Kvantitativna analiza duljina telomera starih i mladih donora u primarnim stanicama fibroblasta iz kože metodom hibridizacije in situ, Q-PNA-FISH

Pavlinović, Mia

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, University of Split, Faculty of science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:166:710388

Rights / Prava: Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Science

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za biologiju

Mia Pavlinović

KVANTITATIVNA ANALIZA DULJINA TELOMERA STARIH I MLADIH DONORA U PRIMARNIM STANICAMA FIBROBLASTA IZ KOŽE METODOM HIBRIDIZACIJE IN SITU, Q-PNA-FISH

Diplomski rad

Split, 2017.

Ovaj rad, izrađen u Splitu 2017. godine, pod vodstvom doc. dr. sc. Ivice Šamanića, predan je na ocjenu Odjelu za biologiju, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu, radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svom mentoru doc.dr.sc Ivici Šamaniću koji je svojim znanstvenim i stručnim savjetima pomogao u oblikovanju ideja ovog diplomskog rada. Posebno zahvaljujem na pomoći prilikom izvođenja istraživačkog dijela ovog rada te na podršci prilikom kretanja u nova istraživačka područja i širenja mojih sposobnosti. Vaša smirenost i strpljenje su zaista bili od velike pomoći te mi je iznimna čast bila surađivati sa vama.

Hvala vam dr. sc. Željana Fredotović na svakom trenutku koji ste izdvojili za savjet i ohrabrenje te recenziju ovog rada.

Posebno se zahvaljujem prof. dr. sc. Jasni Puizini na stručnim i znanstvenim savjetima prilikom recenzije ovog rada.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Mirku Ruščiću na recenziji metodičkog dijela ovog rada.

Prijatelji, hvala vam na podršci i prihvaćanju svih mojih ideja čak kad su bile neizvedive. Na svakoj šali i tišini, na našim zajedničkim trenucima. Hvala.

Hvala ti Ivane na strpljenju i razumijevanju. Bezuvjetnu podršku, ljubav i nadu u najpotrebnijim trenucima samo rijetke osobe mogu pružiti, one velikog srca.

Iznad svega hvala mojoj obitelji, Anđi na životnim savjetima, Antoniu što imam uzora i vječnu zaštitu od svega što mi život može dati. Hvala vam što ste vjerovali u mene.

Ovaj rad posvećujem vama dragi roditelji, mama i tata. Za svako odricanje koje ste napravili, za svaki korak koji ste me naučili, za svaku radost, ljubav i strpljenje što ste mi pružili. Vaša vjera u mene je ono što mi daje poleta, vaše oči ispunjene srećom je ono što me tjera naprijed i vaš život je ono što mi daje primjer kakvom osobom trebam postati. Hvala.

Mia

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za biologiju Diplomski rad

KVANTITATIVNA ANALIZA DULJINA TELOMERA STARIH I MLADIH DONORA U PRIMARNIM STANICAMA FIBROBLASTA IZ KOŽE METODOM HIBRIDIZACIJE IN SITU, Q-PNA-FISH

Mia Pavlinović
Ruđera Boškovića 33, 21 000 Split

Struktura i funkcija telomera bitne su za razumijevanje procesa staničnog starenja. Produžavanje telomera glavni je mehanizam održavanja besmrtnosti tumorskih stanica. U ovom radu proučena je dinamika telomera u kulturi ljudskih fibroblasta iz kože mladih i starih donora. Primarne stanice fibroblasta tretirane su sredstvom za pomlađivanje p19 kako bi se utvrdio mogući utjecaj na duljinu telomera. Telomere stanica fibroblasta iz kože kvantitativno su analizirane metodom hibridizacije in situ, Q-PNA-FISH. Cilj rada je optimiziranje metode za analizu intenziteta telomernih signala dobivenih putem Q-PNA-FISH tehnike, te uspostavljanje statističke metode za kvantificiranje dobivenih vrijednosti.

Rad je pohranjen u knjižici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Splitu, Ruđera Bokškovića 33, Split.

Diplomski rad ima: 86 stranice, 16 slika, 2 tablice, 4 grafikona, 5 histograma , 97 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: telomere, starenje, ljudski fibroblasti, Q-PNA-FISH, kvantifikacija intenziteta telomernih signala
Voditelj: dr.sc.Ivica Šamanić, docent
Ocjenitelji: dr.sc Jasna Puizina, redoviti profeosor
dr. sc. Željana Fredotović, asistent
Rad prihvaćen: 27. rujna 2017. godine

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Split
Faculty of Science
Department of Biology Graduation Thesis

TELOMERE LEGTH ANALYSIS BY QUANTITATIVE FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION, Q-PNA-FISH, IN PRIMARY SKIN FIBROBLASTS FROM YOUNG AND ADULT DONORS

Mia Pavlinović
Ruđera Boškovića 33, 21 000 Split

Telomere structure and function are essential for understanding cellular aging process. The extension of telomere repeats represents a major mechanism for maintaining the immortality of many tumor cells. In this paper telomere length in human skin fibroblasts from young and old donor has been studied. Primary human fibroblasts were treated with p19 rejuvenating agent to determine its ability to fight off aging process.Telomere lengths in the primary cultured human skin fibroblasts were analyzed using quantitative fluorescence *in situ* hybridization, Q-PNA-FISH. The aim of this thesis is to optimise Q-PNA-FISH telomere signal intensity analysis method and to establish a statistical method to quantify the fluorescent signal obtained from a telomere-specific probe.

Thesis deposited in Library of Faculty of Science, Ruđera Boškovića 33, Split, Croatia

Diploma thesis contains : 86 pages, 16 images, 2 tables, 4 charts, 5 histograms, 97 citations, original in Croatian.
Key words: telomeres, aging, human fribroblasts, Q-PNA-FISH, the quantification of the telomeric FISH signals
Supervisor: Ivica Šamanić, Ph.D., Assistant Professor
Reviewers: Jasna Puizina, Ph.D., Professor
Željana Fredotović, Ph.D., Assistant
Thesis accepted: 27. September, 2017.

Sadržaj

1. UVOD ... 1

1.1 TELOMERE ... 1

1.2 TELOMERNI ASOCIRAJUĆI/VEZNI PROTEINI ... 2

1.3 TELOMERAZA ... 5

1.4 REGULACIJA TELOMERAZE ... 7

1.4.1 Transkripcijska regulacija ... 8

1.4.2 Epigenetske modifikacije ... 9

1.4.3 Regulacija i transkripcija hTERT ... 9

1.5 ŠAPERONINI ... 10

1.6 ODRŽAVANJE TELOMERA TELOMERAZOM ... 11

1.6.1 hTERT ... 11

1.6.2 hTR ... 12

1.6.3 Telomerni proteini (engl. shelterin complex) ... 13

1.6.4 TERRA ... 14

1.7 SKRAĆIVANJE TELOMERA, RAK I STARENJE ... 15

2. CILJ ISTRAŽIVANJA ... 17

3. MATERIJALI I METODE ... 18

3.1 MATERIJALI ... 18

3.1.1 Osnovne kemikalije ... 18

3.1.2 Kompleti, enzimi, nukleotidi, proteini ... 18

3.1.3 Hranjive podloge ... 18

3.1.4 Stanične linije ... 18

3.1.5 Priprema kemikalija ... 19

3.1.6 PNA telomerna proba ... 22

3.1.7 Primarne stanice fibroblasta ... 24

3.2 METODE ... 25

3.2.1 Uzgoj stanica fibroblasta u kulturi ... 25

3.2.2 Priprema metafaznih kromosoma ... 26

3.2.3 FLUOROSCENCIJSKA HIBRIDIZACIJA in situ (FISH) S PNA SONDOM ... 28

3.2.4 Mikroskopiranje i izrada slika ... 30

3.2.5 Statistička analiza ... 35

4. REZULTATI ... 36

4.1 ANALIZA TELOMERNIH SIGNALA PRIMARNIH STANICA FIBROBLASTA IZ KOŽE METODOM Q-PNA-FISH ... 36

4.2 RAZDIOBA DULJINA TELOMERA STANICA FIBROBLASTA IZ KOŽE UZORKA MLAĐEG DONORA FX_24_M_13_C 37
4.3 RAZDIOBA DULJINA TELOMERA STANICA FIBROBLASTA IZ KOŽE UZORKA MLAĐEG DONORA NAKON TRETMANA FX_24_M_13_SSE 38
4.4 RAZDIOBA DULJINA TELOMERA STANICA FIBROBLASTA IZ KOŽE UZORKA STARIJEG DONORA FX_75_FA_8_C 39
4.5 RAZDIOBA DULJINA TELOMERA STANICA FIBROBLASTA IZ KOŽE UZORKA STARIJEG DONORA NAKON TRETMANA FX_75_FA_8_SSE 40
4.6 RAZLIKE DULJINA TELOMERA IZRAŽENIH U AFJ RAZLIČITIH UZORAKA METAFAZNIH KROMOSOMA STANICA FIBROBLASTA IZ KOŽE 41
3. KONTROLNOG UZORKA FX_24_M_13_C 41
4.6.1 Razlika duljina telomera starijeg donora: kontrolnog uzorka FX_75_FA_8_C i tretiranog uzorka FX_75_FA_8_SSE 43
4.6.2 Razlika duljina telomera mlađeg donora: kontrolnog uzorka FX_24_M_13_C i tretiranog uzorka FX_24_M_13_SSE 44
4.6.3 Razlika duljina telomera kontrolnog uzorka FX_24_M_13_C mlađeg donora i kontrolnog uzorka FX_75_FA_8_C starijeg donora 45
4.6.4 Razlika duljina telomera tretiranog uzorka FX_24_M_13_SSE mlađeg donora i tretiranog uzorka FX_75_FA_8_SSE starijeg donora 46
4.7 ANALIZA RAZLIKE DULJINA TELOMERA U ODNOSU NA KATEGORIJE RAZREDA ARBITRARNIH JEDINICA 47
4.7.1 Analiza razlike duljina telomera u odnosu na kategorije razreda arbitrarnih jedinica uzoraka FX_75_FA_8 i FX_24_M_13 47

5. RASPRAVA 48

6. ZAKLJUČCI 52

7. LITERATURA 53

8. METODIČKI DIO 66

KRATICE

AKTIP- gen koji kodira protein AKT (engl. *AKT-interacting protein)*

BFB- lomovi i stapanja (engl. *breakage-fusion-bridge)*

c-Myc- onkogen

Cy3- fluorescentna boja (engl.*Cyanine 3*)

DAPI- fluorescentna boja (engl. *4-6-diamidino-2-phenylindole*)

DKC- bolest (engl. *Dyskeratosis congenita)*

DMEM- Dulbeccov modificirani minimalni medij

DNA- deoksiribonukleinska kiselina (engl. *Deoxyribonucleic acid*)

D-petlja- telomerna petlja (engl. *Displacement loop*)

DSB- dvostruki lomovi (engl. *double strand break)*

FISH- fluorescentna in situ hibridizacija (engl. *Fluorescent In Situ Hybridization*)

FCS- teleći fetalni serum (engl. *Foetal Calf Serum*)

FRAP- oporavak nakon izbjeljivanja fluorescencijom **(**engl. *fluorescence recovery afterphotobleaching)*

HIF- hipoksijom inducirani faktor(engl. *hypoxia-inducible factor)*

HSP90- zaštitni proteini (engl. *Heat Shock Protein 90)*

hTER- ljudska telomerazana RNA (engl. *human Telomerase RNA*)

hTERT- ljudska telomerazna reverzna transkriptaza (engl. *human Telomerase Reverse Transcriptase*)

p16- tumor supresor protein

p53- tumor supresor protein

PBS- fosfatni pufer (engl. *Phosphate Buffered Saline*)

PCR- lančana reakcija polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*)

PD- broj udvostručenja populacije (engl. *Population Doublings*)

PNA- fluorescentno obilježena sintetska sonda, (engl. *peptide nucleic acid*)

POT1- telomerni protein (engl. *Protection of telomeres I*)

Rap1- (repressor/activator protein 1) je telomerni protein

RAP- kapacitet dodavanja sekvenci (engl. *repeat addition processivity)*

Sp1- transkripcijski faktor (engl. *specificity protein 1)*

Q-FISH- kvantitativna FISH hibridizacija

TERRA- telomerna ponavljanja koja sadrže RNA (engl. *telomeric repeat containing RNA)*

TF- transkripcijski faktor (engl. *transcription factor)*

TIF- telomerna žarišta (engl. *telomere dysfunction induced foci)*

TPP1- poznat kao TINT1(TIN2 INTERAKTING PROTEIN), PTOP (POT1 I TIN2 organizirajući proteini) i PIP1(POT1 interacting protein)

TIN2- telomerni protein (engl. *TRF1-Interacting protein 2*)

T-petlja- telomerna petlja (engl. *telomeric loop*)

TRF- analiza telomernih restrikcijskih odsječaka (engl. *Telomere Restriction Fragment*)

TRF1- faktor koji se veže na ponavljajuću sekvencu TTAGGG broj 1 (engl. *TTAGGG repeat binding factor 1*)

TRF2- faktor koji se veže na ponavljajuću sekvencu TTAGGG broj 2 (engl. *TTAGGG repeat binding factor 2*)

Tween 20- polisorbat 20-surfaktant

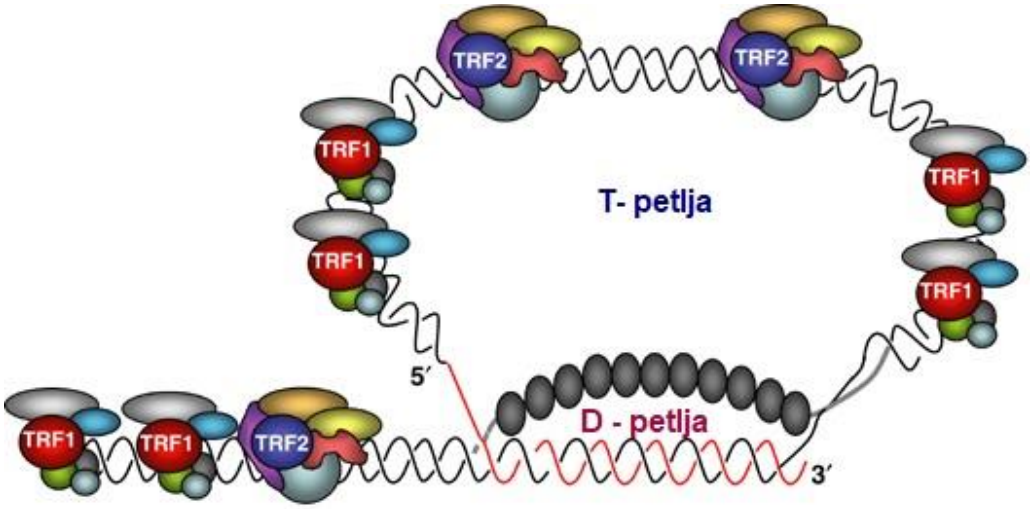
1. UVOD

1.1 Telomere

Normalne somatske stanice imaju ograničeni diobeni potencijal i taj je fenomen interpretiran kao starenje na staničnom nivou. Jedne od ključnih struktura u tom procesu su telomere, specijalizirane strukture na krajevima kromosoma, koje se skraćuju sa svakom diobom stanice. Telomere omogućuju raspoznavanje između kraja kromosoma i dvostrukih lomova (*eng. double strand break,* DSB) genomske DNA. DNA DSB-ovi su potencijalne katastrofične lezije. Ukoliko se ne poprave, DSB postaju metom za razgradnju. Stoga bez prepoznatljivih telomernih struktura, krajevi kromosoma postaju meta za razgradnju, rekombinaciju ili slučajnu fuziju od strane DNA sustava za popravke. Neprovjerena kromosomska degradacija nepovratno rezultira gubitkom genetičke informacije ili staničnom smrću. Rekombinacija telomera može rezultirati nereguliranim povećanjem ili smanjenjem duljine telomera, što naknadno može rezultirati preuranjenim aktiviranjem ili ukidanjem kontrolne točke starenja. Telomerna fuzija rezultira dicentričnim kromosomima koji se uvijek slome tijekom mitoze i pri tome stvaraju dodatne dvostruke lomove što u konačnici rezultira ciklusom lomova i stapanja što stvara genomsku nestabilnost (engl. *breakage-fusion-bridge (BFB) cycle*).

Telomere (Grčki: *telos*=kraj; *meros*=dio) su posebne strukture na krajevima linearnih kromosoma za čiju stabilnost su važne i DNA i proteini. Telomerni sljedovi DNA sastoje se od kratkih heksanukleotidnih, uzastopno ponavljajućih motiva. Ti ponavljajući motivi dobro su evolucijski sačuvani, a prisutni su u svim do sada ispitivanim eukariotima. Tako kod čovjeka i svih ostalih kralježnjaka u telomerama nalazimo ponavljajući TTAGGG slijed, a isti motiv se može naći i kod nekih praživotinja, gljivica kao i nekih beskralježnjaka (školjkaša i bodljikaša). Telomerni sljedovi izgrađeni su unutar jedne vrste od samo jednog motiva koji se uzastopno ponavlja stotine do tisuće puta na krajevima kromosoma. Većina telomernih sljedova je dvostruka DNA , ali postoji i kratka (svako 50 do 100 parova baza) jednolančana sa 3' krajem koji se nalazi na oba kromosomska kraja (Makarov i sur. 1997, recenzirani u Greideru 1996, Linger i Cech 1998, Wellinger i Sen 1997).

Duljina telomernih nizova TTAGGG dosta se razlikuje između različitih vrsta sisavaca (Greider 1996, Coviello-McLaughlin i Prowse 1997, Zijlmans i sur. 1997, Kakuo i sur. 1999, Campisi 2001). Na primjer u ljudskoj staničnoj liniji duljina telomera iznosi 15 do 20 kilobaza (kb). Osim kromosomskih aberacija, svojom strukturom sprječavaju i razne enzime koji bi ih mogli oštetiti i neophodne su za održavanje stabilnosti eukariotskog genoma (Blackburn 1991). Sve telomere završavaju s kratkim gvanin- bogatim jednolančanim 3' produžetkom, koji je kod telomera miša i čovjeka dug između 50 i 100 nukleotida (Klobutcher i sur. 1981). G-bogati 3' produžetak važan je za stvaranje telomerne petlje (t- petlja) (Griffith i sur. 1999) na krajevima kromosoma tako što napada dvolančanu telomernu DNA na granici telomerne i subtelomerne regije i tvori D-petlju (*eng. Displacement*) (Greider 1999), strukturu sličnu onoj kod homologne rekombinacije (Slika 1).



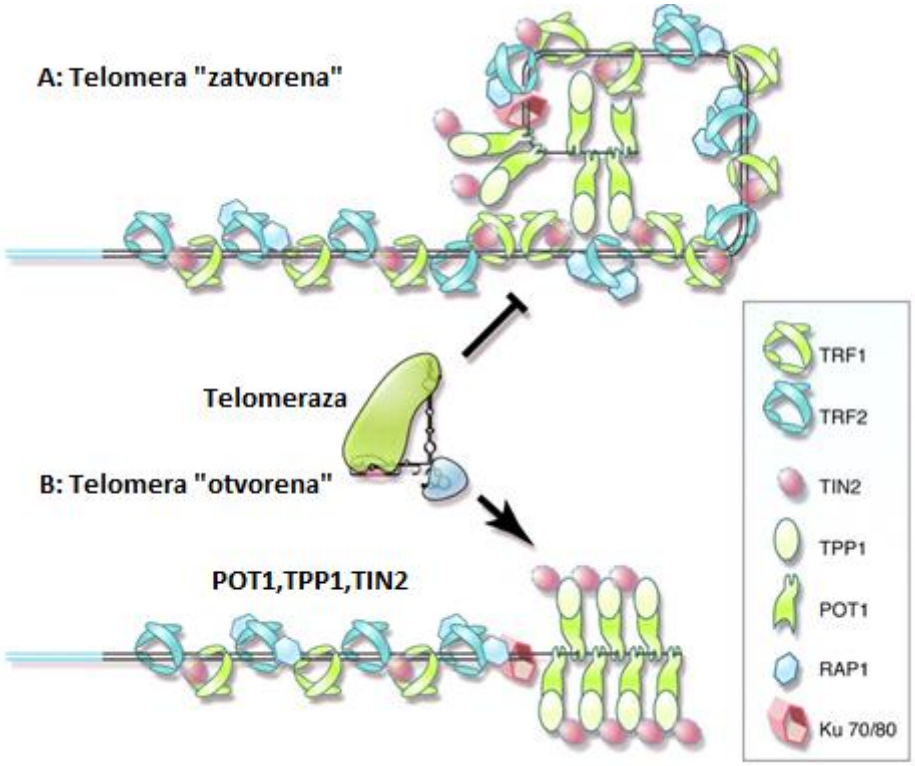
Slika 1. Telomerno-vezujući proteini. Shema prikazuje telomere u konformaciji T-petlje s različitim protein-kompleksima pronađenih kod telomera sisavaca. TRF1 kompleks utječe na duljinu telomera, TRF2 kompleks utječe na duljinu telomera i ograničenje telomera (Preuzeto: Blasco, 2005, The EMBO journal).

Veličina t-petlje je razmjerna duljini telomera i normalno iznosi ~15 kb kod ljudi. Pretpostavlja se da se t-petlja otvara za vrijeme replikacije DNA i onda opet zatvara. Minimalna duljina telomera za tvorbu t-petlje iznosi ~1 kb.

1.2 Telomerni asocirajući/vezni proteini

Telomere izmjenjuju dva stanja: otvoreno – dopuštaju elongaciju uz pomoć telomeraze; i zatvoreno stanje- nedostupno za telomerazu sa većima afinitetom prema otvorenom stanju što se može predvidjeti iz ponavljajućeg slijeda TTAGGG. Pri međudjelovanju telomeraze i

telomera veliki broj proteina je angažiran. Neki od proteina poput TRF1, TRF2, TIN2, TPP1, Rap1, i POT1, takozvani „ shelterini“ (De Lange T 2005), mogu se pronaći na telomerama u bilo kojem trenutku, iako je veoma dinamičan sam proces povezivanja proteina s telomerama. FRAP (engl. *fluorescence recovery after photobleaching*) istraživanja su pokazala kako se POT1 i TRF2 povezuju na telomernu DNA na dva načina : jedan nestabilan (brza izmjena sa nevezanim proteinima) i jedan stabilniji (spora izmjena sa nevezanim proteinima)(Aubert i Lansdorp 2008). Razlika u povezivanju ovisi o strukturi i prisutnosti proteina na samim telomerama, npr. jednostruka G-bogata DNA nasuprot dvolančanim telomernim ponavljanjima (Slika 2).

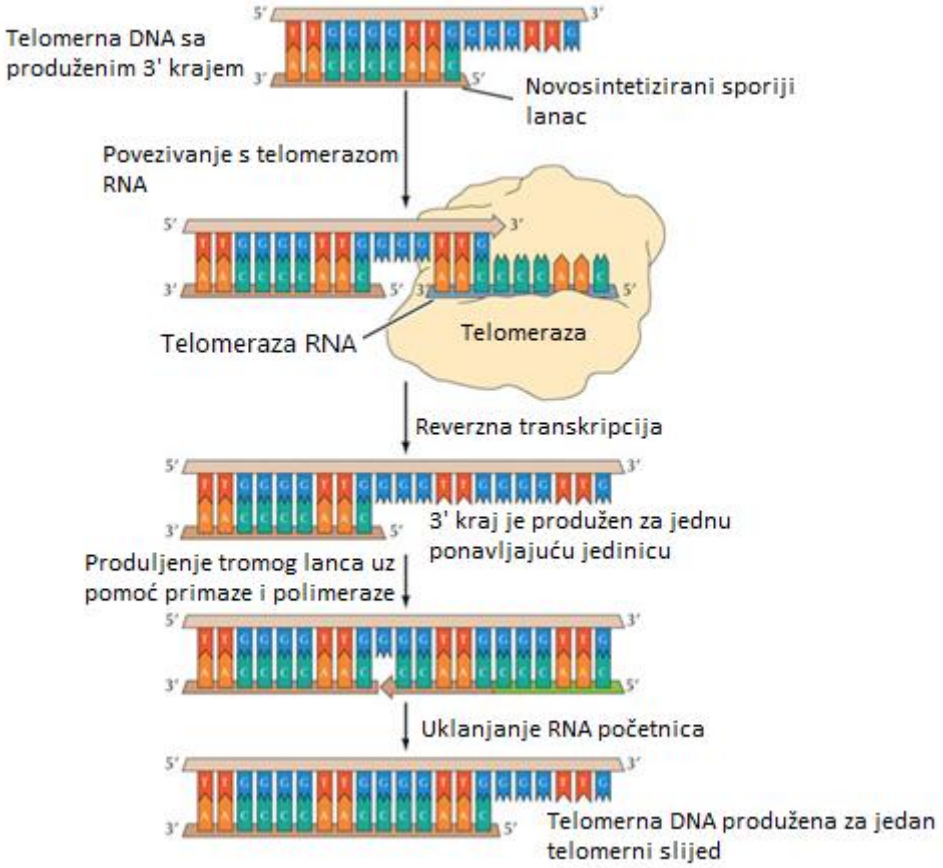


Slika 2. Funkcija telomera vezana je za duljinu telomera preko proteina koji djeluju u interakciji s dvostrukim telomernim ponavljanjima (homodimeri TRF1 I TRF2), proteini koji se vežu na 3' G-bogati jednostruki lanaca na samom kraju kromosoma (POT1) i proteini koji djeluju u interakciji s tim proteinima kao što su RAP1, TPP1 i TIN2, kao i kompleks Ku 70/80 prisutan na spoju jednolančane i dvolančane telomerne DNA

A) Telomere „zatvorene“. TPP1 i POT1 tvore kompleks sa telomernom DNA uz pomoć TIN2 te TRF1 i TRF2 ukoliko je dovoljna duljina ponavljajućeg slijeda telomera Poznato je da TRF1 i -2 imaju mogućnost savijanja telomerne DNA i pristup telomeraze je blokiran ovisno o duljini ponavljajućih slijedova.

B) Telomere „otvorene“. TPP1/ POT1 regrutiraju i stimuliraju enzimsku aktivnost telomeraze na kratkim telomerama (Preuzeto: Aubert i Lansdorp, 2008).

Zbog specifičnih svojstava DNA polimeraze, enzima koji sintetizira komplementarni lanac tijekom replikacije DNA, nakon svakog kruga replikacije genoma dio -3' kraja telomera, ~80-150 nukleotida, ostaje nesintetizirano. Naime, za započinjanje svake replikacije linearne molekule DNA nužna je klica, od koje na više mjesta na kromosomu počinje sinteza novoga lanca (Slika 3). Klica se potom uklanja, a tako nastale praznine popunjavaju se i povezuju u cjelovit novosintetizirani lanac. Kao klica služi kratka molekula RNA. S obzirom na to da DNA polimeraza dodaje nukleotide samo u 5'→3' smjeru, na taj se način ne može popuniti praznina na samom kraju dvolančane molekule DNA (lanac koji zaostaje), na kojem uvijek ostaje komplementarni jednolančani produžetak (Olovnikov 1971). U sljedećoj diobi molekula DNA se ponovno skraćuje za duljinu jednolančanog završetka.



