

Kvantitativne analize telomera

Zorić, Doris

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:449152>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

KVANTITATIVNE ANALIZE TELOMERA
QUANTITATIVE TELOMERE ANALYSIS

Seminarski rad

Doris Zorić

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: prof. dr. sc. Ivica Rubelj

Zagreb, 2015.

SADRŽAJ

<u>1. UVOD</u>	2
Što su telomere	2
Korelacija skraćivanja telomera i procesa starenja	2
Važnost analize telomera.....	3
<u>2. METODE MJERENJA DULJINE TELOMERA</u>	4
2.1. METODA HIBRIDIZACIJE PO SOUTHERNU	4
2.2. KVANTITATIVNA ANALIZA LANČANOM REAKCIJOM POLIMERAZE (Q-PCR)	6
2.3. HPA (engl. „Hybridization Protection Assay“)	7
2.4. FLUORESCENCIJSKA HIBRIDIZACIJA IN SITU (FISH)	7
<u>3. HETEROGENOST REZULTATA ANALIZE TELOMERA</u>	8
3.1. UZROCI HETEROGENOSTI TELOMERA	9
Molekularni uzroci	10
Stanični uzroci	10
Metodološki uzroci	11
<u>4. ZAKLJUČAK</u>	13
<u>5. LITERATURA</u>	14
<u>6. SAŽETAK</u>	15
<u>7. SUMMARY</u>	16

1. UVOD

Što su telomere?

Telomere su specijalizirane strukture na krajevima linearnih kromosoma sačinjene od ponavljajućih slijedova DNA i pridruženog proteinskog kompleksa zvanog „šelterin“ (engl. shelterin). Primarna uloga telomera jest zaštita krajeva kromosoma. Telomere čine strukturu petlje koja sprječava degradaciju, nelegitimnu fuziju i aberantnu rekombinaciju krajeva kromosoma te olakšava njihovu pravilnu replikaciju (Škrobot Vidaček et al., 2013.). Ponavljajući slijedovi evolucijski su konzervirani i specifični – primjerice, sekvenca 5' – TTAGGG – 3' nađena je na krajevima kromosoma svih kralješnjaka (Tablica 1.)

Tablica 1. Prikaz telomernih sekvenci kod nekih skupina organizama. (Preuzeto i prilagođeno iz <https://en.wikipedia.org/wiki/Telomere>)

SKUPINA ORGANIZAMA	TELOMERNNA SEKVENCA
Kralješnjaci	TTAGGG
Više biljke	TTTAGGG
Zelene alge	TTTTAGGG
Insekti	TTAGG
Kolutićavci	TTAGGC

Veliki broj ponavljanja telomernih sekvenci osigurava telomeraza, enzim koji na principu reverzne transkripcije u svakom ciklusu produljuje 3'-kraj DNA za identični nukleotidni slijed (Blackburn and Szostak, 1984.). Kod čovjeka, telomeraza je aktivna samo u matičnim i spolnim stanicama, dok u somatskim stanicama njena aktivnost izostaje. Nedostatak telomerazne aktivnosti u somatskim stanicama odraslog čovjeka kao posljedicu ima skraćivanje telomera i ograničen proliferacijski kapacitet (Olovnikov, 1973.). Naime, sa svakom staničnom diobom gubi se dio terminalne DNA do stadija kritične duljine telomera koju stanica prepoznaje kao oštećenje DNA što u konačnici rezultira prestankom dioba i ulaskom u stadij tzv. senescencije tj. replikativne starosti (Škrobot Vidaček et al., 2013.).

Korelacija skraćivanja telomera i procesa starenja

Gubitak kromosomskih terminalnih sekvenci sa svakim staničnim ciklusom posljedica je nepotpune replikacije 5'-kraja linearne DNA. Zbog nemogućnosti sinteze DNA

de novo, DNA polimeraza nužno zahtijeva RNA početnicu. Nadalje, nukleotidi se dodaju isključivo u 5' -> 3' smjeru pa je zbog polarnosti DNA nemoguće istim kontinuitetom prepisati oba lanca – sinteza tromog lanca (3' -> 5') odvija se diskontinuirano pri čemu nastaju Okazakijevi fragmenti. Nakon jednog ciklusa replikacije, novonastali tromi lanac je kraći za duljinu početnice. Daljnja istraživanja pokazala su uključenost egzonukleaza u sam proces skraćivanja ne samo tromog, već i vodećeg lanca.

Povijesno gledano, dosta rano je ustanovljena veza između problema replikacije telomera i procesa starenja te mogućnosti predviđanja same dinamike skraćivanja telomera. Još 1973. Olovnikov je pretpostavio da skraćivanje krajeva kromosoma sa svakom diobom rezultira senescencijom stanice i da taj proces igra jednu od ključnih uloga u procesu starenja upravo ograničavanjem proliferacije somatskih stanica (Counter et al., 1992.). Također je utvrđena korelacija skraćivanja prosječne duljine telomera (na razini stanice) i replikativnog potencijala stanica donora različite dobi u raznim tipovima tkiva. Generalno se skraćene telomere smatraju medijatorom starenja jer pokreću stanični odgovor na oštećenje DNA koji dovodi do zaustavljanja staničnog ciklusa u G1/S fazi, iako se ne osporava postojanje određenih mehanizama senescencije koji nisu povezani sa skraćivanjem telomera (uvjeti u kulturi, kromatinska nestabilnost, mutacije u onkogenima i sl.) (Bendix et al., 2010.).

