Kvantitativna analiza telomera u ljudskim stanicama MJ-90hTERT

Stančić, Vedran

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:050288

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Vedran Stančić

Kvantitativna analiza telomera u ljudskim stanicama

MJ-90hTERT

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Diplomski rad je izrađen na Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za molekularnu i staničnu biologiju Zavoda za molekularnu biologiju u Zagrebu, pod nadzorom dr. sc. Ivice Rubelja. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademske titule magistar molekularne biologije.

Zahvale

Htio bih se zahvaliti svom mentoru prof. dr. sc. Ivici Rubelju na znanstvenim i stručnim savjetima te podršci i pomoći u izradi ovoga diplomskog rada.

Također bih se htio zahvaliti mag. biol. mol. Luciji Nanić i dr. sc. Sandi Ravlić na svakodnevnim korisnim savjetima i praktičnim podukama o radu u laboratoriju.

Na kraju bih se htio zahvaliti svojoj majci Vesni Stančić, baki Elizabeti Romić i bratu Goranu Stančiću. Njihova kontinuirana vjera u mene i podrška mi je omogućila da ostvarim sve svoje ambicije i želje.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek Diplomski rad

Kvantitativna analiza telomera u ljudskim stanicama MJ-90hTERT

Vedran Stančić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Tema rada je kvantitativna analiza telomera u ljudskim stanicama MJ-90hTERT. To su fibroblasti imortalizirani telomerazom koja im omogućava produžavanje telomera, ali koji imaju fenotip i kontrolu rasta jednaku normalnim fibroblastima. Telomeraza produžuje pojedine telomere u ovisnosti o njihovoj konformaciji, odnosno duljini. Nakon označavanja telomera metodom hibridizacije *in situ* Q-PNA-FISH napravljena je kvantitativna analiza. Ovom se metodom može analizirati relativna duljina svake pojedine telomere i telomernog para na metafaznim kromosomima. Napravljena je usporedba duljina telomera sestrinskih kromatida fibroblasta koji su prošli 45, 60 i 75 udvostručenja populacije (PD) nakon unošenja telomeraze. Analiza promjena u duljini telomera pokazala je ujednačivanje njihove duljine razmjerno broju ciklusa kroz koji je stanična populacija prošla. Također je statistički pokazana pouzdanost metode Q-PNA-FISH u analizi telomera.

Diplomski rad ima: 38 stranica, 16 slika, 60 literaturnih navoda, 3 priloga, izvornik hrvatski.
Rad je pohranjen u: Središnjoj biološkoj knjižnici
Ključne riječi: Telomere, telomeraza, MJ-90hTERT, Q-PNA-FISH, dinamika dijeljenja stanica.
Mentor: Dr. sc.Ivica Rubelj, izv. prof.
Ocjenjivači: Prof. dr. sc. Višnja Besendorfer, prof. dr. sc. Božena Mitić,
Izv. prof. dr. sc. Renata Matoničkin Kepčija
Rad prihvaćen: 06.04.2017

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

A quantitative analysis of the dynamic of telomeres in human MJ-90 hTERT cells.

Vedran Stančić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The topic of this master thesis is a quantitative analysis of the dynamic of telomeres in human MJ-90 hTERT cells. This fibroblast cell line is immortalized by telomerase which enables telomere lenghtening, but the cells retain the same phenotype and growth control as in normal fibroblasts. Telomerase lenghtens telomeres in dependence on their conformation and/or length. Telomeres in these cells are quantitatively analyzed with software after the *in situ* hybridization with the Q-PNA-FISH method. This method enables analysis of each telomere and telomere pair on metaphase chromosomes. The length of sister chromatid telomeres were compared in fibroblasts which grew for 45, 60 and 75 population doublings in culture, after immortalization by telomerase. The analysis of changes in telomere length showed tendency of equalization in telomere length during the growth in the culture. Besides that, the reliability of Q-PNA-FISH in telomere analysis was statistically demonstrated.

Graduation thesis contains: 38 pages, 16 images, 60 citations, 3 appendixes.
Thesis is deposited in: Central biological library
Keywords: Telomeres telomerase, MJ-90hTERT, Q-PNA-FISH, Cell division dynamic.
Supervisor: Dr. sc. Ivica Rubelj, prof.
Reviewers: Prof. dr. sc. Višnja Besendorfer, prof. dr. sc. Božena Mitić,
Assoc. prof. dr. sc. Renata Matoničkin Kepčija
Thesis accepted: 06.04.2017

Suma kontribucija

Fotografije korištene u izradi ovog rada dio su fundusa Laboratorija za molekularnu i staničnu biologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu.

Sadržaj

1. Uvod 1
   1) Telomere i telomeraza 2
   2) Stanično starenje 4
   3) Alternativno produžavanje telomera 6
   4) Q-PNA FISH metoda 8
2. Ciljevi istraživanja 10
3. Materijali i metode 11
   1) Kvantiziranje telomernih signala metafaznih kromosoma 11
   2) Statistička analiza 12
4. Rezultati 14
   1) Jačina telomernih signala 14
   2) Razlike duljina telomera sestrinskih kromatida 17
   3) Varijabilnost signala telomera sestrinskih kromatida 19
5. Rasprava 22
6. Zaključci 26
7. Literatura 27
8. Prilozi 37
9. Životopis 38

Kratice

PNA - peptide nucleic acid – peptidna nukleinska kiselina

FISH - – fluorescencijska hibridizacija *in situ*

Q-PCR - quantitative polimerase chain reaction – kvantitativna lančna reakcija polimeraze

TERT - telomerase reverse transcriptase – telomerazna reverzna transkriptaza

ALT - alternative lengthening of telomeres – alternativno produljenje telomera

DDR - DNA damage response – odgovor na oštećenje DNA

SASP - senescence-associated secretory phenotype – sekretorni fenotip povezan sa senescencijom

1. Uvod

Naziv telomera izveden je iz grčkog jezika u kojem "telos" znači kraj, a "meros" znači dio. U modernim biotehnološkim istraživanjima sve se veći interes posvećuje istraživanju telomera. Telomere su specializirane strukture koje se nalaze na krajevima kromosoma, sastavljene od ponavljajuće sekvence DNA i specifičnog proteinskog kompleksa koji je s njom povezan. Telomere čuvaju integritet kromosoma, pa tako i cijelog genoma, obavljajući više ključnih uloga za pravilno funkcioniranje stanica. Jedna od najbitnijih uloga telomera je da izolira ljepljive krajeve kromosoma sprječavajući nepravilne fuzije s drugim kromosomima, štiteći krajeve kromosoma od djelovanja staničnih nukleaza, te čuvajući krajeve kromosoma od neispravnog djelovanja staničnih mehanizama popravka DNA.

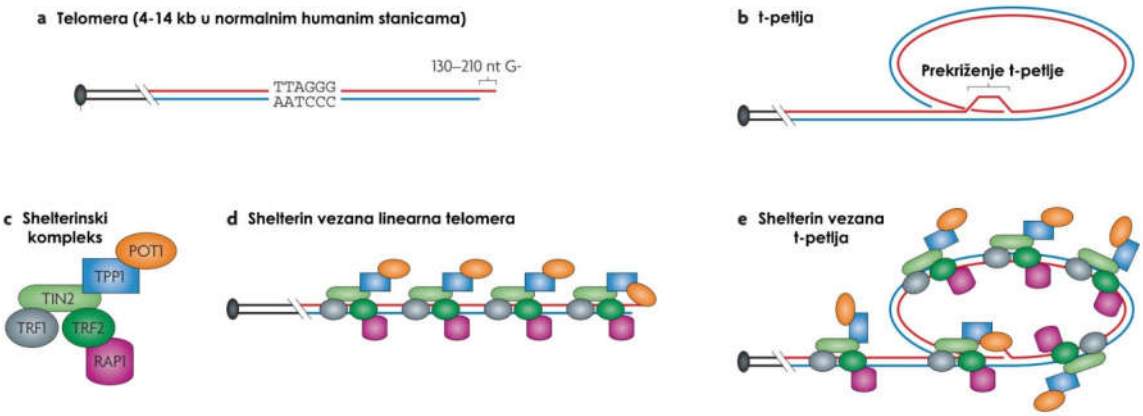
Telomere su čest predmet istraživanja zbog njihove značajne uloge u staničnom starenju, pa tako i starenju cijelog organizma. Neke od najčešćih metoda koje se koriste u tu svrhu su hibridizacija po Southern-u i kvantitativna lančana reakcija polimeraze (Q-PCR). Premda obje metode pokazuju dobru pouzdanost postoji značajna razlika u dobivenim rezultatima (Aviv i sur. 2011). Zato postoji sve veći interes za metodom Q-PNA-FISH (quantitative-peptide nucleic acid-fluorescence *in situ* hybridization) koja radi na principu označavanja neutralno nabijene sintetske nukleinske probe s florescentnom bojom. PNA (Peptid nucleic acid) je sintetski polimer čija je okosnica sačinjena od N-(2-aminoetil)-glicina na koji su specifično vezani purini i pirimidini. Za razliku od nukleinskih kiselina s fosfatnom okosnicom, polipeptidna okosnica PNA ne posjeduje negativan naboj, te se lakše veže za ciljnu komplementarnu sekvencu. Proba se, određena svojom specifičnom sekvencom, spaja s ciljnom DNA ili RNA, nakon čega je moguće vizualizirati mjesto spajanja uz pomoć fluorescencijskog mikroskopa pomoću svjetlosti specifične valne duljine (Aida i sur. 2014).

U ovom radu analizirao sam dinamiku telomera u telomerazom imortaliziranim stanicama MJ-90hTERT. Dobiveni grafički i statistički rezultati će pokazati ponašanje telomera u uvjetima reprogramiranja staničnih dioba te pouzdanost metode Q- PNA-FISH za analizu telomera. Također će poslužiti i za molekularno modeliranje telomera s obzirom na

konformacijske promjene kroz koje telomere prolaze usljed skraćivanja, odnosno produžavanja na modelu stanica normalnog fenotipa, ali aktivne telomeraze.

