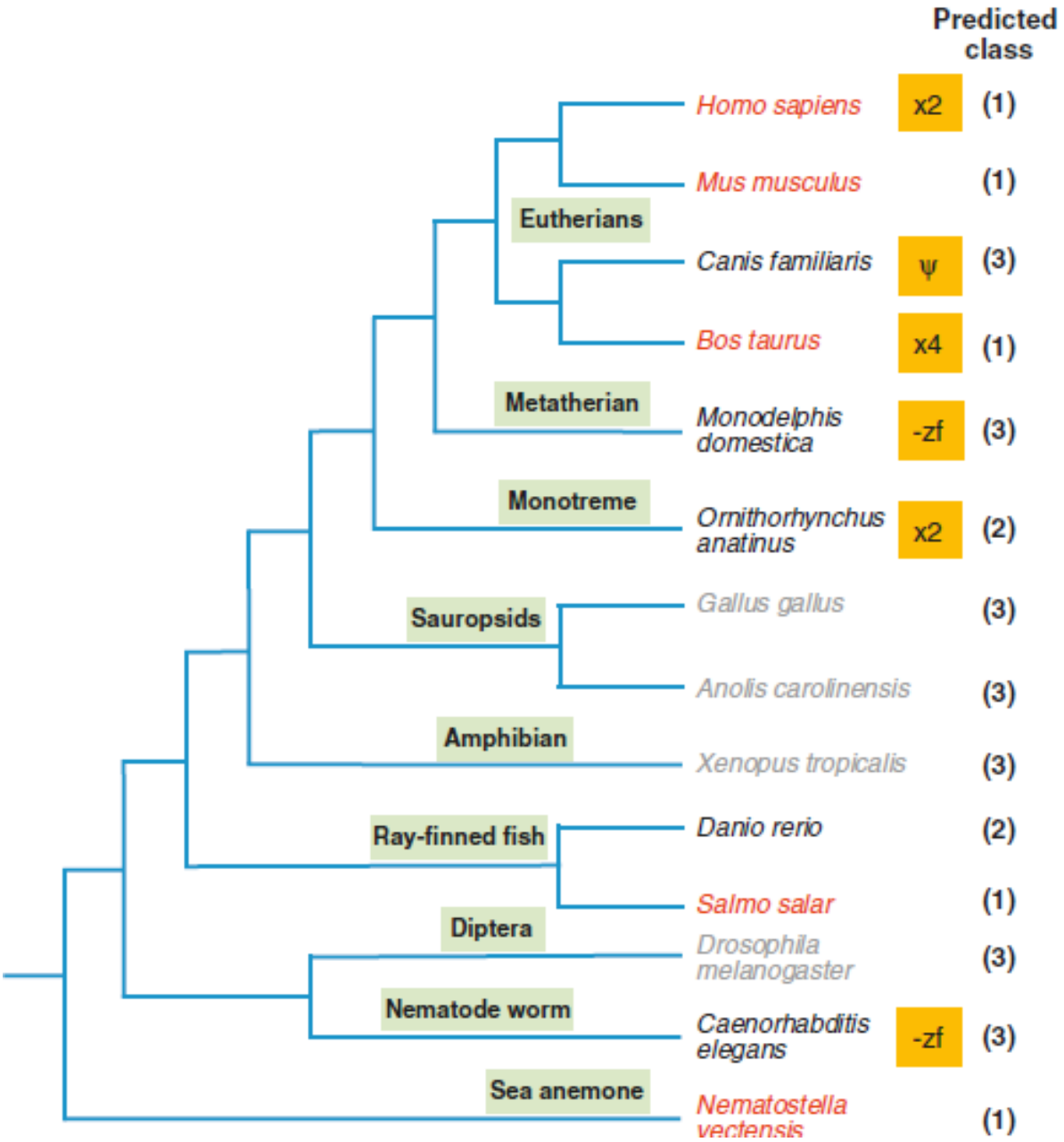

Slika 57: Prikaz sličnosti (različitosti) *PRDM9* čovjeka i morskog crva, dvije vrste koje su se razdvojile prije oko 600 milijuna godina u životinjskom filogenetskom stablu. Između njih, svaka domena pokazuje između 25% i 48% sličnosti sekvenci. KRAB domena (ljubičasto) ima 38% sličnosti, SSXRD 27%, PR/SET domena 48%, a ZF domena 25% sličnosti. ZFi pokazuju 46% sličnosti između čovjeka i morskog crva, dok oni između ljudi imaju oko 86% podudarnosti, a između crva 85%.
Izvor: Ponting, 2011.




Slika 58: Filogenetsko stablo sa prikazom evolucionarnih veza između ZFa različitih vrsta primata.
Izvor: Schwartz i sur., 2014.




Slika 59: Prikaz divergentnosti veličine zinc fingera u *PRDM9* u različitih vrsta primata. Veličina svakog kruga proporcionalna je količini alela u danom ZFu određene vrste. N vrijednost označava broj uzorkovanih alela za svaku grupu, a uključene su bile samo jedinke sa kompletnim parovima alela.
Izvor: Schwartz i sur., 2014.

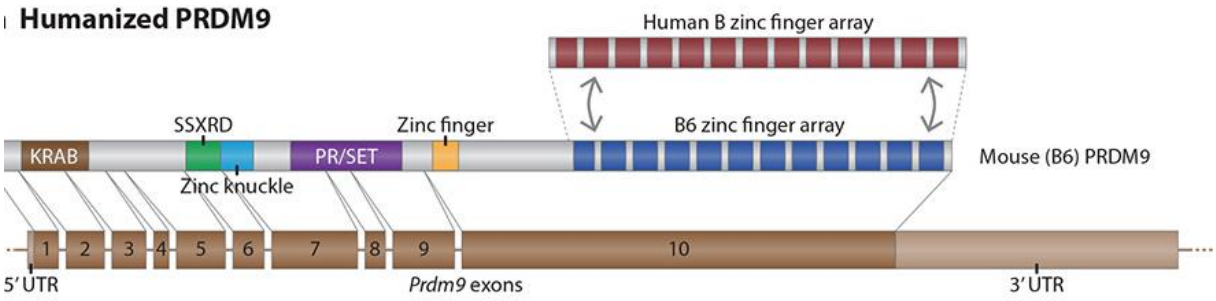



Slika 60: Prikaz razlika u *PRDM9* u različitih vrsta životinja, podijeljenih u 3 grupe, kao što je opisano u gornjem tekstu. U žutim kvadratićima opisane su karakteristike navedenog gena (xN znači da ima paraloge, -zf znači da nema ZF domenu, ψ znači da je pseudogen).

Izvor: Ponting, 2011.

## 2.13. *PRDM9* i sterilnost hibrida

*PRDM9* jedini je specijacijski gen do sada nađen u sisavaca koji je odgovoran za sterilnost fenotipova muških hibrida određenih podvrsta miševa.
Kako bi bolje istražili vezanje *PRDM9* na DNA te njegovu ulogu u fertilnosti i mejotskoj rekombinaciji, Davies i sur. su 2016. godine humanizirali DNA-vezujuću domenu *PRDM9* u muškoj liniji hibridnih miševa (Slika 61). Takva inducirana mutacija promijenila je pozicije DSB hotspotova te potpuno vratila fertilnost muškim miševima. Pokazali su da alteracija 1 *PRDM9* alela utječe na ponašanje DSBova kontroliranih drugim alelima unutar kromosoma.
Davies i sur. su time dokazali da ‘’*re-engineering*’’ zinc fingera (humanizirana ZF domena) može obrnuti hibridnu sterilnost u miševa.




Slika 61: Prikaz humaniziranog *PRDM9* mišjeg gena u istraživanju koje su Davies i sur. napravili 2015. Godine, vrativši time fertilnost sterilnim hibridima miševa.
Izvor: Davies, et al., 2016., Re-engineering the zinc fingers of *PRDM9* reverses hybrid sterility in mice

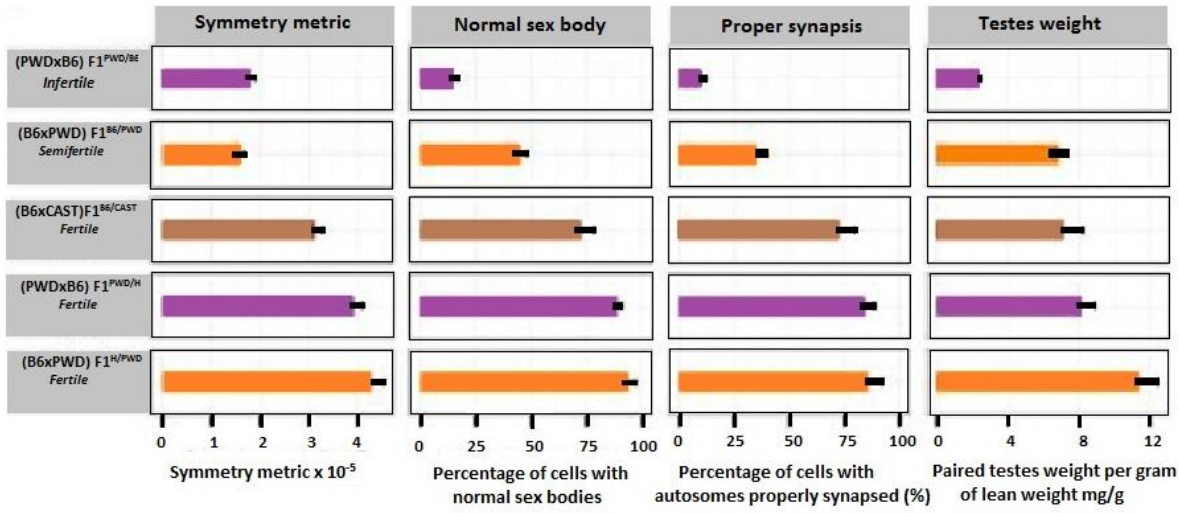
U F1 generaciji dobivenoj križanjem muškog C57BL/6 (B6) miša (*Mus musculus domesticus*) te ženskog PWD/Ph (PWD) miša (*Mus musculus musculus*) zapažena je sterilnost hibrida. Ovaj sterilitet karakteriziran je nemogućnošću sparivanja kromosoma u sinapsu te obustavljenom mejotskom profazom kao rezultatom nemogućnosti DSB popravka. Zbog toga što je ljudski *PRDM9* ZF evolvirao odvojenom evolucijom od onog mišjeg nakon njihovog razdvajanja prije oko 150 milijuna godina, eksperimentalnim pristupom željelo se dokazati da se funkcionalna svojstva *PRDM9* ZFa mogu vratiti unutar nekog genoma u kojem nedostaju, slično kao što unutar populacije mogu nastati neki novi aleli (Davies i sur., 2016.).