S obzirom na proširena znanja o indukciji starenja, model nepotpune replikacije krajeva kromosoma nije dostatan za objašnjavanje pojave naglo skraćenih telomera. Pretpostavlja se da tada dolazi do loma kromosoma prilikom kojeg je izgubljen veliki dio telomerne regije. Neki od predloženih uzroka su jednolančani lomovi nastali oksidativnim oštećenjima, proklizavanje prilikom replikacije, asimetrična izmjena sestrinskih kromatida te rekombinacijom uzrokovane cirkularizacije i delecije distalnih ponavljajućih slijedova. Temeljem prethodno spomenutih opažanja, zaključuje se da je proces skraćivanja telomera kombinacija postepenog linearnog skraćivanja duljine svih telomera uzrokovanog nepotpunom replikacijom terminalnih sekvenci kromosoma i stokastičkim mehanizmom iznenadnog skraćivanja pojedinačnih telomera, što s vremenom rezultira nasumičnom pojavom kritično skraćenih telomera koje uzrokuju rano stanično starenje (Bendix et al., 2010.).

Važnost analize telomera

Strukturna i funkcionalna analiza telomera veoma je važna za razumijevanje osnovnih bioloških funkcija poput stabilnosti genoma, kontrole staničnog rasta i procesa starenja.

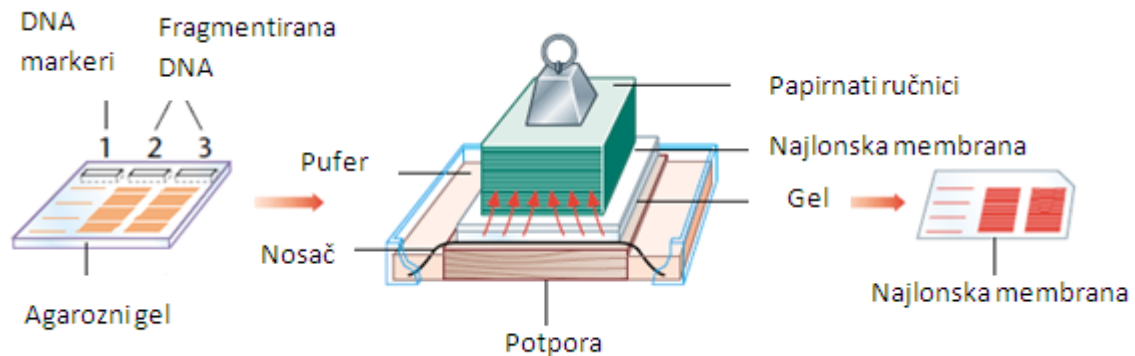
Duljina telomera je široko primjenjiv i pouzdan biomarker za procjenu dugovječnosti i praćenje bolesti povezanih sa starenjem (kardiovaskularne bolesti, tumori itd.) kako na razini individua, tako i na razini populacije. S obzirom na to da se brojni zaključci o biološkim i medicinskim fenomenima temelje upravo na rezultatima ovih mjerenja, njihova točna interpretacija jest krajnje nužna. Najzastupljenije metode za analizu telomera, poput hibridizacije po Southernu (Southern blotting) i kvantitativne lančane reakcije polimerazom (Q-PCR), nedavno su podvrgnute ispitivanju njihove pouzdanosti. Iako navedene metode nude mnoštvo informacija o cjelokupnoj dinamici telomera na razini populacije stanica, javlja se sve veća potreba za praćenjem dinamike pojedinačnih telomera (Ćukušić Kalajžić et al., 2014.). Sve veća važnost dobivenih rezultata u medicinskoj i farmaceutskoj dijagnostici te upotpunjena znanja o nastanku staničnog starenja, koja se fokusiraju na pojedinačne skraćene telomere, dali su poticaj za razvoj novih metoda poput Q-PNA-FISH, HPA, STELA, Universal STELA i dr.

2. METODE MJERENJA DULJINE TELOMERA

2.1. METODA HIBRIDIZACIJE PO SOUTHERNU

Hibridizacija po Southernu (engl. Southern blotting) jedna je od središnjih tehnika molekularne biologije kojom se utvrđuje prisutnost određenog slijeda DNA u cjelokupnom DNA uzorku (C. Harley et al. 1990; Maniatis, 1989.). Temelji se na prijenosu molekula DNA, najčešće restrikcijskih fragmenata, s elektroforetskog agaroznog gela na nitroceluloznu ili najlonsku membranu, na način da je uzorak fragmenata odijeljenih na gelu („bendova“) reproduciran na membranu. Tijekom transfera te predviđenih kemijskih i fizikalnih tretmana, DNA postaje imobilizirana na membrani te se može koristiti kao supstrat za hibridizacijsku analizu s označenim DNA ili RNA probama koje specifično vežu restrikcijske fragmente (Brown, 2001., Maniatis, 1989.). Southern analizi prethodi izolacija genomske DNA i cijepanje iste restrikcijskim enzimima, nakon čega se fragmenti razdvajaju elektroforezom u agaroznom gelu. Sama analiza sastoji se od tri koraka: 1. prijenos fragmenata DNA s gela na membranu, 2. hibridizacija odsječaka DNA na membrani sa specifičnom DNA sondom i 3. detekcija hibridizacijskog signala (Ristov, 2007.). Osnovni princip hibridizacije po Southernu prikazan je na Slici 1. Metoda koju je po prvi puta opisao Southern 1975. godine zbog svoje

jednostavnosti i učinkovitosti jest, uz preinake u odnosu na osnovnu proceduru, i danas jedna od rutinskih metoda u laboratorijima diljem svijeta te je široko primjenjiva u istraživanju brojnih fenomena vezanih uz strukturu i dinamiku procesa na razini DNA (Brown, 2001., Maniatis, 1989.).