1) Telomere i telomeraza

Telomere su nukleoproteinske strukture na krajevima kromosoma, prisutne kod svih eukariota koji imaju linearni genom, uključući protozoa, gljive, biljke i životinje. Telomere mogu varirati veličinom od oko 5 do 10 kilobaza, a sastavljene su od, za sisavce specifičnih, oligonukleotidnih ponavljanja $(TTAGGG)_n$ i proteinskog kompleksa tzv. šelterina (Levy i sur. 1992; Blackburn i sur. 2006). Telomere štite krajeve komosoma od razgradnje s nukleazama, nepotrebnog DNA popravka i fuzije s drugim kromosomima te na taj način održavaju stabilnost genoma (Chan i Blackburn 2004). Uz to imaju još neke važne uloge u stanici kao što su pozicioniranje kromosoma u staničnoj jezgri, transkripcijska represija, formiranje heterokromatina i kontrola stanične diobe (Levy i sur. 1993; Brewer i Fangman 1993; Ferguson i Fangman 1992). Šelterin svojim specifičnim vezivanjima utječu na oblik telomera i pomažu im poprimiti konformaciju T-petlje koja onemogućava dostupnost dvolančanog kraja DNA staničnim nukleazama (Stansel i sur. 2001). Šelterini su proteinska struktura sastavljena od 6 različitih proteina, od kojih glavnu ulogu imaju proteini TRF1 i TRF2. Protein TIN2 je važan za formiranje kompleksa i veže TPP1 i POT1 za TRF1 i TRF2 i Rap1 (de Lange 2005). Proteini TRF1, TRF2 i POT1 posjeduju domenu koja veže DNA, TRF1 i TRF2 specifično vežu sekvencu 5′-YTAGGGTTR-3′(Court et al. 2005) u DNA dupleksu, dok POT1 veže sekvencu 5′-(T)TAGGGTTAG-3′(Ye 2004) blizu 3′ kraja (Slika 1.).

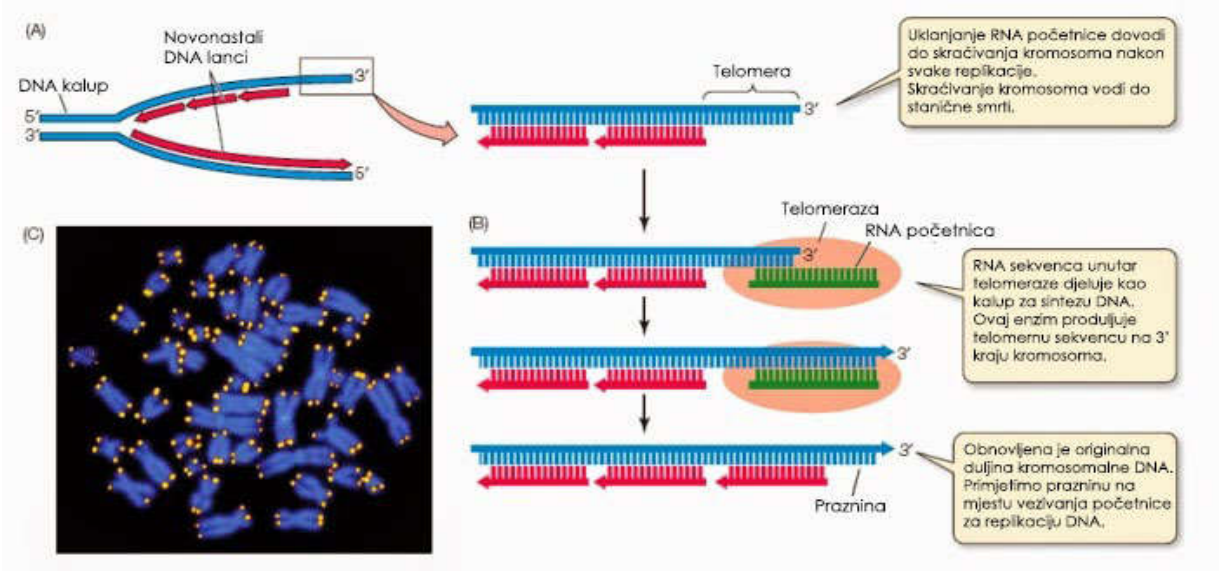


Slika 1. a) Telomere kod kralježnjaka se sastoje od repetitivne DNA sekvence (5'-TTAGGG-3')n. b) Telomera se može saviti i s jednolančanim terminalnim krajem implantirati u dupleks telomerne DNA stvarajući T-petlju. c) Telomerna DNA vezana je sa šest podjedinica šelterinskog kompleksa. d, e) Uloga međusobnih interakcija šelterinskih podjedinica u stvaranju telomerne T-petlje. Preuzeto od Cesare i Reddel Roger 2010. (Cesare i Reddel 2010).

U slučaju da nema aktivnih mehanizama produljenja, tijekom svake stanične diobe dužina telomera će se skratiti. Ovaj karakterističan fenomen često se još zove „problem produljenja krajeva“ (Olovnikov 1973), a proizlazi iz nemogućnosti potpune sinteze cijele dužine DNA krajeva tijekom S-faze staničnog ciklusa, što dovodi do skraćivanja koje s vremenom dostiže kritičnu duljinu, te stanica potom ulazi u senescenciju (Allsopp i sur. 1992). Kod čovjeka DNA replikacija se odvija uz pomoć DNA polimeraze koja u semikonzervativnom procesu, koristeći jedan DNA lanac kao kalup i DNA ili RNA početnicu, kopira DNA lanac kalupa (Salas i sur. 1996).

Produžavanje telomera se razlikuje od standardne replikacije. Obavlja je reverzna transkriptaza telomeraza, ribonukleoproteinski enzim koji je sastavljen od aktivne TERT podjedinice i integrirane RNA podjedinice (Greider i Blackburn 1989; Maldarelli i sur. 1980). Telomeraza se veže na krajeve telomera i koristi svoju katalitičku podjedinicu hTERT kako bi, uz pomoć asocirane RNA molekule, reverznom transkripcijom produljila molekulu DNA na 3´ kraju (Slika 2.). Trenutni modeli sugeriraju postojanje dva mjesta vezivanja telomeraze za RNA kalup i to mjesto koje sadrži komplementarnu RNA i poravnava 3´ kraj telomere s katalitičkim

centrom kako bi moglo započeti produživanje komplementarnog lanca i mjesto sidrenja koje se veže na 5′ kraj i otvara put kroz koji rastući lanac novonastale molekule DNA izlazi iz enzima (Collins i Greider 1993; Lee i Blackburn 1993). Nadalje, lanac bogat citozinima koji odgovara 5′ kraju sintetizira DNA uz pomoć novonastalog kalupa na lancu bogatom guanidinima, uz pomoć uobičajene DNA polimerazne reakcije (Blackburn i Collins 2011). Telomeraza je konstitutivno aktivna u matičnim stanicama i spolnim stanicama, gdje održava duljinu telomera na ~15kB (Bodnar i sur. 1998).



Slika 2. A) Tijekom DNA replikacije na 3' kraju ostaje praznina. B) Telomeraza posjeduje vlastitu RNA početnicu koju koristi kao kalup za sntezu DNA. C) Plavo označeni stanični kromosomi, žuto označene telomere. Preuzeto i prilagođeno prema http://www.nature.com/scitable/content/34864/sadava_11_21_LARGE_2.jpg.

2) Stanično starenje

Već u početku proučavanja staničnih kultura *in vitro* zamjećeno je kako kod primarnih ljudskih stanica postoji ograničeni potencijal dioba. Postoje tri faze rasta staničnih kultura: u početku rastu sporije nakon čega slijedi ubrzani rast, dok je za treću fazu karakteristično usporavanje proliferacije i stagnacija (Hayflick i Moorhead 1961). Danas je poznato kako se

tijekom progresije staničnih dioba dužina telomera skraćuje, zbog takozvanog „problema replikacije krajeva“. Kad dužina telomera dosegne kritičnu minimalnu duljinu, stanica više ne može normalno proliferirati i ulazi u stanje senescencije. Granica do koje stanica može uspješno proliferirati zove se još i „Hayflickov limit“. Kada telomere dosegnu svoju kritičnu minimalnu duljinu, strukture koje štite krajeve kromosoma više ne funkcioniraju ispravno. Stanica tada pokreće stanični odgovor DDR (DNA damage response) sa svojim asociranim proteinima 53BP1, NBS1 i MDC1, povećava se ekspresija kinaza za reguliranje DNA oštećenja ATM i ATR, te u stanicama sve češće nalazimo fosforiliranu varijantu histona γ-H2AX (di Fagagna i sur. 2003). Nakon pojačavanja signala DDR aktiviraju se kinaze CHK1 i CHK2, te proteini regulacije staničnog ciklusa CDC25 i p53 koji osiguravaju koordinaciju DDR-a s trenutnim zaustavljanjem staničnog ciklusa (Fujita i sur. 2009). U tom trenutku stanica ima priliku popraviti DNA oštećenje. U slučaju da se oštećenje ne može popraviti stanica može ići u apoptozu ili senescenciju (d’Adda di Fagagna 2008). Uz p53, u procesu indukcije senescencije pokazao se važan i tumor supresorski protein pRB, te njegov signalni put p16INK4a (Ohtani, i sur. 2004). Pokazalo se da, ukoliko su bilo koja od ova dva ključna tumor supresorska proteina eksprimirana u stanici, će doći do pravilne uspostave senescencije (Shay i sur.1991). U slučaju da ovi proteini nisu eksprimirani ili fukcionalni, stanica će se nastaviti dijeliti, no s ograničenim kapacitetom prije nego što nastupi telomerna kriza, kromosomalna nestabilnost i u konačnici smrt (Shay i Wright 2005). Jedan od ključnih dokaza kako je preduvjet za senescenciju potrebna kritična minimalna duljina telomere dobiven je kad se primjetilo da stanice koje konstitutivno esprimiraju katalitičku podjedinicu telomeraze (hTERT) ne ulaze u senescenciju. S konstitutivnom ekspresijom podjedinice hTERT krajevi kromosoma su se stalno produljavali, te nisu dosezali minimalnu kritičnu duljinu, izbjegavajući senescenciju (Vaziri i Benchimol 1998). Ograničeni proliferacijski pontencijal primarnih ljudskih stanica objašnjava se upravo s činjenicom da one ne eksprimiraju telomerazu, dok normalne ljudske matične stanice posjeduju eksprimiranu telomerazu i time izbjegavaju skraćivanje telomera i suprimiraju DDR odgovor, dajući im neograničenu sposobnost dijeljenja (Masutomi i sur. 2003). Aktiviranjem konstitutivne ekspresije podjedinice hTERT u somatskim staničnim kulturama *in vitro* dobivaju se imortalizirane stanične kulture koje zadržavaju normalne karakteristike. Uz matične stanice, tumori također posjeduju konstutuivno eksprimiranu telomerazu, te izbjegavaju senescenciju i staničnu smrt. Tumori također mogu koristiti rekombinacijski mehanizam alternativnog