Davies i sur. uočili su da humanizacija *PRDM9* ZFa u B6 F1 generaciji nije imala utjecaja na fertilnost niti citogenetske usporedbe zigotenskih DSBova (broja zigotenskih DSBova), stvaranje spolnih stanica, broj COa ili kvantitativne mjere fertilnosti i uspješne sinapse između homologa. Da bi istražili ulogu *PRDM9* u okviru fertilnosti, križani su ženski PWD miševi sa muškim humaniziranim $B6^{B6/H}$ miševima.
Očekivano, $F1^{PWD/B6}$ generacija hibrida bila je potpuno sterilna. U kontrastu s tim, svi već ranije navedeni defekti (nemogućnost sparivanja kromosoma u sinapsu, itd) potpuno su nestali u PWDxB6 $F1^{PWD/H}$ hibrida koji su naslijedili humaniziran ZF. Time je uočeno da *PRDM9* ZF domena skupa sa DNA-vezujućim svojstvima ovog proteina imaju znatnu ulogu u sterilnosti hibrida. Iako je (PWDxB6) $F1^{PWD/B6}$ muška generacija bila kompletno sterilna, muški progeni test recipročnog križanja (B6xPWD) $F1^{B6/PWD}$ generacije bio je semi-fertilan.
Jedan određeni 4,7 Mb lokus (Hstx2) na PWD X kromosomu utjecao je na ove razlike u fertilnosti. Davies i sur. također su testirali utjecaj humanizacije u ovom recipročnom križanju

te je potpuna fertilnost bila vraćena. Time su dokazali da humanizacija *PRDM9* bar djelomice utječe na Hstx2 lokus. U okviru utjecaja na okolinu hotspota (engl. *hotspot landscape*) generirane su visoko-rezolutne DSB mape za miševe različitih *PRDM9* alela i genetskih pozadina, koristeći ChIP-seq single-stranded DNA sekvenciranje odraslih zrelih testisa. Suprotno B6 divljem tipu miševa, $B6^{H/H}$ (humaniziran x humaniziran) muševi pokazali su potpuno promijenjen okoliš hotspotova, pokazujući jak motiv sličan onom u ljudskog *PRDM9*-vezujućeg motiva. Motiv $B6^{H/H}$ poklapao se s ostalima (koji nisu bili humanizirani) u samo 2, 6% motiva. U heterozigotnih miševa, unatoč prisutstvu 2 različita *PRDM9* alela, nađen je sličan broj hotspotova kao i u homozigotnih miševa, a skoro svi $B6^{B6/H}$ hotspotovi (njih 95,8%) nađeni su ili u $B6^{B6/B6}$ ili u $B6^{H/H}$ miševa (Davies i sur., 2016.).

Proučavane su i DSB hotspot mape hibridnih mužjaka: sterilnih (PWDxB6) $F1^{PWD/H}$, recipročno semi-fertilnih (B6xPWD) $F1^{B6/PWD}$, humaniziranih (PWDxB6) $F1^{PWD/H}$ te recipročno humaniziranih (B6xPWD) $F1^{H/PWD}$, sa divljim tipom PWD za usporedbu. Razlike sekvenci između PWD i B6 genoma omogućile su određivanje simetrije ili asimetrije hotspotova, sa DSBima smještenima smještenima na oba kromosoma ili preferencom prema ili PWD ili B6 kromosomima.

Otkriveno je da većina *DMC1* (proteina mejotske rekombinacije, engl. meiotic recombination protein *DMC1*) signala (71,8%) u (PWDxB6) $F1^{PWD/B6}$ i $F1^{B6/PWD}$ miševima hibridima smještena dolazi iz asimetričnih hotspotova, no uočeni povišeni *DMC1* signali mogu se objasniti nakupljanjem *DMC1* tamo gdje je homologni popravak ugrožen ili kompromitiran (Davies i sur., 2016.).

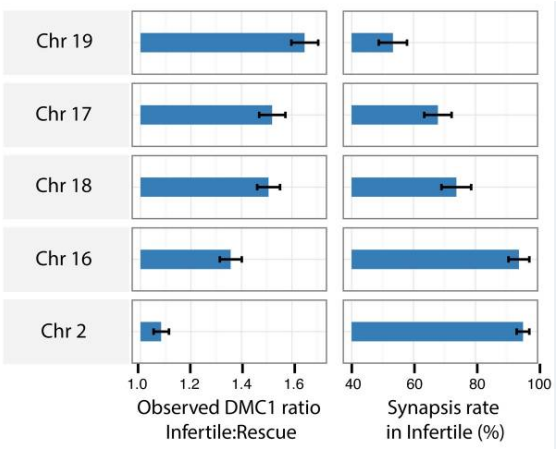



Slika 62: Zapažanja razlika u fertilnosti u proučavanih miševa.
Izvor: Autorova interpetacija prema Davies i sur., 2016.

Nadalje, DSBi asocirani sa PWD alelima uvelike su se pojavljivali na B6 kromosomu, a oni asocirani sa B6 alelima na PWD kromosomima. Takva asimetrija može nastati iz mejotske tendencije da favorizira mutacije koje ometaju *PRDM9* motive u populacijama u kojima su ti motivi aktivni. Zbog toga što ljudski aleli nisu prisutni u miševa, njihova vezujuća mjesta nisu bila pod utjecajem erozije hotspotova unutar mišjeg genoma. Kao posljedica, DSBovi na hotspotovima atributnima ljudskim alelima većinom nastaju na simetričnim hotspotovima (57%) sa ostatkom mutacija koje slučajno upadaju unutar *PRDM9*-vezujućeg motiva.

Mejotski nagon (engl. *meiotic drive*) također bi mogao objasniti dominaciju, kao što je uočeno u ljudskom *PRDM9* alelu dominantnom nad B6 alelu u $B6^{B6/H}$ miševa, zbog toga što su B6 motivi teško erodirali tijekom vremena unutar B6 genoma. Da bi to testirali, Davies i sur. napravili su F2 generaciju miševa s ciljem testiranja ponašanja B6 i humaniziranih alela u neutralnom *Mus musculus castaneous* (CAST/EiJ) okolišu koji nije bio pod utjecajem erozije B6 motiva. Dominacija ljudskog alela je nastala u regijama genoma sa 2 kopije CAST genoma, uklanjajući mogućnost da efekt erozije motiva ukloni dominaciju.
Ovakav rezultat ne uključuje neke ostale faktore koji bi mogli imati utjecaja na dominaciju te sugerira da nedavno nastali *PRDM9* aleli mogu biti dominantni nad starijim alelima za koje je tijek mejoze kroz vrijeme već mogao imati učinak erozije gena.

Erozija *PRDM9*-vezujućih mjesta tijekom mejoze također se odvija i u ljudskih hotspotova, a vjerojatno i u drugih sisavaca. U dvije populacije odvojene vremenskim čimbenikom, erozija diferencijalnih *PRDM9*-vezujućih mjesta smanjit će simetriju u hibrida, što vrlo vjerojatno smanjuje i fertilnost (no ne do ekstrema poput sterilnosti). Zbog toga *PRDM9* može utjecati na fertilnost hibrida u brojnih vrsta sisavaca te ponovljeno djelovati prema specijaciji, iako brza evolucija ZFa *PRDM9* implicira neočekivanu nestabilnost ove teorije. Jedan mogući mehanizam utjecaja (a)simetrije uključuje ulogu vezanja *PRDM9* kao pomoć pri traženju homologije u procesu invazije kromatide jednog homologa za homologna mjesta na drugom, prilikom procesa DSB rekombinacije. Također je uočeno da se DSBovi na asimetričnim hotspotovima popravljaju sporije, povećavajući *DMC1* signal (kao što je već rečeno, zbog nakupljanja zbog nemogućnosti popravka), a kromosomi sa manje simetričnih hotspotova općenito pokazuju sporiji DSB popravak i povišene frekvencije asinapse, rezultirajući semi-fertilnošću ili sterilnošću u životinja smanjenog simetričnog vezanja. Nije poznato kako se homologija (traženje homologije) uspješno odvija u stanici, uzevši u obzir samu veličinu genoma; ili zašto hotspotovi uopće postoje. Oba fenomena mogla bi biti objašnjena različitim modelima u kojima je traženje homologije barem djelomice fokusirano na pozicije samih hotspotova, koji bi uvelike mogli povećati uspješnost navedenog procesa usmjeravajući potragu za homologijom prema *PRDM9*-vezujućim mjestima (Davies i sur., 2016.).




Slika 63: DMC signali na različitim kromosomima u miševa sa vraćenom fertilnosti te onih infertilnih.
Izvor: Davies i sur., 2016.

## 2.14. Medicinske implikacije funkcije *PRDM9* te uočena problematika ekspresije u čovjeka i drugih vrsta životinja

Nedostatak *PRDM9* je do danas uočen u dva neovisna slučaja azoospermije u Japanu (Miyamoto i sur., 2008.; Irie i sur., 2009.). Azoospermija označava medicinsko stanje u kojem sperma ne sadržava spermije, te je vezano uz infertilnost, često uz nemogućnost liječenja, a zahvaća tek 1% populacije. Ovo otkriće suprotno je već navedenom otkriću ženske osobe iz Pakistana sa homozigotnom nul-mutacijom na *PRDM9* koja je unatoč tomu potpuno fertilna (Narasimhan i sur., 2016.). Za sada nije utvrđeno ovise li ove razlike o spolu ili čisto o varijabilnosti genoma u prisutstvu alternativnih mehanizama rekombinacije, no za bolje shvaćanje ovih varijacija biti će potrebna daljnja i temeljitija istraživanja.

Prvi slučaj utjecaja ljudskog *PRDM9* A-alela na neku genetsku bolest uočen je pri frekvencijama razmještaja minisatelita te kromosoma prisutnih u Charcot-Marie-Toothovoj bolesti (CMT) u ljudi, proizašloj iz nealelnih homolognih rekombinacija (engl. *non-alelic homologous recombination, NAHR*) (Berg i sur., 2010.). Nadalje, to otkriće povećalo se na 14 od 27 bolešću-povezanih kromosomskih razmještaja povezanih sa lokacijom ljudskog hotspota *PRDM9* A-alela, a uključuju CMT, Hunterov sindrom te Potocki-Lupski/Smith-Magenis sindrom (Pratto i sur., 2014.). Mnogi od ovih s bolešću-povezanih kromosomskih razmještaja i prijelomnih točaka dogodili su se unutar niskog broja kopija ponavljajućih sekvenci, sugerirajući time da potječu od NAHRa te da prisutnost određenog *PRDM9* alela daje predispozicije određenom poremećaju razmještaja kromosoma. Postoji dodatan dokaz za umješanost *PRDM9* u razmještaj kromosoma na dva NAHR hotspota povezana sa mutacijama koje uzrokuju neurofibromatozu tipa 1 (Hillmer i sur., 2017.).