Slika 1. Southern blot. Agarozni elektroforetski gel s fragmentiranom DNA postavi se na filter-papir koji čini vezu između gela i spremnika s puferom velike ionske jakosti (engl. high-salt buffer). Nitrocelulozna membrana postavi se na vrh gela i prekrije debelim slojem upijajućeg papira koji se pritisne pomoću utega. Posljedica kapilarne sile je prodiranje pufera kroz filter-papir, gel i membranu u sloj upijajućeg papira, pri čemu pufer ispire fragmente s gela i nanosi ih na membranu gdje se vežu na nitrocelulozu. Efektivan prijenos fragmenata veličine do 15 kb zahtijeva otprilike 18 h. (Preuzeto iz Brown T A, 2001.)

Southern blot je uvjerljivo najčešće korištena metoda za analizu duljine telomera. DNA se fragmentira restrikcijskim enzimima RsaI i HinfI, koji su odabrani jer cijepaju DNA u subtelomernoj regiji i minimiziraju netelomerne sekvence. Fragmenti se potom razdvajaju na elektroforetskom gelu i prenose na nitroceluloznu ili najlonsku membranu gdje se, nakon transfera, hibridizira s označenim probama specifičnim za telomerne sekvence (TTAGGG)_n. Probe mogu biti označene radioaktivnim fosfatom ³²P ili kemijski, što rezultira kemoluminiscencijom (biotinilacija, označavanje alkalnom fosfatazom i sl.). Veličina i brojnost terminalnih restrikcijskih fragmenata ili TRF (engl. „Terminal Restriction Fragment“) kvantitativno se određuje denzitometrijom.

Analiza TRF-ova Southern blotom ima nekoliko nedostataka. Za početak, izolirana DNA mora biti čista i nefragmentirana, što je tehnički teško izvedivo. Nadalje, TRF predstavlja prosječnu duljinu svih kromosoma i uključuje subtelomernu regiju nepoznate

duljine te stoga uvelike ovisi o položaju restrikcijskog mjesta koje prepoznaju odabrani enzimi. Ovaj nedostatak može se djelomično prevladati korištenjem više različitih restrikcijskih enzima s ciljem minimizacije subtelomerne regije, no i dalje je nepremostiva činjenica da Southern blot analiza ne daje informacije o stvarnoj duljini telomera. Uz sve navedene nedostatke, Southern blot je i dalje osnovna i najpouzdanija metoda za analizu telomera, a njome dobiveni podaci služe kao standard za kontrolu i usporedbu rezultata dobivenih ostalim metodama (Aviv et al., 2011.).

2.2. KVANTITATIVNA ANALIZA LANČANOM REAKCIJOM POLIMERAZE (Q-PCR)

Q-PCR je inačica metode lančane reakcije polimerazom (Q-PCR, engl. „Quantitative Polymerase Chain Reaction“) u kojoj se dobiveni produkt kvantizira u stvarnom vremenu, zbog čega se često naziva i „Real-Time“ PCR (RT-PCR). U provođenju metode paralelno se odvijaju 2 procesa: 1. Umnažanje željenog genetičkog materijala metodom PCR i 2. Detekcija produkta pomoću fluorescencije. Metoda je najčešće korištena u analizi genske ekspresije, no također je primjenjiva za detekciju i kvantifikaciju određene DNA sekvence u uzorku DNA. Ne čudi, stoga, činjenica da je Q-PCR često korištena metoda za analizu upravo telomernih sekvenci (Aviv et al., 2011.).

U analizi telomera, podaci dobiveni kvantitativnim PCR-om izražavaju se kao omjer broja kopija telomernih ponavljanja (T) i broja kopija jednog kontrolnog gena (S). Ovaj tzv. T/S omjer proporcionalan je prosječnoj duljini telomera, dok se relativna duljina telomera mjeri kvantitativno. Za razliku od Southern blota, izmjerena duljina telomera ne uključuje duljinu varijabilne subtelomerne regije (Lin et al., 2005.). Međutim, Q-PCR, kao ni Southern blot, ne daje rezultate specifične za pojedinačne telomere, već normalizira količinu telomernog produkta u odnosu na jedan gen kako bi se dobili podaci o prosječnoj duljini telomera neke stanične populacije. Otegotna okolnost jest također otežana usporedba dobivenih podataka jer je zbog prirode laboratorijskih uvjeta, uvjeta pokusa te u konačnici same heterogenosti telomera unutar populacije nemoguće dobiti iste rezultate i zabilježiti univerzalne vrijednosti koje bi mogle poslužiti kao kontrola u daljnim istraživanjima (Aviv et al., 2011.).