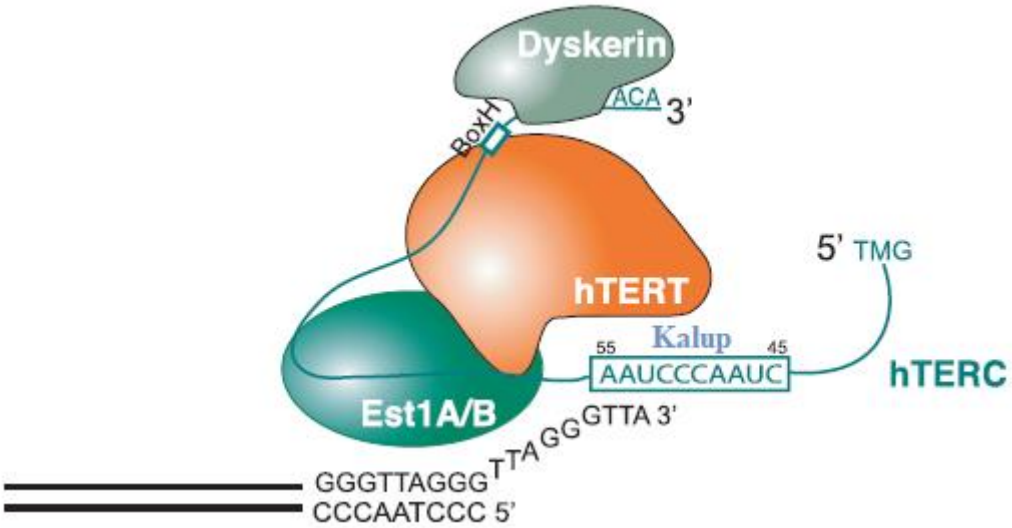
Slika 3. Produživanje telomera uz pomoć telomeraze (Preuzeto : Alberts i sur. 2002).

Tako se nakon svake stanične diobe telomere sisavaca djelomično skraćuju što je dokazano *in vitro* i *in vivo* (Blackburn 1991, Harley i sur. 1990). Postoji minimum tolerancije skraćivanja telomera, do ~2kb za normalne ljudske fibroblaste, ispod koje telomera više ne može ispuniti svoju zaštitnu ulogu. Telomere koje su skraćene do kritične dužine kontrolni mehanizam stanične diobe prepoznaje kao oštećenje DNA i aktivira inhibitore staničnog

ciklusa. Nakon toga stanica se trajno zaustavi u fazi G1 što nazivamo i staničnim starenjem. Smatra se da je dovoljno kritično skraćenje samo jedne telomere u stanici, da bi došlo do staničnog starenja (Hemann i sur. 2001).

1.3 Telomeraza

Telomeraza je specijalizirana reverzna transkriptaza koja ima mogućnost produljivanja 3' kraja kromosoma dodavanjem TTAGGG – ponavljajućeg slijeda. Telomeraza se sastoji od proteina reverzne traskriptaze (TERT) sastavljenog od 1,132 amino kiselina kojeg kodira gen hTERT (Harrington i sur. 1997, Meyerson i sur. 1997, Nakamura i sur. 1997) lociranog na kromosomu 5p15.33 i telomeraze RNA koja se sastoji od 451 nukleotida (uključujući CAAUCCCAAUC telomerni kalup) kodiranih RNA genom hTERC (Feng i sur. 1995), lociranom na kromosomu 3q21-q28. Ribonukleoprotein diskerin (kodiran genom DKC1 na X kromosomu) potreban je za pravilno savijanje i stabilnost telomeraze RNA (Wong i Collins 2006) te je ustanovljeno da je sastavni dio osnovne ljudske telomeraznog enzimskog kompleksa (Cohen i sur. 2007) (Slika 4). Reverzna transkriptaza i telomerazna RNA eksprimirane su pri niskim razinama kod polovične insuficijencije gena DKC1 ili mutacija u DKC1.



Slika 4. Struktura ljudske telomeraze (Preuzeto : Smogorzewska i de Lange 2004).

Telomeraza je aktivna u embrionalnim, matičnim stanicama, ali je neaktivna u većini somatskih stanica (Prowse i Greider 1995, Holt i sur. 1997, Kim i sur. 1999). Spada u porodicu reverznih transkriptaza i njezina katalitička podjednica je filogenetski konzervirana među vrstama i razlikuje se od ostalih reverznih transkriptaza po nekim karakteristikama. Tako su svi reverzno transkriptazni motivi smješteni u C-terminalnom dijelu proteina, sadrži konzerviranu telomerazno-specifičnu regiju nazvanu T-regija smještenu uz reverzno transkriptazne motive. N-terminalna regija sadrži konzervirane funkcionalno važne domene (Nakamura i sur. 1997).

Nedostatak telomeraze predstavlja problem prilikom dijeljenja stanica. Problem se temelji na trima svojstvima DNA replikacije. Prvo, replikacija je dvosmjerna (replikacija napreduje od ishodišta i prema 3' i 5' kraju). Drugo, DNA polimeraza je jednosmjerna (polimerizira samo u 5'-3' smjeru). Treće, DNA polimeraza zahtjeva početnicu, koja je kratki slijed RNA. Svaki ciklus DNA replikacije ostavlja ne nadomješteno 50 – 200 bp DNA na kraju svakog kromosoma. Pri potpunoj replikacji telomere podliježu ograničenoj 5'-3' egzonukleaznoj aktivnosti, stvarajući 3' privjeske na oba telomerna kraja. Zbog problema sa replikacijom na krajevima kromosoma, telomere i stanice bez telomeraze se skraćuju sa svakim staničnim ciklusom (Harley i sur. 1990). Skraćene telomere mogu uzrokovati starenje (nepovratno zaustavljanje rasta i promjenu funkcije stanice), staničnu smrt i genomsku nestabilnost zavisno o tipu stanice.

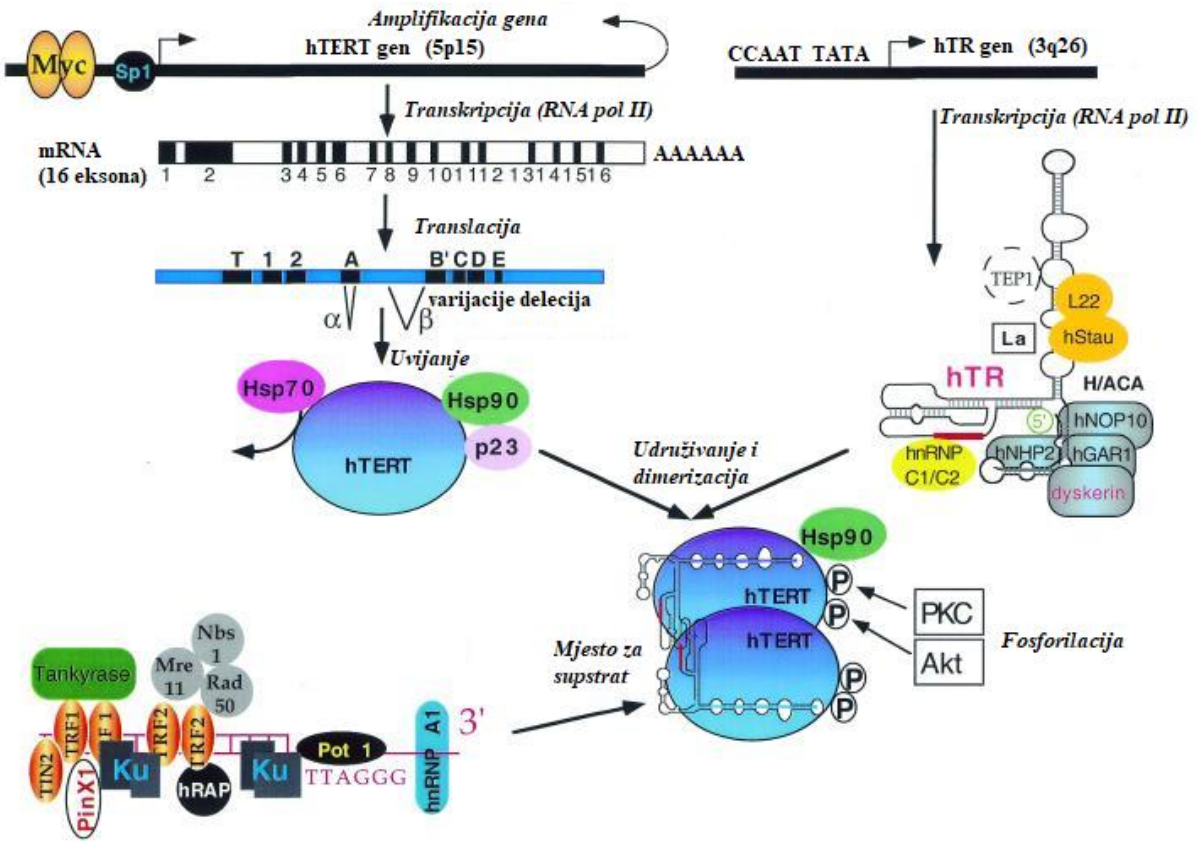
Telomeraza je prisutna u intrauterinom životu čovjeka u svim stanicama, ali nakon rođenja njezina aktivnost se gubi i ograničena je samo na spolne i matične stanice koje sudjeluju u obnavljanju tkiva kao što su stanice koštane srži, stanice bazalne membrane kože, folikula kose ili stanice kripte tankog crijeva (Wright i sur. 2001). Uvođenjem hTERT podjedinice telomeraze u normalne stanice uzrokuje produženje telomera i povećanje diobenog potencijala tih stanica (Bodnar i sur. 1998).

Neke adultne somatske stanice imaju eksprimiranu telomerazu iako to nije čest slučaj, pogotovo kod ljudskih stanica. Ljudske T stanice prolazno izražavaju telomerazu prilikom proliferacije (Buchkovich i Greider 1996, Weng i sur. 1996). Nadalje, zabilježena je aktivnosti telomeraze i kod fibroblasta (Harlebachor i Boukamp 1996). U T stanicama kod ljudi, usprkos prisutnosti telomeraze, telomere se skraćuju prilikom svake stanične diobe, iako sporije nego kod stanica koje uopće nemaju telomerazu. Telomeraza je aktivirana u oko 85% tumora (Shay

i sur. 1997) i stoga je važno razumijevanje mehanizama koji su uključeni u regulaciju, odnosno aktivaciju telomeraze u tumorskim stanicama, kao i njezinu inhibiciju u normalnim stanicama.

1.4 Regulacija telomeraze

Aktivnost telomeraze regulirana je u određenim ljudskim tkivima i dio je mnogih staničnih procesa. Aktivnost telomeraze je poboljšana u aktiviranim limfocitima (Buchkovich i Greider 1996, Liu i sur.1999) i endometrijskom tkivu tijekom menstrualnog ciklusa (Kyo i sur. 1997). Nasuprot tome, terminalno sazrijevanje ili diferencijacija stanica korelira se s represijom aktivnosti telomeraze (Xu i sur. 1996), ali ta dva događaju ne moraju biti u korelaciji u nekim slučajima (Pendino 2001). Niz izvanstaničnih ili unutarstaničnih signala modulira telomerazu, poput UV zračenje (Ueda i sur. 1997), kalcij (Bickenbach i sur. 1998), cink Nemoto i sur. 2000), interferon α (Xu 2000), estrogen (Misiti i sur. 2000) i citokin (Yang i sur. 2001). Ljudska telomeraza je sastavljena od dvije komponente : kalupa RNA koji tvori hTR i proteinske katalitičke podjedinice hTERT (Slika 5) (Weinrich i sur. 1997, Beattie i sur. 1998).



Slika 5. Asocirajući proteini su povezani s hTERT ili hTR i pomažu pri njihovom savijanju ili udruživanju. Različiti proteini stupaju u interakciji s telomernom DNA i sudjeluju u regrutaciji telomeraze. (Preuzeto: Mergny i sur. 2001)

1.4.1 Transkripcijska regulacija

Promotor hTERT je meta velikog broja signalnih puteva i povezuje na više razina gensku regulaciju. U normalnim stanicama, ekspresija hTERT je smanjenja: broj hTERT mRNA molekula po stanici je ispod granica osjetljivosti kvantitativnog RT-PCR (<0.004 molekule/stanici) u usporedbi sa 0.2-6 molekula hTERT RNA molekula za telomeraza pozitivne stanice (Ducrest i sur. 2001). Pojačana regulacija može biti posljedica epigenetskih promjena u genu hTERT.

Pri ekspresiji gena hTERT sudjeluju vrlo raznoliki transkripcijski faktori. Uključeni su Myc, Sp1, receptor za estrogen (Misiti i sur. 2000), E2F-1 (Crowe i sur. 2001), WT-1 (Oh i sur. 1999), NF-kB (Yin i sur. 2001) i MZF-2 (Fujimoto i sur. 2001).

Myc je najviše proučen od svih transkripcijskih faktora. Povećanjem ekspresije gena hTERT Myc potiče rad telomeraze (Wang i sur. 1998). Uočena je povezanost ekspresije gena hTERT sa prekomjernom ekspresijom Myc kod raka prostate u ljudi (Latil i sur. 2000) i cervikalnog tumora (Sagawa i sur 2001). Iako je transkripcijski faktor c-Myc direktni posrednik u aktivaciji telomeraze (Wu i sur. 1999, Greenberg i sur. 1999), postoje indikacije da c-Myc nije aktivan u ulozi posrednika pri aktivaciji telomeraze kod besmrtnih stanica (Drissi i sur. 2001). Prekomjerna ekspresija faktora c-Myc rezultira u značajnom povećanju transkripcijske aktivnosti promotora (Takakura i sur. 1999). Geni c-Myc su često neregulirani u tumorima kod ljudi te pri tome prekomjerna ekspresija c-Myc može uzrokovati reaktivaciju telomeraze. Međutim, TERT nije u mogućnosti zamijeniti c-Myc u transformaciji primarnih glodavaca, sugerirajući da se transformirajuće aktivnosti faktora c-Myc protežu izvan njegove sposobnosti da aktivira ekspresiju gena TERT, a time i aktivnost telomeraze (Greenberg i sur. 1999).

Proteini Myc i Mad1 imaju antagonistički učinak na transkripciju gena hTERT (Oh i sur. 2000). E-kutije na proksimalnom promotoru gena hTERT mobiliziraju se *in vivo* u eksponencijalno proliferirajućim HL60 stanicama pomoću faktora c-Myc. Nasuprot tome, protein Mad1 je induciran i vezan za hTERT promotor u diferenciranim HL60 stanicama. Ovi podaci sugeriraju kako je uzajamno korištenje Myc/Max E-okreta odgovorno za aktivaciju i suzbijanje gena hTERT (Xu i sur. 2001). Faktor Mad je induciran 12-O-tetradeaknoilforbol-13-acetat tretmanom, koji potiskuje promotor-reporter-gensku aktivnost gena hTERT (Gunes i sur. 2000).

Transkripcijski faktor Spl surađuje sa faktorom c-Myc kako bi se aktivirala transkripcija gena hTERT-a (Kyo i sur. 2000). Područje promotora na 3' kraju gena hTERT sadrži GC-kutiju (engl. *GC-box*), koja se spaja s transkripcijskim faktorom Sp1 i esencijalna je za transaktivaciju. Prekomjerna ekspresija transkripcijskog faktora Sp1 dovodi do značajne aktivacije transkripcije na način specifičan za određeni tip stanice. Interakcijom s faktorom p53 može se ukloniti vezivanje za transkripcijski faktor Sp1 što rezultira represijom gena hTERT (Kanaya i sur. 2000, Xu i sur. 2000).

1.4.2 Epigenetske modifikacije

Inhibiranje histon deacetilaze (HDAC) u stanicama bez telomeraze pomoću trihostatina (TSA) rezultira aktivacijom telomeraze i pojačanom regulacijom gena hTERT mRNA (Xu i sur. 2001, Cong i Bacchetti 2000, Takakura i sur. 2001). Ponovna aktivacija telomeraza zbog osjeltjivosti na TSA je moguće zbog regrutiranja histon deacetilaze (HDAC) uz pomoć heterodimera Myc/Mad (Laherty i sur. 1997). TSA ublažava represiju hTERT-a od strane Mad-a (Cong i Bacchetti 2000). Promotor hTERT bez E-kutije još uvijek pokazuje osjetljivost na TSA, što povećava mogućnost da drugi faktori, osim Myc/Mad, mogu regrutirati HDAC. Jedan od mogućih kandidata je transkripcijski faktor Sp1 (Cong i Bacchetti 2000, Takakura i sur. 2001), koji bi imao dvostruku ulogu u regulaciji transkripcije hTERT, kao aktivator i kao represor.

1.4.3 Regulacija i transkripcija hTERT

Regulacija aktivnosti telomeraze najčešće je povezana s regulacijom hTERT-a, prvenstveno na razini transkripcije, ali i posttranslacijske modifikacije. Ovo ima implikacije u staničnom razvoju i karcinogenezi (Cong i sur. 2002, Kim i sur. 1994), zbog aktivnost telomeraze i ekspresije gena hTERT koji je potreban za replikacijsku dugovječnost. Poznato je da je pravilno reguliranje promotora gena hTERT i njegove kasnije transkripcije važno za održavanje diferencijalnih bazalnih telomeraznih aktivnosti između različitih tipova stanica (Cong i sur. 2002, Kyo i sur. 2008). Neke od najčešćih mutacija kod ljudskih karcinoma su one unutar promotora hTERT (Bojesen i sur. 2013, Horn i sur. 2013, Huang i sur. 2013, Killela i sur. 2013, Fredriksson i sur. 2014, Weinhold i sur. 2014). Pretpostavlja se da je regulacija transkripcije gena hTERT ključna za kontrolu aktivnosti telomeraze, dok je posttranslacijska regulacija ključna za njegovo podešavanje (Cong i sur. 2002, Autexier i Lue 2006).

Suradnja širokog raspona hormonskih i nehormonskih regulatora očituje se u modulaciji transkripcije gena hTERT. Nedavno je objavljeno kako je hormon stresa norepinefrin potaknut faktorom c-Myc i hipoksijom induciranim faktorom (HIF)-α, što je pridonijelo invazivnosti i metastazi raka jajnika (Choi i sur. 2015). Fitoplanksin resveratrol, antioksidanas, smanjuje norepinefrin induciranu fosforilaciju src domene od strane protein kinaze A (PKA) i kasnijom ekspresijom HIF-a, čime se smanjuje ekspresija hTERT-a u staničnim linijama raka jajnika (Kim i sur. 2016).

1.5 Šaperonini

In vivo, dodatni čimbenici, osim hTR i hTERT, su neophodni za aktivnost i regrutaciju telomeraze (holoenzima) na telomere. Jedan takav ko-faktor za telomerazu je HSP90, visoko očuvani molekularni šaperon koji je uključen u regulaciju staničnog ciklusa, očuvanost kromosoma i druge signalne puteve (Toogun i sur. 2008, Jackson 2012). Ovaj protein pomaže hTERT na vezanje za komponentu hTR te vezanje telomeraze na DNA (Holt i sur. 1999, Keppler i sur. 2006, Toogun i sur. 2008). Chiu i sur. (2011) dokazali su kako inhibiranje HSP90 dovodi do inhibicije aktivnosti telomeraze i povećanja stupnja apoptoze. HSP90 zajedno s ostalim komponentama toplinskog šoka (HSP70, p60/Hop, HSP40 i p23) eksprimiranog u *E.coli* s hTERT i hTR može rekonstruirati aktivnost telomeraze, dok inhibiranje HSP90 nakon sastavljanja telemeraze ne utječe na njenu aktivnost (Hansen i sur. 2016). Komponenta p23 tvori kompleks s HSP90 te također utječe na regulaciju telomeraze (Holt i sur. 1999, Forsythe i sur. 2001, Makhnevych i Houry 2012). Oba šaperona, (HSP90 i komponenta p23) postižu stabilno povezivanje s N-terminalnim dijelom hTERT-a i ostaju povezani s aktivnom telomerazom nakon što je hTERT ostvario pravilno uvijanje. Ovi šaperonini djeluju na regulaciju telomerazne aktivnosti i nakon stvaranja same telomeraze (Forsythe i sur. 2001).

1.6 Održavanje telomera telomerazom

Telomeraza hTERT se veže na telomeru za hibridizacijsko područje uzvodno od hTR DNA kalupa. Slijedi RNA/DNA hibridizacija na 3' telomernom kraju s RNA kalupom (koji je komplementaran s dva telomerna ponavljanja), telomerazni kompleks dodaje kratke telomerne ponavljajuće sekvence. Kalup hTR se reverzno transkribira u DNA uz pomoć katalitičke aktivnosti hTERT-a, pri čemu se stvaraju kratka telomerna ponavljanja (TTAGGG). Novi lanac se translocira u 5' smjer za procesivnu sintezu dodatnih telomernih ponavljanja na istom telomernom kraju. Važno je razlikovati samu aktivnost telomeraze, tj. sposobnost produživanja telomera dodavanjem kratkih telomernih ponavljanja na G-bogat jednostruki zavijeni lanac od RAP-a. RAP(engl. *repeat addition processivity*) je jedinstveni kapacitet hTERT-a za dodavanje višestrukih telomernih sekvenci na istom telomernom supstratu bez kompletne disocijacije. Ovaj proces je ograničen sposobnošću enzima da translocira i komplementira DNA/RNA hibridizaciju nekoliko nukleotida nizvodno od njegovog početnog mjesta (Qi i sur. 2012, MacNeil i sur. 2016).

1.6.1 hTERT

hTERT sadrži bitne elemente za aktivnost telomeraze i RAP. Domena TEN hTERT-a djeluje kao mjesto za sidrenje telomeraze na jednolančanu DNA, pored primera (Lue 2004, Moriarty i sur. 2005). On regulira telomerazu, RAP, jer je ova domena neophodna za stabilnost RNA/DNA hibrida na telomeri. Mutacije u području domene TEN smanjuju stabilnost RNA/DNA hibrida i rezultiraju propalim telomernim produživanjem (Akiyama i sur. 2015). Utjecaj domene IFD (engl. *insertion in fingers domain*) na aktivnost telomeraze i procesivnost može se dogoditi uslijed neispravne interakcije hTERT-a s kompleksom TPP1-POT1. Osim uloge u regrutaciji TPP1 može regulirati telomerazu kao faktor procesivnosti (Wang i sur. 2007). Heterodimer TPP1/POT1 povećava procesivnost telomeraze kroz OB (engl. *oligonucleotide-binding*) domene TPP1 (Nandakumar i sur. 2012, Sexton i sur. 2012, Kocak i sur. 2014, Schmidt, Dalby i Cech 2014, Sexton i sur. 2014). Kompleks TPP1/POT1/hTERT održava se tijekom elongacije telomera i translocira se na jednolančanu telomernu DNA. Protein POT1 (engl. *protection of telomeres protein 1*) može djelovati kao inhibitor telomernog produljivanja vezivanjem na 3' kraj jednolančanog presjeka, ali i aktiviranjem kompleksa za popunjavanje CTC1/STN1/TEN1 (CST), blokirajući telomerazi pristup telomerama. Stoga je on regulator aktivnosti telomeraze i RAP-a, bilo promicanjem njegove translokacije duž G-

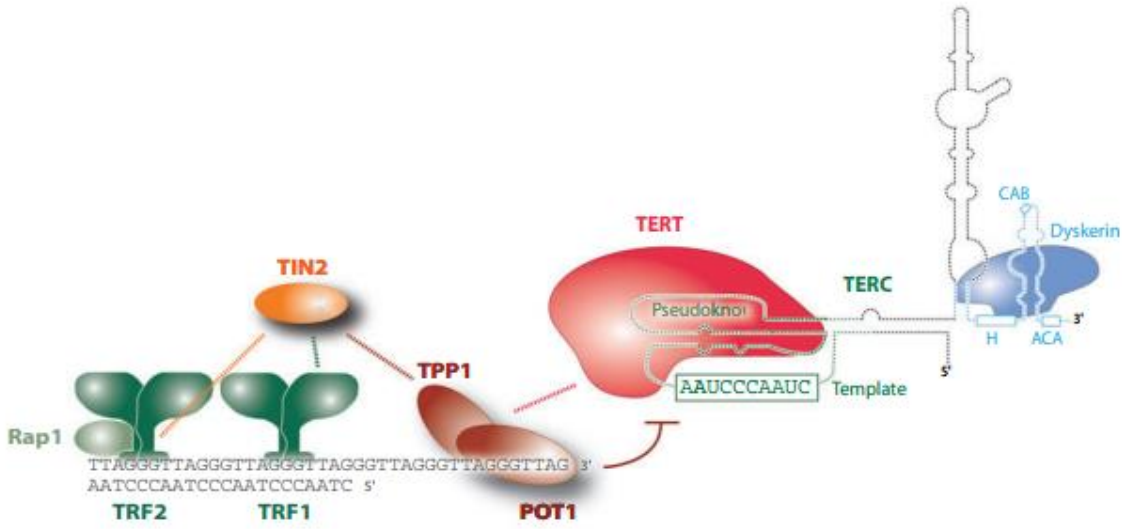
obogaćenog lanca dok je vezan protein TPP1 ili djelujući kao “STOP“ znak na kraju telomera jednolančane DNA kada nije potrebna telomeraza (Baumann i Price 2010, Gomez i sur. 2012).

1.6.2 hTR

Mnoge domene hTR također su neophodne za pravilno produljenje telomera (Zhang i sur. 2011). Takozvana domena „pseudočvora“ (engl. *pseudoknot*) sadrži predložak regije za sintezu DNA i strukturu „pseudočvora“ koja označava kraj kalupa regije. Mutanti telomeraze RNA smanjuju aktivnost telomeraze (Mitchell i Collins 2000, Chen i sur. 2002) iako, samo njihova potpuna delecija može inhibirati regrutiranje i aktivnost telomeraze. Također primijećeno je da nemogućnost vezivanja hTR na telomernu DNA rezultira ukidanjem aktivnosti telomeraze (Yeo i sur. 2005). Moriarty i sur. (2004) pokazali su kako hTR mutanti ne utječu direktno na telomeraznu aktivnost već na interakciju vezne regije RNA i hTERT-a. Domena P1b hTR-a, koja je predložak petlje koja sprječava reverznu transkripciju ne-telomernih sekvenci (Autexier i sur. 1996, Prescott i Blackburn 1997, Lai i sur. 2002), je hTR strukturni element koji je ključan za aktivnost telomeraze. Mutanti sekvence P1b dovode do smanjenja aktivnosti reverzne transkriptaze hTERT-a (Moriarty i sur. 2005).

1.6.3 Telomerni proteini (engl. *shelterin complex*)

Telomerni proteini specifični su za telomernu DNA, prisutni su u svim fazama staničnog ciklusa i imaju funkciju koja je strogo usmjerena isključivo na telomere (Chong i sur. 1995). Imaju važnu ulogu u zaštiti, produživanju i regulaciji telomera. Navedeni proteini tvore kompleks nazvan „shelterin“, a čine ga TRF1, TRF2, Rap1, TIN2, POT1 i TPP (Chong i sur. 1995) (Slika 6). Članovi shelterina su postepeno identificirani tijekom proteklih 18 godina.



Slika 6. Proteini shelterina. Model regulacije aktivnosti telomeraze uz pomoć POT1 i TPP1. TPP1 ima direktnu povezanost s telomerazom te potiče regrutiranje i vezivanje enzima s telomerazom. POT1 se smatra negativnim regulatorom telomeraze zbog svoje sposobnosti kompetitvnosti s enzimima za 3' telomerni kraj. (Preuzeto : Palm i De Lange, 2008)

Prvi telomerni protein TRF1 otkriven je na temelju svog *in vitro* afiniteta za dvolančanu sekvencu TTAGGG, tipičnu za telomere svih kralješnjaka. Protein TRF2 je identificiran kao paralog TRF1 po bazi podataka, a TIN2 i Rap1 pomoću dvohibridnih analiza s TRF1 i TRF2. Protein TPP1 je identificiran na temelju svoje interakcije s TIN2. Najkonzerviraniji protein shelterina, POT1, je identificiran na temelju homologije svoje sekvence sa sekvencama telomernih proteina u jednostaničnim eukariotima.