produljavanja telomera (ALT) (Muntoni 2005) kako bi zaobišli stanično starenje. Tijekom senescencije stanica prolazi kroz značajne morfološke promjene, gubi svoj normalni oblik, postaje velika, plosnata i ponekad višejezgrena (Chen i Ames 1994). Uz morfološke promjene, stanice u senescenciji posjeduju značajno izmijenjenu gensku aktivnost. Micro-čip analize otkrile su jaki upalni odgovor, te povećanu ekspresiju citokina i kemokina (Shelton i sur. 1999) sličnu kao kod stanica u procesu zacijeljivanja rana. Ovaj značajno izmijenjen transkriptom i na kraju sekretom vezan uz senescenciju zove se još i sekretorni fenotip povezan sa senescencijom ("senescence-associated secretory phenotype" tj. SASP) (Rodier i sur. 2009). Senescencija je prepoznata kao jedan od mehanizama pomoću kojih organizam izbjegava tumorigenezu, uz činjenicu da su p53 i RB najčešće mutirani proteini kod tumora. Značajno je da u slučaju naknadne reaktivacije p53 u tumorskim stanicama dolazi do senescencije i naposljetku apoptoze (Ventura i sur. 2007). U području senescencije potrebna su daljnja istraživanja, prvenstveno kako bi se utvrdili diferencirajući biomarkeri koji precizno definiraju stanicu u senescenciji. Danas poznati biomarkeri nisu isključivo specifični za stanicu u procesu senescencije. Interes za ova istraživanja u posljednjih nekoliko godina raste, pogotovo otkad je dokazana veza između tumora i senescencije, što bi s povećanim razumjevanjem tih mehanizama moglo doprinijeti razvitku novih terapija za liječenje tumorskih bolesti.

3) Alternativno produžavanje telomera

Tumori koji mogu alternativnim putom produžavati telomere (ALT - alternative lengthening of telomeres) održavaju duljinu telomera kroz mnoga stanična dijeljenja bez aktivne telomeraze. Iako telomere stanica ALT dijele mnoge karakteristike sa stanicama s aktivnom telomerazom, postoje fenotipska obilježja koja razlikuju imortalizirane stanice ALT od stanica s aktivnom telomerazom. U ALT stanicama česta je prisutnost ekstrakromosomske telomerne DNA, od kojih postoji nekoliko vrsta, takozvani dvolančani telomerni krugovi (T-krugovi) (Cesare i sur. 2004; Wang i sur. 2004), djelomično jednolančani, bogati citozinom, kružni C-krugovi (Henson i sur. 2009) ili G-krugovi bogati gvaninom (Nabetani i Ishikawa 2009) te linearna dvolančana DNA (Lines i sur. 1998) i T-kompleksi s visokom molekularnom težinom, koji često imaju, visoko razgranatu strukturu (Nabetani i Ishikawa 2009). Još neke od značajnijih

karakteristika stanica ALT su jako heterogene dužine telomera, od vrlo dugih do vrlo kratkih (Bryan i sur. 1995), nagle promjene dužine telomera (Murnane i sur. 1994; Perrem i sur. 2001) i veliki stupanj rekombinacije telomera (Londono-Vallejo i sur. 2004). Premda ova fenotipska obilježja pomažu u definiranju stanica ALT, nisu sva podjednako relevantna. Primjerice, za razliku od c-petlji, T-petlje nastaju i unutar normalnih stanica s aktivnom telomerazom tijekom razrješenja križanja telomerskih petlji uz pomoć rekombinacijskih proteina čime nastaju skraćene telomere (Rubelj 2014; Wang i sur. 2004).

Primjećeno je da se u stanicama bez telomeraze ponekad dužina telomera značajno skraćuje ili produžava, što je bila prva indicija da je za proces ALT potrebna homologna rekombinacija (Murnane i sur. 1994). Postoji nekoliko značajnih dokaza da je homologna rekombinacija uključena u proces ALT. Tako, na primjer, označena DNA na jednom kromosomu bila je kopirana na druge kromosomske završetke u stanicama ALT (Cerone i sur. 2001). Također, pronađene su telomere koje imaju kompleksnu reorganizaciju nekanonskih ponavljanja u blizini telomernih regija, što se najlakše objašnjava djelovanjem homologne rekombinacije između dvije nesestrinske telomere ili ekstra kromosomske sekvence (Varley i sur. 2002). Trenutno vodeća hipoteza je da nova telomerna DNA nastaje prilikom rekombinacije telomera pri čemu se koristi sekvenca obližnje telomere (Muntoni i sur. 2009), T-petlja ili sestrinska kromatida kao kalup za sintezu novog lanca (Cerone i sur. 2001). Za produžavanje telomera potreban je kompleks proteina MRN, koji se sastoji od MRE11A, RAD50 i NBS1 (Jiang i sur. 2005; Zhong i sur. 2007). Sasvim je izvjesno da MRN promovira ALT aktivnost tako što dovodi protein ATM na telomere, čime započinje procesiranje krajeva kromosoma i formiranja dugih telomernih 3´ krajeva koji mogu ući u obližnju telomernu DNA, kako bi je koristili kao kalup za produljenje (Lee i Paull 2007).

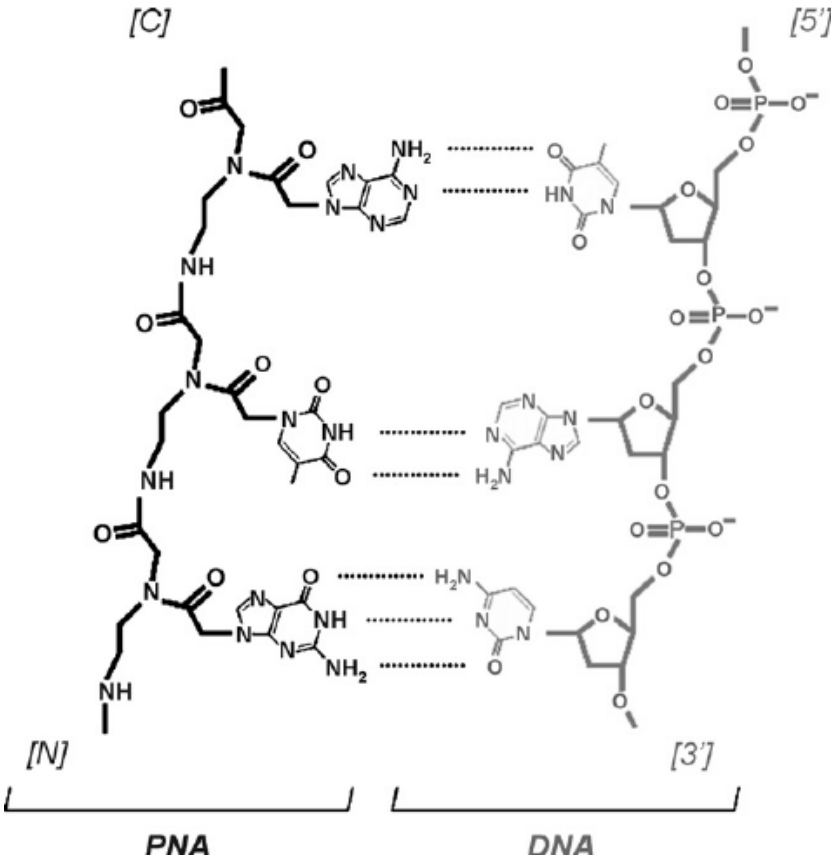
Postavlja se pitanje - ukoliko je ALT produživanje telomera učinkovito i koristi uobičajene stanične proteine, zašto nije aktivno u svim stanicama? Postoje dokazi da je u normalnim stanicama proces ALT suprimiran (Perrem i sur. 1999), konkretno da su za to najvjerojatnije zaduženi proteini iz skupine šelterina TRF2 (Celli i sur. 2006) i POT1 (Palm i sur. 2009). U stanici šelterini su vezani za telomere na kraju kromosoma, ali i za ekstrakromosomsku telomernu DNA. Količina ekstrakromosomske DNA u stanicama ALT je značajno povećana, no ekspresija šelterina ostaje ista, što bi moglo značiti da veliki dio ekstrakromosomske DNA nije

pravilno pokriven, te lakše ulazi u homolognu rekombinaciju (Cesare i sur. 2009). Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se razriješili detalji koji dovode do homologne rekombinacije u stanicama ALT, te odgovorilo na pitanje koji su točno proteini uključeni u sam proces. Kako je mehanizam ALT produljenja telomera prisutan u mnogim mezenhimalnim tumorima, sigurno će još dugo biti predmet istraživanja.