2.3. HPA (engl. „Hybridization Protection Assay“)

HPA (engl. „Hybridization Protection Assay“) je metoda hibridizacije telomernih sekvenci s obilježenim sekvencama pogodna za direktna klinička ispitivanja telomera u malom broju stanica. Osnova metode jest hibridizacija genomske DNA dobivene iz stanice ili lizata tkiva s probama obilježenim akridinijum esterom (AE) za telomernu sekvencu i *Alu* sekvencu te detekcija kemoluminiscencije uz završno određivanje omjera broja telomera i *Alu* sekvenci (Lin et al., 2005.).

Metodu HPA razvili su Nakamura i suradnici koji su proveli komparativnu studiju mjerenja telomera metodom terminalnih restrikcijskih fragmenata određenih Southern blotom i HPA. Rezultati dobiveni korištenjem obiju metoda bili su međusobno kompatibilni, no nastojalo se također ukazati na nekoliko značajnih prednosti metode HPA u odnosu na TRF: 1. Količina telomernih ponavljanja ne uključuje subtelomerne regije 2. Intaktna, očuvana genomska DNA nije nužna za provedbu metode (dapače, fragmentirana ili oštećena DNA je poželjnija) 3. HPA je jednostavna i sigurna za upotrebu (ne koristi radioaktivno obilježene probe), brza, osjetljiva i kvantitativna i 4. Broj telomernih ponavljanja moguće je izmjeriti direktno iz stanica ili lizata tkiva (Nakamura et al., 1999.). Rezultati dobiveni metodom TRF su neprecizni jer se analiza obavlja iz razmaza autoradiograma i HPA uspješno zaobilazi ovaj problem. Međutim, HPA ne daje nikakve detaljne informacije o duljini telomera na razini stanice ili kromosoma i veličina telomera ne može biti izmjerena direktno, stoga joj je primjena ograničena na kliničke primjene u uzorcima s manjim brojem stanica, primjerice uzorcima tjelesnih tekućina ili tkiva dobivenih endoskopijom ili biopsijom. Zaključno, modifikacija metode HPA je nužna, pogotovo u smislu statističke obrade podataka i tehničke izvedbe, s ciljem veće točnosti i mogućnosti primjene u eksperimentalnom i kliničkom pristupu (Lin et al., 2005.).

2.4. FLUORESCENCIJSKA HIBRIDIZACIJA IN SITU (FISH)

Fluorescencijska hibridizacija in situ (FISH, engl. „Fluorescent In Situ Hybridization“) je metoda hibridizacije pojedinih sekvenci DNA metafaznog kromosoma s obilježenim sondama koja se detektira fluorescencijom. Značaj FISH-a u analizi telomera jest mogućnost direktnog označavanja telomerne sekvence oligonukleotidnom probom na razini pojedinačne

stanice. Osnova metode može se opisati u nekoliko koraka. Nužan uvjet je zaustavljanje stanice u metafazi, nakon čega slijedi denaturacija DNA i hibridizacija. Hibridizacijske sonde su sintetski oligonukleotidi konjugirani telomerno-specifičnim fluorescein izotiocijanatom (FITC) ili označeni s Cy3. Negativno bojenje radi se pomoću DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) ili PI (propidij jodida), a dobiveni signal se detektira i vizualizira fluorescencijskim mikroskopom ili sustavom digitalnog oslikavanja.

Mjerenje duljine telomera metodom FISH naziva se kvantitativni FISH (Q-FISH, engl. „Quantitative Fluorescence In Situ Hybridization“). Q-FISH je dodatno unaprijeđen upotrebom peptidnih nukleinskih kiselina (PNA) u kojima je negativno nabijena šećerno-fosfatna okosnica zamijenjena nenabijenom ponavljajućom N(2-aminoetil)-glicinskom okosnicom, odnosno fosfodieterska veza zamijenjena peptidnom vezom, što hibridizacijske duplekse čini puno stabilnijima od DNA/DNA ili DNA/RNA dupleksa. U usporedbi s konvencionalnim oligonukleotidnim probama, iako produciraju veću pozadinsku fluorescenciju, PNA probe izražavaju intenzivnije obojenje većine telomera, čime ujedno povećavaju osjetljivost same metode (Lin et al., 2005.).

3. HETEROGENOST REZULTATA ANALIZE TELOMERA

Biološka važnost telomera je izuzetna s više aspekata, od razine stanice do razine organizma. Budući da je analiza duljine telomera značajna ne samo u fundamentalnim znanstvenim istraživanjima, već i u procjeni dinamike starenja pojedinca i populacije, posebno je važna točna interpretacija podataka, pri kojoj je potrebno uzeti u obzir važno bitno svojstvo telomera – heterogenost. Važno je, stoga, odrediti što je izvor heterogenosti telomera i koji je njen značaj.

3.1. UZROCI HETEROGENOSTI TELOMERA

Heterogenosti telomera doprinose uzroci na razini molekularnih zbivanja i staničnog rasta u kulturi. Pri analizi telomera, intrinzičnoj heterogenosti telomera doprinose i ograničenja samih metoda, što rezultira općenitom heterogenošću rezultata. Problem se

rješava povećanjem broja uzoraka, višestrukim mjerenjima i pomnom statističkom obradom podataka.