Na telomerama su pronađeni i mnogi drugi proteini, koji imaju poznate ne telomerne funkcije i prisutniji su u većim količinama na drugim mjestima u jezgri i citoplazmi nego na telomerama (Palm i de Lange 2008). Većina tih proteina je uključena u transakcije s molekulom DNA, kao što su popravak DNA (Ku70/80, XPF/ERCC1, Apollo, Mre kompleks, RAD51D, PARP1 i PARP2), signaliziranje oštećenja DNA (Mre11 kompleks, 9-1-1 kompleks), replikacija DNA (RecQ helikaze), te kromatinski strukturni proteini (HP1 proteini). Točna funkcija na telomeri samo nekih od ovih proteina je poznata (Palm i de Lange 2008).

Telomerni proteini mogu igrati važnu ulogu tijekom produživanja telomera. Direktnu enzimatsku stimulacijsku ulogu imaju TPP1/POT1. Pokazalo se kako TRF1 I TRF2 uglavnom djeluju kao negativni regulatori na telomere (Van Steensel i de Lange 1997). Utišavanje tih gena dovodi do telomernog produljivanja, a njihova prekomjerna ekspresija je negativno povezana s duljinom telomera (Van Steensel i de Lange 1997, Nandakumar i Cech 2013). Oni ne utječu izravno na aktivnost telomeraze već na raspoloživo stanje telomernog supstrata. Njihovo vezivanje na dvolančanu telomernu DNA potiče formiranje telomernih petlji (t-petlji) zaštitne sekundarne telomerne strukture, koje blokiraju telomernu vezujuću regiju i njihovo produljenje. U većoj mjeri se nalaze na duljim telomerama nego na kratkim telomerama, što znači da su kratke telomere dostupnije za produljivanje (Smogorzewska i sur., 2000).

Protein AKT kojeg kodira gen AKTIP (engl. *AKT-interacting protein* , AKTIP) djeluje u interakciji s TRF1 i regrutira se na telomerama. U HeLa stanicama raka, smanjenja aktivnost AKTIP-a uzrokuje zastoj u sintezi DNA (Burla i sur. 2015). Delecija AKTIP-a također rezultira s lomljivim telomerama i potiče formiranje telomerna DNA oštećenja (telomernih induciranih žarišta, TIF).

Ekstrakcija PinX1 povećava aktivnost telomeraze in vivo i prekomjernu ekspresiju njegove C-terminalne domene koja potpuno inhibira aktivnost telomeraze u stanicama koje sadrže telomerazu dok kod telomeraza negativnih stanica nema učinka (Zhou i Lu 2001).

1.6.4 TERRA

TERRA (engl. *Telomeric repeat-containing RNA*) je nekodirajuća RNA kodirana subtelomernom DNA i završava u telomernim ponavljanjima (Azzalin i sur. 2007, Schoeftner i Blasco 2008). Telomerna RNA može potencijalno konkurirati telomernom supstratu za

interakciju s telomerazom (Schoeftner i Blasco 2008, Redon i sur. 2010). TERRA ima jači afintitet za hTR od telomerne DNA (Azhibek i sur. 2016). Osim toga, pretpostavlja se da TERRA nije ograničena formiranjem struktura koje blokiraju telomerazu kao što su T-petlje (Azhibek i sur. 2016). Transkripcija nekodirajućih RNA u kvasca je potaknuta skraćivanjem telomere (Cusanelli i sur. 2013).

Veći afinitet TERRE prema telomerazi omogućava produljivanje kratkih telomera u kvasca *S.cerevisiae*. TERRA se može regrutirati na kromosomske krajeve uz pomoć TRF2 interakcije s N-terminalnim glicin/arginin obogaćenim dijelovima (GAR) i MYB- tip DNA-vezujuće domene (C-terminalne MYB) TRF2 (Deng i sur. 2009). Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se razmotrila prava uloga TERRE u regulaciji aktivnosti ljudske telomeraze na telomeru.

1.7 Skraćivanje telomera, rak i starenje

Normalne diploidne stanice gube telomere sa svakim dijeljenjem stanice i zbog toga imaju ograničen životni vijek u kulturi. Tkivo ljudske jetre godišnje izgubi 55 parova baza telomerne DNA (Takubo i sur. 2000). Ekspresija statimina i EF-1a, biomarkera za disfunkciju telomera i oštećenost DNA u stanicama, povećavaju se starenjem i starosnim bolestima u ljudi (Jiang i sur. 2008, Song i sur. 2010). Telomerna duljina negativno korelira sa godinama dok ekspresija p16 koji se povećava u starijim stanicama, pozitivno korelira sa starenjem (Jiang i sur. 2008, Song i sur. 2010).

Ubrzano skraćivanje telomera kod genetskog poremećaja s poremećajem diskeratoze povezano je s ranom pojavom nekoliko poremećaja povezanih s dobi i smanjenim životnim vijekom. Telomerazna aktivnost, sposobnost dodavanja telomernih ponavljanja na krajeve kromosoma, prisutna je u embrionalnim, hematopoetskim, matičnim i određenim tipovima stanica koje se regeneriraju, ali odsutna je u većini somatskih stanica. Transgenična indukcija telomeraznog gena u normalne ljudske stanice produljuje njihov životni vijek (Bodnar i sur. 1998). Cawthon i sur. (2003) (Cawthon i sur., 2003) dokazali su da pojedinci s kraćim telomerama imaju znatno slabiji opstanak zbog veće stope umiranja uzrokovane srčanim ili zaraznim bolestima. Progresivno skraćivanje telomera dovodi do starenja, apoptoze, stanične smrti ili onkogene transformacije somatskih stanica u različitim tkivima. Duljina telomera, na

koju mogu utjecati razni čimbenici načina života, može odrediti cjelokupno zdravlje, životni vijek i tempo kojim pojedinac stari (Babizhayev i sur. 2011).

Kao normalni stanični proces, telomerna duljina opada sa godinama (Brouilet i sur. 2003, Valdes i sur. 2005). Stopa kojom se godišnje skraćuju telomere kod ljudi iznosi 24.8-27.7 baza (Brouilette i sur. 2003, Valdes i sur. 2005). Duljina telomera ovisi o godinama (Frenck i sur. 1998), genetici, epigenetici i okolišu (Steinert i sur. 2004, Cell i de Lange 2005, Muñoz i sur. 2005, Benetti i sur. 2007), socijalnom i ekonomskom statusu (Adams i sur. 2007, Cherkas i sur. 2008), vježbanju (Cherkas i sur. 2008), težini (Valdes i sur. 2005, Nordfjäll i sur. 2008) i pušenju (Nawrot i sur. 2004, Valdes i sur. 2005). Kada telomera dosegne određenu kritičnu duljinu podvrgnuta je apoptozi (Wang i sur. 1999, Stiewe i Pützer 2001).

Nekoliko studija pokazuju kako su kraće telomere predispozicija za stvaranje karcinoma. Pojedinci s kratkim telomerama imaju veći rizik od razvoja karcinoma pluća, mokraćnog mjehura, bubrežnih stanica, glave i vrata (Wu i sur. 2003, McGrath i sur. 2007). Pojedinci mogu biti rođeni s kratkim telomerama ili mogu imati genetski poremećaj koji dovodi do kratkih telomera. Takvi pojedinci imaju veći rizik od razvoja koronarne bolesti srca i preranog starenja (Brouilette i sur. 2003, 2007). Nedostatak telomeraznog RNA gena u genetskom poremećaju dyskeratosis congenita (DKC) dovodi do kraćih telomera i povezana je s preuranjenim sjedenjem kose, predispozicijom za razvoj karcinoma, ranjivost na infekcije, progresivno zatajenje koštane srži i preranu smrt kod odraslih (Vulliamy i sur. 2001).

Bavljenjem tjelovježbom obrnuto korelira s biomarkerima za oštećenje DNA i telomera i s ekspresijom p16, biomarkerom za starenje ljudskih stanica (Song i sur. 2010). Vježba može smanjiti štetne masnoće i pomoći mobilizirati otpadne proizvode radi bržeg uklanjanja, što dovodi do smanjenog oksidativnog stresa i očuvanja DNA i telomera. Vježbanje je povezano s povišenom telomeraznom aktivnošću i supresijom nekoliko apoptoznih proteina uključujući p53 i p16 (Werner i sur. 2009). Usporedbom leukocita sportaša i nesportaša utvrđena je povećana aktivnost telomeraze i smanjene skraćivanja telomera kod sportaša (Werner i sur. 2009). Vježba je povezana sa smanjenem razine oksidativnog stresa i povišenom ekspresijom stabilizirajućih proteina telomera, stoga može smanjiti tempo starenja i dobno-vezujućih bolesti.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja ovog diplomskog rada su:

1. Osmisliti analiziranje intenziteta telomernih signala dobivenih putem Q-PNA-FISH tehnike uz pomoć programa Photoshop i Fiji.
2. Napraviti kvantitativnu analizu duljine telomera te analizirati relativnu distribuciju telomera metafaznih kromosoma prije i nakon tretmana sredstvom protiv starenja (engl. *anti-aging agent p19*).
3. Usporediti razlike u jačini intenziteta telomernih signala kod tretiranih i ne tretiranih stanica fibroblasta.
4. Usporediti razlike u jačini intenziteta telomernih signala kod tretiranih stanica fibroblasta starog i mladog donora.
5. Analizirati varijabilnost razlika kvantiziranih telomernih signala u odnosu na kategorije razreda duljina telomera kod ukupnog tretmana, uzimajući u obzir spol i starost te tretiranost samih preparata.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1 Osnovne kemikalije

Etanol, formaldehid, formamid, klorovodična kiselina (HCl), kalijev klorid (KCl), kolcemid, kalijev hidrogenfosfat (KH_2PO_4), metanol, magnezijev klorid ($MgCl_2$), maleinska kiselina, natrijev klorid (NaCl), natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4), natrijev citrat, octena kiselina, Tris-Cl, Tween-20 (P1379, Sigma), Dulbecco-jev fosfatni pufer (DPBS, Sigma, D8537)

3.1.2 Kompleti, enzimi, nukleotidi, proteini

Pepsin (Fluka, 77160)

Tripsin (Sigma)

Kolcemid (Otopina 10 µg/mL, Serva)

Cy3 –$(CCCTAA)_3$ PNA telomerna sonda (Panagene)

Blokirajući reagens (Roche)

DAPI sa sredstvom protiv izbljeđivanja (engl. *Fluoroshield with DAPI* , Sigma, F6057)

3.1.3 Hranjive podloge

Dulbecco modificirani minimalni medij (engl. .*Dulbecco's modified Eagle's medium*, DMEM) s 4500 mg/L glukoze, L-glutaminom, fenolnim crvenilom i 3,7 g/L $NaHCO_3$, obogaćen s 10% telećim fetalnim serumom (engl. *Fetal Bovine Serum*, FBS)

3.1.4 Stanične linije

Primarne stanice fibroblasta iz kože dvaju donora:

- FX_24_M_13 – muška osoba starosti 24 godine
- FX_75_FA_8 – ženska osoba starosti 75 godina

3.1.5 Priprema kemikalija

- **Fiziološka pufer otopina fosfata (engl. *Phosphate – buffered saline,* PBS)**

Za pripremu PBS otopine potrebno je otopiti u 800 ml destilirane vode 8 g natrijeva klorida (NaCl), 0.2 g kalijeva klorida (KCl), 1.44 g natrijeva hidrogenfosfata (Na_2HPO_4) i 0.24 g kalijeva hidrogenfosfata (KH_2PO_4). Potrebno je podesiti pH vrijednost na 7.4 dodavanjem klorovodične kiseline (HCl) i nadopuniti destiliranom vodom do ukupne vrijednosti 1 litre. Kako bi sterilizirali otopinu potrebno ju je autoklavirati 20 minuta pod tlakom na 120°C te potom pohraniti na sobnoj temperaturi.

- **Priprema 1 M HCl**

Za pripravu 1 M HCl ukupnog volumena od 100 mL potrebno je pomiješati 8.285 mL 36% HCl i 91.715 mL destilirane H_2O.

Za pripravu 0.01 M HCl ukupnog volumena 50 mL potrebno je 0.5 mL 1 M HCl i 49,5 mL destilirane H_2O.

- **Priprema 10% otopine pepsina**

Potrebno je otopiti 0.1 g praha pepsina u 1 mL destilirane vode.

- **Otopina pepsina (0.005%)**

Kako bi imala maksimalnu učinkovitost, otopinu pepsina, je potrebno pripremiti i neposredno nakon pripreme odmah iskoristiti. Za pripravu otopine pepsina ukupnog volumena 50 mL potrebno je 2.5 ml 10% otopine pepsina, 0.5 ml 1 M klorovodične kiseline (HCl) te 47 ml destilirane vode. Prije korištenja zagrijati na 45°C.

- **PNA hibridizacijski pufer**

Tablica 1. Priprema osnovnih kemikalija

Reagens	**Masa (g)**	**Volumen H_2O**	**Konačna koncentracija**
Na_2HPO_4 (pH=7.4)	14.196 g	100 mL	1 mol/dm^3
Tris – Cl	12.114 g	100 mL	1 mol/dm^3
NaCl	29.22 g	100 mL	5 mol/dm^3

- **PNA Sonda**

PNA liofilizirana sonda otopljena je u 0.5 mL sterilne destilirane vode kako bi se postigla koncentracija 67 µg/mL (5 nM). Neposredno prije dodavanja u hibridizacijsku otopinu koncentriranu PNA sondu preporuča se promiješati vorteksiranjem dvije minute, zagrijati 5 minuta na 70°C uz lagano miješanje na termo bloku te centrifugirati 3 - 4 minute na maksimalnoj brzini.

- **Blokirajući reagens**

Za pripremu 1 mL blokirajućeg reagensa potrebno je otopiti 0.1 g blokirajućeg reagensa u 30 µL 5M NaCl i 930 µL maleinske kiseline (0.012 g maleinske kiseline u 970 mL sterilne destilirane vode).

- **PNA Hibridizacijska otopina**

Za pripremu 1 mL hibridizacijske otopine korištene su sljedeće otopine.

Tablica 2. PNA hibridizacijska otopina

Reagens	**Početna koncentracija**	**Konačna koncentracija**	**Volumen (µL)**
Na_2HPO_4 (pH=7.4)	1 M	10 mM	10 µL
NaCl	5 M	10 mM	2 µL
Tris – Cl (pH=7.4)	1 M	20 mM	20 µL
formamid		70 %	700 µL
PNA sonda	67 µg/mL	800 ng/mL	11.94 µL
Sterilna destilirana voda			206.06 µL
Blokirajući reagens	10%	0.005 %	50 µL

- **Otopine za ispiranje**

Otopina za ispiranje 1

Za ukupni volumen od 200 mL potrebno je 140 mL otopine formamida (70%), 4 ml Tris-Cl (1 M, pH=7.4) te 56 mL H_2O.

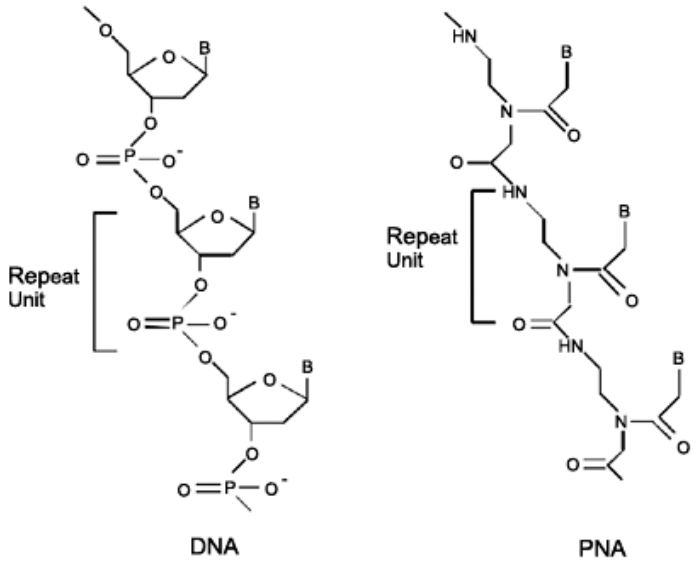
Otopina za ispiranje 2

Za ukupni volumen od 200 mL potrebno je 10 mLTris (1M, pH=7.4), 6 mL NaCl (5 M), 100 µL Tween – 20 te 184 mL destilirane H_2O.

3.1.6 PNA telomerna proba

Peptidno nukleinska kiselina je umjetno stvoreni polimer sličan DNA ili RNA. Kreirali su je 1991. godine Peter E. Nielsen (sveučilište Kopenhagen), Michael Egholm (sveučilište Kopenhagen), Rolf H. Berg (Risø Nacionalni laboratorij) i Ole Buchardt (sveučilište Kopenhagen) (Nielsen i sur. 1991).

DNA i RNA molekule sadrže šećere deoksiribozu i ribozu u svojoj okosnici. PNA sonda u svojoj strukturi umjesto šećera riboze i deoksiriboze ima ponavljajuće jedinice *N*-(2-aminoetil) glicina međusobno povezane peptidnom vezom (slika 7.). Purinske i pirimidinske baze povezuju se na okosnicu PNA uz pomoć metilenskog mosta (-CH2-) i karbonilne grupe (-(C=O)-). PNA sonda ima N- terminalni kraj na prvoj lijevoj poziciji i C- terminalni kraj na zadnjoj desnoj poziciji poput peptida (Egholm i sur. 1993).



Slika 7. Struktura DNA i PNA oligonukleotida (Preuzeto: Wang i Xu, 2004)

Korištenje PNA sonde ima nekoliko prednosti. Izmjenom lanca sličnog DNA (naboj na C- i N- terminalnim krajevima lako je promijeniti kako bi prema vani bili neutralni) može se izbjeći elektrostatsko odbijanje između tog sličnog lanca i negativno nabijene DNA ili RNA. Nadalje, oligomeri izgrađeni od izmijenjenih amino kiselina koje su „građevne jedinice“ (PNA monomeri) mogu se proizvesti uz pomoć razrađenih protokola za sintezu peptida krute faze, u količinama od miligrama do grama. Glasničke skupine, interkalatori ili metalni vezači mogu

se povezati na N- terminalnu amino grupu ili C- terminalni karboksilni kraj. I najveća prednost PNA je visoka biostabilnost. PNA oligomeri ne mogu razgraditi ni nukleaze niti proteaze. PNA je akiralna molekula što dodatno umanjuje probleme enantiomerske čistoće.

Svojstva PNA - DNA dvostrukog lanca najbolje su proučena na pentadekameru H-TGTACGTCACAACTA-NH_2 (Egholm i suradnici, 1993). Taj oligomer tvori dupleks sa komplementarnom antiparalernom DNA (antiparalelno: amino kraj PNA je paralelan sa 3´ krajem oligonukleotida). Bitno svojstvo PNA – DNA dupleksa je veliki afinitet za antiparalelno spajanje. Proučavanjem kinetike samog spajanja koje je uključivalo kapilaranu gel elektroforezu, pokazalo se kako je stvaranje PNA – DNA dupleksa iznimno brzo (manje od 30 sekundi). Termalna stabilnost PNA – RNA dupleksa je konstantno neznatno veća od iste određene za PNA – DNA dupleks (Hyrup i Nielsen, 1996).

Okosnica PNA ne sadrži nabijenu fosfatnu grupu, povezivanje između PNA – DNA lanaca je snažnije nego između DNA – DNA lanaca, zbog nedostatka elektrostatskih odbijanja. Zbog takve prirode PNA – DNA je hidrofobna zbog čega ju je teže dostaviti u tjelesne stanice putem otopine. Stanična membrana je negativno nabijena, pozitivno nabijene molekule poput DNA i RNA oligonukleotida privučene su staničnom stjenkom te putem endocitoze prolaze kroz stanični zid. Nasuprot tome, neutralna molekula PNA nije privučena negativno nabijenom staničnom stjenkom što ima za posljedicu slabu prodiranje kroz membranu (Wang i Xu, 2004). Ranija istraživanja sa homopiridinskim lancima (lanci koji su se sastojali samo od jedne ponavljajuće pirimidinske baze) pokazala su da je T_m (temperatura taljenja) 6-baznog timin PNA/ adenin DNA duplog lanca 31°C u usporedbi s ekvivalentnim 6- baznim DNA/DNA dupleksom koji se denaturira na temperaturi manjoj od 10°C. PNA molekule su istinske kopije DNA molekula po pitanju prepoznavanja parova baza. PNA – PNA veza je jača od PNA – DNA veze.

3.1.7 Primarne stanice fibroblasta

Primarne stanice su izravno izolirane iz ljudskog ili životinjskog tkiva primjenom enzimatskih i mehaničkih postupaka (slika 8). Imaju isti kariotip i broj kromosoma kao one u izvornom tkivu. Nakon izoliranja smještaju se u umjetne uvjete u plastičnim ili staklenim posudama koje sadrže specijalizirani medij sa esencijalnim hranjivim tvarima i faktorima rasta kako bi im se omogućila nesmetana proliferacija. Postoje dva tipa primarnih stanica: adherentne i suspendirane. Adherentne stanice zahtijevaju sidrište za rast i ovisne su o njemu. Adherentne stanice su najčešće izolirane iz tkiva ili organa. Suspendirane stanice ne zahtijevaju sidrište za rast. Suspendirane stanice se izoliraju iz krvožilnog sustava.

Stanice koje nastaju iz primarnih stanica imaju ograničeni životni vijek. Stanice se ne mogu uzgajati na neodređeno vrijeme zbog nekoliko razloga. Povećanje broja stanica u primarnoj kulturi dovodi do iscrpljivanja supstrata i hranjivih tvari. Osim toga, poveća stanična aktivnosti do koje dolazi uslijed povećanja broja stanica, dovodi do postepenog povećanja stupnja toksičnosti koji potječe od metabolita čim se sprječava daljnji rast stanica.

Stanične linije su desetljećima igrale važnu ulogu u znanstvenim istraživanjima jer su dopuštale puno veću kontrolu nad manipulacijama staničnih funkcija i procesa. Mana takvog materijala za istraživanje je interpretacija dobivenih rezultata zbog pogrešne identifikacije i kontaminacije staničnih linija. Osim toga stanične linije se razlikuju genetski i fenotipski od tkiva iz kojeg su potekle, te često pokazuju i unutar iste stanične linije različitu morfologiju. Iako stanične linije imaju neograničen životni vijek, zbog svojih nedostataka ponovo se pojavio interese znanstvenika za primarne stanice koje imaju konačan životni vijek i ograničen broj dijeljenja. Ono što ih čini kvalitetnim materijalom za provođenjem istraživanja jest to da imaju normalnu staničnu morfologiju i sadrže većinu bitnih faktora i funkcija poput stanica *in vivo*.

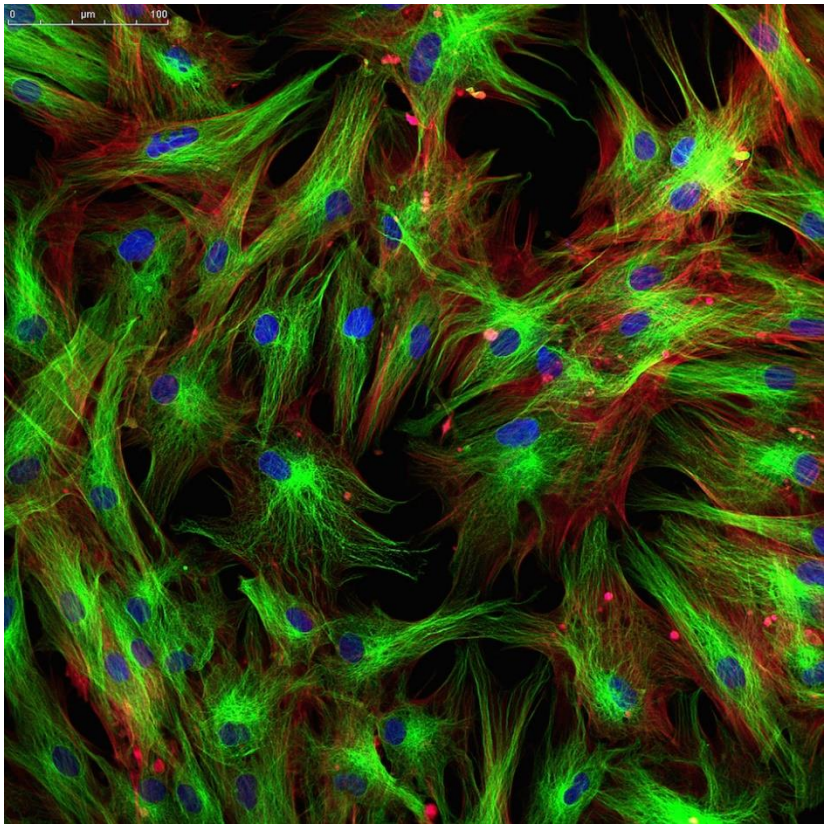
Primarne stanice u usporedbi sa staničnim linijama su puno osjetljivije i zahtijevaju dodatne nutrijente koji nisu uključeni u klasični medij. Kako bi se postigli optimalni uvjeti za rast potrebno je pripraviti specijalni medij za rast za svaki tip stanica. Korištenje supstrata koji su bliži stvarnim fiziološkim uvjetima, a ne sintetskih polimera ,može značajno poboljšati čistoću, rast i prihvaćanje stanica.

Iako je rad s primarnim stanicama teži od istog sa staničnim linijama, podaci koji se dobiju uz pomoć primarnih stanica su puno relevantniji i sličniji sa *in vivo* okruženjem.

3.2 METODE

3.2.1 Uzgoj stanica fibroblasta u kulturi

Za eksperiment i kvantificiranje duljine telomera korištene su primarne stanice fibroblasta iz kože, starih (FX_75_FA_8) i mladih (FX_24_M_13) donora Stanice su uzgajane i presađivane u Dulbecco modificiranom minimalnom mediju (DMEM) obogaćenim s 10% telećim fetalnim serumom (FBS) i 1% otopinom penicilin-streptomicina u sterilnim uvjetima u termostatu pri 37°C s 5% CO_2. Stanice su presađivane tako da bi se neposredno nakon odstranjivanja medija ispirale s fiziološkom otopinom (0,9% otopina NaCl) te odvojile od podloge uz pomoć otopine tripsina (0,25%) u kojoj bi se nalazile od 5 do 7 minuta pri 37°C. Nakon što su se stanice odvojile od podloge djelovanje tripsina bi se zaustavilo uz pomoć medija sa serumom koji inhibira aktivnost tripsina. Nakon postizanja konfluentnosti stanice fibroblasta su održavane u Dulbecco modificiranom minimalnom mediju (DMEM) obogaćenim s fetalnim telećim serumom (FBS, 0,5%) kako bi stanice ušle u stanje mirovanja.



Slika 8. Normalni ljudski fibroblasti odrasle osobe, jezgre-plavo obojane, mikrofilamenti-zeleno obojani (Preuzeto : Axol Bioscience).

3.2.2 Priprema metafaznih kromosoma

Dobivanje metafaznih stanica (1. DAN)

1. Kada stanice dosegnu 70% popunjenosti, dodati 50 µL kolcemida* (10µg/mL) u 15ml medija te inkubirati 4.5 sata u inkubatoru na 37°C, 5% CO_2.

   * Kolcemid je citostatik koji depolarizira mikrotubule odnosno inhibira formiranje diobenog vretena i zaustavalja mitozu u metafazi. Koristi se kako bi se povećao postotak metafaznih stanica.
2. Nakon inkubacije, sakupiti 5 mL medija iz stanične kulture te ga prenijeti u Falcon tubu.
3. Isprat stanice sa 2.5 mL PBS-a, sakupiti ih i dodati u Falcon tubu koja sadrži već skupljeni medij.