4) Q-PNA FISH metoda

FISH (fluorescence *in situ* hybridization) je citogenetička metoda koja se koristi flourescentske sonde za označavanje i vizualizaciju specifičnih DNA ili RNA sekvenci unutar stanica. Metoda koristi visoko specifične sonde s vezanom fluorescencijskom bojom koje vezujući se za specifičnu DNA ili RNA sekvencu se koriste za označavanje određenih sekvenci od interesa. Najčešće se koristi u označavanju specifičnih dijelova kromosoma kao što su naprimjer telomere. Danas su razvijene različite vrste metoda FISH ovisno o potrebni istraživanja i strukturi koja se označava, neke od vrsta FISH su; Flow FISH, Fiber FISH, Q-FISH. Metoda PNA FISH je specifična po tome što se kao sonda upotrebljava sintetska peptidna nukleinska kiselina (PNA) (slika 3). PNA se razlikuje od DNA sonde po tome što je negativno nabijena fosfatna okosnica DNA zamijenjena s neutralno nabijenom poliamidnom okosnicom N -(2-amino etil)-glicin prvi put sintetizirana od strane Nielsen i suradnika (Nielsen i sur. 1991). PNA pokazuje veću specifičnost hibridizacije s ciljnom DNA ili RNA zbog svoje neutralne peptidne okosnice koja ne odbija negativno nabijene molekule DNA i RNA, Također, PNA pokazuje visoku rezistenciju na razgradnju od strane DNAza, RNAaza, proteinaza i peptidaza. S razvojem bioinformatike pokazalo se da rezultati metoda FISH mogu kvantitativno odrediti količinu DNA ili RNA materijala u uzorku. U slučaju istraživanja telomera kvantizacija znači da je intenzitet florescencije vezanih sondi u direktnoj korelaciji s dužinom telomerne sekvence do razine specifičnosti od 200 parova baza (Lansdorp et al. 1996). Danas se metoda FISH koristi u različite kliničke svrhe kao naprimjer, identifikacija specifičnih patogena, komparativna genomska hibridizacija i spektralni kariotip (Levsky 2003) što direktno doprinosi diagnosticiranju i prognoziranju napredka specifičnih nasljednih genetičkih bolesti kao što su; Prader-Willijev sindrom, Angelmanov sindrom i akutna limfoblastična leukemija i druge. Danas

na tržištu postoji široka ponuda komercijalnim FISH kompleta koji se koriste u raznim istraživanjima.



Slika 3. Vezanje sintetske molekule PNA sa specifičnom DNA sekvencom uz pomoć vodikovih veza (Marti i sur. 2007).

2. Ciljevi istraživanja

Ciljevi istraživanja ovog diplomskog rada su:

1- Napraviti kvantitativnu analizu i analizirati relativnu distribuciju telomera metafaznih kromosoma stanica hTERT nakon 45, 60 i 75 udvostručenja populacije.
2- Usporediti signale sestrinskih telomera pojedinih kromosoma te analizirati distribuciju i dinamiku razlika u intenzitetu kod sestrinskih telomera u odnosu na broj udvostručenja populacije.
3- Analizirati varijabilnost razlika kvantiziranih signala u odnosu na dužu telomeru iz pojedinog para kod rastućih dioba.

3. Materijali i metode

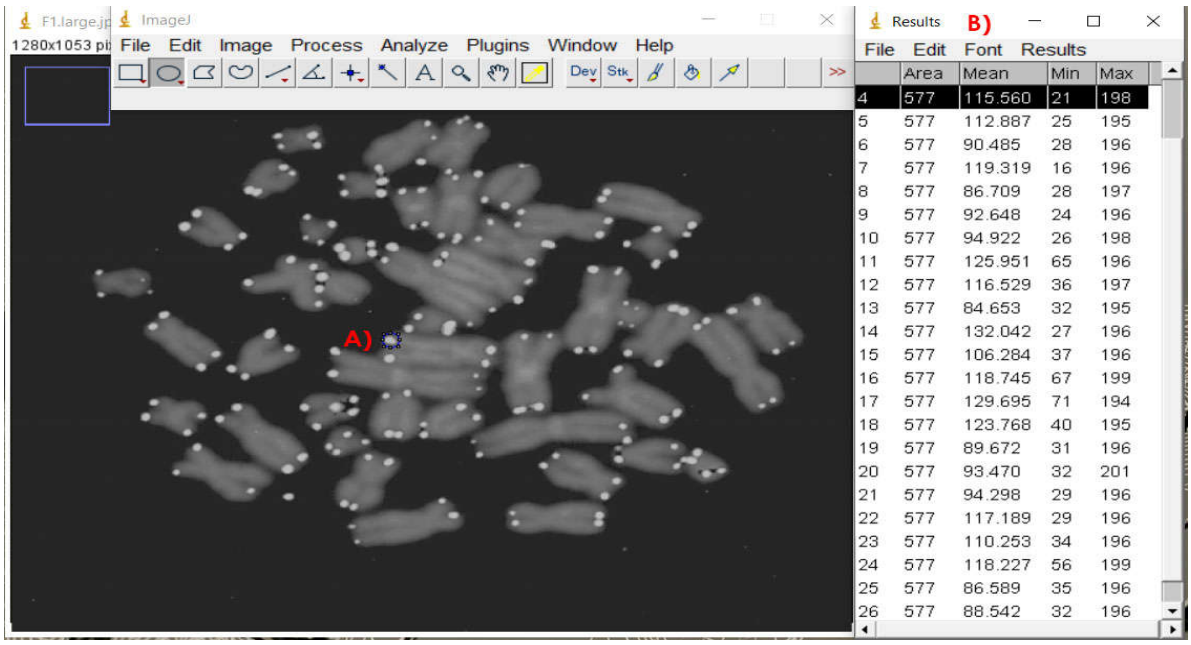
1) Kvantiziranje telomernih signala metafaznih kromosoma

Korištene su fotografije kulture imortaliziranih stanica MJ-90hTERT ljudskih fibroblasta, normalnog fenotipa. Telomere su analizirane kod fibroblasta s konstitutivno aktivnom telomerazom koji su prošli 45, 60 i 75 populacijskih dioba (PD). Telomere navedenih stanica su obilježene metodom Q-PNA-FISH. Za kvantiziranje telomernih signala korišten je program za analizu fotografija „Image J v1.47.v." (Slika 3) (Schneider i sur. 2012). Za kompjutersku analizu korišteni su sljedeći parametri; „Area" - površina koja se mjeri u kvadratnim pikselima, „Minimum" - minimalna vrijednost florescencije na zadanoj površni, „Maksimum" - maksimalna vrijednost florescencije na zadanoj površini, „Average" - zbroj svih vrijednost florescencije za sve piksele na određenoj površini podijeljen je s brojem piksela na zadanoj površini, također poznato pod terminom OD (optical density/optička gustoća). Optička gustoća se mjeri formulom OD= log10(255/vrijednost florescencije piksela). Računalo mjeri intenzitet florescencije crno bijele skale s arbitrarnim vrijednostima od 0(crno) do 255(bijelo). Svi parametri određeni su na četiri decimalna mjesta. Slike su prvo prebačene u crno bijeli 8-bitni format kako bi se uklonila interferencija od crvene florescencijske sonde. Potom su istoznačne slike, obojene fluorescencijskom bojom DAPI, prebačene u crno-bijeli 8-bitni format. Fotografija s telomernim signalima preklopljena je preko istovjetne fotografije obojene fluorescencijskom bojom DAPI kako bi se dobio uvid pripadnosti telomernih signala određenim kromosomima. Prilikom mjerenja posebna se pozornost pridodala pravilnom označavanju kromosoma u kojem su telomere sestrinskih kromatida označena sa slovima A i B te istovjetne telomere na suprotnoj strani kromosoma s C i D, tako se lakše moglo pratiti o kojoj telomeri je riječ prilikom statističke analize. Sva mjerenja su napravljena na povećanju od 150% originalne veličine uz pomoć kružnog označivača, promjera 13 piksela, s ukupnom površinom od 132,66 piksela kvadratnih. Pošto računalo analizira sliku uz pomoć piksela, to jest malih kvadratića, površina je nešto manja od idealne matematičke površine vrijednosti 176,71 mm^2 koje bi dobili s

formulom za izračunavanje površine kruga $A= r^2*\pi$ no, to nema utjecaja na kvalitetu mjerenja zbog toga što označivač i dalje u potpunosti pokriva područje florescencije.