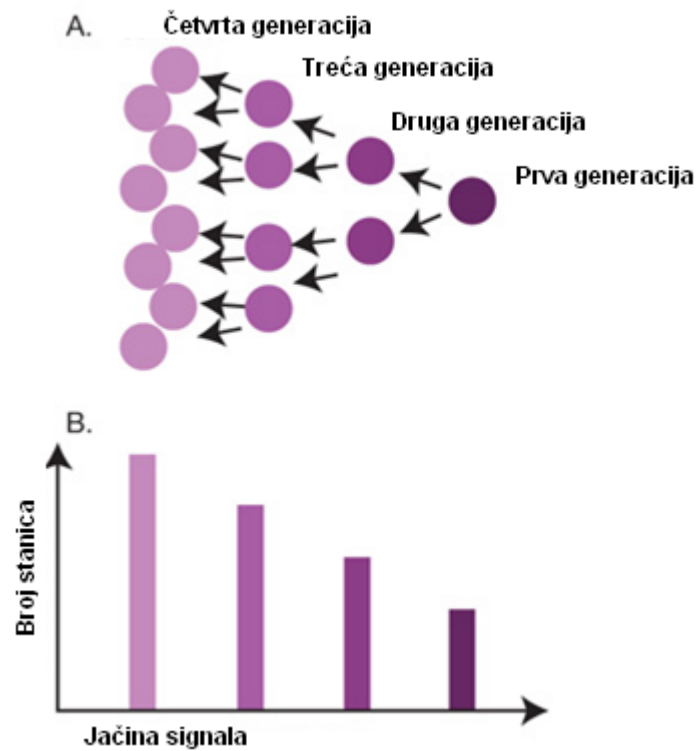
Molekularni uzroci

Molekularni mehanizmi replikacije i procesiranja generiraju primarnu heterogenost telomera na razini DNA, odnosno kromosoma tako da su one heterogene po svojoj dužini unutar iste stanice. Fenomen nepotpune replikacije krajeva DNA za posljedicu ima skraćivanje jednog lanca DNA. Prilikom nove replikacije, izvorno skraćeni lanac generira još kraći lanac, potom još kraći itd. sve do stadija kritične duljine. Varijaciji u duljini nakon same replikacije doprinosi i enzimatska obrada egzonukleazama koje ne izrezuju jednak broj parova baza na svakoj DNA. Nadalje, replikacijom i postreplikacijskom enzimatskom doradom generirani spektar različitih duljina telomera nije isti u svakoj stanici – segregacijom kromosoma stanice kćeri nasljeđuju različite telomerne profile. Drugim riječima, dva ista kromosoma imaju telomere različitih duljina. Sa svakom novom diobom telomere se skraćuju i nanovo raspoređuju po stanicama kćerima, što rezultira međusobno različitim replikativnim potencijalom stanica. Kao jedan od mogućih uzroka zamijećena je pojava naglo skraćenih telomera, odnosno delecije terminalnih sekvenci što je posljedica homologne rekombinacije na krajevima kromosoma (Rubelj, Vondraček, 1999.).

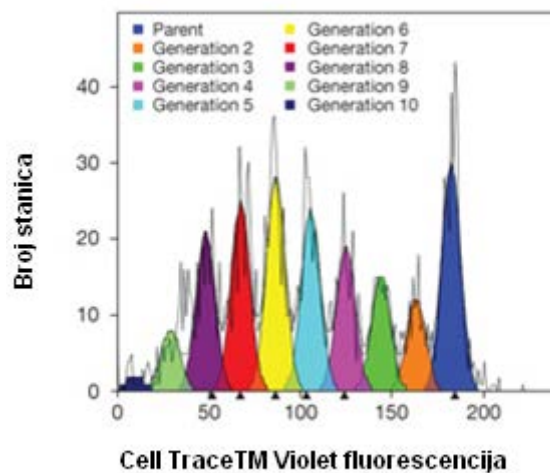
Stanični uzroci

Prilikom rasta stanica u kulturi, primjećena su dva fenomena koji značajno doprinose heterogenosti telomera na razini stanične populacije. Oba fenomena svode se na razliku između potencijalnog broja udvostručenja stanice (PD, engl. „Population Doublings“) i stvarnog broja dioba koje će stanica ostvariti (CG, engl. „Cell Generation“). Prvi fenomen jest kontaktna inhibicija, odnosno prestanak diobe stanice nakon direktnog doticaja okolnih stanica u kulturi. Stanice u kulturi nasumično su raspoređene po podlozi i dijele se različitim brzinama, stoga je nemoguće unaprijed znati koje stanice i u kojem trenutku više neće moći proliferirati. Drugi fenomen može se opisati kao „odustajanje“ stanica od diobe. Kod mladih stanica većina stanica koje su ušle u diobu normalno će se podijeliti, a manji dio ipak ne, pri čemu se sa svakim udvostručenjem populacije smanjuje broj stanica koje ulaze u diobu. Praćenje broja stanica koje se dijele i stanica kod kojih izostaje dioba eksperimentalno se izvodi na nekoliko načina, jedan od kojih je obilježavanjem staničnih membrana bojom DiI, Cell Trace i slično (Slika 2., Slika 3.). Također je moguće pratiti udio stanica koje ugrađuju

radioaktivni timidin (stanice koje se dijele) ili stanica koje eksprimiraju β -galaktozidazu (stanice koje se ne dijele) (Maniatis, 1989.).