   Stanice u mitozi ne lijepe se jako za ploču stanične kulture, stoga je potrebno sačuvati sav mediji i PBS kako ne bi došlo do gubljenja stanica u metafazi.
4. Dodati 0,5 ml tripsina i inkubirati 5 minuta u inkubatoru na 37°C, 5% CO2
5. Nakon inkubacije tripsin inaktivirati uz pomoć 1 ml već sakupljenog medija iz Falcon tube.
6. Sakupiti sav inaktivirani trpsin u kojem se nalaze stanice.
7. Sakupljene stanice centrifugirati 8 minuta na 800 rpm.
8. Ukloniti supernatant.
9. Nježno vorteksirajući dodavati kap po kap 5 mL KCl (0.075 M) prethodno zagrijanog na 37°C.
10. Inkubirati 10 minuta na 37°C u vodenoj kupelji.
11. Dodati 3 kapi svježe pripremljene fiksirajuće otopine (MeOH/Octena kiselina 3:1) temperature 4°C.
12. Centrifugirati 8 minuta na 800 rpm.
13. Ukloniti supernatant tako da u tubi ostane 1 mL otopine.
14. Dodati 1 mL fiksirajuće otopine tijekom laganog vorteksiranja te potom još 4.5 mL.
15. Centrifugirati na 800 rpm 8 minuta, odliti supernatant tako da u tubi zaostane 1 mL te ponovo dodati prvo 1 mL fiksirajuće otopine i naknadno još 4.5mL.
16. U ovom trenutku prikupljene stanice pohrane se preko noći na -20°. Sljedećeg dana pristupa se izradi preparata s metafaznim kromosomima.

Izrada preparata metafaznih kromosoma (2.dan)

1. Uzorke centrifugirati 8 min na 800 rpm.
2. Ukloniti supernatant tako da u tubi ostane 1 mL otopine.
3. Resuspendirati stanice i dodati 10 mL svježe fiksirajuće otopine tijekom vorteksiranja.
4. Centrifugirati 8 minuta na 800 rpm.
5. Uklonit supernatan tako da u tubi ostane 1 mL otopine.
6. Pasterovom pipetom s kapilarnim krajem sakupiti stanice.
7. Prikupljene stanice pažljivo nakapati na vrh koso položenih predmetnih stakalaca* i ostaviti da se ocijede.

   (Predmetna stakalca prethodno su očišćena, uranjanjem u 100% EtOH i otopinu fiksativa, te osušena stajanjem na zraku.*)
8. Preparate stanica osušiti preko noći.

3.2.3 FLUOROSCENCIJSKA HIBRIDIZACIJA in situ (FISH) S PNA SONDOM

3.2.3.1 Predtretman stakalaca

1. Postaviti preparate s metafaznim kromosomima u staklenu posudu sa stalkom za predmetna stakalca (engl. *coupling jar*) i ispirati s 1 x PBS puferom (5 minuta pri sobnoj temperaturi).
2. Uroniti stakalca u otopinu fiksativa (priprema se miješanjem jednakih volumena 3.7% formaldehida i 1 x PBS) i inkubirati 2 minute.
3. Isprati stakalca 3 x 5 minuta u svježem 1 x PBS puferu.
4. Inkubirati stakalca u otopini 0.005 % pepsina 10 minuta pri 37°C.
5. Stakalca kratko isprati u 1 x PBS puferu.
6. Stakalca isprati u otopini fiksativa (priprema se miješanjem jednakih volumena 3.7% formaldehida i 1 x PBS) 2 minute.
7. Stakalca isprati u 1 x PBS puferu (3 x 5 minuta).
8. Stakalca dehidrirati po 5 minuta u seriji otopina etanola (70%, 80%, 90%, 100%)..
9. Osušiti stakalca stajanjem na zraku u tami.

3.2.3.2 Hibridizacija

1. Na svako stakalce u mraku nanijeti 35 µl PNA hibridizacijske otopine i pokriti pokrovnicom.

   Stakalca postaviti u vlažnu plastičnu posudicu prethodno zagrijanu na 80°C i denaturirati 5 minuta pri 80°C u vodenoj kupelji.
2. Stakalca hibridizirati 2 sata na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi.
3. Isprati preparate u otopini za ispiranje 1 (2 x 15 minuta).
4. Isprati preparate u otopini za ispiranje 2 (3 x 5 minuta).
5. Stakalca dehidrirati u uzastopnoj seriji etanola (70%, 80%, 90%, 100%) po dvije minute u svakoj.
6. Osušiti stakalca stajanjem na zraku u tami.

3.2.3.3 Bojanje kromosoma s 4,6-diamino-2-fenilindolom (DAPI)

Preparati metafaznih kromosoma nakon hibridizacije s fluorescentno obilježenom PNA probom analiziraju se pomoću fluorescencijskog mikroskopa (Zeiss Imager M1), upotrebom filtra za plavu i crvenu fluorescenciju. Fluorescentna boja 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) upotrebljava se u svrhu određivanja položaja

heterokromatina bogatog parovima baza adenin-timin (A-T) na kromosomima. Kromosomi bojani bojom DAPI pri pobudnoj svjetlosti valne duljine 360 nm fluoresciraju plavo.

Na stakalca se doda kap otopine DAPI sa sredstvom protiv izbljeđivanja (engl. *Fluoroshield with DAPI*). Stakalca se pokriju pokrovnicom i pohrane u tamnoj kutiji pri 4°C do mikroskopiranja.

3.2.4 Mikroskopiranje i izrada slika

Preparati su pregledani uz pomoć fluorescenscijskog mikroskopa (Zeiss Axio Imager M1). Korišteni su filteri za plavu fluorescenciju (Zeiss Filter Set 49 (488049-9901-000), pobudna svjetlost za DAPI je λ=358 nm, a eksitacijski maksimum λ=463 nm) i filter za crvenu fluorescenciju (Filter Set 20 HE (489020-0000-000), pobudna svjelost za Cy3 je λ=549 nm, a eksitacijski maksimum λ=562 nm). Ukupno je 12 preparata stanica fibroblasta iz kože (4 skupine po 3 stakalca) (Slika 9), 2 skupine se odnose na preparate 75 godišnjakinje, unutar kojih se nalaze stanice tretirane sredstvom za pomlađivanje (engl. *antiaging agent p19*), uzorak FX_75_FA_8_SSE i kontrolna skupina bez tretmana, uzorak FX_75_FA_8_C.

Slika 9. Preparati metafaznih kromosoma.

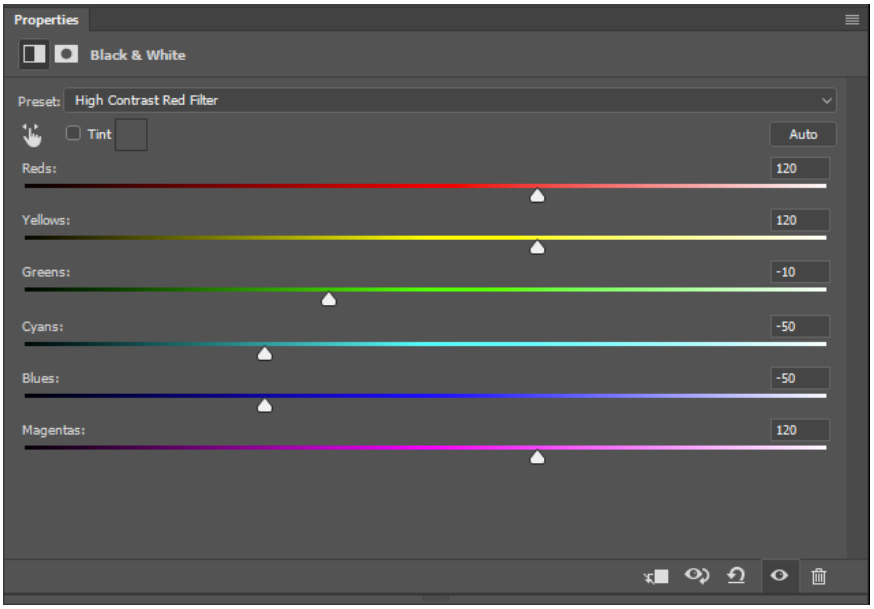
Druge dvije skupine se odnose na preparate 24 godišnjaka unutar kojih se nalaze stanice tretirane sredstvom p19, uzorak FX_24_M_13_SSE i kontrolna skupina bez tretmana, uzorak FX_24_M_13_C. Stanice fibroblasta iz kože starog donora prošle su 8 udvostručenja populacije (engl. *population doublings*, PDs), dok su stanice mladog donora prošle 13 udvostručenja populacije. Udvostručavanje populacije ili pasaža (engl. *passage*) je broj koji

označava koliko je puta određena kultura stanica „presađena“, odnosno koliko je puta kultura stanica izrasla do potpune popunjenosti (engl. *confluency*), razrjeđena u nekom omjeru i puštena da ponovo izraste do potpune popunjenosti. Preparati su pregledani fluorescencijskim mikroskopom uz pomoć imerzijskog objektiva (100x). Nakon pronalaska metafaznih kromosoma i centriranja njihovog položaja kromosomi su slikani visoko rezolucijskom mikroskopskom kamerom (Carl Zeiss AxioCam MR Rev3) i analizirani uz pomoć programa Axio Vision Rel. 4.7. (Karl Zeiss, Beč, Austria) koja je spojena na mikroskop i računalo (Slika 10).

Slika 10. Fluorescencijski mikroskop s visoko rezolucijskom mikroskopskom kamerom (Carl Zeiss AxioCam MR Rev3).

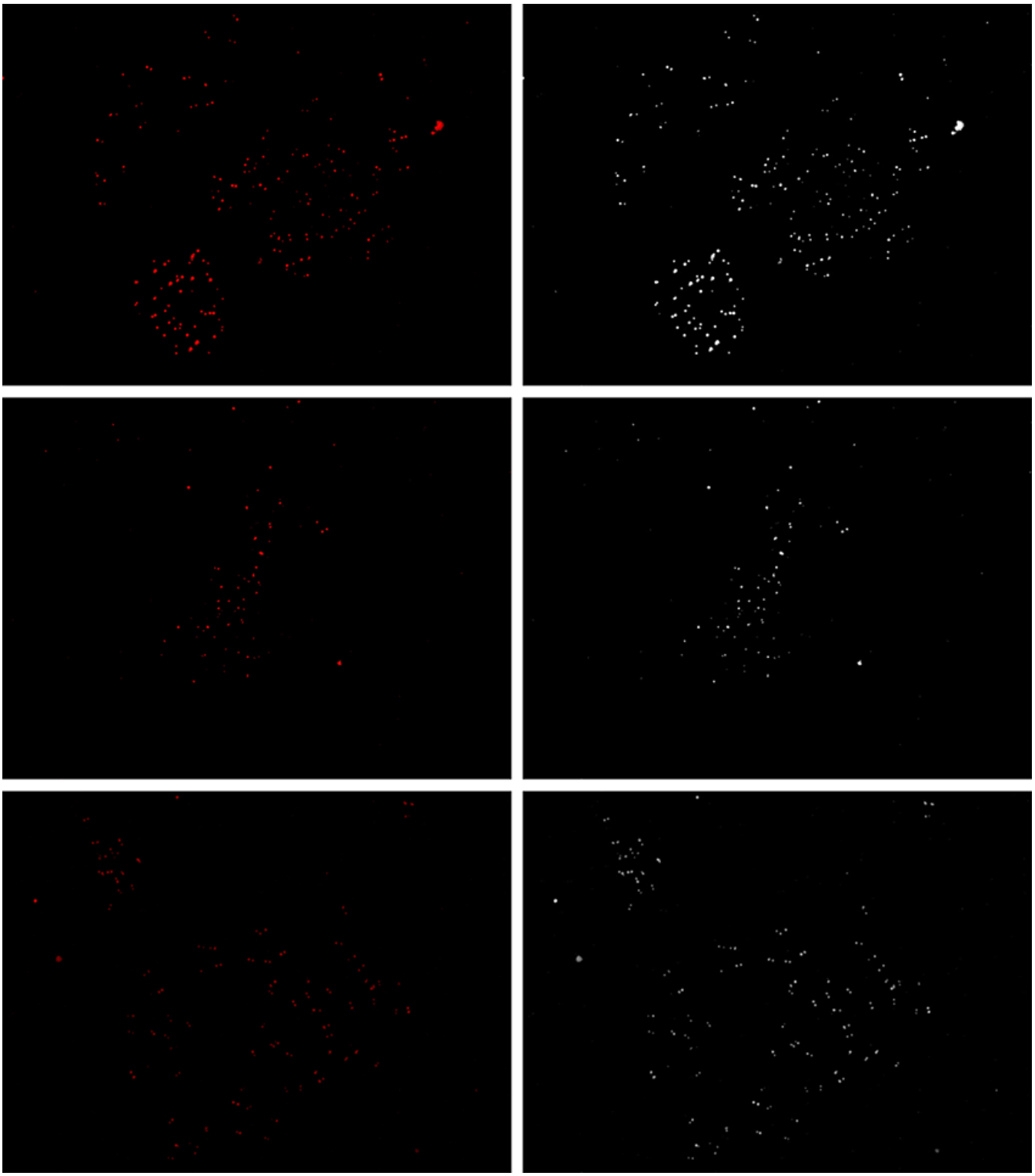
Slike su dodatno poboljšane unutar samog programa Axio Vision, podešavajći min i max vrijednosti te ekspoziciju kako bi se potamnila pozadina iza samih kromosoma, a pojačao intezitet signala. Na takav način smanjen je pozadinski šum, odnosno eliminirani lažni signali.

Uz pomoć računalnog programa Adobe Photoshop 7.0 sve slike su pretvorene u 8- bitne crno bijele fotografije. Prilikom obrade fotografija koristili smo alat Adobe Photoshop i ugrađene filtere za pretvorbu obojane slike u crno bijelu tehniku. Obzirom na limitaciju daljnjeg postupka mjerenja, ovo je bilo potrebno obaviti prije nego li fotografije uđu u proces daljnje analize. Photoshop već dugi niz godine posjeduje nevjerojatno jake filtere za pretvaranje slika u crno bijelu tehniku, ali i mogućnost ciljanog uklanjanja tonova (nijansi) specifične boje. U ovom postupku odlučili smo se za High Contrast Red Filter koji uklanja svu crvenu boju iz slike i povećava kontrast među susjednim točkama (Slika 11) .



Slika 11. Obrada Adobe Photoshop 7.0 programom u filteru High Contrast Red

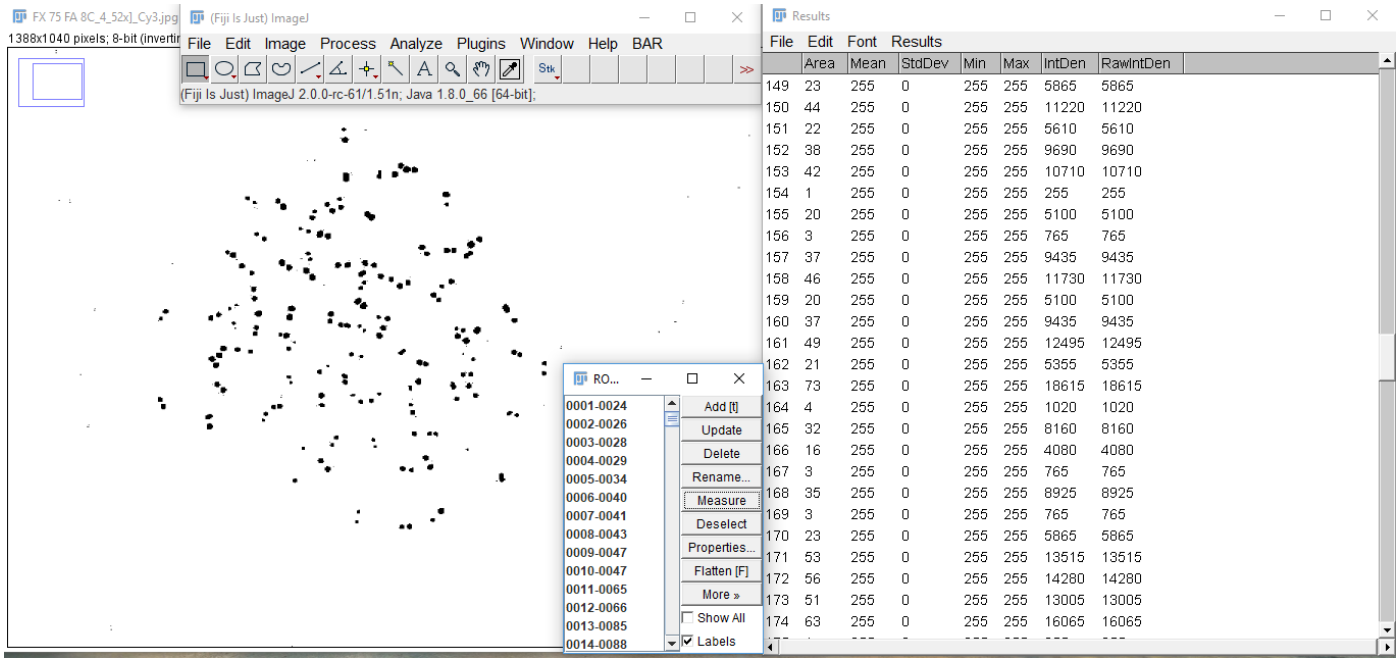
Točka u računalnoj grafici označava najmanju (osnovnu) jedinicu od koje je slika sastavljena. Ovaj pojam je u uskoj vezi s pojmom točke u geometriji i likovnoj umjetnosti. Osim pojma točke upotrebljavaju se i pojam piknjica ako se pojam želi razlikovati od matematičkog ili likovnog pojma točke. Također, u literaturi direktno prevedenoj s engleskog jezika susrećemo se s činjenicom da se pojam piksel (engl. *pixel*) često ne prevodi. Rezultat korištenog filtera vidljiv je na idućim primjerima obrade (Slika 12).



Slika 12. Fotografije metafaznih signala telomera stanica fibroblasta iz kože prije i nakon obrade u Adobe Photoshop 7.0

Crno bijele slike, na kojima su telomerni signali, analizirane su uz pomoć programa za obradu fotografija Image J (win 64) te uz pomoć njegove proširene verzije (Fiji).

Kako bi se automatizirao cijeli proces označavanja telomernih signala kao i izračunavanja njihove gustoće točkica po odabranoj površini, obavljene su slijedeće akcije. Prvo se na slici uz pomoć opcije *invert* zamjeni boja pozadine i signala, tako da su signali postali crne točkice. Potom se uz pomoć akcija *threshold i huang* signali u potpunosti pretvore u crne pixele. Kako bi se odvojili signali, koji su slučajno se spojili zbog preklapanja sivih pixela koji su pretvoreni u pixele crne boje, upotrijebljena je akcija *watershed.* Uz pomoć ROI managera označeni su svi signali te analizirana njihova gustoću po površini. Sva mjerenja signala obavljena su pri povećanju slike na 150 %. Kako bi se uklonio pozadinski šum koji je preostao nakon svih obrada, ručno je izmjerena prosječna vrijednost inteziteta pozadine jer ona utječe na intezitete samih telomernih signala (Slika 13).



Slika 13. Crno bijela fotografija metafaznih kromosoma obojenih s DAPI fluorescencijskom bojom i telomera označenih sa specifičnom PNA probom. Podaci su obrađeni uz pomoć ROI manager, te računalo bilježi minimalnu maksimalnu i srednju vrijednost fluorescencije s arbitrarnom vrijednosti od 0-255. Nakon kvantizacije podatci su korišteni za statističku analizu u programu „Excel“.

3.2.5 Statistička analiza

Dobivene podatke o intezitetu telomernih signala obrađeni su u računalnom programu Microsoft Excel. Iz preparata metafaznih kromosoma fibroblasta kod kontrolne skupine mlađih donora FX_24_M_13 prikupljeno je 1467 numeričkih vrijednosti denziometrije iz 11 fotografija, dok je iz tretirane skupine FX_24_M_13_SSE prikupljeno 2469 numeričkih podataka iz 13 fotografija. Iz preparata metafaznih kromosoma fibroblasta kod kontrolne skupine starijih donora FX_75_FA_8_C prikupljeno je 2542 numeričkih vrijednosti iz 15 fotografija dok je iz tretirane skupine FX_75_FA_8_SSE prikupljeno 1445 numeričkih vrijednosti iz 12 fotografija. U statističkoj analizi sveukupno je korišteno 7923 numeričkih vrijednosti flourescencije. Za svaku skupinu podataka radi normalizacije pozitivnih signala, od svih signala oduzeta je srednja vrijednost intenziteta pozadine. Iz vrijednosti telomernih signala izračunala se srednja vrijednost s kojom se podijeli svaki pojedini telomerni signal čime se dobio relativni intenzitet pojedinačnih telomera. Dobivene vrijednosti su međusobni odnosi arbitrarne vrijednosti duljine pojedinačnih telomera. Kako bi se utvrdilo kolika je statistička razlika između dvaju uzoraka istog donora primarnih stanica, upotrijebio se Wilcoxon rank – sum test.

4. REZULTATI

U ovom radu napravljena je analiza duljine telomera primarnih stanica fibroblasta iz kože metodom kvantitativne PNA fluorescencijske hibridizacije *in situ* (Q-PNA-FISH). U metodi Q-PNA-FISH koristi se specifična jednolančana molekula PNA u kojoj su telomerni ponavljajući nukleotidi povezani peptidnim vezama, a u ovom slučaju je na krajevima obilježena fluorescentnom bojom *cyanine 3* (Cy3) koji daje crvene signale na krajevima kromosoma. Signal koji daje takva sonda je proporcionalan duljini telomere (Poon i sur. 1990) i netelomerne sekvence nemaju utjecaj na njegov intenzitet. Granica osjetljivosti ove metode je ~200 nukleotida (Martens i sur. 1998).

4.1 Analiza telomernih signala primarnih stanica fibroblasta iz kože metodom Q-PNA-FISH

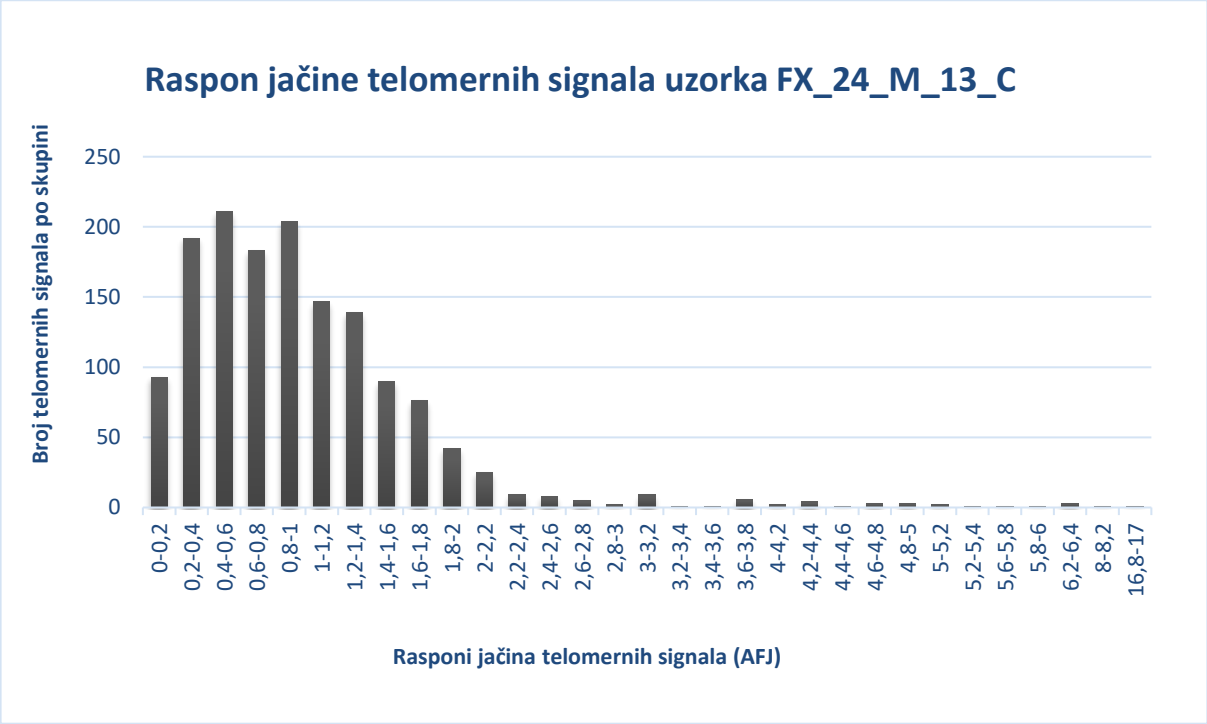
Telomere metafaznih kromosoma primarnih stanica fibroblasta iz kože uzoraka FX_24_M_13_SSE, FX_24_M_13_C, FX_75_FA_8_C i FX_75_FA_8_SSE obilježeni su PNA sondom. Nakon hibridizacije, stanice su se tretirale fluorescencijskom bojom DAPI radi bolje vizualizacije kromosoma. Fluorescencijski signali telomera koji su dobiveni prilikom snimanja preparata obrađeni su High Contrast Red Filter (Photoshop) koji uklanja svu crvenu boju iz slike i povećava kontrast među susjednim točkama.

Od svih dobivenih vrijednosti signala oduzeta je srednja vrijednost pozadine radi normalizacije telomernih signala, te su podijeljeni s prosjekom ukupnih telomernih signala i na taj način je dobiven relativni intenzitet pojedinačnih telomera odnosno arbitrarne fluorescencijske jedinice (AFJ). Oduzimanje pozadine je potrebno kako se signali ne bi razlikovali s obzirom na intenzitet UV lampe, duljinu ekspozicije ili duljinu izloženosti cijelog preparata UV zračenju.

Uz pomoć programa Fiji (Image J) izmjeren je intenzitet fluorescencije vezane probe PNA koji je razmjeran duljini telomere. Grafički prikaz rezultat dobiven je uz pomoć Excel programa i opcije Pivot table. Prvi set podataka prikazuje razdiobu duljina telomera izraženih u arbitrarnim fluorescencijskim jedinicama (AFJ) raspoređenih po razredima.