2) Statistička analiza

Za statističku analizu korišten je program „Excel“ u koji su unesene sve prikupljene numeričke vrijednosti. Iz fotografija metafaznih kromosoma fibroblasta kod 45 populacijskih dioba iz 60 fotografija prikupljeno je 2978 numeričkih vrijednosti denzitometrije, kod 60 populacijskih dioba iz 60 fotografija prikupljeno je 2234 numeričkih vrijednosti denzitometrije, te kod 75 populacijskih dioba iz 80 fotografija prikupljeno je 5371 numeričkih vrijednosti denzitometrije. U statističkoj analizi sveukupno je korišteno 10586 numeričkih vrijednost florescencije. Za svaki set podataka jedinstvenih za pojedinu fotografiju provedena je normalizacija tako što je izračunata prosječna vrijednost florescencije i podijeljena s dobivenom vrijednošću seta podataka koji čini fotografiju, to jest N= Σ(vrijednosti flourescencija telomera/broj telomera)/(vrijednosti flourescencije telomera). Na taj način bilo je moguće uspoređivati vrijednosti fluorescencija različitih fotografija iz čega su dobiveni grafički prikazi, te statistički izračuni. Izračunata je prosječna jakost florescencije svakog kraja kromosoma to jest prosječna jakost signala dviju sestrinskih telomera na svakom kraju kromosoma (A+B/2) i (C+D/2). Izračunata je i razlika između prosjeka jakosti florescencije dviju sestrinskih kromatina na krajevima kromosoma, nakon što se izdvojila veća telomere od para sestrinskih kromatida oduzeta je od manje (< telomera sestrinske kromatide A ili B), (A-B) i (C-D). Prilikom stvaranja grafičkih prikaza raspona jačine telomernih signala i razlike duljina telomera sestrinskih kromatida vrijednosti su svrstane u kategorije s excel formulom „FREQUENCY“. Prilikom stvaranja grafova varijabilnost signala telomera sestrinskih kromatida vrijednosti veće telomere u paru sestrinskih kromatida pridružene su njihovoj razlici duljina telomere sestrinskih kromatida, te su vrijednosti poredane po rastućoj vrijednosti duljine telomere veće sestrinske kromatide. Nakon toga izračunate su prosječne vrijednosti razlike sestrinskih kromatida za dvadeset prethodno određenih kategorija koje su se koristile u stvaranju grafičkih raspodjela.

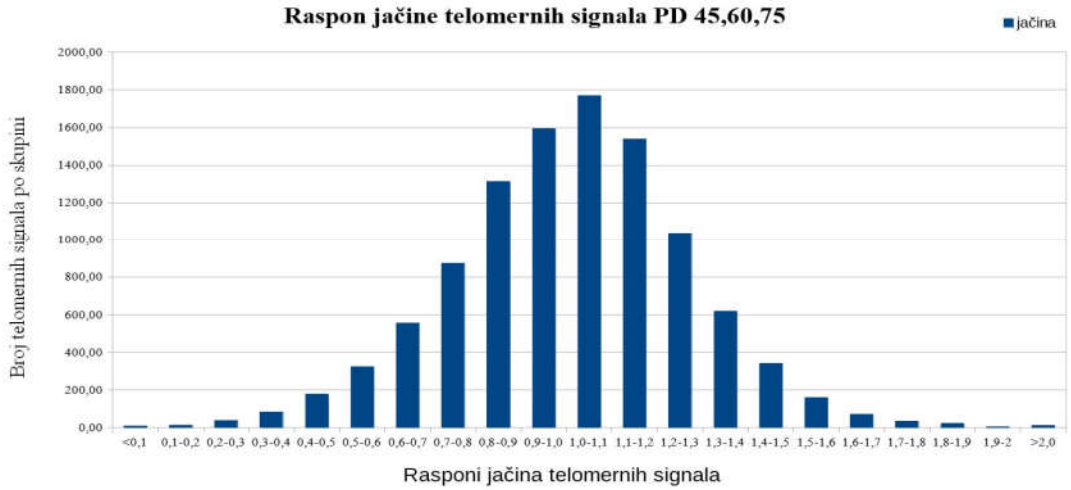


Slika 4. A) Crno bijela fotografija metafaznih kromosoma obojenih s fluorescencijskom bojom DAPI i telomera označenih sa specifičnom sondom PNA. B) Podatci preuzeti s fotografije uz pomoć kružnog označivača. Računalo bilježi minimalnu, maksimalnu i srednju vrijednost florescencije s arbitrarnom vrijednosti od 0-225. Nakon kvantizacije podatci su korišteni za statističku analizu u programu “Excel”.

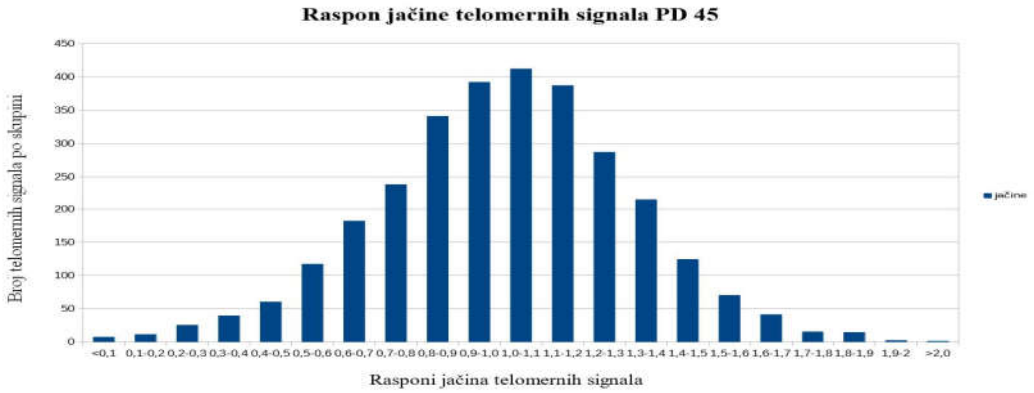
4. Rezultati

1) Jačina telomernih signala

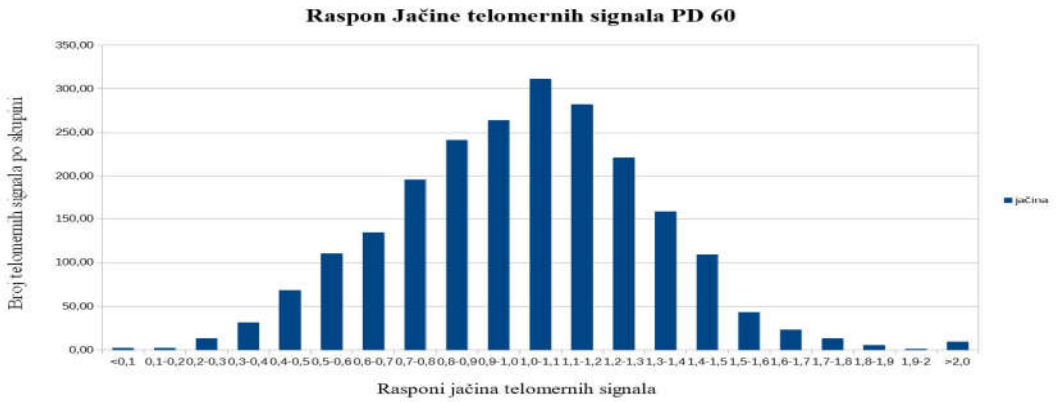
Telomere normalnih humanih fibroblasta imortaliziranih telomerazom analizirane su nakon što je stanična populacija udvostručena 45, 60, odnosno 75 puta (45, 60 i 75 PD). Metafazni kromosomi su hibridizirani telomernom sondom PNA i intenzitet signala analiziran pod fluorescentnim mikroskopom. Jačina signala je izražena kao numerički podatak te su svi podaci statistički razvrstani u nekoliko kategorija, prikazanih na slici 3. Intenzitet florescencije vezane sonde PNA razmjeran je duljini telomere. Prvi set grafičkih prikaza vizualizira statističku razdiobu relativne duljine telomera po skupinama i odstupanja od prosječne duljine. Slika 5. prikazuje raspon jačine telomernih signala nakon 45, 60 i 75 populacijskih dioba. Podatci pokazuju normalnu raspodjelu u kojoj se većina vrijednosti nalazi oko prosječne duljine telomera. Telomere pokazuju širok raspon intenziteta, odnosno duljina. Slika 6. prikazuje raspon jačine telomernih signala nakon 45 populacijskih dioba fibroblasta normalnog fenotipa s aktivnom telomerazom. Telomere pokazuju veliku raznolikost u duljinama. Na slici 7. prikazan je raspon jačine telomernih signala nakon 60 populacijskih dioba: vidljiv je manji raspon intenziteta telomernih signala u usporedbi s podacima dobivenih analizom stanica nakon 45 PD (Slika. 6) te veće grupiranje oko prosječne vrijednosti. Iz podataka se može zaključiti da su se duljine telomera počele izjednačavati pod utjecajem telomeraze. Slika 8. prikazuje raspon jačine telomernih signala nakon 75 udvostručenja populacija, kad one poprimaju najužu konformaciju oko prosječne vrijednosti, što ukazuje da su se dužine telomera u populaciji uglavnom međusobno izjednačile.



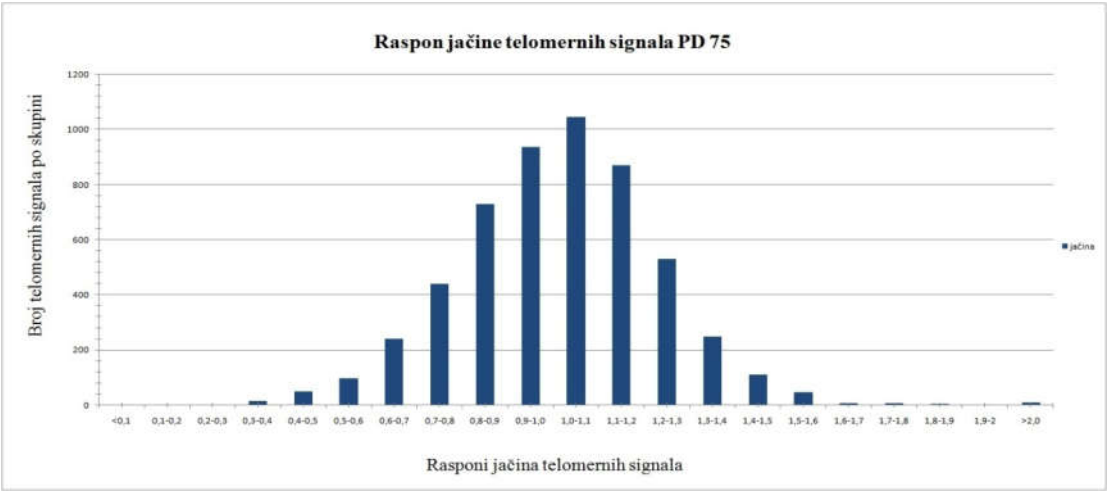
Slika 5. Raspon jačina telomernih signala kod imortaliziranih fibroblasta PD45, PD60, PD75. Normalizirani telomerni signali, čija je jačina očitana sa slike dobivene fluorescencijskom hibridizacijom *in situ* imortaliziranih humanih fibroblasta denzitometrijom, svrstani su u 21 skupinu po svojoj duljini i odstupanju od srednje vrijednosti.