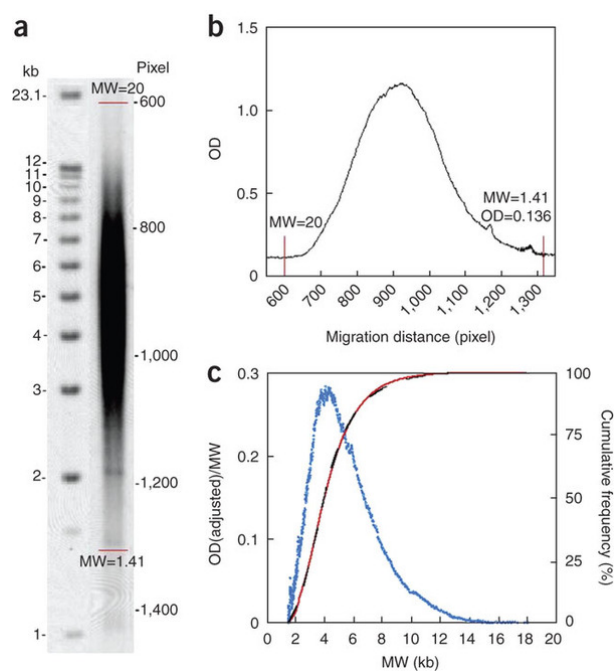
Slika 2. Mehanizam označavanja stanica. (A) Ilustracija proliferacije stanica praćene analizom razrjeđenja boje. (B) Prikaz fluorescencijskih signala dobivenih protočnom citometrijom.



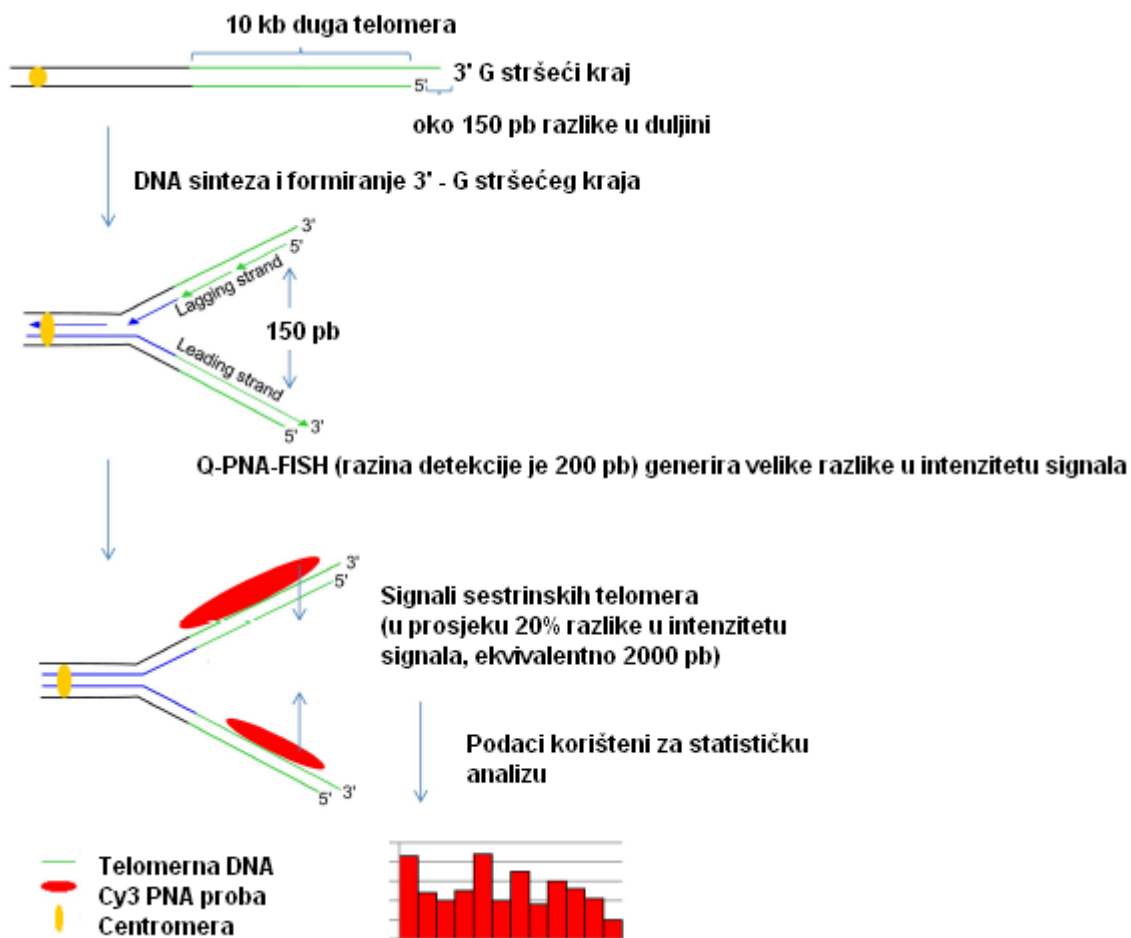
Slika 3. Praćenje dioba populacije ljudskih limfocita pomoću bojanjem s Cell Trace™.