Europske majke djece sa Downovim sindromom kao rezultatom krivog razdvajanja kromosoma u mejozi I uz nedostatak COa na kromosomu 21 pokazuju povišenu frekvenciju ne-A *PRDM9* alela za koje je predviđeno da imaju smanjenu frekvenciju *PRDM9*-veznih mjesta na navedenom kromosomu (Oliver i sur., 2016.).

Višak $PRDM9^{C}$ alela nađen je u roditelja s djecom sa akutnom limfoblastičnom leukemijom B-limfocita, što je dokazano nezavisnim studijama (Hussin i sur., 2013.).

Korelacija između određenih *PRDM9* alela i raka događa se u somatskim stanicama, ali do danas uloga *PRDM9* u tom procesu još nije potpuno razjašnjena.

*PRDM9* gen je, kao što je već rečeno, prisutan u gotovo svih vrsta (s izuzetkom porodice pasa) sisavaca, nekih vrsta reptila, riba te beskralješnjaka. Treba ipak napomenuti da se velike razlike u izgledu *PRDM9* mogu očitovati između jedinki unutar istih rodova, razreda pa čak i obitelji no tako i onih između različitih vrsta (obitelji, rodova, razreda). Svaka vrsta posjeduje upravo sebi specifičnu varijaciju *PRDM9* gena, pri čemu se većinom misli na dužinu ZF domene, jer je uočeno da ona uvelike varira čak i između jedinki unutar istog reda. Nadalje, *PRDM9* gen se može nalaziti na različitim kromosomima unutar jedinki istog reda (npr. primati, tablica 3).

Tablica 3: Popis najbitnijih funkcija *PRDM9* gena, zatim procesa u koje je uključen te smještaja u stanici.

| **Funkcije *PRDM9*** |
|---|
| Transkripcijski faktor aktivnosti RNA polimeraze II |
| Histonska-lizinska N-metiltransferazna aktivnost |
| Vezanje iona metala |
| DNA vezujuća specifičnost |
| Vezanje na rekombinacijske hotspotove |
| Transkripcijske regulatorne regije za DNA vezujuću specifičnost |
| **Procesi u koje je uključen** |
| Histonska lizinska metilacija |
| Mejotska konverzija gena |
| Pozicioniranje nukleosoma |
| Pozitivna regulacija recipročne mejotske rekombinacije |
| Regulacija transkripcije putem RNA polimeraze II |
| Transkripcija |
| Stanični ciklus |
| Mejoza |
| **Smještaj u stanici** |
| U jezgri |

Izvor: Autorova interpretacija prema https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/56979

Tablica 4: Usporedba ekspresije *PRDM9* gena nađene u različitim tkivima u čovjeka (*Homo sapiens*) te štakora (*Rattus norvegicus*). Crvenom bojom su naznačene najviše očitane vrijednosti ekspresije *PRDM9*, obje u očitane u tkivu testisa.

| **HPA RNA-seq tkiva čovjeka (*Homo sapiens*) za *PRDM9*** | | | |
|---|---|---|---|
| **Organ/Tkivo** | **Uzoraka** | **RPKM*** | **Broj*** |
| Nadbubrežna žlijezda | 3 | 0 ± 0 | 0 |
| Crvuljak | 3 | 0 ± 0 | 0 |
| Koštana srž | 4 | 0 ± 0 | 0 |
| Mozak | 3 | 0 ± 0 | 0 |
| Debelo crijevo | 5 | 0 ± 0 | 0 |
| Duodenum | 2 | 0 ± 0 | 0 |
| Endometrij | 3 | 0.007 ± 0.01 | 271 |
| Jednjak | 3 | 0.002 ± 0.002 | 101 |
| Masno tkivo | 3 | 0 ± 0 | 0 |
| Žućni mjehur | 3 | 0 ± 0 | 0 |
| Srce | 4 | 0 ± 0 | 0 |
| Bubreg | 4 | 0 ± 0 | 0 |
| Jetra | 3 | 0 ± 0 | 0 |
| Pluća | 5 | 0 ± 0 | 0 |
| Limfni čvor | 5 | 0 ± 0 | 0 |
| Jajnik | 2 | 0 ± 0 | 0 |
| Gušterača | 2 | 0 ± 0 | 0 |
| Placenta | 4 | 0.002 ± 0.002 | 215 |
| Prostata | 4 | 0 ± 0 | 0 |
| Žlijezda slinovnica | 3 | 0 ± 0 | 0 |
| Koža | 3 | 0 ± 0 | 0 |
| Ileum | 4 | 0 ± 0 | 0 |
| Slezena | 4 | 0 ± 0 | 0 |
| Želudac | 3 | 0 ± 0 | 0 |
| Testis | 7 | 2.185 ± 0.518 | 404456 |
| Štitnjača | 4 | 0 ± 0 | 0 |
| Mokraćni mjehur | 2 | 0 ± 0 | 0 |

| **RNA-Seq tkiva štakora (*Rattus norvegicus*) za *PRDM9*** | | | |
|---|---|---|---|
| **Organ** | **Uzoraka** | **RPKM*** | **Broj*** |
| Nadbubrežna 2 tjedna | 8 | 0.354 ± 0.068 | 23477 |
| Nadbubrežna 21 tjedan | 8 | 0.441 ± 0.136 | 32009 |
| Mozak 2 tjedna | 8 | 0.11 ± 0.064 | 8560 |
| Mozak 21 tjedan | 8 | 0.154 ± 0.032 | 10478 |
| Srce 21 tjedan | 8 | 0.199 ± 0.042 | 9883 |
| Srce 6 tjedana | 8 | 0.125 ± 0.042 | 7468 |
| Bubreg 21 tjedan | 8 | 0.749 ± 0.11 | 49911 |
| Jetra 2 tjedna | 8 | 0.374 ± 0.102 | 17433 |
| Jetra 21 tjedan | 8 | 0.42 ± 0.115 | 20412 |
| Pluća 21 tjedan | 8 | 0.298 ± 0.08 | 19500 |
| Pluća 6 tjedana | 8 | 0.284 ± 0.07 | 19985 |
| Mišić 2 tjedna | 8 | 0.098 ± 0.046 | 5508 |
| Mišić 21 tjedan | 8 | 0.228 ± 0.062 | 10508 |
| Slezena 2 tjedna | 8 | 0.087 ± 0.055 | 6237 |
| Slezena 21 tjedan | 8 | 0.106 ± 0.047 | 7699 |
| Slezena 6 tjedana | 8 | 0.088 ± 0.053 | 7038 |
| Testis 104 tjedna | 4 | 0.114 ± 0.014 | 4531 |
| Testis 2 tjedna | 4 | 1.288 ± 0.075 | 49270 |
| Testis 21 tjedan | 4 | 0.345 ± 0.068 | 13803 |
| Testis 6 tjedana | 4 | 0.579 ± 0.078 | 22317 |
| Timus 104 tjedna | 8 | 0.446 ± 0.206 | 28184 |
| Timus 2 tjedna | 8 | 0.171 ± 0.052 | 12180 |
| Timus 6 tjedana | 8 | 0.15 ± 0.078 | 11529 |
| Maternica 104 tjedna | 4 | 0.099 ± 0.03 | 4130 |
| Maternica 2 tjedna | 4 | 0.056 ± 0.048 | 1742 |
| Maternica 21 tjedan | 4 | 0.081 ± 0.027 | 3721 |
| Maternica 6 tjedana | 4 | 0.068 ± 0.025 | 2607 |

*RPKM - engl. *„Reads per kilobase per million reads placed"*, očitanja po kilobazi na milijun očitanja

*Broj - aproksimalan broj mapiranih genskih očitanja na transkript (engl. *approximate total reads mapped to gene transcript features*)

RNAseq je napravljen na 95 ljudskih uzoraka različitih vrsta tkiva s namjerom da se odredi tkivna specifičnost gena.

RNA-Seq napravljen je na 320 uzoraka izoliranih iz 11 organa od oba spola sveukupno 344 štakora.

Izvor: Autorova interpretacija prema https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/56979/?report=expression te https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/365155/?report=expression

Tablica 5: Prikaz sličnosti i razlika *PRDM9* gena u različitih razreda, redova i vrsta životinja.

| ***PRDM9*, PR/SET domena u različitih vrsta** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Red/Razred** | **Engleski naziv** | **Latinski naziv** | ***PRDM9*** | **Lokacija** | **Dodatne zabilješke** |
| Primates (*Primates*) Primati | Human | *Homo sapiens* | ✓ | Chromosome 5 | Postoje paralozi (*PRDM7*). Jako brza evolucija i pozitivna selekcija *PRDM9* (ZF domene). |
| | Chimpanzee | *Pan troglodytes* | ✓ | Chromosome 5 | |
| | Rhesus monkey | *Macaca mulatta* | ✓ | Chromosome 6 | |
| | Green monkey | *Chlorocebus sabaeus* | ✓ | Chromosome 4 | |
| | Crab-eating macaque | *Macaca fascicularis* | ✓ | Chromosome 6 | |
| | Western gorilla | *Gorilla gorilla* | ✓ | Chromosome 17 | |
| | Olive baboon | *Papio anubis* | ✓ | Chromosome 6 | |
| | Pygmy chimpanzee | *Pan paniscus* | ✓ | Chromosome 5 | |
| | Sumatran orangutan | *Pongo abelii* | ✓ | Chromosome 5 | |
| | Northern white-cheeked gibbon | *Nomascus leucogenys* | ✓ | Chromosome 6 | |
| | Sumatran orangutan | *Pongo abelii* | ✓ | Chromosome 5 | |
| | Uganda red colobus moneky | *Procolobus tephrosceles* | ✓ | N/A | |
| Elephants (*Elephantidae*) Slonovi | African savanna elephant | *Loxodonta africana* | ✓ | N/A | N/A |
| Rodents (*Rodentia*) Glodavci | House mouse | *Mus musculus* | ✓ | Chromosome 17 | Jako brza evolucija i pozitivna selekcija *PRDM9* (ZF) |
| | Norway rat | *Rattus norvegicus* | ✓ | Chromosome 1 | |
| | Damara mole-rat | *Fukomys damarensis* | ✓ | N/A | |
| | Upper Galilee mountains blind mole rat | *Nannospalax galili* | ✓ | N/A | |

Nastavak tablice 5:

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Mongolian gerbil | *Meriones unguiculatus* | ✓ | N/A | |
| | Degu | *Octodon degus* | ✓ | N/A | |
| Bats (*Chiroptera*) Šišmiši | Little brown bat | *Myotis lucifugus* | ✓ | N/A | N/A |
| | Black flying fox | *Pteropus alecto* | ✓ | N/A | N/A |
| | Egyptian rousette/fruit bat | *Rousettus aegypticus* | ✓ | N/A | N/A |
| Marsupials (*Marsupialia*) Tobolčari | Koala | *Phascolarctos cinereus* | ✓ | N/A | Ne posjeduju ZF domenu |
| | Gray short-tailed opossum | *Monodelphis domestica* | ✓ | N/A | |
| Treeshrews (*Euarchontoglires*) | Chinese tree shrew | *Tupaia chinensis* | ✓ | N/A | N/A |
| Sea cows, sirenians (*Sirenia*) Morske krave | Florida manatee | *Trichechus manatus latirostris* | ✓ | N/A | N/A |
| Dogs, Canids (*Canidae*) Psi | Domestic dog | *Canis familiaris* | ✕ | N/A | Postoji kao pseudogen |
| | Grey wolf | *Canis lupus* | ✕ | N/A | |
| | Red fox | *Vulpes vulpes* | ✕ | N/A | |
| | Coyote | *Canis latrans* | ✕ | N/A | |
| Bovids (*Bovidae*) šupljorošci Preživači | Cattle, cow | *Bos taurus* | ✓ | N/A | Postoje brojni paralozi (4). Jako brza evolucija i pozitivna selekcija *PRDM9* (ZF) |
| | Zebu | *Bos indicus* | ✓ | Chromosome 1 | |
| | Domesticated goat | *Capra hircus* | ✓ | Chromosome 8 | |
| | Domesticated sheep | *Ovis aries* | ✓ | N/A | |
| | Yak | *Bos grunniens* | ✓ | N/A | |
| | Gayal, mithun | *Bos frontalis* | ✓ | N/A | |

Nastavak tablice 5:

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Monotremes (*Monotremata*) Jednootvori | Platypus | *Ornithorhynchus anatinus* | ✓ | N/A | Postoje paralozi (2). |
| Birds (*Aves*) Ptice | Little egret | *Egretta garzetta* | ✕ | N/A | Ptice ne posjeduju *PRDM9*. Samo ZF + KRAB domena u kokoši na 14.kromosomu. |
| | Chicken | *Gallus gallus* | ✕ | Chromosome 14 | |
| | House sparrow | *Passer domesticus* | ✕ | N/A | |
| Reptiles (*Reptilia*) Reptili, gmazovi | Three-toed box turtle | *Terrapene mexicana triungius* | ✓ | N/A | Nađen u nekih kornjača (*Testudines*), zmija (*Serpentes*) te guštera (*Lacertilia*) |
| | Carolina anole lizard | *Anolis carolinensis* | ✓ | N/A | |
| Amphibians (*Amphibia*) Vodozemci | Western clowed frog | *Xenopus tropicalis* | ✕ | Chromosome 6 | Vodozemci ne posjeduju *PRDM9*. |
| Ray-finned fish (*Actinopterygii*) Zrakoperke | Zebrafish | *Danio rerio* | ✓ | N/A | Prisutan je i u modernih potomaka besčeljušnjača (*Agnatha*, engl. *Jawless fish*), nekih riba koštunjača (*Osteichthyes*, engl. *Bony fish*) te latimerija (*Coelacanthiformes*) |
| | Atlantic salmon | *Salmo salar* | ✓ | Chromosome 17 | |
| | Rainbow trout | *Oncorhynchus mykiss* | ✓ | Chromosome 20 | |
| Flies (*Diptera*) Dvokrilci | Common fruit fly | *Drosophila melanogaster* | ✕ | N/A | Ne posjeduje *PRDM9* |
| Snails, slugs (*Gastropoda*) Puževi | Sea snail | *Lottia gigantea* | ✓ | N/A | N/A |
| Corals (*Anthozoa*) Koralji | Starlet sea anemone | *Nematostella vectensis* | ✓ | N/A | Jako brza evolucija i pozitivna selekcija *PRDM9* (ZF) |
| Nematodes (*Nematoda*) Oblići | Roundworm | *Caenorhabditis elegans* | ✓ | N/A | Ne posjeduju ZF domenu |

Nastavak tablice 5:

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Plasmodium parasites (*Plasmodiidae*) | Malaria parasites | *Plasmodium berghei* | ✓ | N/A | Ne posjeduje pravi *PRDM9*, no posjeduje jedan ZF protein (PbZfp) kojem nedostaje PR/SET domena, ali je unatoč tome potreban za metilaciju histona H3 na K4, K27 i K36. |

Izvor: Autorova interpretacija napravljena prema znanstvenim radovima korištenima u ovom radu

Mjerenjem ekspresije *PRDM9* gena u različitim tkivima (Tablica 2) dobiveni su rezultati koji ukazuju na najveću ekspresiju navedenog gena u tkivu testisa čovjeka (*Homo sapiens*) te smeđeg štakora (*Rattus norvegicus*). Prema navedenim rezultatima u čovjeka je jako mala ekspresija zapažena još jedino u tkivima endometrija, jednjaka te placente. Suprotno tomu, u gotovo svakom proučavanom tkivu smeđeg štakora uočena je ekspresija *PRDM9* gena, što nam daje zbunjujuće rezultate. Štoviše, treba uzeti u obzir da u istraživanjima nije navedeno koje su se točno stanice kojeg tkiva navedenih organa proučavale, pogotovo u slučaju čovjeka. Nadalje, ne znamo starost ljudskih jedinki čiji su organi proučavani, tako da je rezultate teško uspoređivati s onima u štakora ili neke druge vrste, npr. miša (*Mus musculus*) čiji su rezultati slični onima u štakora (nije prikazano).

Prema svim dosadašjim istraživanjima neosporiv je utjecaj ekspresije *PRDM9* gena na reproduktivni sustav i organe, no i dalje je nejasno zašto je otkrivena ekspresija i na drugim tkivima (štakor). Treba uzeti u obzir i činjenicu da ekspresija nije otkrivena u jajnika čovjeka, dok za štakora ne postoje podaci, što je vrlo zbunjujuće. Već je ranije rečeno da je otkriven slučaj žene u Iranu koja posjeduje nul-mutaciju za navedeni gen, a rodila je dvoje zdrave djece, dok su dva odvojena slučaja muškaraca iz Japana sa nul-mutacijom bila potpuno sterilna. Navedena otkrića otkrivena su slučajno, putem medicinskih istraživanja za nešto drugo, tako da ne postoje genetski podaci o djeci žene iz Irana, koji bi možda dali odgovore na još mnoga neodgovorena pitanja koja muče znanstvenike. Također treba napomenuti jako mali broj dostupnih uzoraka u istraživanju ekspresije *PRDM9* na čovjeku, zbog mnogih socioloških i etičkih problema koji se javljaju pri želji za takvim istraživanjima. Sve navedene nelogičnosti dan danas zbunjuju znanstvenike, stoga i prikazane rezultate treba uzeti s određenom dozom netočnosti, jer je *PRDM9* još uvijek velikim dijelom neotkriven.

# 3. ZAKLJUČAK

Rekombinacija je, skupa sa mutacijama, bitan čimbenik i pokretač evolucije, esencijalna za reprodukciju te je središte skoro svake genetske analize. Razvojem tehnologije u novije doba poboljšala se ljudska sposobnost konstruiranja genomskih, visoko-rezolutnih rekombinacijskih mapa te novih molekularnih tehnika za daljnju analizu i shvaćanje genetske rekombinacije i njenih produkata. Prvotno otkriće *Meisetz*a, kasnije nazvanog *PRDM9* gen; te njegove uloge u procesu rekombinacije njegovim određivanjem rekombinacijskih hotspotova u mnogih sisavaca (uključujući čovjeka i miša) otvorilo je vrata brojnim istraživanjima funkcija i uloga ovog proteina. Danas razumijemo da se *PRDM9* tijekom mejoze veže na DNA na odgovarajuću sekvencu unutar hotspota markirajući time hotspot za moguću DSB formaciju, reorganizira okolni kromatin metilirajući nukleosome te između ostalog osigurava ispravan popravak DSBa.

U ovom radu pokazan je i opisan način rada *PRDM9* gena te njegovih domena, uz mehanizme i interakcije brojnih drugih gena i proteina.

Danas je dokazano da *PRDM9* ne radi sam te on ovisi o brojnim faktorima i proteinima, baš kao što oni ovise o njemu. Već je ranije rečeno da nedostatak bilo koje od njegove četiri domene znatno utječe na tijek i uspješnost mejoze, a time i same rekombinacije.

Kao što je spomenuto na početku ovog rada, genetska rekombinacija jedna je od glavnih pokretača evolucije, jer bez raznolikosti ne bi bilo mogućnosti genetske promjene i specijacije; jednostavnije rečeno, svi bismo bili klonovi jedni drugih.

Evolucija i specijacija interesantni su pojmovi u kojem god pogledu ih proučavali: u širem okviru te u onom užem, na citogenetskoj razini. Ako se vratimo sve do Mendela i njegovog najobičnijeg križanja grašaka i cvijeća, možemo uočiti isti uzorak križanja i u viših organizama, samo što će on fenotipski možda biti manje izražen, čisto zbog brojnih faktora koji utječu na raspodjelu i odvajanje alela i gena. Promatrajući proces genetske rekombinacije u širem okviru, nepobitno možemo reći da je riječ o vrlo kompleksnom procesu koji zapravo uvelike ovisi o čistim vjerojatnostima. Ako uzmemo samo nastanak spolnih stanica u roditeljima te sve čimbenike potrebne za njihov nastanak (homologe koji se moraju spojiti u sinapsu, hotspotove koji moraju imati odgovarajući motiv, *PRDM9* sa sukladnim DNA-vezujućim motivom, itd.) i hoće li se sve navedeno besprijekorno poklopiti, razmislimo zatim o nastanku i popravku DSBova i njihovim mogućim razrješenjima (CO ili NCO, a znamo da većina DSBova završi NCOom), shvatit ćemo da su upravo to samo neki od faktora hoće li neka jedinka jako ličiti svojoj majci, ocu, baki, djedu ili nekom daljnjem pretku. Kolika je točno vjerojatnost za to i; kolika će vjerojatnost za išta od toga biti ako nakon mejotske rekombinacije u priču ubacimo i model nezavisne segregacije nakon mejoze II? Na kojoj god razini gledali genetsku segregaciju; na razini alela, gena, kromosoma, ona će u svakom slučaju biti potpuno slučajna i nasumična te će stavaranje gameta biti prepušteno slučajnom odabiru (no ta segregacija uvijek odvijati u nekom omjeru, te će vjerojatnosti za novonastale moguće genotipove (pa s time i fenotipove) uvijek postojati).