4.2 Razdioba duljina telomera stanica fibroblasta iz kože uzorka mlađeg donora FX_24_M_13_C

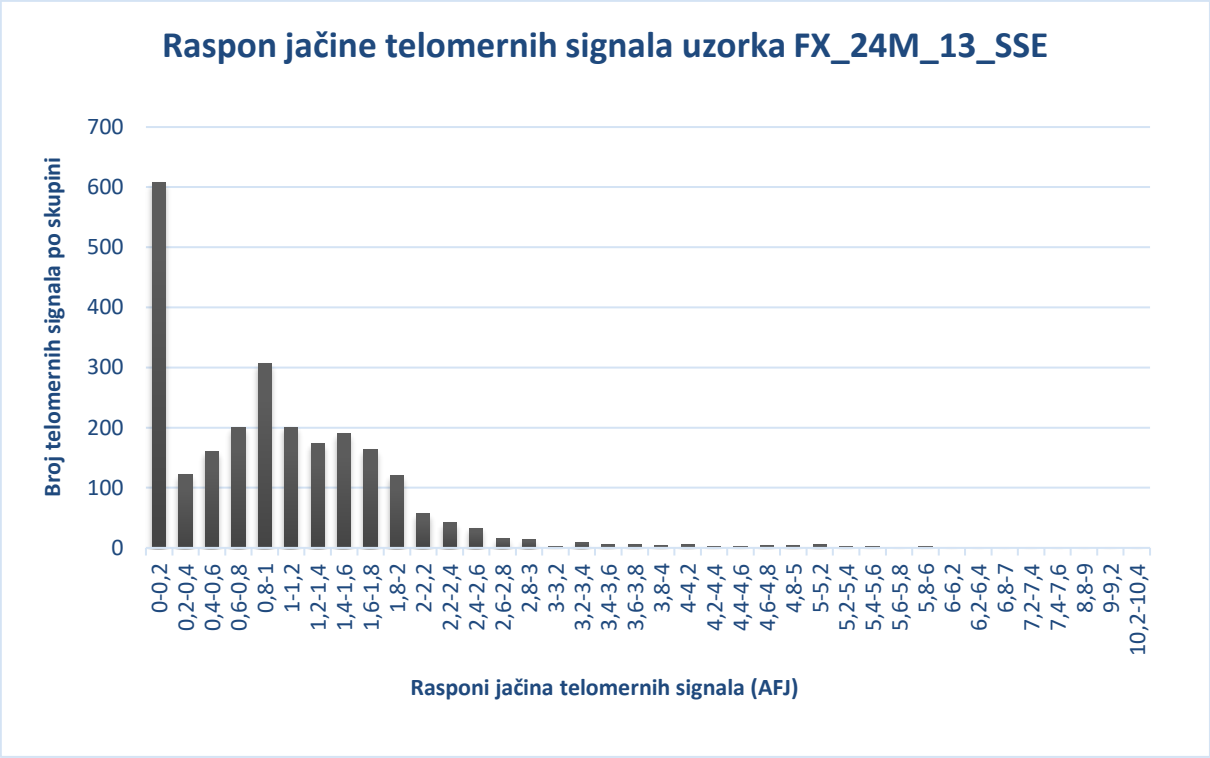
Za 3 preparata metafaznih kromosoma stanica fibroblasta koji potječu od uzorka FX_24_M_13_C, što označava da je riječ o kontrolnim stanicama fibroblasta iz kože muške osobe starosti 24 godine, koje su prošle 13 populacijskih udvostručavanja, dobiveno je 1466 numeričkih podataka. U ovoj analizi fluorescencijski signal je uzet kao arbitrarna fluorescencijska vrijednost te se s obzirom na intenzitet signala provela podjela po razredima. Razredi predstavljaju duljine telomera izražene u arbitrarnim fluorescencijskim jedinicama. Što je intenzivniji signal smatra se da je duljina telomera veća jer je na samu telomeru vezana veća količina PNA sonde. Set numeričkih podataka prikazuje histogram 1. Duljine telomera izražene su u arbitrarnim fluorescencijskim vrijednostima, te su podijeljenje u razrede. Postoje odstupanja od normalne distribucije. Većina telomera spada u skupinu duljina od 0,2 AFJ do 1,2 AFJ što u usporedbi s ostalim izvorima (Čukušić-Kalajžić) pokazuje normalnu duljinu telomera kod mlade osobe. Ostali razredi duljina počevši od 5,5 AFJ do 17 AFJ pokazuju odstupanja od prosječne duljine telomera (prosječna duljina=1,2 AFJ do 1,4 AFJ).



Histogram 1. Raspon jačine telomernih signala uzorka FX_24_M_13_C (x-os predstavlja razrede duljina izražene u arbitrarnim jedinicama AFJ, y-os predstavlja frekvenciju telomernih signala za određeni razred).

4.3 Razdioba duljina telomera stanica fibroblasta iz kože uzorka mlađeg donora nakon tretmana FX_24_M_13_SSE

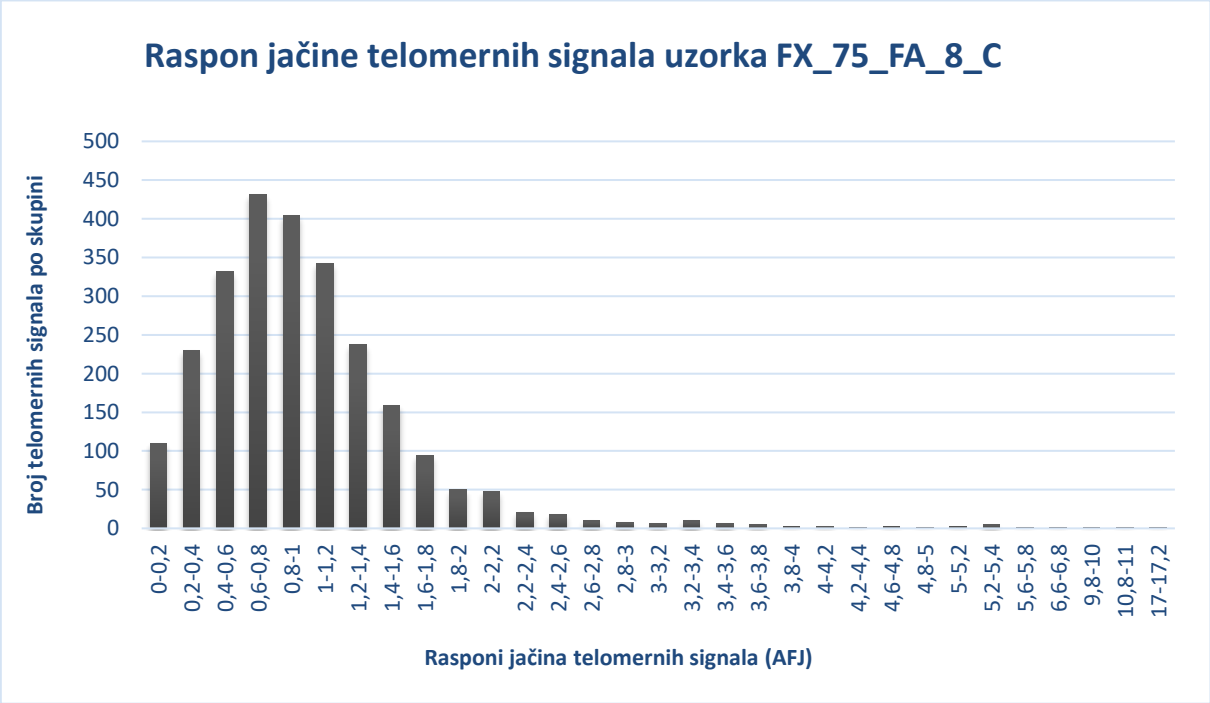
Za 3 preparata metafaznih kromosoma stanica fibroblasta koji potječu od uzorka FX_24_M_13_SSE, što označava da je riječ o stanicama fibroblasta iz kože muške osobe starosti 24 godine izloženim sredstvu za pomlađivanje p19, koje su prošle 13 populacijskih udvostručavanja, dobiveno je 2469 numeričkih podataka. Duljine telomera izražene su u arbitrarnim fluorescencijskim vrijednostima, te su podijeljenje u razrede. Set numeričkih podataka za arbitrarne duljine telomera za uzorak FX_24_M_13_SSE prikazan je histogramom 2. Distribucija samih podataka odstupa od normalne razdiobe zbog prvog razreda AFJ vrijednosti (0-0,2). Taj razred prikazuje da je preko 600 telomera duljine 0-0,2 AFJ što bi značilo da se velika većina telomera tijekom samog eksperimenta skratila. S obzirom na ostalu distribuciju podataka uočava se normalna razdioba oko prosječne vrijednosti.



Histogram 2. Raspon jačine telomernih signala uzorka FX_24_M_13_SSE (x-os predstavlja razrede duljina izražene u arbitrarnim jedinicama AFJ, y-os predstavlja frekvenciju telomernih signala za određeni razred).

4.4 Razdioba duljina telomera stanica fibroblasta iz kože uzorka starijeg donora FX_75_FA_8_C

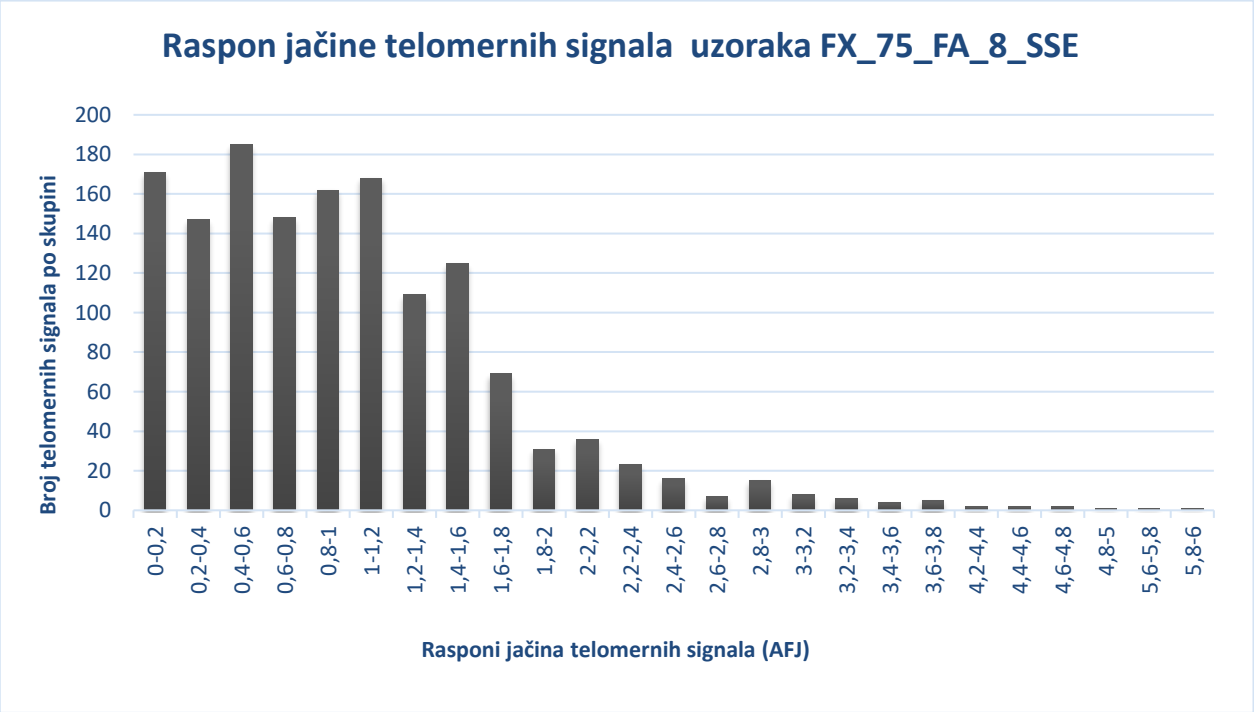
Za 3 preparata metafaznih kromosoma fibroblasta koji potječu od uzorka FX_75_FA_8_C, što označava da je riječ o kontrolnim stanicama fibroblasta iz kože ženske osobe starosti 75 godine, koje su prošle 8 populacijskih udvostručavanja, dobiveno je 2541 numeričkih podataka. Duljine telomera izražene su u arbitrarnim fluorescencijskim vrijednostima te su podijeljene u razrede. Set numeričkih podataka za arbitrarne duljine telomera za uzorak FX_75_FA_8_C prikazan je histogramom 3. Uočava se normalna distribucija podataka oko prosječne vrijednosti (0,8-1,2 AFJ). Većina telomera pokazuje razliku od 20 % u intenzitetima signala, a taj trend je prisutan u svim pojedinim metafazama uzoraka FX_24_M_13_C I FX_24_M_13_SSE. Gubitak telomernih ponavljanja varira između >4% i <46%.



Histogram 3. Raspon jačine telomernih signala uzorka FX_75_FA_8_C (x-os predstavlja razrede duljina izražene u arbitrarnim jedinicama AFJ, y-os predstavlja frekvenciju telomernih signala za određeni razred).

4.5 Razdioba duljina telomera stanica fibroblasta iz kože uzorka starijeg donora nakon tretmana FX_75_FA_8_SSE

Za 3 preparata metafaznih kromosoma fibroblasta koji potječu od uzorka FX_75_FA_8_SSE, što označava da je riječ o stanicama fibroblasta iz kože ženske osobe starosti 75 godine izloženim sredstvu za pomlađivanje p19, koje su prošle 8 populacijskih udvostručavanja, dobiveno je 1444 numeričkih podataka. Duljine telomera izražene su u arbitrarnim fluorescencijskim vrijednostima te su podijeljene u razrede. Set numeričkih podataka za arbitrarne duljine telomera za uzorak FX_75_FA_8_SSE prikazan je histogramom 4. Sama raspodjela intenziteta signala nije ujednačena. Više od 70 % intenziteta signala spada u kategorije duljina telomera od 0,2 do 1,8 AFJ. Potom se uočava nagli pad vrijednosti od 1,8 AFJ do 5,8 AFJ.



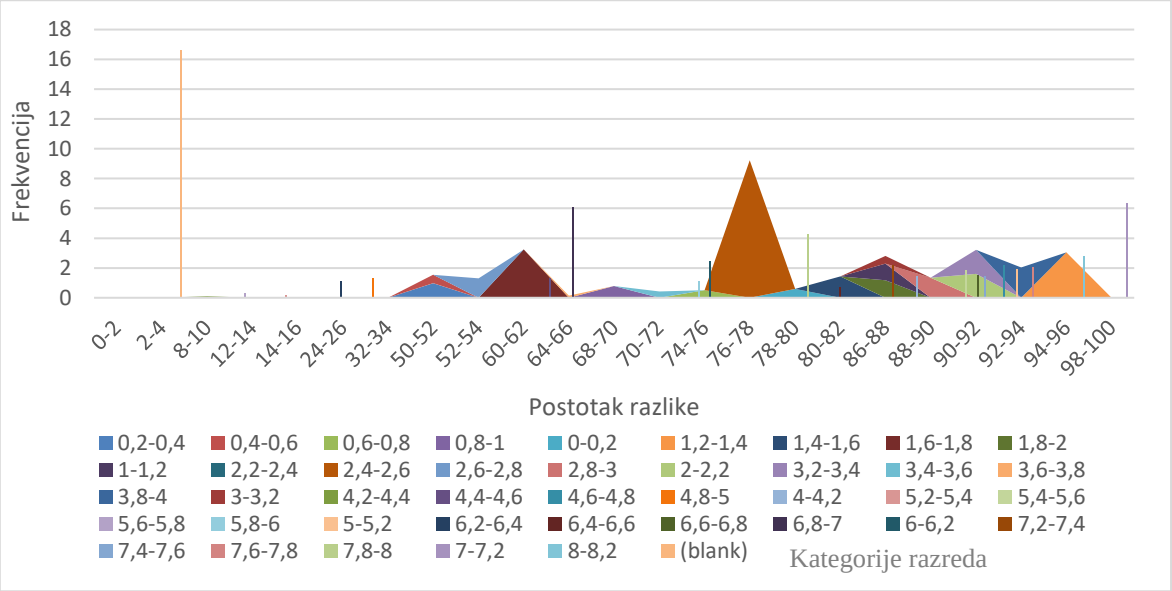
Histogram 4. Raspon jačine telomernih signala uzoraka FX_75_FA_8_SSE (x-os predstavlja razrede duljina izražene u arbitrarnim jedinicama AFJ, y-os predstavlja frekvenciju telomernih signala za određeni razred).

4.6 Razlike duljina telomera izraženih u AFJ različitih uzoraka metafaznih kromosoma stanica fibroblasta iz kože

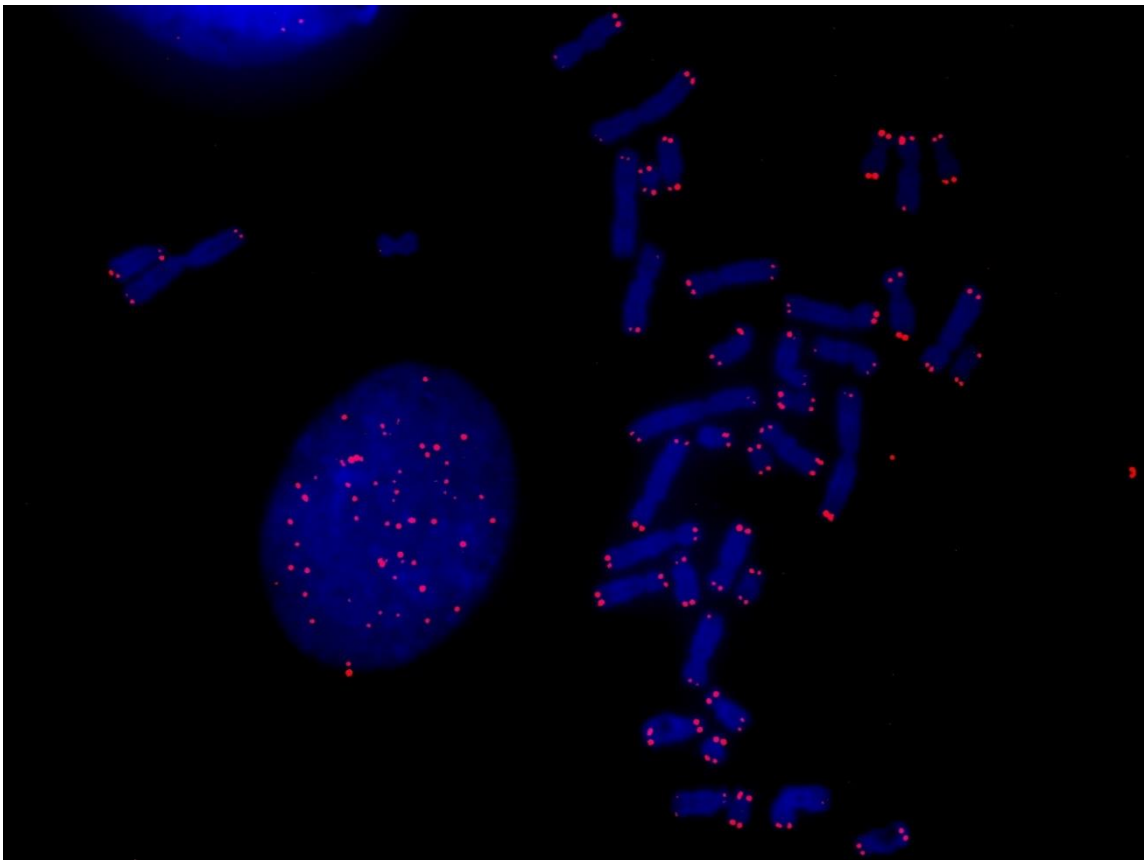
Nakon analize intenziteta signala telomera svih kromosoma zasebno, iz četiri pojedinačna uzorka stanica fibroblasta iz kože, međusobno je uspoređena duljina telomera (AFJ) između različitih uzoraka:

1. Kontrolnog uzorka FX_75_FA_8_C i tretiranog uzorka FX_75_FA_8_SSE starijeg donora,
2. Kontrolnog uzorka FX_24_M_13_C i tretiranog uzorka FX_24_M_13_SSE mlađeg donora
3. Kontrolnog uzorka FX_24_M_13_C mlađeg donora i kontrolnog uzorka FX_75_FA_8_C starijeg donora,
4. Tretiranog uzorka FX_24_M_13_SSE mlađeg donora i tretiranog uzorka FX_75_FA_8_SSE starijeg donora.

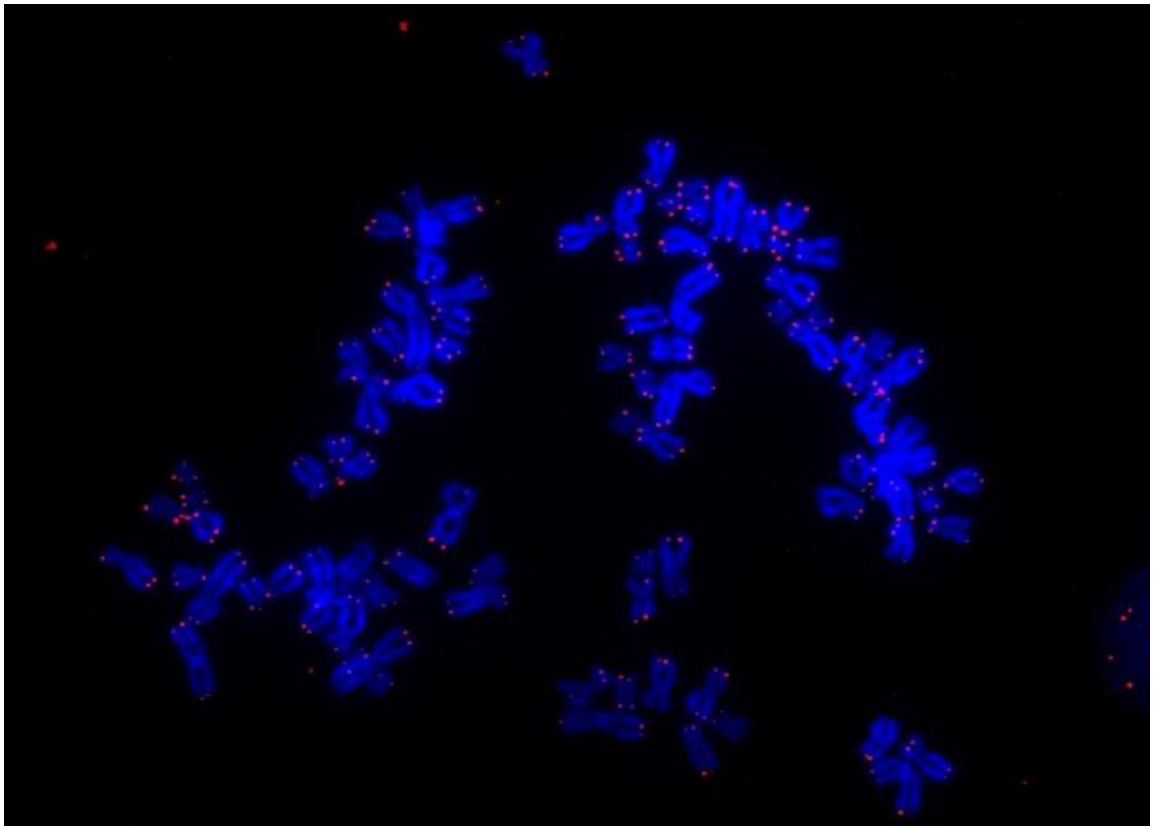
Primjer izračuna razlike između tretiranih i netretiranih telomera za jednu metafazu prikazan je na slici 13.



Slika 13. Distribucija razlika intezitet signala između dvaju setova podataka (kontrolne i tretirane skupine) iražena u postotcima za dane metafazu prikazane na slici 14. i 15.



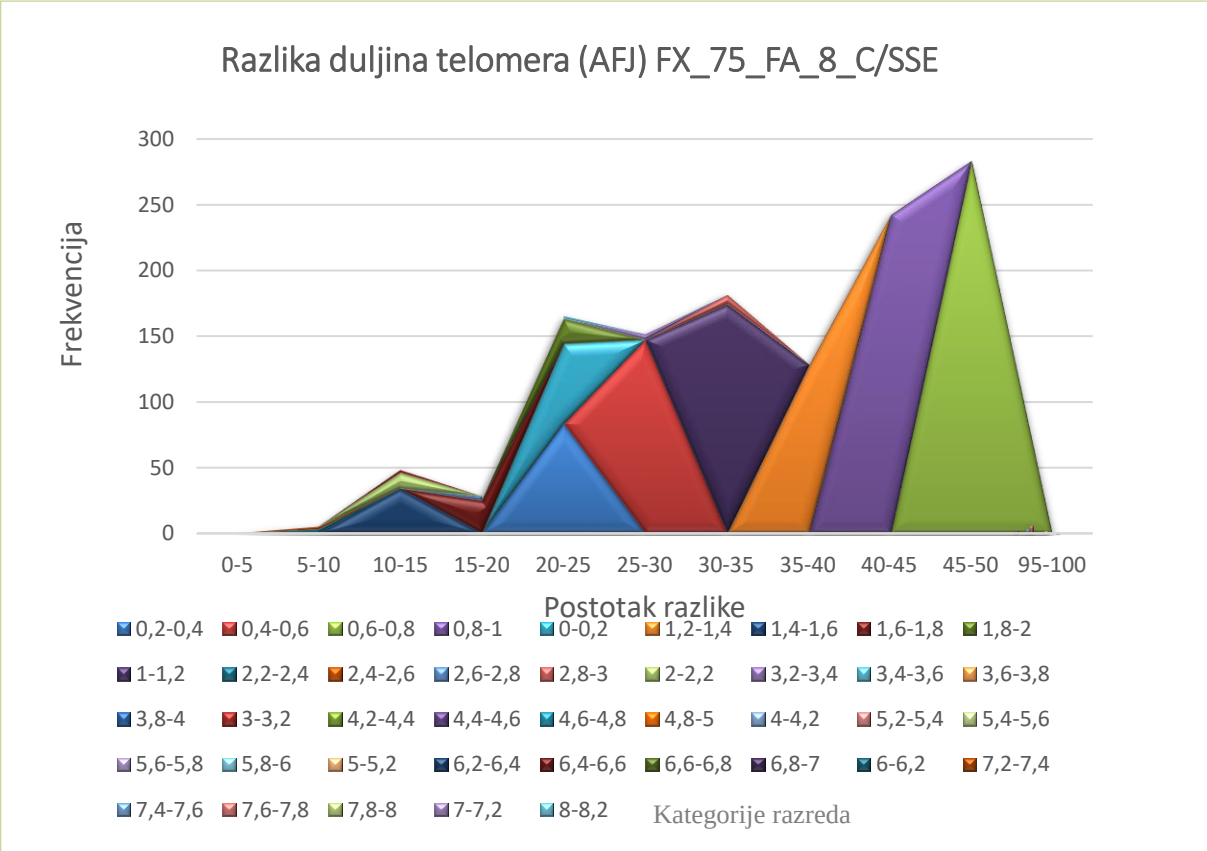
Slika 14. Prikaz tretiranih metafaznih kromosoma stanica fibroblasta iz kože 75-godišnjakinje (FX_75_FA_8_SSE)



Slika 15. Prikaz kontrolnih metafaznih kromosoma stanica fibroblasta iz kože 75-godišnjaka (FX_75_FA_8_C) .