Slika 6. Raspon jačina telomernih signala kod imortaliziranih fibroblasta PD45. Normalizirani telomerni signali, čija je jačina očitana sa slike dobivene fluorescencijskom hibridizacijom *in situ* imortaliziranih humanih fibroblasta denzitometrijom, svrstani su u 21 skupinu po svojoj duljini i odstupanju od srednje vrijednosti.



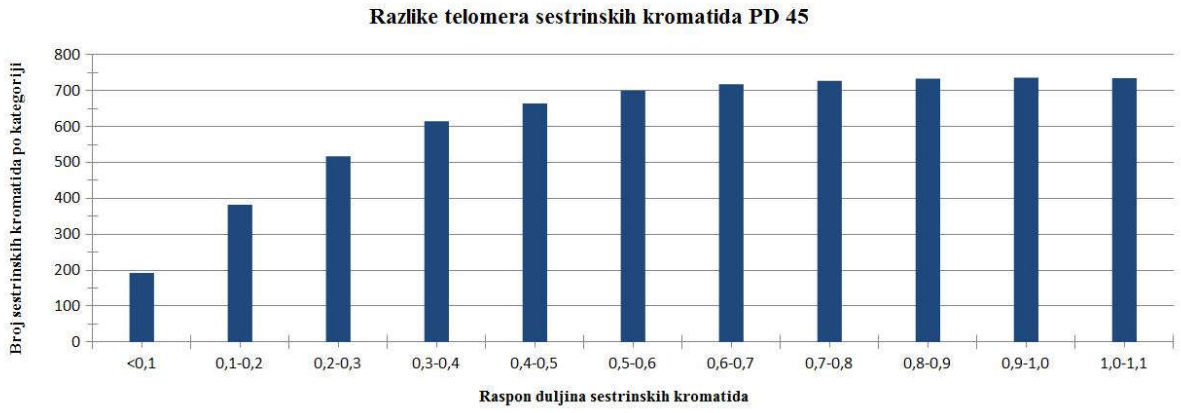
Slika 7. Raspon jačina telomernih signala kod imortaliziranih fibroblasta PD60. Normalizirani telomerni signali, čija je jačina očitana sa slike dobivene fluorescencijskom hibridizacijom *in situ* imortaliziranih humanih fibroblasta denzitometrijom, svrstani su u 21 skupinu po svojoj duljini i odstupanju od srednje vrijednosti.



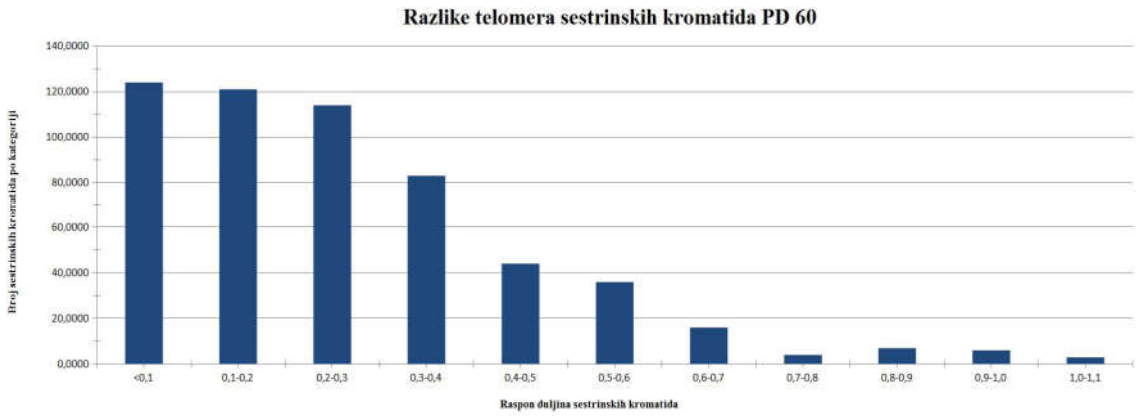
Slika 8. Raspon jačina telomernih signala kod imortaliziranih fibroblasta PD75. Normalizirani telomerni signali, čija je jačina očitana sa slike dobivene fluorescencijskom hibridizacijom *in situ* imortaliziranih humanih fibroblasta denzitometrijom, svrstani su u 21 skupinu po svojoj duljini i odstupanju od srednje vrijednosti.

2) Razlike duljina telomera sestrinskih kromatida

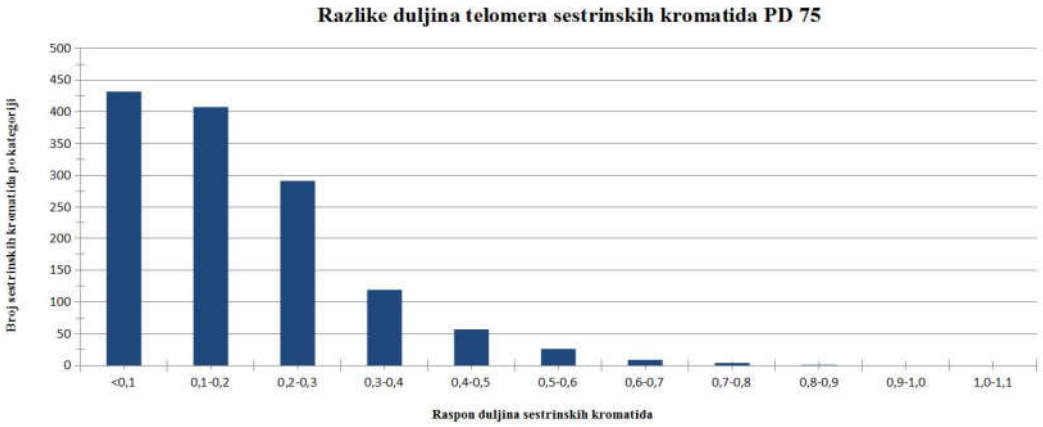
Nakon analize intenziteta telomera svih kromosoma, uspoređena je duljina telomera sestrinskih kromatida, kod imortaliziranih fibroblasta koji su prošli 45, 60 i 75 udvostručenja populacije. Na Slici 9. prikazana je analiza razlika u intenzitetu signala između sestrinskih telomera kod stanica PD 45. Kako razlike u intenzitetu odražavaju razlike u duljini telomera, može se zaključiti da između sestrinskih kromatida postoje razlike i do 50 %. Na Slici 10., kod fibroblasta PD 60, dolazi do značajnog smanjenja razlike između sestrinskih telomera, te većina razlika pada na manje od 50% duljine sestrinske kromatide. Razlika u rezultatima može se pripisati aktivnosti telomeraze koja kao kalup uzima dužu sestrinsku kromatidu i koristi je za sintezu sestrinske kromatide, izjednačavajući njihove dužine. Na zadnjem prikazu (Slika 11.), kod fibroblasta PD 75, razlike između sestrinskih telomera se i dalje smanjuju te je većina razlika ispod 30%. Smanjenje razlika između populacija od 60 i 75 PD ukazuju da se aktivnost telomeraze smanjuje s procesom izjednačavanja duljina sestrinskih kromatida te da taj proces dostiže optimum (Slike 9. i 10.).



Slika 9. Raspon razlika duljina sestrinskih telomera kod imortaliziranih fibroblasta PD45. Duljina sestrinskih telomera očitana je denzitometrijom fluorescentnog signala nakon hibridizacije s telomernom probom. Nakon normalizacije, vrijednosti manje sestrinske kromatide oduzete su od veće sestrinske kromatide i svrstane su u 11 kategorija po rastućoj vrijednosti razlika.



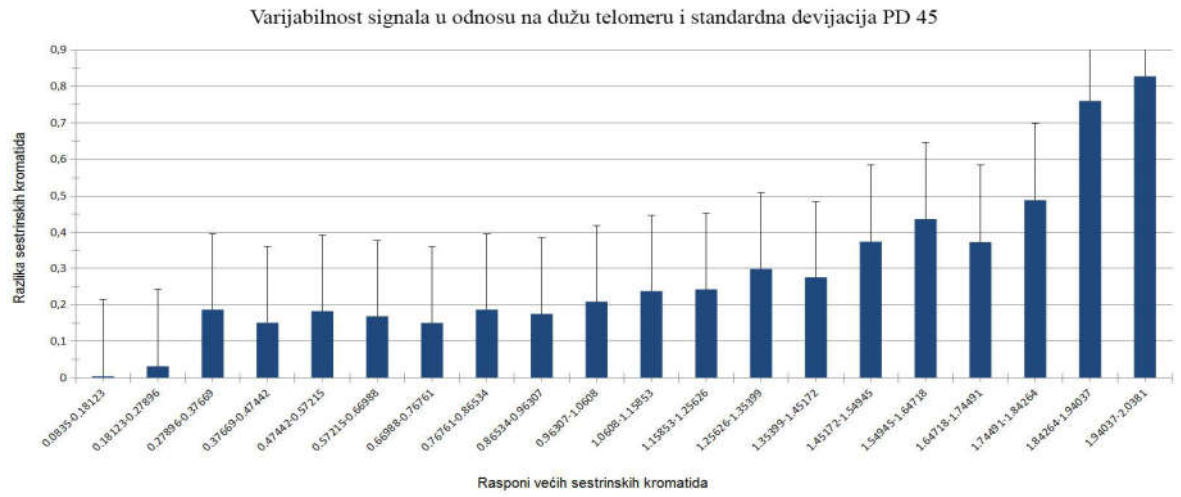
Slika 10. Raspon razlika duljina sestrinskih telomera kod imortaliziranih fibroblasta PD60. Duljina sestrinskih telomera očitana je denzitometrijom fluorescentnog signala nakon hibridizacije s telomernom probom. Nakon normalizacije, vrijednosti manje sestrinske kromatide oduzete su od veće sestrinske kromatide i svrstane su u 11 kategorija po rastućoj vrijednosti razlika.