Uzevši sve navedeno u obzir, vjerojatnost da je upravo neka jedinka nastala baš takva kakva je i da je upravo ona rođena (uz vjerojatnost spajanja najbržeg spermija i jajne stanice) skoro je pa nevjerojatna, gledajući širu sliku ovog procesa. Upravo zbog svih tih procesa koji su se morali poklopiti i slučajnosti koje su se morale dogoditi (slučajnosti orijentacije homolognih kromosoma u mejozi I te crossing overa, itd.), danas zahvaljujemo veliku genetsku varijabilnost vrsta koju inače ne bismo imali.

Ako se osvrnemo na proces mejotske rekombinacije u užem smislu, na citogenetskoj razini, jednako je fascinantan kao i onaj u širem smislu. *PRDM9* prvi je opisani specijacijski gen u sisavaca, a samim njegovim otkrićem otvorena su vrata u potpuno nova područja do sad još neotkrivenih procesa vezanih uz genetsku rekombinaciju. Od najprimitivnijih načina prijenosa genetskog materijala pa do onih kompliciranijih i profinjenijih, genska rekombinacija je od svog početka pa do danas očuvala jednu od svojih najbitnijih uloga – očuvanje varijabilnosti te genetsku snagu za napredovanjem i selekcijom – specijaciju kao način prirodnog očuvanja vrsta te njihove različitosti. Uzaludno bi stoga bilo reći da je *PRDM9* sam odgovoran za sve te procese u sisavaca i nekih drugih vrsta. Istina, *PRDM9* igra veliku ulogu u inicijaciji rekombinacije i njenom tijeku, no kao što je već rečeno u rad ovog gena ulazi nemali broj drugih gena i proteina s kojima on stupa u interakciju.

*PRDM9* gen je, u zaključku, samo jedan mali dio mejoze I, no koliko god se malen činio, iznimno bitan čimbenik genetske rekombinacije. Makar danas znamo mnogo o načinu rada *PRDM9* i njegovim mehanizmima, bilo bi suludo reći da znamo sve, jer i dalje postoji jako velik broj nelogičnosti povezan sa *PRDM9* te se postavljaju brojna pitanja na koja znanstvenici dan danas nemaju odgovore. Upravo je zbog toga potrebno mlade znanstvenike učiti detaljnije o mejozi, kako bi se održala potreba i zanimanje za istraživanjima ovog iznimnog gena, u nadi da će u budućnosti korištenjem sve razvijenijih tehnologija naći odgovore na sva do sad neodgovorena pitanja (i dati nam detaljniju sliku same mejoze i njenih mehanizama).

# 4. POPIS LITERATURE


Ahlawat, S., S., D., Sharma, P., Sharma, R., Arora, R., Kataria, R., . . . Singh, R. (2017.). Evolutionary dynamics of meiotic recombination hotspots regulator PRDM9 in bovids. *Molecular Genetics and Genomics, 292*(1), 117-131. doi:10.1007/s00438-016-1260-6

Ahlawat, S., Sharma, P., Sharma, R., Arora, R., & De, S. (2016.). Zinc Finger Domain of the PRDM9 Gene on Chromosome 1 Exhibits High Diversity in Ruminants but Its Paralog PRDM7 Contains Multiple Disruptive Mutations. *PLoS ONE, 11*(5). doi:10.1371/journal.pone.0156159

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002.). *Molecular Biology of the Cell* (Fourth edition ed.). New York: Garland Science.

Andersen, S., & Sekelsky, J. (2010.). Meiotic versus mitotic recombination: two different routes for double-strand break repair: the different functions of meiotic versus mitotic DSB repair are reflected in different pathway usage and different outcomes. *BioEssays, 12*(32), 1058–66. doi:10.1002/bies.201000087

Auton, A., Fledel-Alon, A., Pfeifer, S., Venn, O., & Laure, S. (2012.). A fine-scale chimpanzee genetic map from population sequencing. *Science, 336*, 193–198. doi:10.1126/science.1216872

Bailey, R. (2015.). *Mendel's Law of Segregation.*

Baker, C., Walker, M., Kajita, S., Petkov, P., & Paigen, K. (2014.). PRDM9 binding organizes hotspot nucleosomes and limits Holliday junction migration. *Genome Res*, 724-732.

Baker, Z., Schumer, M., Haba, Y., Bashkirova, L., Holland, C., Rosenthal, G., & Przeworski, M. (2017.). Repeated losses of PRDM9-directed recombination despite the conservation of PRDM9 across vertebrates. *ELife, 6*(6). doi:10.7554/eLife.24133

Bast, F., Kubota, S., & Okuda, K. (2014.). Phylogeographic Assessment of Panmictic Monostroma Species from Kuroshio Coast, Japan Reveals Sympatric Speciation. *Journal of Applied Phycology*. doi:10.1007/s10811-014-0452-x

Baudat, F., Buard, J., Grey, C., Fledel-Alon, A., Ober, C., Przeworski, M., . . . de Massy, B. (2010.). Prdm9 Is a Major Determinant of Meiotic Recombination Hotspots in Humans and Mice. *Science, 327*, 836–40. doi:10.1126/science.1183439

Baudat, F., Imai, Y., & de Massy, B. (2013.). Meiotic recombination in mammals: localization and regulation. *Nat Rev Genet, 14*, 794-806.

Bednar, J., & Dimitrov, S. (2011.). Chromatin under mechanical stress: from single 30 nm fibers to single nucleosomes. *FEBS Journal*. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08153.x

Berg, I., Neumann, R., Lam, K., Sarbajna, S., Odenthal-Hesse, L., May, C., & Jeffreys, A. (2010.). PRDM9 variation strongly influences recombination hot-spot activity and meiotic instability in humans. *Nat Genet, 42*, 859-863.

Berg, I., Neumann, R., Sarbajna, S., Odenthal-Hesse, L., Butler, N., & Jeffreys, A. (2011.). Variants of the protein PRDM9 differentially regulate a set of human meiotic recombination hotspots highly active in African populations. *PNAS*, 12378-12383. Retrieved from https://doi.org/10.1073/pnas.1109531108

Bernstein, H., & Bernstein, C. (2010.). Evolutionary origin of recombination during meiosis. *BioScience, 60*(7), 498–505. doi:10.1525/bio.2010.60.7.5

Bernstein, H., Bernstein, C., & Michod, R. (2011.). DNA Repair. In I. Kruman (Ed.), *Meiosis as an Evolutionary Adaptation for DNA Repair.* Tech Open Publisher. doi:10.5772/25117

Beveridge, M., & Simmons, L. W. (2006.). Panmixia: an example from Dawson's burrowing bee (Amegilla dawsoni) (Hymenoptera: Anthophorini. *Molecular Ecology*. doi:10.1111/j.1365-294X.2006.02846.x.

Bharath, M., Chandra, N. R., & Rao, M. (2003.). Molecular modeling of the chromatosome particle. *Nucleic Acids Research*.

Boubou, D., Clement, J., Duret, L., Kadlec, J., de Massy, B., & Baudat, F. (2018.). PRDM9 Methyltransferase Activity Is Essential for Meiotic DNA Double-Strand Break Formation at its Binding Sites. *Molecular Cell, 69*, 1-13. Retrieved from https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.01.033

Brick, K., Smagulova, F., Khil, P., Camerini-Otero, R., & Petukhova, G. (2012.). Genetic recombination is directed away from functional genomic elements in mice. *Nature, 485*, 642-645.

Buard, J., Rivals, E., Dunoyer de Segonzac, D., Garres, C., Caminade, P., de Massy, B., & Boursot, P. (2014.). Diversity of Prdm9 zinc finger array in wild mice unravels new facets of the evolutionary turnover of this coding minisatellite. *PLoS ONE, 9*(1). doi:10.1371/journal.pone.0085021

Carlson, E. A. (2004.). *Mendel's Legacy: The Origin of Classical Genetics.* CSHL Press.

Carlson, E. A. (2004.). *Mendel's Legacy: The Origin of Classical Genetics.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Chi, J., Mahé, F., Loidl, J., & Logsdon, J. (2014.). Meiosis gene inventory of four ciliates reveals the prevalence of a synaptonemal complex-independent crossover pathway. *Mol. Biol. Evol.* doi:10.1093/molbev/mst258

Cooper, G. M., & Hausman, R. E. (2010.). *Stanica - Molekularni pristup* (Vol. 5th). (G. Lauc, Ed.) Zagreb: Medicinska Naklada.

Coxx, H. J. (1925.). *Biological Stains - A Handbook on the Nature and Uses of the Dyes Employed in the Biological Laboratory.*

Creighton, H., & McClintock, B. (1931.). A Correlation of Cytological and Genetical Crossing-Over in Zea Mays. *Proc Natl Acad Sci, 17*(8), 492–7. doi:10.1073/pnas.17.8.492

Davies, B., Hatton, E., Altemose, N., Hussin, J., Pratto, F., Zhang, G., . . . Donelly, P. (2016.). Re-engineering the zinc fingers of PRDM9 reverses hybrid sterility in mice. *Nature*. doi:10.1038/nature16931

de Massy, B. (2013.). Initiation of meiotic recombination: how and where? Conservation and specificities among eukaryotes. *Annu Rev Genet, 47*, 563-599.

Finch, J. T., & Klug, A. (1976.). Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 73*. doi:10.1073/pnas.73.6.1897

Fledel-Alon, A., Leffler, E., Guan, Y., Stephens, M., Coop, G., & Przeworski, M. (2011.). Variation in Human Recombination Rates and Its Genetic Determinants. *PLoS ONE, 6*(6). doi:10.1371/journal.pone.0020321

Flemming, W. (1878.). *Zur Kenntniss der Zelle und ihrer Theilungs-Erscheinungen; Schriften des Naturwissenschaftlichen Vereins für Schleswig-Holstein.*

Fokin, S. (2013.). Otto Bütschli (1848–1920) Where we will genuflect? *Protistology, 8*(1), 22-35.

Ford, E. B. (1960.). *Mendelism and Evolution* (7th edition ed.). London: Methuen & Co.

Fujino, T., Hasegawa, M., Shibata, S., Kishimoto, T., Imai, S., & Takano, T. (2000.). PCCX1, a novel DNA-binding protein with PHD finger and CXXC domain, is regulated by proteolysis. *Biochem Biophys Res Commun, 271*(2), 305–310. doi:10.1006/bbrc.2000.2614

Gall, J., & Nye, B. (2005.). 100 Greatest Discoveries. *Science*. Retrieved from https://carnegiescience.edu/news/100-greatest-discoveries

Gamsjaeger, R., Liew, C., Loughlin, F., Crossley, M., & Mackay, J. (2007.). Sticky fingers: zinc-fingers as protein-recognition motifs. *Trends in Biochemical Sciences, 32*(2), 63-70. doi:10.1016/j.tibs.2006.12.007

Gopalakrishnana, A., Alya, A., Aravindb, L., & Kumar, N. (2017.). Multifunctional Involvement of a C2H2 Zinc Finger Protein (PbZfp) in Malaria Transmission, Histone Modification, and Susceptibility to DNA Damage Response. *mBIO*. doi:https://doi.org/10.1128/mBio.01298-17.