4.6.1 Razlika duljina telomera starijeg donora: kontrolnog uzorka FX_75_FA_8_C i tretiranog uzorka FX_75_FA_8_SSE

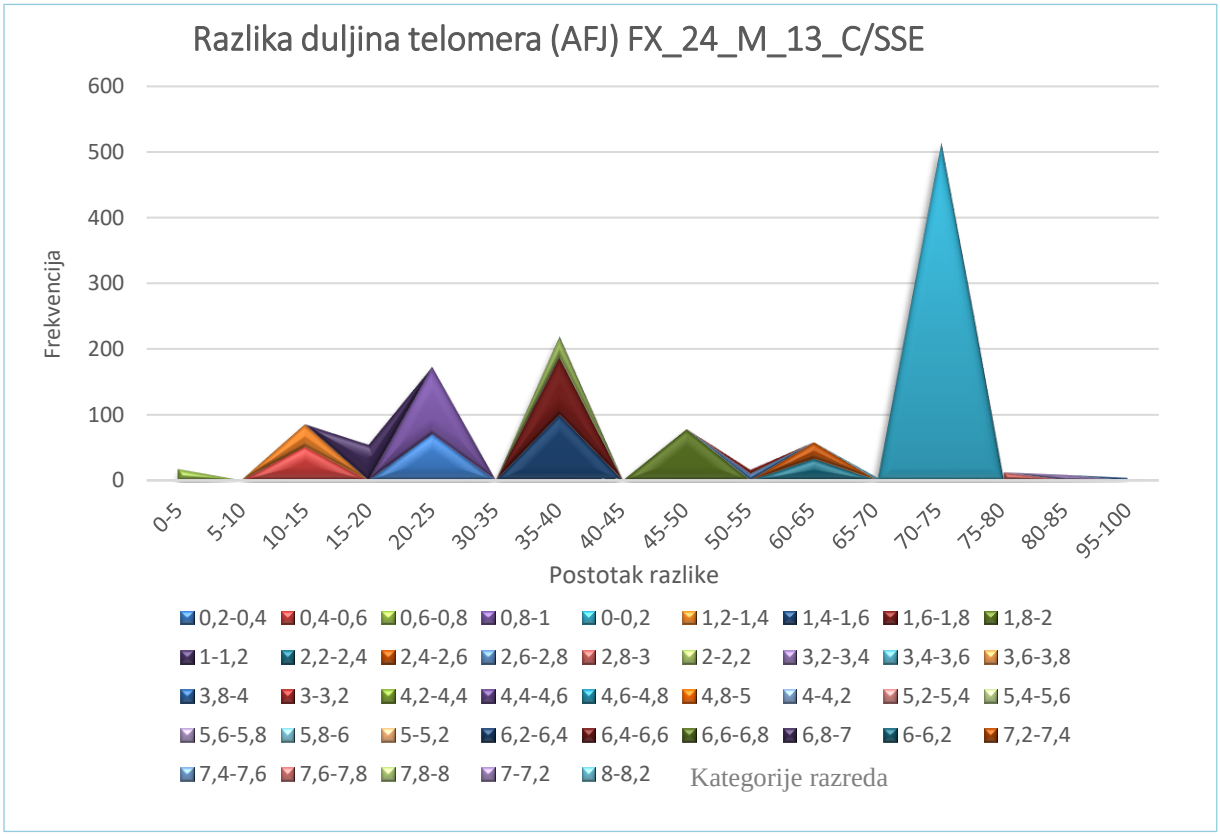
Kako bi se preciznije analiziralo do kojeg stupnja se razlikuje duljine telomera stanica fibroblasta između kontrolnog uzorka i uzorka tretiranog sredstvom za pomlađivanje p19 starijeg donora, dobiveni skupovi podataka prikazani su kao odnos između razreda duljina telomera, frekvencije i postotak razlike. Postotak razlike je izračunat kao razlika između frekvencije dvaju razreda duljina te je potom podijeljen njihovim zbrojem i pomnožen s 100. Iz distribucije razlika intenziteta dvaju uzoraka FX_75_FA_8_C/SSE (Grafikon 1), uočeno je da je 50% razlike u frekvenciji (~275) intenziteta signala za razrede duljine od 0,6 do 1 AFJ. Razlike od 25% do 30% prisutne su u razredima duljina od 1-1,2 AFJ i 2,8-3AFJ što znači da je kod oba uzorka približno slična frekvencija intenziteta signala. Razredi 1,4-1,6 AFJ, 1,6-1,8 AFJ te 2-2,2 AFJ pokazuju isti postotak razlike od 10-15% ali sa linearno progresivnom frekvencijom koraka ≤16. Na temelju ovih pokazatelja možemo preliminarno zaključiti kako su telomere za razred 0,6-0,8 AFJ kod tretiranih stanica fibroblasta u uzorku starijeg donora (~150) kraće u odnosu na isti razred kod kontrolnog uzorka starijeg donora (~470).



Grafikon 1. Dijagram prikazuje na x osi postotak razlike između dva uzorka (FX_75_FA_8_C/SSE), y-osi brojčanu razliku dvaju uzoraka, a njegova površina predstavlja razred duljina izražen u AFJ.

4.6.2 Razlika duljina telomera mlađeg donora: kontrolnog uzorka FX_24_M_13_C i tretiranog uzorka FX_24_M_13_SSE

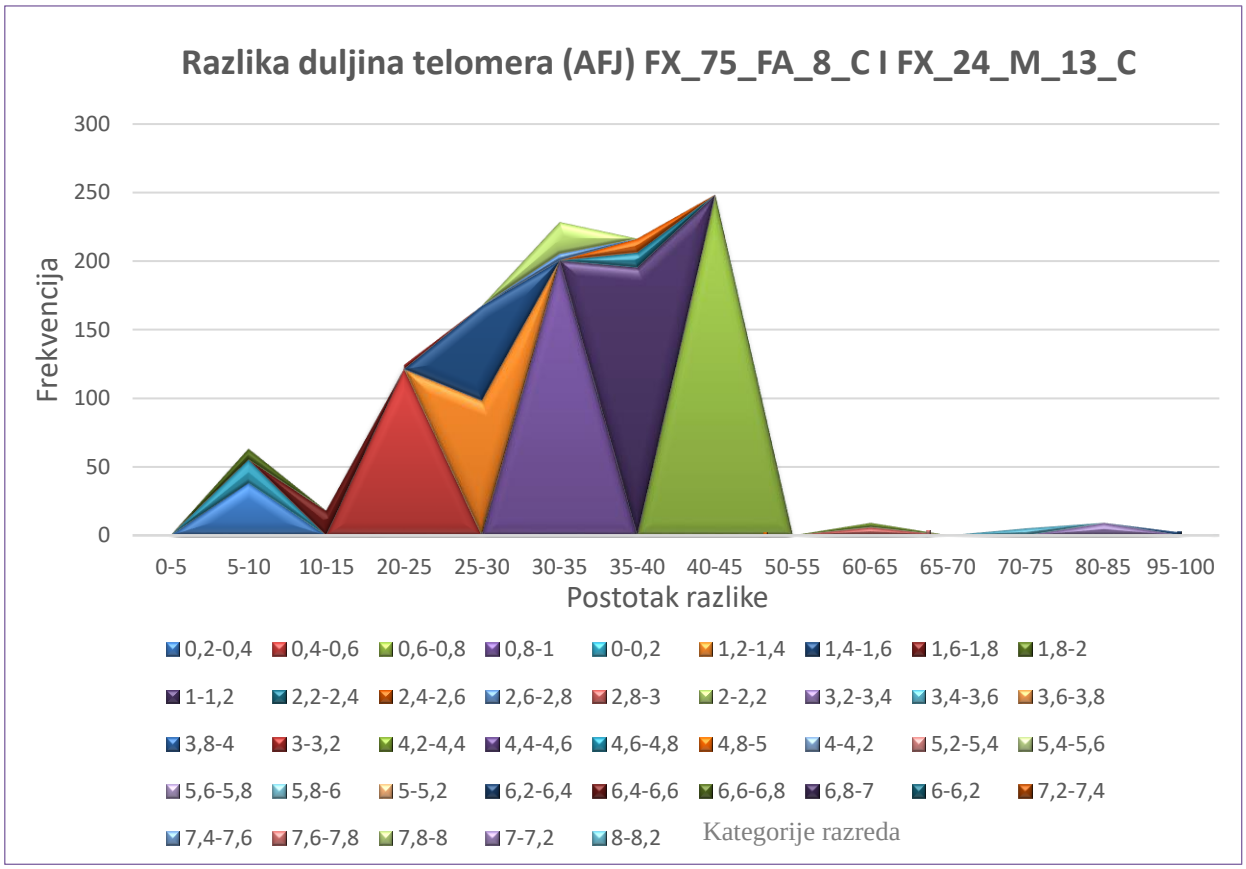
Usporedbom uzoraka tretiranih i ne tretiranih stanica fibroblasta mlađeg donora (Grafikon 2) uočen je najveći postotak razlike, 65-70-% sa frekvencijom ~510 za razred duljina od 0-0,2. S obzirom da je na početku u kontrolnoj skupini uzoraka frekvencija za taj razred bila ~ 93, a nakon tretmana ~607 na temelju preliminarne studije pokazuju da je moguće da uslijed tretiranja sa sastojkom p19 može doći do povećanja broja kraćih telomera. Kao i kod prethodne analize FX_75_FA_8_C/SSE uočava se isti uzorak ponavljanja frekvencije za razrede 1,4-1,6 AFJ, 1,6-1,8 AFJ, 2-2,2 AFJ te stupnjem razlike od 35% do 40 %. Minimalnu razliku između tretiranih i ne tretiranih uzoraka sa razlikom od 10% do 15% pokazuju razredi 0,4-0,6 AFJ, 1,2-1,4 AFJ, 1-1,2 AFJ. Frekvencija razlika za te razrede iznosi ~ 46. Na temelju preliminarne studije za ovaj skup podataka, razredi 0,6 do 1,2 imaju najmanji stupanj razlike. Na temelju ovih pokazatelja možemo preliminarno zaključiti kako je zaista došlo do povećanja broja kraćih telomera za razred 0-0,2 AFJ, no nasuprot tome za razrede 0,8-1; 1-1,2; 1,8-2 AFJ došlo je do produljenja odnosno do povećanja broja duljih telomera kod tretiranog uzorka mladog donora u odnosu na kontrolni uzorak mladog donora.



Grafikon 2. Dijagram prikazuje na x osi postotak razlike između dva uzorka (FX_24_M_13_C/SSE), y-osi brojčanu razliku dvaju uzoraka, a njegova površina predstavlja razred duljina izražen u AFJ.

4.6.3 Razlika duljina telomera kontrolnog uzorka FX_24_M_13_C mlađeg donora i kontrolnog uzorka FX_75_FA_8_C starijeg donora

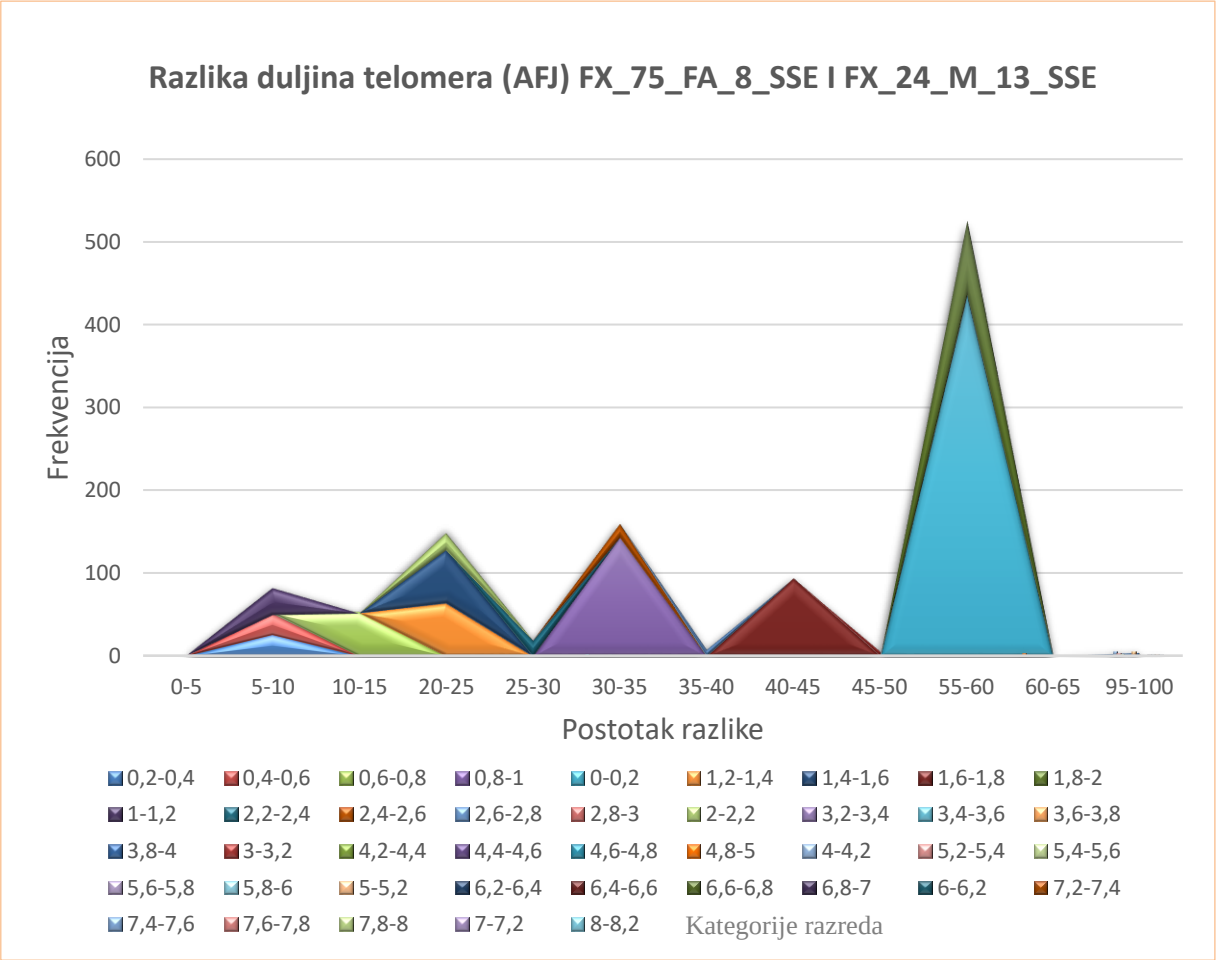
Usporedbom kontrolnih uzoraka stanica fibroblasta mlađeg i starijeg donora (Grafikon 3) utvrđeno je da u ovom eksperimentu postoji najveća razlika između frekvencija unutar skupine 0,6-0,8 AFJ i to za 45%. Prosjek distribuiranih razreda (2-2,6) razlikuje se za 35-40% unutar setova. Dok je najmanja razlika (5-10%) kod već skraćenih telomera unutar razreda (0-0,4 AFJ i 1,6-2 AFJ) sa frekvencijom ~50. Na temelju preliminarne studije za dane setove podataka može se pretpostaviti da se najmanje skraćuju već skraćene telomere, dok one duže podložnije su skraćivanju. Obe skupine uzoraka su kontrolne skupine, no već u samom početku kod starijeg donora se pokazala veća frekvencija duljih telomera unutar razreda 0,6-1,4 AFJ u odnosu na mlađeg donora. U svakom razredu AFJ, uzorci starijeg donora prednjačili su za 50% većim brojem ponavljanja intenziteta signala telomera u odnosu na mlađeg donora.



Grafikon 3. Dijagram prikazuje na x osi postotak razlike između dva uzorka (FX_75_FA_8_C i FX_24_M_13_C), y-osi brojčanu razliku dvaju uzoraka, a njegova površina predstavlja razred duljina izražen u AFJ.

4.6.4 Razlika duljina telomera tretiranog uzorka FX_24_M_13_SSE mlađeg donora i tretiranog uzorka FX_75_FA_8_SSE starijeg donora

Usporedbom uzoraka tretiranih stanica fibroblasta mlađeg i starijeg donora (Grafikon 4) najveći postotak razlike (~50%) postoji unutar razreda 0-0,2 AFJ. To je zbog toga što je u tom razredu kod mlađeg donora bilo preko 70 % zastupljenosti telomera te duljine nakon tretmana, dok je kod starijeg donora nakon tretmana bilo zastupljeno samo 25%. Ujedno je to i razred u kojem se nalaze najkraće telomere. Mlađi donor pri početku u toj kategoriji je imao samo 93 telomere te duljine, dok je stariji donor imao 110. Nakon tretmana mlađi donor je u toj kategoriji imao 607 dok je stariji donor imao 171. Razlika od 5-10% se uočava unutar razreda 0,2-0,6 AFJ te kod 1-1,2 AFJ. Usporedbom razreda od 0,8 do 2,2 AFJ tretiranih stanica fibroblasta starog i mladog donora na temelju preliminarnog istraživanja pokazalo se da je tretman sredstvom p19 uspješniji kod mlađeg donora za 15% u prosjeku u odnosu na starijeg donora.



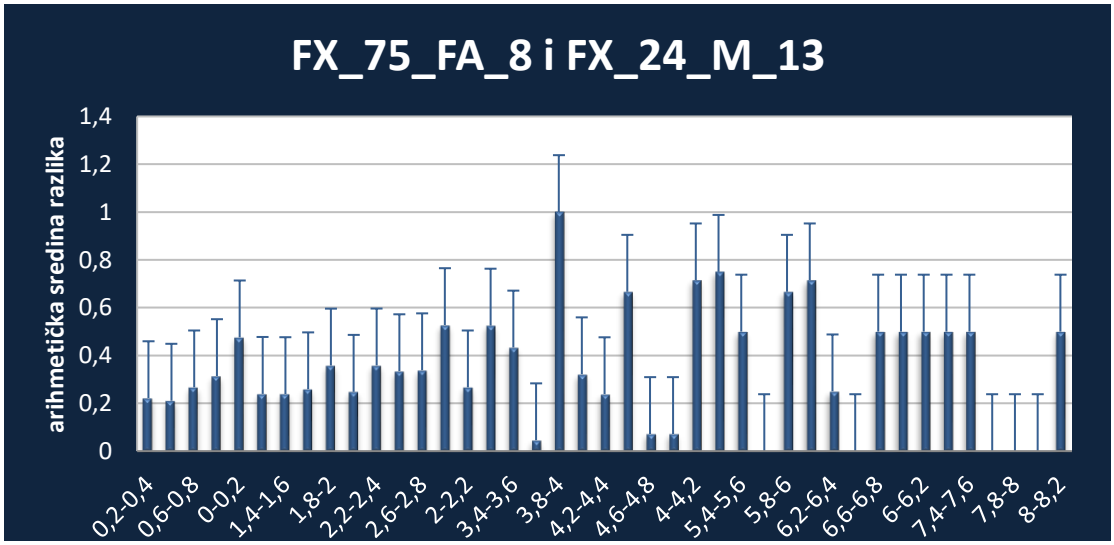
Grafikon 4. Dijagram prikazuje na x osi postotak razlike između dva uzorka (FX_75_FA_8_SSE i FX_24_M_13_SSE), y-osi brojčanu razliku dvaju uzoraka, a njegova površina predstavlja razred duljina izražen u AFJ.

4.7 Analiza razlike duljina telomera u odnosu na kategorije razreda arbitrarnih jedinica

4.7.1 Analiza razlike duljina telomera u odnosu na kategorije razreda arbitrarnih jedinica uzoraka FX_75_FA_8 i FX_24_M_13

Dodatna analiza razlike duljina telomera provedena je uz tri parametra: aritmetičke sredine razlika izražene u postocima, standardna devijacija razlika između duljina telomera i frekvencije po kategorijama duljine razreda (intenzitet signala) izražene u arbitrarnim fluorescencijskim jedinicama (Histogram 5).

Uočljiva je povezanost kod svih uzoraka kako dolazi do proporcionalnog pada razlike s duljinom telomera. Ta povezanost je i s obzirom na uzorke jesu li tretirani ili ne te potječu li od mlađih odnosno starijih stanica fibroblasta. Najveće razlike uočene između dviju populacije nalaze se u razredima duljina koje su neučestale poput 3,8-4 AFJ. Te se taj trend nastavlja s porastom duljine telomera (AFJ). Standardna devijacija iznosi 0,2381, stoga većina razlika zaista je proporcionalna s smanjenjem duljine telomera (AFJ) osim u graničnim slučajevima.



Histogram 5. Aritmetičke sredine razlika između tretiranih i kontrolnih skupina uzoraka FX_75_FA_8 i FX_24_M_13

5. RASPRAVA

Proučavanje rasta ljudskih stanica u kulturi pokazalo je kako postoje razlike u proliferativnom potencijalu stanica iste populacije(Smith i Whitney 1980), odnosno kako sve stanice ne stare istom dinamikom. Teorija „opredjeljenja fibroblasta prema starenju“ (engl. *Commitment theory of cellular aging*) govori kako tijekom rane stanične diobe dolazi do „opredjeljenja“ stanica prema starenju, nakon čega broj staničnih diobi postaje ujednačen sve do prestanka rasta. Konstantni broj staničnih diobi može se determinirati uz pomoć postupnog gubitka telomera (Holliday 2012). Kako je broj skraćivanja telomera ograničen tako je ograničen i stanični rast, tj. dolazi do zaustavljanja daljnjih diobi.

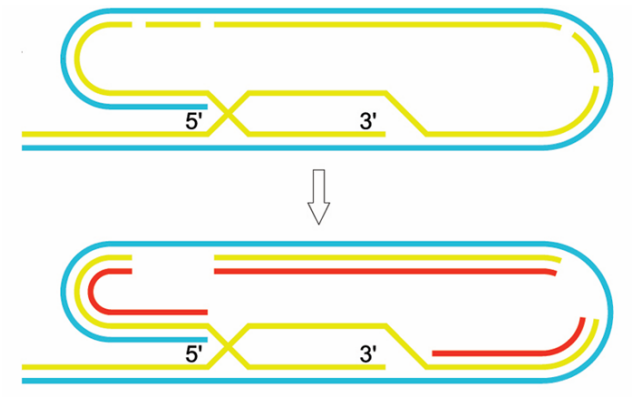
Molekularni sat skraćivanja telomera je mehanizam koji određuje potencijal rasta za određenu kulturu stanica. Skraćivanje telomera popratna je pojava svake stanične diobe, nastaje kao posljedica nepotpune replikacije kromosomskih krajeva za vrijeme sinteze DNA (Holliday 2012). U normalnim ljudskim fibroblastima telomere se postepeno skraćuju sa svakom diobom stanica (Harley i sur. 1990), za 50 – 200 nukleotida kao posljedica nepotpune replikacije i razgradnje C – bogatog lanca (Baird 2008).Osim postepenog skraćivanja telomera može doći i do naglog skraćivanja (Vidaček i sur. 2010).

Dokazano je kako fibroblasti normalnog fenotipa iz kože odraslih donora imaju ograničenu proliferaciju (Holliday 2014). Mnoga istraživanja o odnosu starosti donora i životnog vijeka njihove kulture fibroblasta pokazala su inverzan odnos između starosti donora i replicirajućeg životnog vijeka stanica u kulturi (Holliday 2014). Dosada nitko nije izmjerio stvarni životni vijek iz jedne jedinke ljudskih stanica kožnih fibroblasta. Jedna kultura ne osigurava realnu mjeru za dugovječnost. Glavno uporište za teoriju „opredjeljivanja“ potječe iz eksperimenta kod kojih je veličina populacije znatno smanjenja na određenim PD razinama (engl. *population doublings*). Otkriće da se telomere progresivno smanjuju kod ljudskih fibroblasta tijekom njihovog *in vitro* životnog vijeka, može se prepisati gubitku aktivnosti enzima telomeraze. Postoji i drugačiji molekularni sat, konstantan gubitak DNA metilacija tijekom životnog vijeka, dok transformirane besmrtne stanice ostaju na konstantnoj razini metiliranosti CpG mjesta (Holliday 2014).

Skraćivanje telomera i replikativno starenje zasigurno nisu jedini uzrok starenju stanica i organizma u konačnici. Poznato je da različiti utjecaji kao što su oksidativni stres, dvolančani lomovi DNA i prekomjerna ekspresija nekih onkogena također izazivaju fenotip starih stanica (Campisi 2013).

S obzirom da telomere imaju ključnu ulogu u staničnom starenju i karcinogenezi posljednjih nekoliko desetljeća se ulažu veliki napori u razvoj sve boljih metoda za određivanje njihove točne duljine. Metoda koju su razvili Peter Lansdorp i njegovi suradnici (Lansdorp i sur. 1996), telomerni Q-FISH, omogućila je analizu telomera manjeg broja stanica odnosno pojedinačnih stanica. Fluorescentno obilježena PNA proba se hibridizira na metafazne kromosome. Telomerna duljina individualnih kromosomskih krakova se izražava kao telomerna fluorescentna jedinica (engl. *Telomere Fluorescence Unit, TFU*). I ova metoda ima nekoliko nedostataka, teško je prevesti TFU u stvarnu duljinu DNA i također postoji granica ispod koje nije moguća detekcija s obzirom da se radi o hibridizacijskoj metodi. Glavno ograničenje metode je ipak činjenica da je ograničena samo na stanice koje se dijele pa tako nije moguće odrediti duljinu telomera u starim stanicama koje su se prestale dijeliti.

Postoje razni modeli koji objašnjavanju razlike u signalima telomera dobivenih metodom Q-PNA-FISH, a da se istovremeno zadrži reproducibilnost dobivenih mjerenja (Cukusic Kalajzic i sur. 2014). Jedan od modela se zasniva na nepotpunom obilježavanju G-bogatog lanca sondom PNA. Telomere su osjetljive na oksidativni stres te ukoliko su stanice izložene agensima koji ga uzrokuju dolazi do jednolančanih lomova u genomskoj DNA. Puno je veća frekvencija takvih lomova u telomernoj DNA na G-bogatom lancu nego drugdje u genomu (Von Zglinicki i sur. 2000).Prilikom korištenja agresivnih kemikalija i metoda dolazi do nastajanja jednolančanih lomova duž telomere na G-bogatom lancu i odvajanja jednolančaih dijelova telomerne DNA. Takve telomere pokazuju smanjeni intenzitet fluorescencije nakon hibridizacije sa sondom Cy3-$(C_3TA_2)_3$PNA (Slika 16.).



Slika 14. Nepotpuno obilježvanje G-bogatog lanca sondom Cy3-$(C_3TA_2)_3$PNA ukoliko dođe do gubitka dijela G-bogatog lanca telomerne DNA uslijed nastanka jednolančanih lomova. ▬ sonda Cy3-$(C_3TA_2)_3$PNA (Preuzeto: Čukušić- Kalajžić 2014.)

Jedan od ciljeva ovog diplomskog rada bio je kvantificirati intenzitet signala telomera ljudskih fibroblasta iz kože metodom Q-PNA FISH, te utvrditi postoje li razlike u duljini telomera stanica fibroblasta iz kože kod kontrolne skupine i skupine tretirane sredstvom za pomlađivanje p19. Radi se o stanicama fibroblasta iz kože mladog donora starosti 24 godine, čiji su fibroblasti prošli 13 populacijskih udvostručavanja, te fibroblastima starije donorice od 75 godina nakon 8 populacijskih udvostručavanja. U konačnici, cilj je bio utvrditi dinamiku skraćivanja telomera radi određivanja frekvencije mogućih skraćivanja koja imaju presudni utjecaj stanično starenje.

Dosad objavljeni rezultati pokazali su reproducibilnost u kvantitativnoj analizi PNA-FISH signala između određenih tipova stanica, različitih kromosoma iste stanične linije te istih ili različitih jedinki (Londoño-Vallejo i sur. 2001, Graakjaer i sur. 2004, Graakjaer i sur. 2006, Gilson i Londoño-Vallejo 2007, Cukusic Kalajzic i sur. 2014) što govori kako je to statistički pouzdana metoda za mjerenje duljine telomera.

Usporedbom kontrolnih uzoraka stanica fibroblasta mlađeg i starijeg donora utvrđeno je kako kod starijeg donora postoji veća frekvencija duljih telomera unutar razreda 0,6-1,4 AFJ u odnosu na mlađeg donora. U svakom razredu AFJ, uzorci starijeg donora prednjačili su za 50% većim brojem ponavljanja intenziteta signala telomera u odnosu na mlađeg donora. Ta razlika u rezultatima se može pripisati i aktivnosti telomeraze koja kao kalup uzima dužu

kromatidu i koristi je za sintezu kraće dok ne izjednači njihove dužine (Crabbe i sur. 2004). Smanjivanjem razlika u duljini smanjuje se i aktivnost telomeraze sve dok se ne dostigne optimum.

Usporedba razreda od 0,8 do 2,2 AFJ tretiranih stanica fibroblasta starog i mladog donora, na temelju preliminarnog istraživanja, pokazuje kako je tretman sredstvom p19 uspješniji kod mlađeg donora u prosjeku za 15% u odnosu na starijeg donora. Ovakav rezultat može imati razna uporišta, osim starosti postoje i drugi faktori kao spol, vitalnost, stečena rezistentnost tijekom godina i reakcija na tretman sredstvom za pomlađivanje p19.

Kod tretiranih stanica fibroblasta u uzorku starijeg donora (~150) telomere su kraće u odnosu na 0,6-0,8 AFJ razred kod kontrolnog uzorka starijeg donora (~470). Mogući razlozi neujednačene raspodjele intenziteta signala u uzorku su preagresivne kemikalije i mehanička oštećenja prilikom tretiranja metafaznih kromosoma. Osim mogućih oštećenja prilikom tretmana metafaznih kromosoma, za pad vrijednosti intenziteta signala odgovorna je i smanjena aktivnost telomeraze u starijoj dobi.

Učestalost velikih razlika u signalima telomera ne može se pripisati samo fenomenu naglog skraćivanja telomera. Stoga se pretpostavlja da pored naglog skraćivanja telomera koje je relativno rijedak događaj, primijećene razlike mogu nastati uslijed procesa PNA hibridizacije, složenosti suprastruktura telomerne DNA, tj. t-petlje i vezanih proteina te razlika u postreplikacijskoj obradi novonastalih telomernih lanaca (Čukušić-Kalajžić i sur. 2014).