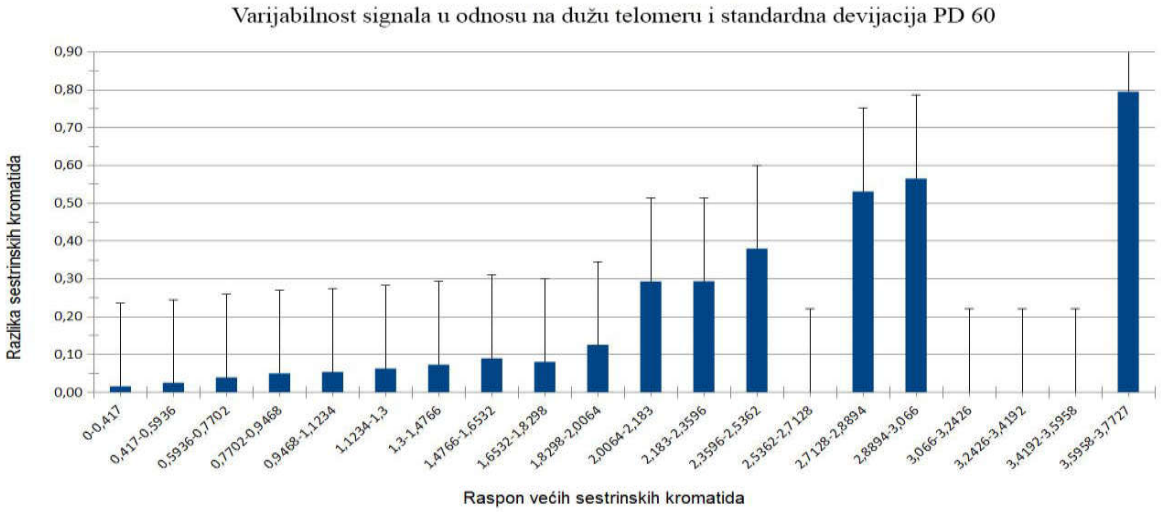
Slika 11. Raspon razlike u duljini sestrinskih telomera kod imortaliziranih fibroblasta PD75. Duljina sestrinskih telomera očitana je denzitometrijom fluorescentnog signala nakon hibridizacije s telomernom probom. Nakon normalizacije, vrijednosti manje sestrinske kromatide oduzete su od veće sestrinske kromatide i svrstane su u 11 kategorija po rastućoj vrijednosti razlika.

3) Varijabilnost signala telomera sestrinskih kromatida

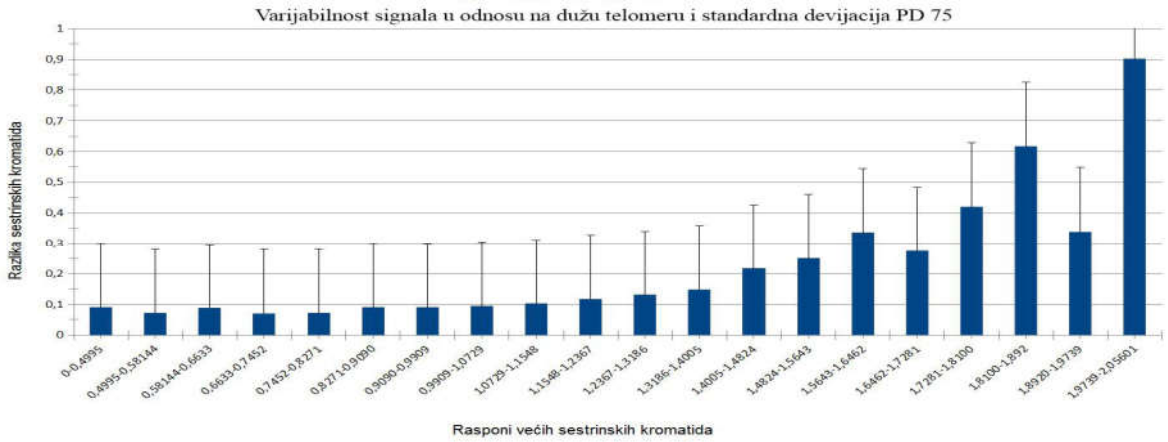
Treći dio analize telomera fibroblasta obuhvatio je prikaz odnosa razlike telomera sestrinskih kromatida i veličine veće sestrinske telomere. Analizirani podaci su poredani po rastućoj vrijednosti. Vidimo da se razlike između sestrinskih telomera povećavaju zajedno s duljinom veće sestrinske telomere, no da standardna devijacija ostaje stalna. Na Slici 12., kod analize fibroblasta PD 45 raste razlika u duljinama među sestrinskim telomera s porastom duljine veće telomere. Standardna devijacija ostaje konzistentna. Na prikazu telomera kod fibroblasta PD 60 (Slika 13.) povećava se razlika u duljini telomera sestrinskih kromatida s porastom duljine veće telomere u paru sestrinskih telomera. Ne postoje vrijednosti koje bi se mogle svrstati u kategorije nekih većih raspona te je to na grafovima 13, 14 i 15 prikazano kao prazna kategorija. Naime, postoje izrazito duge kromatide kojima nedostaje ili je značajno reducirana sestrinska kromatida. Na prikazu analize fibroblasta PD 75 (Slika 14.) također je vidljivo da postoje određene točke koje izrazito odstupaju od prosjeka, tj. da postoje telomere na koje nije djelovala telomeraza. Integralni prikaz na Slici 15. prikazuje varijacije signala svih sestrinskih telomera dajući ravnomjernu rastuću raspodjelu razlika. Uniformnost standardne devijacije i lagani eksponencijalni rast vrijednosti pokazuje konzistentnost ove metode i govori u korist njene reproducibilnosti kroz različita mjerenja.



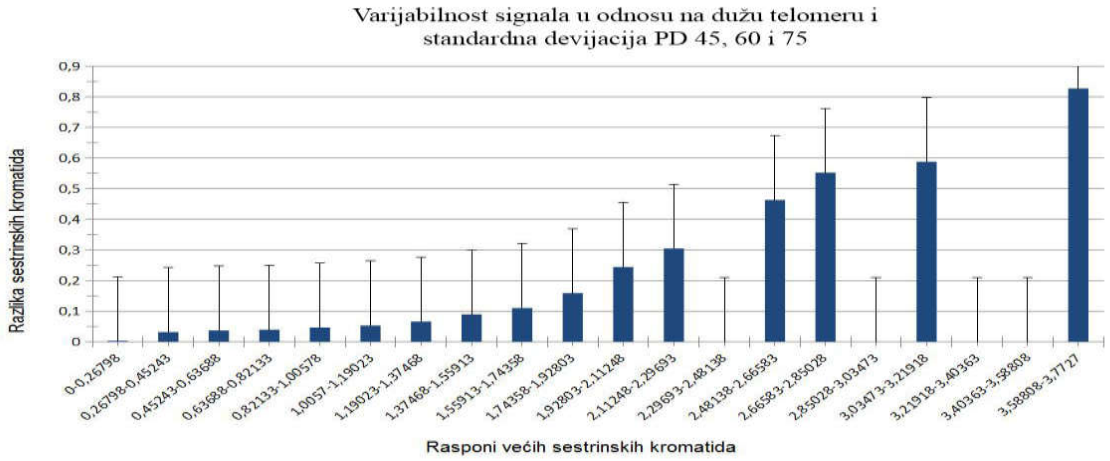
Slika 12. Varijabilnost signala u odnosu na dužu telomeru i standardna devijacija PD45. Vrijednosti intenziteta signala dobivenog hibridizacijom fluorescentne sonde s telomerama veće sestrinske kromatide svrstane su u 20 kategorija po rastućoj vrijednosti i pridružene odgovarajućoj vrijednosti razlika u intenzitetu signala telomera između sestrinskih kromatida.



Slika 13. Varijabilnost signala u odnosu na dužu telomeru i standardna devijacija PD60. Vrijednosti intenziteta signala dobivenog hibridizacijom fluorescentne sonde s telomerama veće sestrinske kromatide svrstane su u 20 kategorija po rastućoj vrijednosti i pridružene odgovarajućoj vrijednosti razlika u intenzitetu signala telomera između sestrinskih kromatida.



Slika 14. Varijabilnost signala u odnosu na dužu telomeru i standardna devijacija PD 75. Vrijednosti intenziteta signala dobivenog hibridizacijom fluorescentne sonde s telomerama veće sestrinske kromatide svrstane su u 20 kategorija po rastućoj vrijednosti i pridružene odgovarajućoj vrijednosti razlika u intenzitetu signala telomera između sestrinskih kromatida.