Griffiths, A., Miller, J., & Suzuki, D. (2000.). *An Introduction to Genetic Analysis* (Vol. 7th). New York: W.H.Freeman.

Griffiths, A., Wessler, S., Carroll, S., & Doebley, J. (2012.). *Introduction to Genetic Analysis (10 ed.).* New York: W.H. Freeman and Company.

Groeneveld, L., Atencia, R., Garriga, R., & Vigilant, L. (2012.). High diversity at PRDM9 in chimpanzees and bonobos. *PLoS ONE, 7*(7). doi:10.1371/journal.pone.0039064

Güre, A., Wei, I., Old, L., & Chen, Y. (2002.). The SSX gene family: characterization of 9 complete genes. *International Journal of Cancer, 101*(5), 448-453. doi:10.1002/ijc.10634

Hall, T. (2005.). Multiple modes of RNA recognition by zinc finger proteins. *Current Opinion in Structural Biology, 15*(3), 367–73. doi:10.1016/j.sbi.2005.04.004

Hartel, D. L., & Jones, E. W. (2009.). Chapter 6: Molecular Biology of DNA Replication and Recombination. In *Genetics: Analysis of Genetics and Genomes.* Burlington: Jones & Bartlett.

Hayashi, K., Yoshida, K., & Matsui, Y. (2005.). A histone H3 methyltransferase controls epigenetic events required for meiotic prophase. *Nature, 48*(17), 374-8.

Helleday, T. (2007.). *Double-Strand Break Repair via Double Holliday Junctions (Szostak Model)*. Retrieved from Engelward Laboratory: http://web.mit.edu/engelward-lab/animations/DSBR.html

Helleday, T., Lo, J., van Gent, D., & Engelward, B. (2007.). DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair*, 923–35. doi:doi:10.1016/j.dnarep.2007.02.006

Henig, R. M. (2009.). *The Monk in the Garden : The Lost and Found Genius of Gregor Mendel, the Father of Modern Genetics.* Houghton Mifflin.

Hill, M. A. (2018.). *Embryology.* UNSW Embryology. Retrieved from https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Main_Page

Hillmer, M., Summerer, A., Mautner, V., Högel, J., Cooper, D., & Kehrer-Sawatzki, H. (2017.). Consideration of the haplotype diversity at nonallelic homologous recombination hotspots improves the precision of rearrangement breakpoint identification. *Human Mutation, 38*(12), 1711-1722. doi:10.1002/humu.23319

Hinch, A., Tandon, A., Patterson, N., Song, Y., Rohland, N., Palmer, C., & .... Myers, S. (2011.). The landscape of recombination in African Americans. *Nature, 476*(7359), 170-5. doi:10.1038/nature10336

Hine, R. S. (2008.). *Oxford Dictionary Biology (6th ed.).* New York: Oxford University Press.

Hirano, T. (2016.). Condensin-based chromosome organization from bacteria to vertebrates. *Cell*(164), 847–857. doi:10.1016/j.cell.2016.01.033

Hohenhauer, T., & Moore, A. (2012.). The PRDM family: expanding roles in stem cells and development. *Development, 139*, 2267-2282.

Huntley, S., Baggott, D., Hamilton, A., Tran-Gyamfi, M., Yang, S., Kim, J., . . . Stubbs, L. (2006.). A comprehensive catalog of human KRAB-associated zinc finger genes: insights into the evolutionary history of a large family of transcriptional repressors. *Genome Res.* doi:10.1101/gr.4842106

Hussin, J., Sinnett, D., Casals, F., Idaghdour, Y., Bruat, V., Saillour, V., . . . .... Awadalla, P. (2013.). Rare allelic forms of PRDM9 associated with childhood leukemogenesis. *Genome Res., 23*(3), 419-30. doi:10.1101/gr.144188.112

Imai, Y., Baudat, F., Taillepierre, M., Stanzione, M., Toth, A., & de Massy, B. (2017.). The PRDM9 KRAB domain is required for meiosis and involved in protein interactions. *Chromosoma*. doi:10.1007/a00412-017-0631-z

Irie, S., Tsujimura, A., Miyagawa, Y., Ueda, T., Matsuoka, Y., Matsui, Y., . . . H., T. (2009.). Single-Nucleotide Polymorphisms of the PRDM9 (MEISETZ) gene in patients with nonobstructive azoospermia. *Journal of Andrology, 30*(4), 426-31. doi:10.2164/jandrol.108.006262

Jeppsson, K., & Kanno, T. S. (2014.). The maintenance of chromosome structure: positioning and functioning of SMC complexes. *Nature Reviews - Molecular Cell Biology*, 601–614. doi:doi:10.1038/nrm3857

Kantharaj, G. R. (2015., February 24th). *Genetics, Mendelian genetics*. Retrieved from http://preuniversity.grkraj.org/html/9_GENETICS.htm

Keeney, S. (2008.). Spo11 and the Formation of DNA Double-Strand Breaks in Meiosis. *Genome Dyn Stab.*, 81-123. doi:10.1007/7050_2007_026

King, R., & Stransfield, W. (1998.). *Dictionary of genetics.* New York, Oxford: Oxford University Press.

Klug, A. (1999.). Zinc finger peptides for the regulation of gene expression. *Journal of Molecular Biology, 293*(2), 215–8. doi:10.1006/jmbi.1999.3007

Koh-Senta, X., Joy, J., Poulsen, A., Li, Y., Tan, Y., Shim, Y., . . . Hill, J. (2014.). Characterizaction of the histone methyltransferase PRDM9 using biochemical, biophysical and chemical biology techniques. *Biochemical Journal, 461*, 323-334. doi:10.1042/BJ20140374

Kono, H., Tamura, M., Osada, N., Suzuki, H., Abe, K., Moriwaki, K., . . . Shiroishi, T. (2014.). Prdm9 polymorphism unveils mouse evolutionary tracks. *DNA Res., 21*(3), 315-26. doi:10.1093/dnares/dst059.

Kornberg, R. D. (1974.). Chromatin Structure: A Repeating Unit of Histones and DNA. *Science, Vol. 184*(Issue 4139), pp. 868-871. doi:DOI: 10.1126/science.184.4139.868

Kumar, R., & Massy, B. d. (2010.). Initiation of Meiotic Recombination in Mammals. *Genes, 1*, 521-549. doi:10.3390/genes1030521

Laity, J., Lee, B., & Wright, P. (2001.). Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Current Opinion in Structural Biology, 11*(1), 39–46. doi:10.1016/S0959-440X(00)00167-6

Latrille, T., Duret, L., & Lartillot, N. (2017.). The Red Queen model of recombination hot-spot evolution: a theoretical investigation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biol Sciences, 372*(1736). doi:10.1098/rstb.2016.0463

Lichten, M., & Goldman, A. (1995.). Meiotic Recombination Hotspots. *Annual Review of Genetics, 29*, 423–44. doi:10.1146/annurev.genet.29.1.423

Lilley, D. M. (2000.). Structures of helical junctions in nucleic acids. *Quarterly reviews of biophysics*, 109-159. doi: doi:10.1017/S0033583500003590

Lim, F., Soulez, M., Koczan, D., Thiesen, H., & Knight, J. (1998.). A KRAB-related domain and a novel transcription repression domain in proteins encoded by SSX genes that are disrupted in human sarcomas. *Oncogene, 17*(15). doi:10.1038/sj.onc.1202122

Liu, Y., & West, S. (2004.). Happy Hollidays: 40th anniversary of the Holliday junction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology, 5*, 937–44. doi: doi:10.1038/nrm1502

Luger K., M. A. (1997.). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution. *Nature*(389), 251-260. doi:doi:10.1038/38444

Margolin, J., Friedman, J., Meyer, W., Vissing, H., Thiesen, H., & Rauscher, F. (1994.). Krüppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains. doi:10.1073/pnas.91.10.4509

Maton, A. (1997.). *Cells: Building Blocks of Life.* New Jersey.

Matthews, R. (2013.). The bizarre case of the chromosome that never was. Retrieved July 13th, 2013.

McEachern, M., & Haber, J. (2006.). Break-induced replication and recombinational telomere elongation in yeast. *Annual Review of Biochemistry*, 111–35. doi:10.1146/annurev.biochem.74.082803.133234

Mendel, G. (1865.). Experiments in Plant Hybridization.

Merriam-Webster. (2018.). Merriam-Webster Dictionary. Retrieved from https://www.merriam-webster.com/dictionary/chromosome

Miko, I. (2008.). Gregor Mendel and the Principles of Inheritance. *Nature Education*. Retrieved from https://www.nature.com/scitable/topicpage/gregor-mendel-and-the-principles-of-inheritance-593

Miyamoto, T., Koh, E., Sakugawa, N., Sato, H., Hayashi, H., Namiki, M., & Sengoku, K. (2008.). Two single nucleotide polymorphisms in PRDM9 (MEISETZ) gene may be a genetic risk factor for Japanese patients with azoospermia by meiotic arrest. *J Assist Reprod Genet., 25*(11-12), 553–557. doi:10.1007/s10815-008-9270-x

Monday, T. (2010.). Characterization of the RNA content of chromatin. *20*(7), 899–907.

Myers, S., Bowden, R., Tumian, A., Bontrop, R., Freeman, C., & MacFie, T. (2010.). Drive against hotspot motifs in primates implicates the PRDM9 gene in meiotic recombination. *Science, 327*, 876–879.

Myers, S., Freeman, C., Auton, A., Donnelly, P., & McVean, G. (2008.). A common sequence motif associated with recombination hot spots and genome instability in humans. *Nature genetics, 40*(9), 1124-1129.

Myers, S., Spencer, C., & Auton, A. (2006.). The distribution and causes of meiotic recombination in the human genome. *Biochem. Soc. Trans., 34*, 526–30. doi:doi:10.1042/BST0340526

Narasimhan, V., Hunt, K., Mason, D., Baker, C., Karczewski, K., Barnes, M., & ... van Heel, D. (2016.). Health and population effects of rare gene knockouts in adult humans with related parents. *Science, 352*(6284), 474-477. doi:10.1126/science.aac8624

Neale, M. (2010.). PRDM9 points the zinc finger at meiotic recombination hotspots. *Genome Biol, 11*, 104–106.