Na temelju preliminarnih rezultata ovog eksperimenta, koji su pokazali kako je u stanicama fibroblasta mlađeg donora, nakon tretmana sredstvom za pomlađivanje p19, došlo do povećanja broja iznimno kratkih telomera za 70%, odnosno do povećanja broja intenziteta signala u razredima duljih telomera za 40%, potrebno je provesti temeljitija i raznovrsnija istraživanja s obzirom na izbor metoda za određivanje točne duljine telomera. Posebno bi bile korisne metode STELA (engl. ***S**ingle **T**elomere **L**ength **A**nalysis*) kojom je moguće točno odrediti jako kratke telomere i TRF (engl. ***T**erminal **R**estriction **F**ragment*) kojom je moguće utvrditi heterogenost duljina telomera unutar staničnih populacija. Zanimljivo bi bilo metodom kvantitativnog RT-PCR-a pogledati i ekspresiju gena za telomerazu (hTERT) kao i gena TERF-1 koji suprimira produžavanje telomera, radi određivanja razine njihove aktivnosti.

6. ZAKLJUČCI

S obzirom na vlastita mjerenja i prikazane rezultate te dostupne literaturne podatke mogu donijeti sljedeće preliminarne zaključke:

1. Razlike u intenzitetu telomernih signala između kontrolnog uzorka FX_75_FA_8_C i tretiranog uzorka FX_75_FA_8_SSE stanica fibroblasta iz kože starijeg donora pokazuju kako tretman sredstvom za pomlađivanje p 19 uvjetuje povećanje broja skraćenih telomera za 50 % u odnosu na početno stanje.

2. Analiza intenziteta signala telomera kontrolnog uzorka FX_24_M_13_C i tretiranog uzorka FX_24_M_13_SSE stanica fibroblasta iz kože mlađeg donora pokazuje kako je uslijed tretmana sredstvom za pomlađivanje p19 došlo do povećanja broja iznimno kratkih telomera za 70 % te je istovremeno došlo do povećanja broja intenziteta signala u razredima duljih telomera za 40 %.

3. Q-PNA-FISH analiza dinamike skraćivanja telomera stanica fibroblasta iz kože različitih donora, kontrolnog uzorka FX_24_M_13_C mlađeg donora i kontrolnog uzorka FX_75_FA_8_C starijeg donora, pokazuje da su razlike u duljini telomera veće i učestalije kod starijeg donora za 50% u razredima duljine od 0,8 – 2 AFJ. To bi sugeriralo kako stariji donor ima duže telomere u odnosu na mlađeg donora što nije u skladu s dosadašnjim istraživanjima

4. Razlika duljina telomera tretiranog uzorka FX_24_M_13_SSE mlađeg donora i tretiranog uzorka FX_75_FA_8_SSE starijeg donora ukazuje da su telomere mlađeg donora podložnije produljivanju uslijed djelovanja sredstvom za pomlađivanje p19 jer je uspješnost obnavljanja telomera mlađeg donora za 40 % veća u razredima kako kraćih tako i duljih telomera.

5. Standardna devijacija razlike intenziteta jačine telomernih signala između svih populacija pokazuje da je razlika u intenzitetu signala proporcionalna s smanjenjem duljine telomera izraženih u AFJ.

7. LITERATURA

Adams J, Martin-Ruiz C, Pearce MS, White M, Parker L & von Zglinicki T (2007) No association between socio-economic status and white blood cell telomere length. *Aging Cell* **6:** 125–128 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17156082 [Accessed September 19, 2017]

Akiyama BM, Parks JW & Stone MD (2015) The telomerase essential N-terminal domain promotes DNA synthesis by stabilizing short RNA-DNA hybrids. *Nucleic Acids Res.* **43:** 5537–5549 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25940626 [Accessed September 19, 2017]

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K & Walter P (2002) Molecular biology of the cell Garland Science

Aubert G & Lansdorp PM (2008) Telomeres and Aging. *Physiol. Rev.* **88:** Available at: http://physrev.physiology.org/content/88/2/557.long#ref-205 [Accessed September 12, 2017]

Autexier C & Lue NF (2006) The structure and function of telomerase reverse transcriptase. *Annu. Rev. Biochem.* **75:** 493–517 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16756500 [Accessed September 18, 2017]

Autexier C, Pruzan R, Funk WD & Greider CW (1996) Reconstitution of human telomerase activity and identification of a minimal functional region of the human telomerase RNA. *EMBO J.* **15:** 5928–35 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8918470 [Accessed September 19, 2017]

Azhibek D, Skvortsov D, Andreeva A, Zatsepin T, Arutyunyan A, Zvereva M & Dontsova O (2016) TERRA mimicking ssRNAs prevail over the DNA substrate for telomerase *in vitro* due to interactions with the alternative binding site. *J. Mol. Recognit.* **29:** 242–247 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26669798 [Accessed September 19, 2017]

Azzalin CM, Reichenbach P, Khoriauli L, Giulotto E & Lingner J (2007) Telomeric Repeat

Containing RNA and RNA Surveillance Factors at Mammalian Chromosome Ends. *Science (80-.).* **318:** 798–801 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17916692 [Accessed September 19, 2017]

Babizhayev MA, Savel'yeva EL, Moskvina SN & Yegorov YE (2011) Telomere Length is a Biomarker of Cumulative Oxidative Stress, Biologic Age, and an Independent Predictor of Survival and Therapeutic Treatment Requirement Associated With Smoking Behavior. *Am. J. Ther.* **18:** e209–e226 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20228673 [Accessed September 19, 2017]

Baird DM (2008) Telomere dynamics in human cells. *Biochimie* **90:** 116–121 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17854970 [Accessed September 24, 2017]

Baumann P & Price C (2010) Pot1 and telomere maintenance. *FEBS Lett.* **584:** 3779–3784 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20493859 [Accessed September 19, 2017]

Benetti R, García-Cao M & Blasco MA (2007) Telomere length regulates the epigenetic status of mammalian telomeres and subtelomeres. *Nat. Genet.* **39:** 243–250 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17237781 [Accessed September 19, 2017]

Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S & Wright WE (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279:** 349–52 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9454332 [Accessed September 19, 2017]

Bojesen SE, Pooley KA, Johnatty SE, Beesley J, Michailidou K, Tyrer JP, Edwards SL, Pickett HA, Shen HC, Smart CE, Hillman KM, Mai PL, Lawrenson K, Stutz MD, Lu Y, Karevan R, Woods N, Johnston RL, French JD, Chen X, et al (2013) Multiple independent variants at the TERT locus are associated with telomere length and risks of breast and ovarian cancer. *Nat. Genet.* **45:** 371–84, 384–2 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23535731 [Accessed September 18, 2017]

Brouilette S, Singh RK, Thompson JR, Goodall AH & Samani NJ (2003) White Cell Telomere Length and Risk of Premature Myocardial Infarction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23:** 842–846 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12649083 [Accessed

September 19, 2017]

Brouilette SW, Moore JS, McMahon AD, Thompson JR, Ford I, Shepherd J, Packard CJ, Samani NJ & West of Scotland Coronary Prevention Study Group (2007) Telomere length, risk of coronary heart disease, and statin treatment in the West of Scotland Primary Prevention Study: a nested case-control study. *Lancet* **369:** 107–114 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17223473 [Accessed September 19, 2017]

Burla R, Carcuro M, Raffa GD, Galati A, Raimondo D, Rizzo A, La Torre M, Micheli E, Ciapponi L, Cenci G, Cundari E, Musio A, Biroccio A, Cacchione S, Gatti M & Saggio I (2015) AKTIP/Ft1, a New Shelterin-Interacting Factor Required for Telomere Maintenance. *PLOS Genet.* **11:** e1005167 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26110528 [Accessed September 19, 2017]

Campisi J (2013) Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annu. Rev. Physiol.* **75:** 685–705 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23140366 [Accessed September 24, 2017]

Cawthon RM, Smith KR, O'Brien E, Sivatchenko A & Kerber RA (2003) Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet* **361:** 393–395 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12573379 [Accessed September 19, 2017]

Celli GB & de Lange T (2005) DNA processing is not required for ATM-mediated telomere damage response after TRF2 deletion. *Nat. Cell Biol.* **7:** 712–718 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15968270 [Accessed September 19, 2017]

Chen J-L, Opperman KK & Greider CW (2002) A critical stem-loop structure in the CR4-CR5 domain of mammalian telomerase RNA. *Nucleic Acids Res.* **30:** 592–7 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11788723 [Accessed September 19, 2017]

Cherkas LF, Hunkin JL, Kato BS, Richards JB, Gardner JP, Surdulescu GL, Kimura M, Lu X, Spector TD & Aviv A (2008) The Association Between Physical Activity in Leisure Time and Leukocyte Telomere Length. *Arch. Intern. Med.* **168:** 154 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18227361 [Accessed September 19, 2017]

Choi MJ, Cho KH, Lee S, Bae YJ, Jeong KJ, Rha SY, Choi EJ, Park JH, Kim JM, Lee J-S, Mills GB & Lee HY (2015) hTERT mediates norepinephrine-induced Slug expression and ovarian cancer aggressiveness. *Oncogene* **34:** 3402–12 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25151968 [Accessed September 18, 2017]

Cong Y-S, Wright WE & Shay JW (2002) Human telomerase and its regulation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66:** 407–25, table of contents Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12208997 [Accessed September 18, 2017]

Crabbe L, Verdun RE, Haggblom CI & Karlseder J (2004) Defective Telomere Lagging Strand Synthesis in Cells Lacking WRN Helicase Activity. *Science (80-.).* **306:** 1951–1953 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15591207 [Accessed September 24, 2017]

Cukusic Kalajzic A, Skrobot Vidacek N, Huzak M, Ivankovic M & Rubelj I (2014) Telomere Q-PNA-FISH - Reliable Results from Stochastic Signals. *PLoS One* **9:** e92559 Available at: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0092559 [Accessed September 24, 2017]

Cusanelli E, Romero CAP & Chartrand P (2013) Telomeric Noncoding RNA TERRA Is Induced by Telomere Shortening to Nucleate Telomerase Molecules at Short Telomeres. *Mol. Cell* **51:** 780–791 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24074956 [Accessed September 19, 2017]

Deng Z, Norseen J, Wiedmer A, Riethman H & Lieberman PM (2009) TERRA RNA Binding to TRF2 Facilitates Heterochromatin Formation and ORC Recruitment at Telomeres. *Mol. Cell* **35:** 403–413 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19716786 [Accessed September 19, 2017]

Forsythe HL, Jarvis JL, Turner JW, Elmore LW & Holt SE (2001) Stable Association of hsp90 and p23, but Not hsp70, with Active Human Telomerase. *J. Biol. Chem.* **276:** 15571–15574 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11274138 [Accessed September 18, 2017]

Fredriksson NJ, Ny L, Nilsson JA & Larsson E (2014) Systematic analysis of noncoding somatic mutations and gene expression alterations across 14 tumor types. *Nat. Genet.* **46:** 1258–63 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25383969 [Accessed

September 18, 2017]

Frenck RW, Blackburn EH & Shannon KM (1998) The rate of telomere sequence loss in human leukocytes varies with age. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95:** 5607–10 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9576930 [Accessed September 19, 2017]

Gilson E & Londoño-Vallejo JA (2007) Telomere Length Profiles in Humans: All Ends are Not Equal. *Cell Cycle* **6:** 2486–2494 Available at: http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cc.6.20.4798 [Accessed September 24, 2017]

GOMEZ DE, ARMANDO RG, FARINA HG, MENNA PL, CERRUDO CS, GHIRINGHELLI PD & ALONSO DF (2012) Telomere structure and telomerase in health and disease. *Int. J. Oncol.* **41:** 1561–1569 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22941386 [Accessed September 19, 2017]

GRAAKJAER J, Londono-Vallejo JA, Christensen K & Kølvraa S (2006) The Pattern of Chromosome-Specific Variations in Telomere Length in Humans Shows Signs of Heritability and Is Maintained through Life. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1067:** 311–316 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16804004 [Accessed September 24, 2017]

Graakjaer J, Pascoe L, Der-Sarkissian H, Thomas G, Kolvraa S, Christensen K & Londono-Vallejo J-A (2004) The relative lengths of individual telomeres are defined in the zygote and strictly maintained during life. *Aging Cell* **3:** 97–102 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15153177 [Accessed September 24, 2017]

Hansen DT, Thiyagarajan T, Larson AC & Hansen JL (2016) Telomerase repeat amplification protocol (TRAP) activity upon recombinant expression and purification of human telomerase in a bacterial system. *Protein Expr. Purif.* **123:** 6–13 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26965413 [Accessed September 18, 2017]

Harley CB, Futcher AB & Greider CW (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345:** 458–460 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2342578 [Accessed September 24, 2017]

Holliday R (2012) Telomeres and telomerase: the commitment theory of cellular ageing revisited. *Sci. Prog.* **95:** 199–205 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22893980 [Accessed September 23, 2017]

Holliday R (2014) The Commitment of Human Cells to Senescence. In *Interdisciplinary topics in gerontology* pp 1–7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24862011 [Accessed September 23, 2017]

Holt SE, Aisner DL, Baur J, Tesmer VM, Dy M, Ouellette M, Trager JB, Morin GB, Toft DO, Shay JW, Wright WE & White MA (1999) Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes Dev.* **13:** 817–26 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10197982 [Accessed September 18, 2017]

Horn S, Figl A, Rachakonda PS, Fischer C, Sucker A, Gast A, Kadel S, Moll I, Nagore E, Hemminki K, Schadendorf D & Kumar R (2013) TERT Promoter Mutations in Familial and Sporadic Melanoma. *Science (80-.).* **339:** 959–961 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23348503 [Accessed September 18, 2017]

Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov G V., Chin L & Garraway LA (2013) Highly Recurrent TERT Promoter Mutations in Human Melanoma. *Science (80-.).* **339:** 957–959 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23348506 [Accessed September 18, 2017]

Jackson SE (2012) Hsp90: Structure and Function. In *Topics in current chemistry* pp 155–240. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22955504 [Accessed September 18, 2017]

Jiang H, Schiffer E, Song Z, Wang J, Zurbig P, Thedieck K, Moes S, Bantel H, Saal N, Jantos J, Brecht M, Jeno P, Hall MN, Hager K, Manns MP, Hecker H, Ganser A, Dohner K, Bartke A, Meissner C, et al (2008) Proteins induced by telomere dysfunction and DNA damage represent biomarkers of human aging and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105:** 11299–11304 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18695223 [Accessed September 19, 2017]

Keppler BR, Grady AT & Jarstfer MB (2006) The Biochemical Role of the Heat Shock Protein 90 Chaperone Complex in Establishing Human Telomerase Activity. *J. Biol. Chem.* **281:** 19840–19848 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16714764 [Accessed

September 18, 2017]

Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, Bettegowda C, Agrawal N, Diaz LA, Friedman AH, Friedman H, Gallia GL, Giovanella BC, Grollman AP, He T-C, He Y, Hruban RH, Jallo GI, Mandahl N, Meeker AK, Mertens F, Netto GJ, Rasheed BA, et al (2013) TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110:** 6021–6 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23530248 [Accessed September 18, 2017]

Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL & Shay JW (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **266:** 2011–5 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7605428 [Accessed September 18, 2017]

Kim SH, Cho KH, Kim YN, Jeong BY, Park CG, Hur GM & Lee HY (2016) Resveratrol attenuates norepinephrine-induced ovarian cancer invasiveness through downregulating hTERT expression. *Arch. Pharm. Res.* **39:** 240–8 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26428673 [Accessed September 18, 2017]

Kocak H, Ballew BJ, Bisht K, Eggebeen R, Hicks BD, Suman S, O'Neil A, Giri N, Maillard I, Alter BP, Keegan CE, Nandakumar J, Savage SA, Nandakumar J & Savage SA (2014) Hoyeraal-Hreidarsson syndrome caused by a germline mutation in the TEL patch of the telomere protein TPP1. *Genes Dev.* **28:** 2090–2102 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25233904 [Accessed September 19, 2017]

Kyo S, Takakura M, Fujiwara T & Inoue M (2008) Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers. *Cancer Sci.* **99:** 1528–38 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18754863 [Accessed September 18, 2017]

Lai CK, Miller MC & Collins K (2002) Template boundary definition in Tetrahymena telomerase. *Genes Dev.* **16:** 415–420 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11850404 [Accessed September 19, 2017]

Lansdorp PM, Verwoerd NP, van de Rijke FM, Dragowska V, Little MT, Dirks RW, Raap AK & Tanke HJ (1996) Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum. Mol.*

Genet. **5:** 685–91 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8733138 [Accessed September 24, 2017]

Londoño-Vallejo JA, DerSarkissian H, Cazes L & Thomas G (2001) Differences in telomere length between homologous chromosomes in humans. *Nucleic Acids Res.* **29:** 3164–71 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11470873 [Accessed September 24, 2017]

Lue NF (2004) Adding to the ends: what makes telomerase processive and how important is it? *BioEssays* **26:** 955–962 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15351966 [Accessed September 19, 2017]

MacNeil DE, Bensoussan HJ & Autexier C (2016) Telomerase Regulation from Beginning to the End. *Genes (Basel).* **7:** Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27649246 [Accessed September 19, 2017]

Makhnevych T & Houry WA (2012) The role of Hsp90 in protein complex assembly. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1823:** 674–682 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21945180 [Accessed September 18, 2017]

McGrath M, Wong JYY, Michaud D, Hunter DJ & De Vivo I (2007) Telomere Length, Cigarette Smoking, and Bladder Cancer Risk in Men and Women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **16:** 815–819 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17416776 [Accessed September 19, 2017]

Mitchell JR & Collins K (2000) Human telomerase activation requires two independent interactions between telomerase RNA and telomerase reverse transcriptase. *Mol. Cell* **6:** 361–71 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10983983 [Accessed September 19, 2017]

MORIARTY TJ, Marie-Egyptienne DT & Autexier C (2005) Regulation of 5’ template usage and incorporation of noncognate nucleotides by human telomerase. *RNA* **11:** 1448–1460 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16120835 [Accessed September 19, 2017]

Moriarty TJ, Ward RJ, Taboski MAS & Autexier C (2005) An Anchor Site-Type Defect in

Human Telomerase That Disrupts Telomere Length Maintenance and Cellular Immortalization. *Mol. Biol. Cell* **16:** 3152–3161 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15857955 [Accessed September 19, 2017]

Muñoz P, Blanco R, Flores JM & Blasco MA (2005) XPF nuclease-dependent telomere loss and increased DNA damage in mice overexpressing TRF2 result in premature aging and cancer. *Nat. Genet.* **37:** 1063–1071 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16142233 [Accessed September 19, 2017]

Nandakumar J, Bell CF, Weidenfeld I, Zaug AJ, Leinwand LA & Cech TR (2012) The TEL patch of telomere protein TPP1 mediates telomerase recruitment and processivity. *Nature* **492:** 285–289 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23103865 [Accessed September 19, 2017]

Nandakumar J & Cech TR (2013) Finding the end: recruitment of telomerase to telomeres. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14:** 69–82 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23299958 [Accessed September 19, 2017]

Nawrot TS, Staessen JA, Gardner JP & Aviv A (2004) Telomere length and possible link to X chromosome. *Lancet* **363:** 507–510 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14975611 [Accessed September 19, 2017]

Nordfjäll K, Eliasson M, Stegmayr B, Melander O, Nilsson P & Roos G (2008) Telomere Length Is Associated With Obesity Parameters but With a Gender Difference. *Obesity* **16:** 2682–2689 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18820651 [Accessed September 19, 2017]

Palm W & De Lange T (2008) How Shelterin Protects Mammalian Telomeres. Available at: https://pdfs.semanticscholar.org/3c04/b9c152105fdc50f71ee5210c28b05c36f015.pdf [Accessed September 22, 2017]

Prescott J & Blackburn EH (1997) Telomerase RNA mutations in Saccharomyces cerevisiae alter telomerase action and reveal nonprocessivity in vivo and in vitro. *Genes Dev.* **11:** 528–40 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9042865 [Accessed September 19, 2017]

Qi X, Xie M, Brown AF, Bley CJ, Podlevsky JD & Chen JJ-L (2012) RNA/DNA hybrid binding affinity determines telomerase template-translocation efficiency. *EMBO J.* **31:** 150–161 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21989387 [Accessed September 19, 2017]

Redon S, Reichenbach P & Lingner J (2010) The non-coding RNA TERRA is a natural ligand and direct inhibitor of human telomerase. *Nucleic Acids Res.* **38:** 5797–5806 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20460456 [Accessed September 19, 2017]

Schmidt JC, Dalby AB & Cech TR (2014) Identification of human TERT elements necessary for telomerase recruitment to telomeres. *Elife* **3:** Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25271372 [Accessed September 19, 2017]

Schoeftner S & Blasco MA (2008) Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nat. Cell Biol.* **10:** 228–236 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18157120 [Accessed September 19, 2017]

Sexton AN, Regalado SG, Lai CS, Cost GJ, O'Neil CM, Urnov FD, Gregory PD, Jaenisch R, Collins K & Hockemeyer D (2014) Genetic and molecular identification of three human TPP1 functions in telomerase action: recruitment, activation, and homeostasis set point regulation. *Genes Dev.* **28:** 1885–1899 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25128433 [Accessed September 19, 2017]

Sexton AN, Youmans DT & Collins K (2012) Specificity Requirements for Human Telomere Protein Interaction with Telomerase Holoenzyme. *J. Biol. Chem.* **287:** 34455–34464 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22893708 [Accessed September 19, 2017]

Smith JR & Whitney RG (1980) Intraclonal variation in proliferative potential of human diploid fibroblasts: stochastic mechanism for cellular aging. *Science* **207:** 82–4 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7350644 [Accessed September 24, 2017]

Smogorzewska A & de Lange T (2004) Regulation of Telomerase by Telomeric Proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **73:** 177–208 Available at: http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biochem.73.071403.160049 [Accessed September 22, 2017]

Smogorzewska A, van Steensel B, Bianchi A, Oelmann S, Schaefer MR, Schnapp G & de Lange T (2000) Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol. Cell. Biol.* **20:** 1659–68 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10669743 [Accessed September 19, 2017]

Song Z, Von Figura G, Liu Y, Kraus JM, Torrice C, Dillon P, Rudolph-Watabe M, Ju Z, Kestler HA, Sanoff H & Lenhard Rudolph K (2010) Lifestyle impacts on the aging-associated expression of biomarkers of DNA damage and telomere dysfunction in human blood. *Aging Cell* **9:** 607–615 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20560902 [Accessed September 19, 2017]

van Steensel B & de Lange T (1997) Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* **385:** 740–743 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9034193 [Accessed September 19, 2017]

Steinert S, Shay JW & Wright WE (2004) Modification of subtelomeric DNA. *Mol. Cell. Biol.* **24:** 4571–80 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15121873 [Accessed September 19, 2017]

Stiewe T & Pützer BM (2001) p73 in apoptosis. *Apoptosis* **6:** 447–52 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11595834 [Accessed September 19, 2017]

Takubo K, Nakamura K, Izumiyama N, Furugori E, Sawabe M, Arai T, Esaki Y, Mafune K, Kammori M, Fujiwara M, Kato M, Oshimura M & Sasajima K (2000) Telomere shortening with aging in human liver. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **55:** B533-6 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11078086 [Accessed September 19, 2017]

Toogun OA, DeZwaan DC & Freeman BC (2008) The Hsp90 Molecular Chaperone Modulates Multiple Telomerase Activities. *Mol. Cell. Biol.* **28:** 457–467 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17954556 [Accessed September 18, 2017]

Valdes A, Andrew T, Gardner J, Kimura M, Oelsner E, Cherkas L, Aviv A & Spector T (2005) Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet* **366:** 662–664 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16112303 [Accessed September 19, 2017]

Vidaček NŠ, Ćukušić A, Ivanković M, Fulgosi H, Huzak M, Smith JR & Rubelj I (2010) Abrupt telomere shortening in normal human fibroblasts. *Exp. Gerontol.* **45:** 235–242 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20080170 [Accessed September 24, 2017]

Vulliamy T, Marrone A, Goldman F, Dearlove A, Bessler M, Mason PJ & Dokal I (2001) The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Nature* **413:** 432–435 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11574891 [Accessed September 19, 2017]

Wang F, Podell ER, Zaug AJ, Yang Y, Baciu P, Cech TR & Lei M (2007) The POT1–TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature* **445:** 506–510 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17237768 [Accessed September 12, 2017]

Wang JYJ, Gong J, Costanzo A, Yang H-Q, Melino G, Kaelin WG & Levrero M (1999) The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature* **399:** 806–809 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10391249 [Accessed September 19, 2017]

Weinhold N, Jacobsen A, Schultz N, Sander C & Lee W (2014) Genome-wide analysis of noncoding regulatory mutations in cancer. *Nat. Genet.* **46:** 1160–1165 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25261935 [Accessed September 18, 2017]

Werner C, Furster T, Widmann T, Poss J, Roggia C, Hanhoun M, Scharhag J, Buchner N, Meyer T, Kindermann W, Haendeler J, Bohm M & Laufs U (2009) Physical Exercise Prevents Cellular Senescence in Circulating Leukocytes and in the Vessel Wall. *Circulation* **120:** 2438–2447 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19948976 [Accessed September 19, 2017]

Wong JMY & Collins K (2006) Telomerase RNA level limits telomere maintenance in X-linked dyskeratosis congenita. *Genes Dev.* **20:** 2848–58 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17015423 [Accessed September 12, 2017]

Wright DL, Jones EL, Mayer JF, Oehninger S, Gibbons WE & Lanzendorf SE (2001) Characterization of telomerase activity in the human oocyte and preimplantation embryo. *Mol. Hum. Reprod.* **7:** 947–955 Available at: https://academic.oup.com/molehr/article-lookup/doi/10.1093/molehr/7.10.947 [Accessed September 24, 2017]

Wu X, Amos CI, Zhu Y, Zhao H, Grossman BH, Shay JW, Luo S, Hong WK & Spitz MR (2003) Telomere dysfunction: a potential cancer predisposition factor. *J. Natl. Cancer Inst.* **95:** 1211–8 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12928346 [Accessed September 19, 2017]

Yeo M, Rha SY, Jeung HC, Shen XH, Yang SH, An SW, Roh JK & Chung HC (2005) Different role of functional domains of hTR in DNA binding to telomere and telomerase reconstruction. *FEBS Lett.* **579:** 127–132 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15620701 [Accessed September 19, 2017]

von Zglinicki T, Pilger R & Sitte N (2000) Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.* **28:** 64–74 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10656292 [Accessed September 24, 2017]

Zhang Q, Kim N-K & Feigon J (2011) Architecture of human telomerase RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108:** 20325–20332 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21844345 [Accessed September 19, 2017]

Zhou XZ & Lu KP (2001) The Pin2/TRF1-interacting protein PinX1 is a potent telomerase inhibitor. *Cell* **107:** 347–59 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11701125 [Accessed September 19, 2017]

8. METODIČKI DIO

METODIČKI DIO

Ime i prezime nastavnika	Škola	Datum
Mia Pavlinović	III. gimnazija Split	27.09.2017

Nastavna jedinica /tema	Razred
Molekularna osnova nasljeđivanja	4.B

Temeljni koncepti	Ključni pojmovi
Struktura DNA, građa nukleotida, semikonzervativna replikacija DNA, građa kromosoma	Deoksiribonukleinska kiselina (DNA), nukleotid, purinske i pirimidinske baze, semikonzervativna replikacija, kromatin, kromosom

Cilj nastavnog sata (nastavne teme)
Upoznati građu kromosoma i funkciju gena kao pokretača evolucije i nositelja nasljednih svojstava.