Metodološki uzroci

Povrh prethodno opisanih svojstava koja uvjetuju heterogenost telomera na razini stanice i heterogenost u distribuciji telomera na razini populacije, na heterogenost rezultata analize telomera utječu i ograničenja korištenih metoda. Primjerice, analiza TRF-ova hibridizacijom po Southernu daje razmaz (Slika 4.). Takvom analizom moguće je ustvrditi prosječnu duljinu telomera i dobiveni podaci su točni i međusobno usporedivi, no i dalje neprecizni. Rezultati analize Q-PCR-om uvelike ovise o uvjetima samog eksperimenta. Metoda je izrazito osjetljiva i dobiveni podaci najčešće nisu usporedivi s rezultatima analize provedene u drugim laboratorijima. Nadalje, ovom metodom se ne može utvrditi stvarna duljina telomera, već se ona normalizira u odnosu na omjer broja dobivenih signala za telomernu sekvencu i broja signala za jednu kopiju kontrolnog gena gen. FISH, s druge strane, ima problem s intenzitetom dobivenih signala. Fluorescencijski signali koji se očitavaju posljedica su hibridizacije telomerne sekvence s konstruiranom DNA ili PNA probom. Uspješnost hibridizacije ovisi uvelike o konformaciji DNA (npr. kromatinska organizacija, stupanj denaturiranosti...). Primjerice, postotak denaturiranosti DNA se može razlikovati od kromosoma do kromosoma na razini stanice, odnosno na razini populacije, rezultat čega su razlike u intenzitetu dobivenog signala (Slika 5.) (Maniatis 1989).



Slika 4. Analiza TRF-ova metodom hibridizacije po Southernu. Slika prikazuje distribuciju duljine TRF-ova na reprezentativnom uzorku. Preuzeto iz Kimura et al., 2010.



Slika 5. Analiza telomera metodom Q-PNA-FISH. Uz početnu varijaciju u duljini samih telomera, provedbom metode javlja se prosječna varijacija u intenzitetu signala od 20%. (Preuzeto iz Čukušić Kalajžić et al., 2014.)

Unatoč navedenim nedostacima, kvantitativna analiza telomera se provodi rutinski i daje reproducibilne rezultate. Valja naglasiti, pritom, da je analiza TRF-ova Southern blotom i dalje uvjerljivo najbolja metoda za takav tip analize te se svakim danom unaprijeđuje. Određenim postupcima moguće je reducirati metodološka ograničenja i dobiti preciznije rezultate. Primjerice, iako duljina terminalnog restrikcijskog fragmenta uključuje, uz telomernu, i pridruženu subtelomernu regiju, korištenjem većeg broja restrikcijskih enzima moguće je minimizirati subtelomernu regiju i dobro aproksimirati stvarnu duljinu telomere. S druge strane, problem razmaza različitih duljina TRF-ova i jakih pozadinskih signala nastoji se premostiti odabirom tzv. „prozora analize“ (analysis window) koji fokusira analizu na

najkraće telomere kao markere stanične dobi i dinamike starenja. Gornje granice takvog „prozora analize“ određene su na temelju intenziteta najjačeg signala i intenziteta na mjestu distribucije (Horn et al., 2010.). Svaki tip kvantitativne analize telomera nužno zahtijeva statističku analizu i interpretaciju podataka. Statistička analiza omogućuje, prije svega, očitavanje rezultata. Puka procjena i aproksimacija duljina TRF-ova iz razmaza dobivenog Southern blotom nema težinski značaj u istraživanju i takvi podaci nisu relevantni ni primjenjivi. Suprotno tomu, pravilna statistička interpretacija smješta podatke u kontekst cilja istraživanja, omogućuje usporedbu rezultata i primjenu podataka u daljnjim istraživanjima.

4. ZAKLJUČAK

Iako je kvantitativno određivanje prosječne duljine telomera već široko korišteno u brojnim istraživanjima procesa starenja i karcinogeneze, u zadnje se vrijeme poseban značaj poglavito pridaje mjerenju kratkih telomera. Metode mjerenja telomera su se razvile u više pravaca od mjerenja na razini stanične populacije (analiza TRF-ova) do mjerenja na razini individualne stanice (FISH metode) i teže automatizaciji i robotizaciji. Mjerenje duljine pojedinačne telomere samo po sebi nema biološku vrijednost, no usporedba duljina telomera unutar reprezentativnog uzorka populacije može imati izniman značaj. Poznavanje duljine telomera „zdravih“ pojedinaca različite dobi omogućuje usporedbu individualnih duljina telomera unutar dobnih i spolnih skupina i daje sliku zdravstvenog statusa pojedinca te procjenjuje njegovu biološku dob. Nadalje, redovito mjerenje telomera u određenom vremenskom periodu (longitudinalna studija) omogućuje praćenje učinaka pojedinih medicinskih tretmana ili životnih navika na dinamiku skraćivanja telomera. Mjerenjem dodatnih markera staničnog starenja poput p16 i 53BP1 paralelno s duljinom telomera, u budućnosti bi bilo moguće definirati tzv. „potpis starenja“ (aging signature). Zaključno, kvantitativna analiza telomera postaje novi alat za procjenu dobnog i zdravstvenog statusa.