Nirenberg, M. (2013.). Nirenberg: History Section: Gregor Mendel. *Gregor Mendel: The Father of Modern Genetics*. Retrieved from https://history.nih.gov/exhibits/nirenberg/HS1_mendel.htm

Oliver, P., Goodstadt, L., Bayes, J., Birtle, Z., Roach, K., Phadnis, N., . . . Ponting, C. (2009.). Accelerated evolution of the PRDM9 speciation gene across diverse metazoan taxa. *PLoS Genet, 5*(12). doi:10.1371/journal.pgen.1000753

Oliver, T., Middlebrooks, C., Harden, A., Scott, N., Johnson, B., Jones, J., . . . Sherman, S. (2016.). Variation in the Zinc Finger of PRDM9 is Associated with the Absence of Recombination along Nondisjoined Chromosomes 21 of Maternal Origin. *J Down Syndr Chromosom Abnorm., 2*(2). doi:10.4172/2472-1115.1000115

Padhi, A., Shen, B., Jiang, J., Zhou, Y., Liu, G., & Ma, L. (2017.). Ruminant-specific multiple duplication events of PRDM9 before speciation. *BMC Evol Biol, 17*(79). doi:10.1186/s12862-017-0892-4

Paigen, K., & Petkov, P. (2010.). Mammalian recombination hot spots: properties, control and evolution. *Nature reviews, 11*, 221-233. doi:10.1038/ngr2712

Parvanov, E., Petkov, P., & Paigen, K. (2010.). Prdm9 controls activation of mammalian recombination hotspots. *Science, 327*(5967). doi:10.1126/science.1181495

Parvanov, E., Tian, H., Billings, T., Saxl, R., Spruce, C., Aithal, R., . . . Petkov, P. (2017.). PRDM9 interactions with other proteins provide a link between recombination hotspots and the

chromosomal axis in meiosis. (Y. M. Yamashita, Ed.) *Mol Biol Cell, 28*(3), 488-499. doi:10.1091/mbc.E16-09-0686

Pavlica, M. (2012.). *Mrežni udžbenik iz Genetike* (Vol. I). Zagreb: Udžbenici zagrebačkog sveučilišta, elektronička izdanja. Retrieved from http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/index.html

Pearson. (2017.). *Mendelian Inheritance*. Retrieved from Pearson - The Biology Place: http://www.phschool.com/science/biology_place/biocoach/inheritance/laws.html

Perez, N. (2007.). Meiosis. *Molecular Biology Web Book*. Retrieved from http://www.web-books.com/MoBio/

Ponting, C. P. (2011.). What are the genomic drivers of the rapid evolution of PRDM9? *Trends in Genetics, 27*(5), 165-177. doi:10.1016/j.tig.2011.02.001

Pratto, F., Brick, K., Khil, P., Smagulova, F., Petukhova, G., & Camerini-Otero, R. (2014.). DNA recombination. Recombination initiation maps of individual human genomes. *Science, 14*(346). doi:10.1126/science.1256442

Revenkova, E., & Jessberger, R. (2006.). Shaping meiotic prophase chromosomes: cohesins and synaptonemal complex proteins. *Chromosoma*(115), 235–40. doi:10.1007/s00412-006-0060-x

Rousseau-Merck, M., Koczan, D., Legrand, I., Möller, S., Autran, S., & Thiesen, H. (2002.). The KOX zinc finger genes: genome wide mapping of 368 ZNF PAC clones with zinc finger gene clusters predominantly in 23 chromosomal loci are confirmed by human sequences annotated in EnsEMBL. *Cytogenetics, Genome Research*. doi:10.1159/000069802

Schleyden, M. J. (1847.). *Microscopical researches into the accordance in the structure and growth of animals and plants.*

Schwartz, J. (2008.). *In pursuit of the gene: from Darwin to DNA.* Harvard University Press.

Schwartz, J., Roach, D., Thomas, J., & Shendure, J. (2014.). Primate evolution of the recombination regulator PRDM9. *Nature communications, 5*(4370). doi:10.1038/ncomms5370

Segurel, L. (2013.). The complex binding of PRDM9. *Genome Biology, 14*(112).

Smagulova, F., Gregoretti, I., Brick, K., Khil, P., Camerini-Otero, R., & Petukhova, G. (2011.). Genome-wide analysis reveals novel molecular features of mouse recombination hotspots. *Nature, 472*, 375-378.

Snustad, D., & Simmons, M. (2008.). *Principles of Genetics* (5th ed.).

Steiner, C., & Ryder, O. (2013.). Characterization of PRDM9 in equids and sterility in mules. *PLoS ONE, 8*(4). doi:10.1371/journal.pone.0061746

Sun, F., Fujiwara, Y., Reinholdt, L., Hu, J., Saxl, R., Baker, C., . . . Handel, M. (2015.). Nuclear localization of PRDM9 and its role in meiotic chromatin modification and hologous synapsis. *Chromosoma, 124*, 397-415. doi:10.1007/s00412-015-0511-3

Sung, P., & Klein, H. (2006.). Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*(7), 739–50. doi:10.1038/nrm2008

Thoma, F., Koller, T., & Klug, A. (1979.). Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *The Journal of Cell Biology*(83), 403–427. doi:10.1083/jcb.83.2.403

Thomas, J., Emerson, R., & Shendure, J. (2009.). Extraordinary molecular evolution in the PRDM9 fertility gene. *PLoS ONE, 4*(12). doi:10.1371/journal.pone.0008505

Troast, D., Suhling, F., Jinguji, H., Sahlén, G., & Ware, J. (2016.). A Global Population Genetic Study of Pantala flavescens. doi:10.1371/journal.pone.0148949

Valmori, D., Qian, F., & Ayyoub, M. (2006.). Expression of synovial sarcoma X (SSX) antigens in epithelial ovarian cancer and identification of SSX-4 epitopes recognized by CD4+ T cells. *Clin. Cancer Res.*, 398–404. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1902

Voo, K., Carlone, D., Jacobsen, B., Flodin, A., & Skalnik, D. (2000.). Cloning of a mammalian transcriptional activator that binds unmethylated CpG motifs and shares a CXXC domain with DNA methyltransferase, human trithorax, and methyl-CpG binding domain protein 1. *Mol Cell Biol, 20*(6), 2108–2121. doi:10.1128/MCB.20.6.2108-2121.2000

Waldeyer-Hartz. (1888.). *Über Karyokinese und ihre Beziehungen zu den Befruchtungsvorgängen". Archiv für mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik.*

Wilson, E. (1925.). *The Cell in Development and Heredity* (3rd ed.). New York: Macmillan.

Winckler, W., Myers, S., Richter, D., Onofrio, R., McDonald, G., & Bontrop, R. (2005.). Comparison of fine-scale recombination rates in humans and chimpanzees. *Science, 308*, 107–111.

Wolfram, A., & Neumann, H. (2016.). Chromosome condensation and decondensation during mitosis. *Cell Biology*. doi:10.1016/j.ceb.2016.01.013.

# 5.PRILOG

## 5.1. Popis slika

Slika 1: Nukleotid je građen od šećera deoksiriboze, fosfatne skupine i dušične baze (purinske: adenin ili gvanin i pirimidinske: citozin ili timin). ....2
Slika 2: Prikaz strukture DNA te kromosoma unutar jezgre stanice. ....3
Slika 3: Prikaz razlika između binarne fizije, mitoze te mejoze. ....4
Slika 4: Mejoza I – redukcijska dioba ....5
Slika 5: Prikaz mejoze II. ....5
Slika 6: Shematski prikaz Mendelovog dihibridnog križanja graška. Mendel je križao heterozigote iz F1 generacije, te je u F2 generaciji uočio omjer 9:3:3:1 dobivenih fenotipova. 9/16 biljaka je imalo okrugle, žute sjemenke; 3/16 okrugle, zelene sjemenke; 3/16 je imalo smežurane, žute sjemenke; a samo 1/16 je imalo smežurane, zelene sjemenke. ....9
Slika 7: Primjer slučajne orijentacije homolognih kromosoma u mejozi I. ....10
Slika 8: Flemmingove ilustracije stanice tijekom diobe, sa slikama kromosoma; iz njegovog rada *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung*, 1882. ....11
Slika 9: Kromosomi u stanici žlijezde slinovnice, jedan od više od 100 Flemmingovih crteža iz rada *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung*, 1885. ....12
Slika 10: Prikaz slaganja histonskog oktamera te namatanja DNA oko istoga. ....13
Slika 11: Prikaz spajanja nukleosoma sa H1 histonom i nastanka kromatosoma. ....14
Slika 12: Kromatin u obliku nukleosoma: primarna kromatinska struktura, najmanje kondenzirana, debljine od 11 nm. Bijele strelice prikazuju slobodnu ''linker'' DNA, a crne strelice prikazuju nukleosome. ....15
Slika 13: Kromatinsko vlakno debljine 30 nm – struktura solenoida. ....16
Slika 14: Prikaz razlike između interfazne jezgre (lijevo) i kromosoma (desno) u tjelesnoj stanici čovjeka. ....17
Slika 15: Distribucija različitih vrsta kondenzina – kondenzina I (zelenog) i kondenzina II (crvenog) u ljudskih metafaznih kromosoma. ....18
Slika 16: Razine pakiranja DNA, od dvostruke zavojnice, do kromosoma. ....18
Slika 17: Prikaz položaja centromere i kinetohora na metafaznom kromosomu. ....19
Slika 18: Ljudska stanica prikazujući mikrotubule (zeleno), kromosome (plavo) te kinetohore (ružičaste točkice) kao mjesta vezanja mikrotubula. ....20
Slika 19: Prikaz telomera (bijelo) na vrhovima ljudskih kromosoma. ....20
Slika 20: Prikaz Mejoze I po fazama (profaza I, metafaza I, anafaza I te telofaza I). ....21
Slika 21: Leptoten profaze I mejoze ....22
Slika 22: Prikaz sinaptonemskog kompleksa u presjeku homolognih kromosoma. ....23
Slika 23: A: Shematski prikaz SCa. Homolozi (svjetlo plavo) povezani transverzalnim (crne linije) i longitudinalnim (tamno plave linije) filamentima. Kromatin (crvene linije) povezan je na odgovarajuća mjesta na kromosomima, protežući se od sestrinskih kromatida. Smatra se da rekombinacijski noduli (čvorovi)(sivi elipsoid) u centralnoj regiji pomažu rekombinaciji. 24
Slika 24: Prikaz zigotena profaze I. ....25
Slika 25: Prikaz pahitena profaze I. ....26
Slika 26: Mikroskopski prikaz diplotena profaze I. ....26