Ishodi učenja
1. Objasniti strukturu i građu DNA molekule . 2. Objasniti građu kromosoma. 3. Zaključiti koje su razlike između prokariotskih i eukariotskih gena.

Br.	Razrada ishoda nastavne jedinice	Zadatak/ primjer ključnih pitanja za provjeru ostvarenosti ishoda	KR	PU
1.Objasniti strukturu i građu DNA molekule.				
1.1	Opisati sastav nukleotida.	Što omogućava međusobno sparivanje nukleotida?	2.	
1.2	Razlike dušičnih baza.	Nabroji dušične baze!	2.	
1.3	Zaključiti kako dolazi do povezivanja dušičnih baza.	Zbog čega se različiti nukleotidi mogu povezati?	1.	
1.4	Opisati DNA strukuturu.	Navedi ključne dijelove DNA strukture!	2.	
1.5	Opisati semikonzervativnu replikaciju DNA!	Opiši replikaciju DNA!	1.	
2.Objasniti građu kromosoma.				
2.1	Navesti različite stanične organizacije kromosoma.	Posjeduju li kružnu kromosomsku organizaciju eukariotski organizmi?	2.	
2.2	Opisati nukleosom!	Čemu služe histoni?	2.	
2.3	Objasniti što je gen.	Čega je nositelj gen?	2.	
3.Zaključiti koje su razlike između prokariotskih i eukariotskih gena.				
3.1	Objasniti dijelovi eukariotskog gena.	Prepoznaj na slici koji od navedenih gena su pripadnici prokariotske stanice!	2.	

Kognitivna razina (KR): I. reprodukcija, II. konceptualno razumijevanje i primjena znanja, III. rješavanje problema

Procjena uspješnosti učenja (PU): – odgovara manje od 5 učenika, +/- odgovara otprilike polovina učenika, + odgovara većina učenika

METODIČKI DIO

Artikulacija (pregledni nacrt nastavnog sata)			
Tip sata	Obrada novog nastavnog sadržaja	Trajanje	45 minuta

STRUKTURNI ELEMENT NASTAVNOG SATA		BR. ISHODA	KORISTITI U IZVEDBI	METODA	SOCIOLOŠKI OBLIK RADA	TRAJANJE (min)
UVOD	U uvodnom dijelu sata ću se predstaviti te uvesti učenike u temu današnjeg sata uz pomoć video uratka.		PP	I	F	5
	Što se primjetili na početku video uratka? - Slaganje lego kockica, što smo povezali sa slaganjem uputa za formiranje bilo kojeg živog bića. (R2) Jeste li uočili gdje su zapisane uputa za formiranje živog bića? - Složene su u uzvojnici izgrađenoj od različitih lego kockica.(R1) Je su li se te lego kockice povezivala nasumično ili su tražile svoj par? - Nisu se povezivale nasumično. (R1) Pri kraju videa, vidjeli ste tvorevinu poput klupka vune, možete li predložiti što bi to moglo biti? - Skup svih uputa, tvornica za neke nove molekule (proteine), nemamo asocijacija…(R2-R3) Kao što se mogli zaključiti današnja tema je „Molekularna osnova nasljeđivanja“ te vas molim da zapišete naslov u vaše bilježnice.	1.4	PP	I	F	
RAZRADA	**Slajd 3.** U pozadini možemo uočiti strukturu. Opišite kako ova struktura izgleda i zna li netko što predstavlja?		PP	R	F	25
	- Izgleda kao dvostruka uzvojnica, sa poprečnim dijelovima koji izgledaju prelomljeni, tj. kao da iz dva dijela se sastoje. (R1)	1.4	PP	R	F	
	- To bi bila DNA uzvojnica. (R3)	1.1	PP	R	F	
	Slajd 4. Na prvoj slici prikazana je kemijska struktura kojeg spoja?					
	- Deoksiriboze. (R2)	1.1	PP	R	F	
	Drugi dio ove kemijske strukture koji se nadovezuje na deoksiribozu predstavlja što ?					
	- Fosfatnu skupinu. (R2)	1.1	PP	R	F	
	Preko kojeg atoma je vezana fosfatna skupina na šećer?					
	-Preko 5C atoma. (R2)					
	Znači sada možemo zaključiti što izgrađuje vanjski dio naše DNA uzvojnice i što joj zapravo formira okosnicu?	1.1	PP	R	F	
	- Šećerno-fosfatna okosnica. (R1)	1.1	PP	R	F	
	Osim šećerno fosfatne okosnice, nešto mora graditi i sredinu same DNA					

	uzvojnice. Vidimo da postoji još jedan sastavni dio, a to su dušične baze. Zašto se zovu dušičnim bazama (s obzirom na kemijsku strukturu)? - U svom sastavu sadrže dušik. (R2) Izgledaju li isto sve dušične baze ? - Ne. (R1) Znači ipak postoje različite skupine dušičnih baza. Pa tako jedne od njih zovemo pirimidinske, dok druge nazivamo purinskim bazama. Pirimidinske baze su aromatske heterocikličke organske molekule, koje u sastavu prstena imaju dva dušikova atoma. Pirimidinske baze su citozin i timin. Purinske baze po svom sastavu su heterocikličke aromatske organske molekule koje se sastoje od pirimidinskog prstena i imidazolnog prstena, te u svakom od ta dva prstena se nalaze po dva dušikova atoma. Purinske baze su adenin i gvanin.	1.2 1.2	PP PP	R R	F F	
	Ako je na 5C atom deoksiriboze vezana fosfatna skupina, znači koji je atom još uvijek slobodan za vezivanje određene dušične baze? - Slobodan je 3C atom, tj. vežu se na hidroksilnu skupinu (-OH) na 3C atomu šećera. (R3) Nabrojite od čega je građena DNA! - Izgrađena je od fosfatno-šećerne okosnice i dušičnih baza. (R2) Osnovna jedinica strukture molekule DNA je nukleotid. Nukleotid je izgrađen od šećera, fosfatne skupine i dušične baze.	1.3 1.4	PM PM	R R	F I	
	Kao što smo rekli dušična baza se veže na hidroksilnu skupinu 3C atoma šećera deoksiriboze i to nazivamo 3' krajem polinukleotidnog lanca. Zašto se lanac naziva polinukleotidnim lancem? - Jer „poli“ označava mnogo u ovom slučaju nukleotida. (R1) Drugi kraj lanca je 5' kraj. Prema tome molekula DNA dvostruka zavojnica koju čine dva antiparalelna polinukleotidna lanca međusobno omotana oko zajedničke zamišljene osi. Kao što ste i sami uočili baze se sparuju na točno određeni način. Uvijek se veže jedna pirimidinska baza s jednom purinskom bazom. Timin i adenin povezuju se s dva vodikova mosta. Gvanin i citozin povezju se s tri vodikova mosta.	1.3	PP	R	F	
	Slajd 5. Molekulu DNA prvi je izolirao, iz jezgri bijelih krvnih stanica i spermija lososa, Fridrich Miescher 1870. godine. U otkrivanju strukture molekule DNA sudjelovalo je mnogo znanstvenika 50-tih godina 20. stoljeća: Koji točno znanstvenici i na koji način su oni to otkrili saznat ćete ukoliko pravilno spojite tesktove s imenima znastvenika koji se nalaze pod	1.4	PP	R	F	

	pseudonimom koji je vezan za sami tekst. (R3) Rješenje: Linus Pauling – „razoružani mirni nobelovac“ – pokušao opisati DNA strukturu Maurice Wilkins –„X-ray-man“ – prve slike DNA uz pomoć X-zraka Roslind Franklin – „Ugljenova ljubav“ – bavila se proučavanjem ugljena i grafita te kristalogarfijom uz pomoć X-zraka James Watson – „Detektiv DNA“ – otkriće nukleinske kiseline Francis Crick – „Dobar prijatelj“ – u suradnji s James Watsonom otkrio je strukturu DNA					
	Molim vas da mi pokušate objasniti uz pomoć slike kako dolazi do formiranja DNA okosnice i što dalje nastaje? - U početku se spajaju dušične baze po točno određenom principu, tako se sve više niže nukleotida i nastaje polinukleotidni lanac koji napreduje prema 5' kraja tj. raste na 3' kraju. Dalje se formira nekakvo klupko koje se uvija i nastaje na kraju kromosom. (R2)	1.4	PP	R	F	
	Slajd 6. U prirodi za sve postoje razrađeni mehanizmi i načini povezivanja kao i uzročno-posljedične veze kako dolazi do nečega. Tako i DNA molekula ne nastaje spontano tj. njene kopije. Nasljeđivanje svojstava ima kemijsku osnovu u semikonzervativnoj replikaciji DNA pri čemu nastaju kopije gena koje se prenose s roditelja na potomke. Uz pomoć ovog kratkog video uratka proučiti ćemo proces replikacije DNA.					
	Nakon odgledanog video uratka molim vas ponovite mi kako teče proces replikacije DNA? - Replikacija započinje odvajanjem polinukleotidnih lanaca zbog pucanja vodikovih veza između komplimentarnih dušikovih baza. Svaki polinukleotidni lanac služi kao kalup za sintezu novog komplementarnog lanca. Replikacija se događa tijekom S-faze interfaze , a odvija se uz pomoć različitih enzima od kojih je najvažnija DNA polimeraza. (R3)	1.5	PP	R	F	
	Što nastaje nakon semireplikacije DNA? - Nastaju dvije identične molekule kćeri, kopije orginalne dvostruke uzvojnice. (R3)	1.5	PP	R	F	
	Od čega se sastoje molekule kćeri ? - Sastoje se od jednog orginalnog roditeljskog lanca i jednog	1.5	PP	R	F	

	novosintetiziranog lanca. (R3)					
	Slajd 7.					
	Na prikazanoj slici vidljiva je struktura kromosoma. Na temelju dosadšnjih saznanja pokušajte sami identificirati o kojim strukturama se radi, koje pomažu u stvaranju kromosoma!					
	- Nukleotidi i kasnije nukleosomi. (R3)	2.1	PP	R	F	
	Što mislite imaju li jednaku strukturu kromosoma prokarioti i eukarioti?					
	- Prokarioti imaju kružnu dvolančanu molekulu DNA. (R3)	2.1	PP	R	F	
	Gdje nalazimo kružnu DNA , kod kojih organizama?					
	- Virus, bakterije, organeli eukariotske stanice: plastidi i mitohondriji. (R3)	3.1	PP	R	F	
	DNA eukariotske stanice pakiran je uz pomoć bazičnih bjelančevina – histona. Kompleks DNA i bjelančevina nazivamo kromatin ili nukleoprotein.					
	Slajd 8.					
	Kada mi možemo vidjeti kromosome pod mikroskopom?					
	- Postaju vidljivi tek u diobi. (R3)	2.2	PP	R	F	
	Zašto ih tada tek možemo dobro uočiti?					
	- Jer se tada spiraliziraju kako bi moglo doći do crossingovera između nesestrinskih kromatida i izmjene gena. Prethodno su bili despiralizirani. (R3)	2.2	PP	R	F	
	Osnovna jednica kromatina je nukleosom koji je izgrađen od dvolančane molekule DNA omotane oko 8 histona. Tako nastaje nukleosomsko vlakno, koje se uz pomoć drugih histona pakira u kromatinsko vlakno.					
	Tijekom diobe pakiranje kromatinskog vlakna je sve gušće i to nazivamo spirilizacijom.					
	Maksimalno spirilizirani kromosomi su u metafazi.					
	Koliko kromosoma ima čovjek?					
	- 46 kromosoma.(R1)	2.3	PP	R	F	
	Što su geni i čemu služe?					
	- Dio molekule DNA ili redoslijed nukleotidnih parova duž molekule DNA koji nosi informaciju za bjelančevinu ili molekulu RNA. (R3)	2.3	PP	R	F	
	Slajd 9.					
	Opišite mi razlike između eukariotske i prokariotske stanice! (R2)	3.1	PP	R	F	
	S obzirom na razliku u građi razlikuju se i u genskom zapisu.					
	Proučite sliku i recite koji dijelovi se izrezuju, a koji ostaju ?					
	- Introni se izrezuju i ostaju eksoni.(R1)	3.1	PP	R	F	
	Stoga možete zaključiti kako dijelovi eukariotskog gena koji nose informaciju su eksoni te su isprekidani dijelovima koji se nazivaju introni.					
	U prokariota takvih intronskih dijelova gena nema.					

METODIČKI DIO

	Za domaći uradak napravite strukturne modele DNA uzvojnice od materijala po želji te uz pomoć žireva i klupka vune napravite metafazne kromosome i kromosome za vrijeme diobe.	1. 2. 3.				
PONAVLJANJE	Pred kraj sata, ukoliko ostane vremena, učenicima ću reći neka odgovaraju na pitanja iz udžbenika kako bih provjerila usvojenost sadržaja.	1.2. 3.	UDŽ	T	I	

Nositelji aktivnosti: N – nastavnik, U - učenici (dodati i mijenjati uloge ukoliko je potrebno uz svaku aktivnost)

Koristiti u izvedbi: RL – radni listić za učenike, UDŽ – udžbenik, RB – radna bilježnica, P – ploča, PM – prirodni materijal, E – pokus/eksperiment, MD – model, AP – aplikacija, PP – projekcija prezentacije, V – video zapis, A – animacija, I – igra, IU – igranje uloga, RS – računalna simulacija, M – mikroskop, L – lupa, F – fleks kamera, T – tablet, MO – mobitel, OP – organizator pažnje, AL - anketni listić TM - tekstualni materijali (dodati prema potrebi)

Metode: PR – praktični radovi, D – demonstracija, C – crtanje, I – usmeno izlaganje, R – razgovor, T – rad na tekstu i pisanje

Oblici rada: I – individualno, P – rad u paru, G – grupni rad, F – frontalno

Materijalna priprema

- Power point prezentacija
- Udžbenik
- Video uradci

Plan učeničkog zapisa

<u>Molekularna osnova nadljeđivanja</u>

<u>DNA (*eng.*DeoxyriboNucleic Acid):</u>

-nukleotid = šećer (deoksiriboza) + fosfatna skupina + dušična baza

-baze : - purinske : ADENIN i GVANIN

- pirimidinske : CITOZIN i TIMIN

-sparivanje: A+T G+C

-semikonzervativna replikacija

<u>Građa kromosoma:</u>

-nukleosom : dvolančana molekula DNA + 8 histona

-kromatin: DNA + bjelančevine

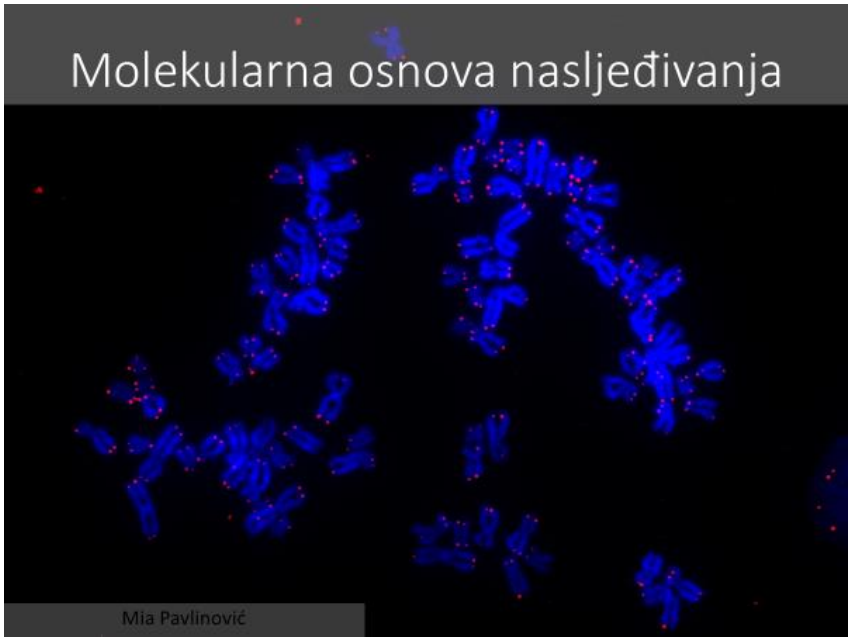
METODIČKI DIO

-spiralizacija

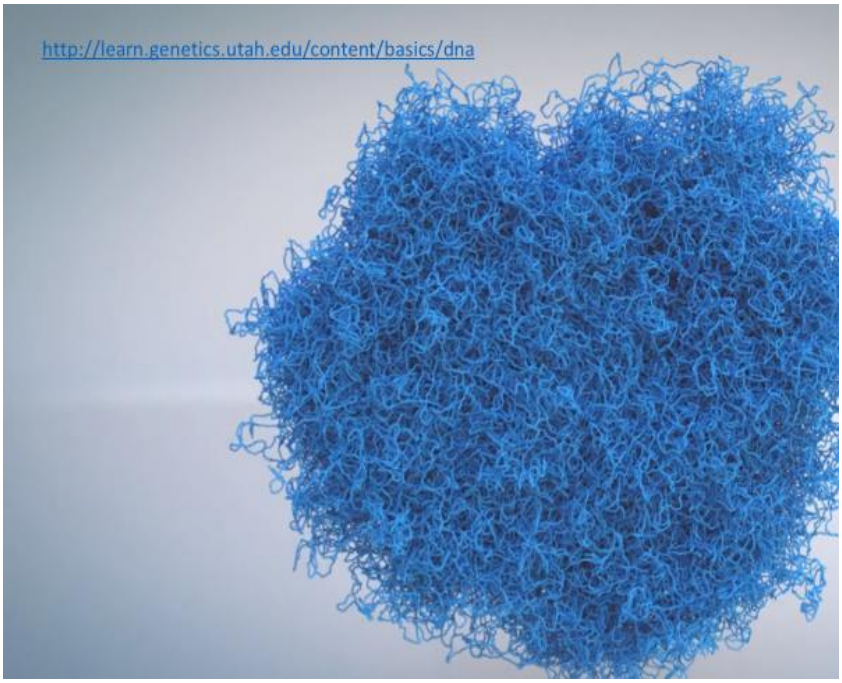
Prokariotski geni : eksoni
Eukariostki geni: introni + eksoni

Prilozi

Slajd 1.



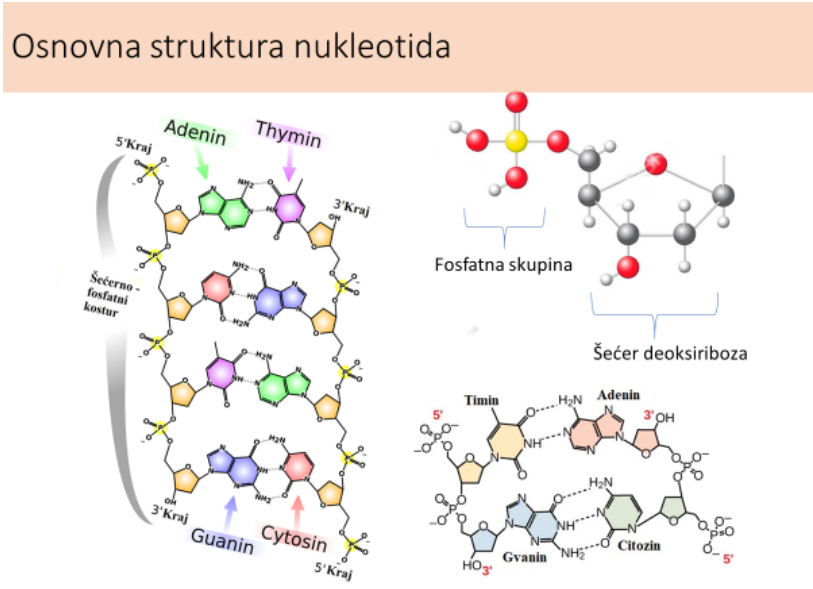
Slajd 2.



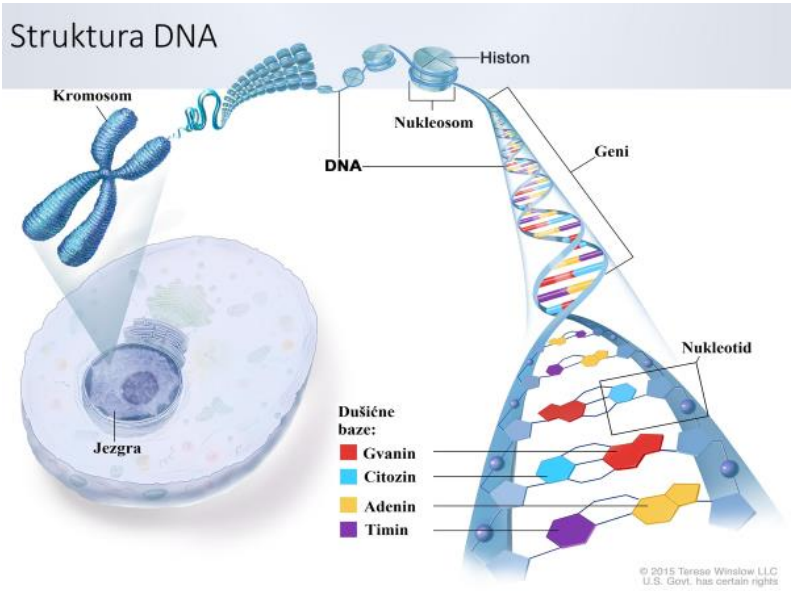
METODIČKI DIO

Slajd 3.

Slajd 4.



Slajd 5.



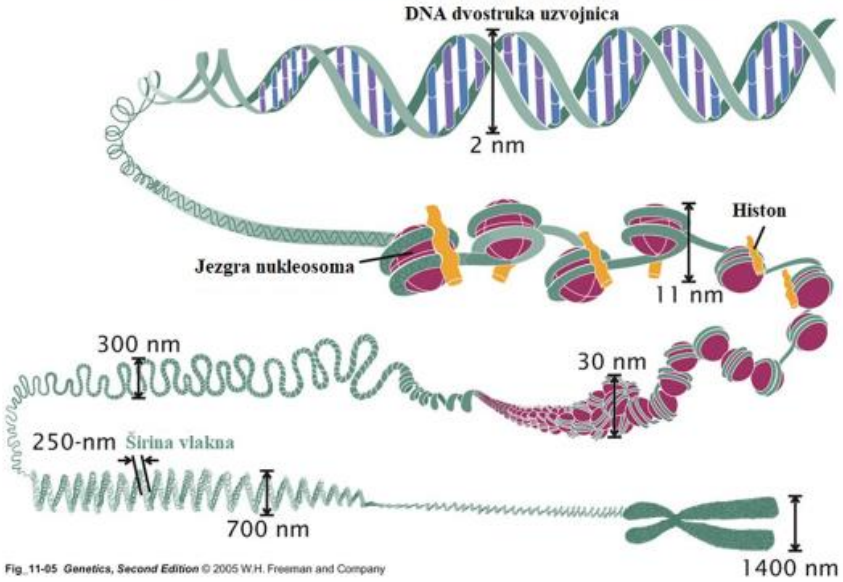
METODIČKI DIO

Slajd 6.

DNA udvostručivanje

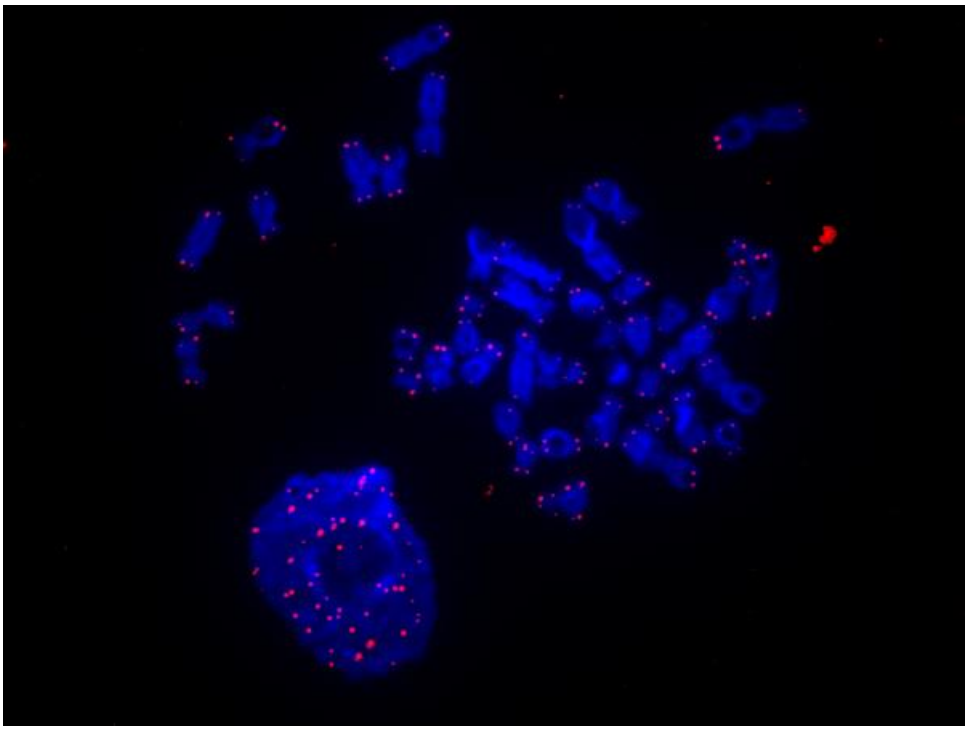
Slajd 7.

Građa kromosoma

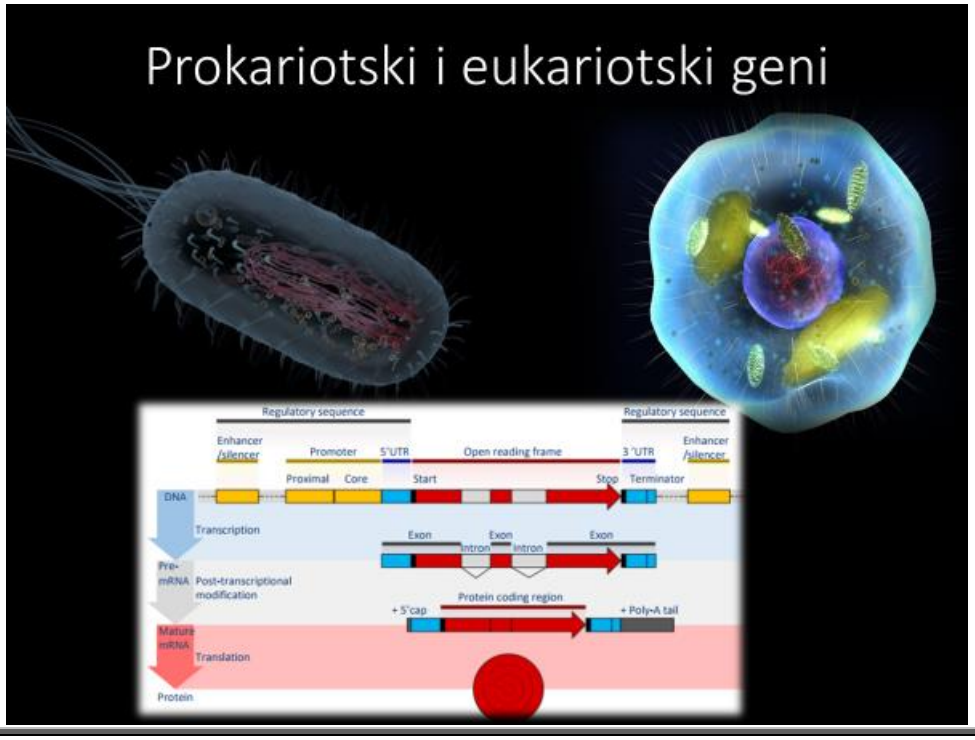


METODIČKI DIO

Slajd 8.



Slajd 9.



Literatura
Pavlica, M., Balabanić, J., (2014): *Genetika i evolucija* – udžbenik biologije za 4. razred gimnazije. Školska knjiga, Zagreb.