5. LITERATURA

- Aviv A, Blackburn E, Kimura M, Cao X, Lin J, Hunt S, 2011. Impartial comparative analysis of measurement of leukocyte telomere length/DNA content by Southern blots and qPCR. *Nucleic Acid Research* **39** (20), 1 – 5
- Bendix L, Bendix Horn P, Birk Jensen U, Rubelj I, Kolvraa, S, 2010. The load of short telomeres, estimated by a new method, Universal STELA, correlates with number of senescent cells, *Aging Cell* **8**, 383 – 397
- Blackburn E H , Szostak J W, 1984. *Annu. Rev. Biochem.* **53**, 163-194
- Brown T A, 2001. Southern Blotting and Related DNA Detection Techniques. *Encyclopedia of Life Sciences*
- Counter C M, Avilion A A, LeFeuvre C E, Stewart N G, Greider C W, Harley C B, Bacchetti S, 1992. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *The EMBO Journal* **11** (5), 1921 - 1929
- Ćukušić Kalajžić A, Škrobot Vidaček N, Huzak M, Ivanković M, Rubelj I, 2014. Telomere Q-PNA-FISH - Reliable Results from Stochastic Signals. *PLOS ONE* **9**(3): e92559
- Kimura M, Stone R C, Hunt S C, Skurnick J, Lu X, Cao X, Harley C B, Aviv A, 2010. Measurement of telomere length by the Southern blot analysis of terminal restriction fragment lengths. *Nature Protocols* **5**, 1596 - 1607
- Lin K, Yan J, 2005. The telomere length dynamic and methods of its assessment. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **9** (4), 977 – 989
- Maniatis T, Sambrook J, Fritsch E F, 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*
- Nakamura Y, Hirose M, Matsuo H, Tsuyama N, Kamisango K, Ide T, 1999. Simple, Rapid , Quantitative Detection of Telomere Repeats in Cell Lysate by a Hybridization Protection Assay. *Clinical Chemistry* **45** (10): e134, 1718 – 1724
- Olovnikov A M, 1973. *J. Theor. Biol.* **41**, 181-190
- Ristov A A, 2007. *Metode u molekularnoj biologiji*
- Rubelj I, Vondraček Z, 1999. Stochastic mechanism of cellular aging - Abrupt telomere shortening as a model for stochastic nature of cellular aging. *J. theor. Biol.* **197**, 425-438.
- Škrobot Vidaček N, Pavlič D, Perić M, Rubelj I, 2013. Lifestyle, telomeres and aging – what is the connection?. *Periodicum Biologorum* **115** (4), 465 – 468

<https://en.wikipedia.org/wiki/Telomere>

6. SAŽETAK

Duljina telomera, kao i dinamika njihovog skraćivanja, pokazatelj je dobi i replikativnog potencijala stanice te je pouzdan biomarker za procjenu dugovječnosti i praćenje bolesti povezanih sa starenjem. Sve češća upotreba rezultata mjerenja duljine telomera u dijagnostici zahtijeva točnu i preciznu kvantitativnu analizu i statističku obradu podataka. Kvantitativna analiza telomera danas se provodi s različitim spektrom metoda, od kojih je uvjerljivo najkorištenija i najbolje interpretirana analiza terminalnih restrikcijskih fragmenata (TRF) metodom hibridizacije po Southernu. Glavni nedostatak ove analize jest činjenica da njome ne saznajemo stvarnu duljinu telomera, već prosječnu duljinu terminalnih fragmenata (telomera s pridruženom subtelomernom regijom) na razini stanice ili populacije. Ostale često korištene metode poput kvantitativnog PCR-a ili Q-PNA-FISH-a imaju nekoliko prednosti u odnosu na hibridizaciju po Southernu, no zbog velike varijacije u rezultatima ili nemogućnosti usporedbe rezultata i dalje su manje pouzdane. Zbog proširenog znanja o naglom skraćivanju pojedinih telomera kao uzroku senescencije, teži se individualnijem pristupu i usavršavanju metoda za analizu duljine pojedinih telomera te metoda za brzu kliničku primjenu (primjerice, HPA). Otegotna okolnost kvantitativne analize telomera jest njihovo svojstvo heterogenosti po veličini uvjetovano zbivanjima na molekularnoj razini DNA, stanice i stanične populacije, koja uz metodološka ograničenja producira i heterogenost rezultata. Kvantitativna analiza, stoga, zahtijeva nužno statističku obradu i ispravnu interpretaciju podataka. Točni rezultati analize telomera tada mogu biti primjenjivi u dijagnostici preuranjenog staničnog starenja, ranom otkrivanju bolesti i aproksimaciji maksimalne životne dobi te dati informacije o biološkim fenomenima za daljnja fundamentalna znanstvena istraživanja.

7. SUMMARY

Telomere length, just like the dynamics of its shortening, is indicator of the cell age and its replicative potential but also a reliable biomarker for lifespan approximation and the monitoring of aging-related diseases. The results provided by telomere length measurement depend upon the correct and precise quantitative and statistical analysis. Quantitative analysis of telomeres is determined by several methods, among which the most commonly used and most reliable one is terminal restriction fragment (TRF) length analysis by Southern blot. The main disadvantage of the aforementioned method is the fact that it doesn't show the actual telomere length, but the mean terminal fragment with subtelomeric tails for given cell population. Other often applied methods such as the quantitative PCR or Q-PNA-FISH have some advantages compared to Southern blot. Yet, due to significant variation of the results or impossibility of their comparison among different studies these methods are not first choice in fundamental research. Wider knowledge about the single telomere shortening to critical level, when senescence is induced, resulted in increasing effort in creating a more individual approach in telomere measurement. Still, the aggravating circumstance of quantitative telomere analysis is the telomere property of intrinsic heterogeneity. It is caused by molecular processes at the DNA level, cell level and cell population level. In addition, the methodological limitations add to increased heterogeneity of results. Therefore, quantitative analysis unquestionably needs to be accompanied by a statistical analysis and an accurate interpretation of results. Precise telomere analysis results can be applied in cell senescence, studies of various diseases and population lifespan distribution.