Slika 27: Mikroskopski prikaz dijakineze profaze I u biljnoj stanici. .....27
Slika 28: Profaza I spermatocita.....27
Slika 29: Pojednostavljeni shematski prikaz crossing overa između homologa. .....28
Slika 30: Ilustracije crossing overa Thomasa Hunta Morgana (1916, *A Critique of the Theory of Evolution,* strana 132).....29
Slika 31: Prikaz dvostrukog crossing overa Thomasa Hunta Morgana (1916, *A Critique of the Theory of Evolution*).....29
Slika 32: Predloženi model vezanja *SPO11* proteina na DNA prije cijepanja iste.....32
Slika 33: Molekularni mehanizam CO i NCO formacije putem različitih modela DSB popravka. DSB formacija nastaje u leptotenu i zahtijeva *SPO11* i *MEI1* (i MEI4 u kvasaca). DSB popravak napreduje do kraja pahitena u kojem su formirani rekombinantni produkti (CO ili NCO). Crne i bijele točke označavaju polimorfizme. .....34
Slika 34: Prikaz obustave gametogeneze zbog nedostatka mejotskih DSBova u mišjih testisa. Vidi se razlika u spermatogenezi divljeg tipa (A) i Mei4$^{-/-}$ tipa miševa (B) 8 tjedana nakon rođenja. Razlika oogeneza u divljeg tipa (C,E) i Mei$^{-/-}$ (D,F) miševa prikazana je 2 i 8 tjedana nakon rođenja. Ap-S na slici B označavaju apoptozne spermatocite. PF na C slici označava primordijalne folikule.....35
Slika 35: Prikaz rekombinacijskih rata na 12.kromosomu u čovjeka. Graf prikazuje rekombinacijske hotspotove koji su evidentni putem najviših crnih vrhova/crta, okruženih regijama bez ili niske rekombinacije. Treba obratiti pozornost na nedostatak rekombinacijske aktivnosti u području centromere.....37
Slika 36: Lijevo: *PRDM9* se u ljudi nalazi na 5.kromosomu.....39
Slika 37: Pozicija *PRDM9* na 5.kromosomu u ljudi.....39
Slika 38: Pozicija *PRDM9* na 17. mišjem kromosomu.....39
Slika 39: Shematski prikaz domena *PRDM9* gena u miša. .....40
Slika 40: Prikaz razlika u mejotskoj progresiji u *Meisetz*$^{-/-}$ miševa. Proučavane su sekcije divljeg tipa (a) te *Meisetz*$^{-/-}$ (b) mišjih testisa koji su u b slučaju prikazivali poremećaj u radu. Sekcije divljeg tipa (c) i *Meisetz*$^{-/-}$ (d) potvrdile su obustavu spermatogeneze u pahitenu. Obojane sekcije divljeg tipa (e) i *Meisetz*$^{-/-}$ (f) jajnika te prikaz istoga pod imunoflorescencijom (divljeg tipa – g, i; te *Meisetz*$^{-/-}$ -h, j). Oznake E17.5 označava starost embrija, a 1dpp jedan dan post partum.....41
Slika 41: Razvojne faze mejotske profaze u stanicama testisa divljeg tipa i *Meisetz*$^{-/-}$ miševa. .....41
Slika 42: 3D model KRAB (Krüppel-associated box) domene. .....42
Slika 43: Prikaz *PRDM9* gena (gore) uz prikaz modificiranog *PRDM9*ΔKB1 sa delecijom unutar KRAB domene. .....43
Slika 44: Imunoflorescentna analiza *PRDM9*, SYCP3 (mejotskog markera kromosomskih elemenata) i γH2AX (markera DSB formacije) ekspresije u kromosomskih uzorcima *PRDM9*$^{+/+}$ (B6), *PRDM9*$^{+/\Delta KB1}$, *PRDM9*$^{\Delta KB1/\Delta KB1}$ te *PRDM9*$^{-/-}$ spermatocita u leptotenu. .....44
Slika 45: Defekti u spermatogenezi i oogenezi (u stanicama testisa i jajnika) u *PRDM9*$^{+/+}$ (B6), *PRDM9*$^{+/\Delta KB1}$, *PRDM9*$^{\Delta KB1/\Delta KB1}$ miševa.....44
Slika 46: Gore: Pojednostavljeni prikaz razlike između *PRDM9* sa metiltransferaznom aktivnošću (lijevo) te istoga bez metiltransferazne aktivnosti (desno). U drugom slučaju vidljivo je da nije došlo do nastanka DSBa.....48

Slika 47: Prikaz varijabilnosti ZF domene u različitih vrsta ruminanta. Različita ponavljanja alela na ZF domeni ukazuju na veliku varijabilnost čak i unutar vrsta. Prvi ZF (plavi romb lijevo) je očuvan i jednak u svih prikazanih vrsta. ..... 50
Slika 48: Shematski prikaz rada *PRDM9* gena. *PRDM9* se ZF domenom veže na određeni hotspot motiv, nakon čega PR/SET domene trimetiliraju histone i vrše kromatinske modifikacije. Zatim dolazi do vezanja proteina potrebnih za nastanak DSBa (*SPO11*) do čega na kraju i dolazi. ..... 51
Slika 49: Hollidayev model homologne rekombinacije sa prikazom područja heterodupleksa. ..... 53
Slika 50: A: Hollidayev čvor prikazan elektronskim mikroskopom. B: Dvije moguće konfiguracije Hollidayeva čvora, sa DNA paralelne (lijevo) ili antiparalelne (desno) konfiguracije. ..... 54
Slika 51: Molekularni prikaz strukture Hollidayevog čvora. ..... 54
Slika 52: Prikaz DSBR i SDSA modela. Lijevo je prikazano razrješenje Hollidayeva čvora DSBRom koji najčešće rezultira crossing overom. Desno je prikazan SDSA model razrješenja Hollidayeva čvora, češći u mitozi, koji ne rezultira crossing overom. ..... 55
Slika 53: Još jedan shematski prikaz DSB popravka. ..... 56
Slika 54: Prikaz dvaju različitih izomera Hollidayeva čvora te njihovih razrješenja, koja ukazuju na SDSA (lijevo) i DSBR (desno). Ovisno o orijentaciji i konformaciji CO može izostati (lijevo) ili se ipak dogoditi (desno). ..... 57
Slika 55: Prikaz razlike razrješenja SDSAom (lijevo) i DSBRom (desno). SDSA u većini slučajeva rezultira konverzijom gena i popravkom DSBa u kojem se oštećenja jednog homologa popravljaju komplementarnim slijedovima drugoga. Nakon poravnavanja, može se dogoditi da mali dio lanca jednog homologa ostane na drugom i obrnuto, no takva preklapanja se kasnije uklanjaju DNA ligazom. Suprotno s tim, DSBR će u većini slučajeva rezultirati COom kojim će doći do genetske rekombinacije između homologa. ..... 57
Slika 56: Prikaz *PRDM9* ovisne rekombinacije u sisavaca (lijevo), dok je u kvasaca i ptica riječ o *PRDM9*-neovisnoj rekombinaciji (NDR, slika desno). ..... 60
Slika 57: Prikaz sličnosti (različitosti) *PRDM9* čovjeka i morskog crva, dvije vrste koje su se razdvojile prije oko 600 milijuna godina u životinjskom filogenetskom stablu. Između njih, svaka domena pokazuje između 25% i 48% sličnosti sekvenci. KRAB domena (ljubičasto) ima 38% sličnosti, SSXRD 27%, PR/SET domena 48%, a ZF domena 25% sličnosti. ZFi pokazuju 46% sličnosti između čovjeka i morskog crva, dok oni između ljudi imaju oko 86% podudarnosti, a između crva 85%. ..... 62
Slika 58: Filogenetsko stablo sa prikazom evolucionarnih veza između ZFa različitih vrsta primata. ..... 63
Slika 59: Prikaz divergentnosti veličine zinc fingera u *PRDM9* u različitih vrsta primate. Veličina svakog kruga proporcionalna je količini alela u danom ZFu određene vrste. N vrijednost označava broj uzorkovanih alela za svaku grupu, a uključene su bile samo jedinke sa kompletnim parovima alela. ..... 63
Slika 60: Prikaz razlika u *PRDM9* u različitih vrsta životinja, podijeljenih u 3 grupe, kao što je opisano u gornjem tekstu. U žutim kvadratićima opisane su karakteristike navedenog gena (xN znači da ima paraloge, -zf znači da nema ZF domenu, ψ znači da je pseudogen). ..... 64

Slika 61: Prikaz humaniziranog *PRDM9* mišjeg gena u istraživanju koje su Davies i sur. napravili 2015. Godine, vrativši time fertilnost sterilnim hibridima miševa. .....65
Slika 62: Zapažanja razlika u fertilnosti u proučavanih miševa. .....66
Slika 63: DMC signali na različitim kromosomima u miševa sa vraćenom fertilnosti te onih infertilnih.....67

## 5.2. Popis tablica

Tablica 1: Različite stope mutacija u jednoj generaciji u različitih organizama.....6
Tablica 2: Prikaz hipervarijabilnih ljudskih minisatelita i njihovih hotspot motiva. .....38
Tablica 3: Popis najbitnijih funkcija *PRDM9* gena, zatim procesa u koje je uključen te smještaja u stanici.....69
Tablica 4: Usporedba ekspresije *PRDM9* gena nađene u različitim tkivima u čovjeka (Homo sapiens) te štakora (Rattus norvegicus). Crvenom bojom su naznačene najviše očitane vrijednosti ekspresije *PRDM9*, obje u očitane u tkivu testisa.....70
Tablica 5: Prikaz sličnosti i razlika *PRDM9* gena u različitih razreda, redova i vrsta životinja. 71

# ŽIVOTOPIS AUTORA

Magdalena Matijević rođena je 10.lipnja 1993. godine u Zagrebu. Pohađala je jezičnu, XVI. gimnaziju (Križanićevu) u Zagrebu od 2008. do 2012. godine, istovremeno pohađajući i glazbenu (srednju) školu Pavla Markovca. Zahvaljujući intenzivnom učenju engleskog jezika u srednjoj školi, tijekom zadnjeg (4.) razreda, stječe diplomu sveučilišta u Cambridgeu iz poznavanja naprednog engleskog jezika i literature (engl: *General Certificate of Education, Advanced Subsidiary level and Advanced level, Language and Literature in English, University of Cambridge*). Uz engleski, tijekom osnovne i srednje škole učila je talijanski i španjolski jezik.

2012. godine upisuje Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, na kojem 2015. stječe titulu sveučilišne prvostupnice (baccalaurea) inžinjerke animalnih znanosti (univ.bacc.ing.agr.). Na istom fakultetu zatim upisuje diplomski studij "Genetika i oplemenjivanje životinja" kako bi stekla titulu magistra znanosti. Tijekom studija redovno volontira u KSETu (Klubu Studenata Elektrotehnike), kao student radi u Zoološkom vrtu u Zagrebu, a 2016. godine upisuje izvanredni studij japanologije na Filozofskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Uz navedeno, posjeduje umjetničke vještine te često crta i izrađuje umjetnine.