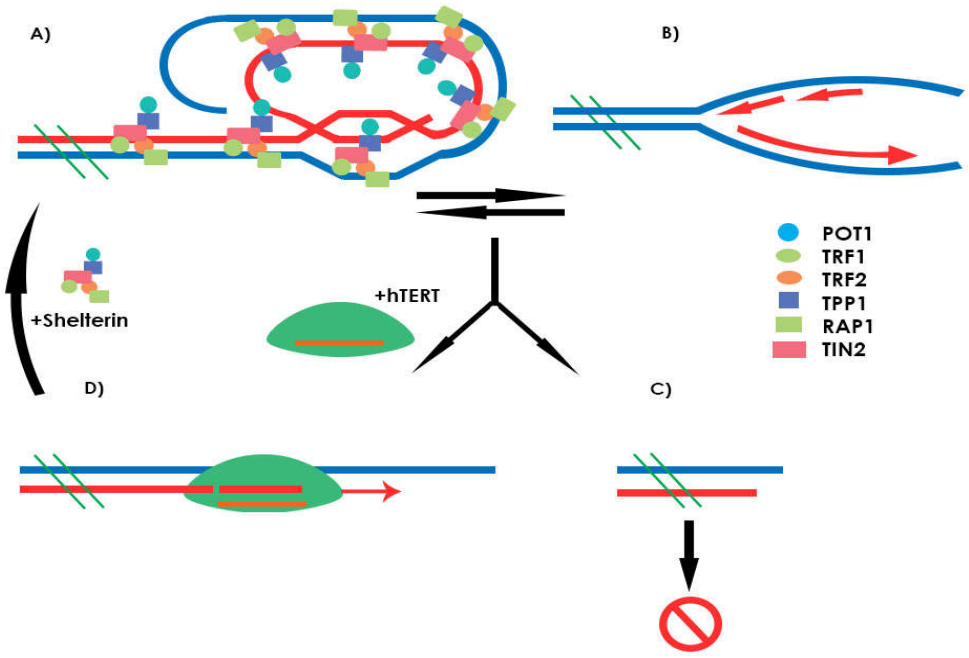
Slika 15. Varijabilnost signala u odnosu na dužu telomeru i standardna devijacija PD45, PD60 i PD75. Vrijednosti intenziteta signala dobivenog hibridizacijom fluorescentne sonde s telomerama veće sestrinske kromatide svrstane su u 20 kategorija po rastućoj vrijednosti i pridružene odgovarajućoj vrijednosti razlika u intenzitetu signala telomera između sestrinskih kromatida.

5. Rasprava

Krajevi kromosoma posjeduju specijaliziranu nukleoproteinsku strukturu koja igra nekoliko ključnih uloga u organizmu eukariota, prvenstveno djelujući kao štitnik, čuvajući nizvodne gene od gubitaka uslijed višestrukih replikacija DNA. Naime, sustav replikacije DNA u stanici nije sposoban posve sintetizirati krajeve linearnih kromosoma, tako da se telomere postupno skraćuju nakon svake diobe. Upravo svojstvo kontroliranog gubitka segmenta tijekom replikacije dovelo je do razvitka hipoteze o djelovanju telomera kao staničnom satu ograničavajući broj dioba. Kad se telomere skrate do kritične duljine dolazi do zaustavljanja staničnog ciklusa i stanica ulazi u senescenciju (Blackburn 2001). Ovi su procesi povezani s konformacijom telomera. One mogu, tijekom staničnog ciklusa, postojati u dvije konformacije: u otvorenoj konformaciji u S-fazi, kad je omogućen pristup replikacijskim enzimima krajevima kromosoma da bi došlo do replikacije DNA, te zatvorenoj konformaciji, u kojoj je telomera zaštićena od djelovanja enzima i drugih vanjskih faktora u ostalim fazama ciklusa. Nakon svakog ciklusa replikacije telomere će se, iz otvorene konformacije, ako je dužina DNA dostatna, saviti u zatvorenu konformaciju T-petlje. Telomera će tako nastaviti ciklus mijenjanja konformacije tijekom staničnih ciklusa sve dok telomerna DNA ne postane prekratka i u stanici ne započne signalna kaskada za ulazak u senescenciju.

Kako proces starenja vodi zaustavljanju stanične proliferacije, stanice koje se kontinuirano dijele, poput matičnih, spolnih i tumorskih stanica, moraju imati mehanizam produžavanja svojih telomera. To omogućava enzim telomeraza u imortalnim stanicama. Duljina telomera u takvim stanicama može značajno varirati ovisno o više faktora, kao što su broj molekula telomeraze, frekvencija interakcija telomeraze i telomera, te broj telomernih ponavljanja dodanih u svakom ciklusu produljenja (Schmidt i Cech 2015). Otvorena konformacija telomere omogućava pristup telomerazi, tako da se telomerna sekvenca DNA, kad dostigne kritičnu duljinu, produljuje i omogućava da poprimi stabilnu konformaciju (Blackburn 2001) (Slika 16.). Iako većina enzima dolazi u kontakt sa svojim supstratom jednostavnim procesom difuzije, molekula telomeraze i njenog supstrata telomera ima relativno malo u stanici. Npr, u humanoj stanici tijekom S-faze ima oko 250 telomeraza i 184 telomera. Stoga postoji mehanizam koji privlači telomerazu telomeri (Xi i Cech 2014). Najveći je afinitet telomeraze

prema najkraćoj telomeri. Za asocijaciju telomeraze s telomerom ključan je protein TPP1, jedan od sastavnih proteina šelterinskog kompleksa (Xin i sur. 2007). Protin TPP1 se sastoji od N-terminalne OB-preklopne domene koja je zadužena za asociaciju telomeraze za telomeru i C-terminalne domene koja veže TIN2 i na taj način povezuje TPP1 s POT1. Analiza mutacija OB-preklopne domene proteina TPP1 pokazalo je da aminokiselinska sekvenca TEL direktno veže telomerazu za telomeru. Također nedavna analiza delecija u sekvenci TEL pokazala je da delecija jedne aminokiseline kod ($TPP1^{k170\Delta}$) je asocirana s pojavom Hoyeraal-Hreidarsson sindroma (Kocak i sur. 2014).



Slika 16. A) Telomere s vezanim šelterinskim kompleksom u konformaciji T-petlje. B) Tijekom staničnih dioba telomera se skraćuje uslijed nesavršene replikacije DNA. C) U somatskim stanicama, nakon određenog broja dioba, dužina DNA postaje prekratka za formaciju T-petlje i dostigne kritičnu duljinu nakon koje stanica ulazi u apoptozu. D) U stanicama shTERT, telomeraza s asociranom početnicom RNA produljuje telomeru procesom reverzne transkripcije vraćajući je na optimalnu duljinu te telomera s šelterinskim kompleksom ponovno poprima konformaciju T-petlje. POT1, TRF1, TRF2, TPP1, RAP1, TIN2: proteini šelterinskog kompleksa, hTERT: telomeraza

U bilo kojoj populaciji stanica određenog tkiva postoji heterogenost u dužini telomerne sekvence. Isto tako, u stanicama u kojima se aktivirala telomeraza i u kojima dolazi do produženja telomera, neće sve telomere biti jednake duljine. Pretpostavka je da ako se produžuju samo telomerne sekvence koje su skraćene do kritične duljine, da će kroz višestruke cikluse produžavanja različite duljine telomera u stanici s vremenom dostići prosječnu optimalnu dužinu, naravno uz manje varijacije ovisne o subtelomernim regijama pojedinih kromosoma (Aubert i Lansdorp 2008). Proces ujednačavanja duljina telomera djelovanjem telomeraze kroz duži vremenski period pokazana je u ovom radu na modelu imortaliziranih fibroblasta. Fibroblasti su bili vrlo pogodan model jer su to stanice s normalnim kontrolnim mehanizmima koji su prethodno prolazili proces skraćivanja telomera te su u jednoj točki svog životnog ciklusa imortalizirani unosom telomeraze, za razliku od tumorskih stanica kod kojih je proces imortalizacije mnogo složenije pratiti. Analiza duljina telomera sestrinskih kromatida fibroblasta koji su od časa imortalizacije prošli 45, 60 i 75 populacijskih dioba pokazuje da kroz veći broj staničnih ciklusa dolazi do ujednačavanja duljine telomera i smanjenja heterogenosti u duljini između telomerama sestrinskih kromatida. Ovi podaci bi ukazivali na veći afinitet telomeraze prema kraćoj telomeri u sestrinskom paru koji bi zatim doveo do njenog produljivanja i s vremenom izjednačavanja s dužom telomerom sestrinske kromatide.

Usporedba duljine duže telomere u paru sestrinskih kromatida i dobivenih razlika u duljini telomera sestrinskih kromatida pokazuje da što su pojedine telomere dulje, to im je razlika prema duljini telomere sestrinske kromatide veća. Analiza pokazuje lagani eksponencijalni porast vrijednosti omjera duljine veće telomere i razlike duljine u odnosu na svoj par. Standardne devijacije izmjerenih vrijednosti u ovoj analizi su ujednačene, bez obzira na izmjereni intenzitet, te tako pokazuju vjerodostojnost i reproducibilnost ove metode.

Složena interakcija svih proteina koji utječu na telomere i utjecaj duljina telomera na razne stanične procese najbolje se mogu proučavati uz pomoć računalne analize velike količine podataka. Danas postoje različite metode kojima se mogu analizirati duljine telomera. Jedna od najstarijih metoda je analiza terminalnih restrikcijskih fragmenata (TRF), kojom se ukupna stanična DNA hibridizira obilježenom telomernom sondom, te se dobiva srednja duljina telomera cijele stanične populacije. Velik broj metoda koje se danas koriste zasniva se na lančanoj reakciji polimerazom, poput kvantitativne reakcije u stvarnom vremenu (qPCR), i metode STELA kojom

se mjere duljine pojedinih kromosoma te mogu detektirati kritično kratke telomere. Metoda qFISH, koja je korištena u ovom radu omogućuje analizu distribucije duljina pojedinih telomera, detekciju poremećaja telomera i njihove fuzije. Velika količina podataka se dobiva i sekvenciranjem cijelog genoma, koja se može analizirati kompjutorski razvitkom softverskih alata kao što "Computel" i "TelSeq" (Nerisisyan 2016). Upoznavanje dinamike telomera i procesa koji reguliraju starenje i besmrtnost omogućit će bolje razumijevanje osnovnih staničnih procesa kao i pridonijeti razumijevanju i liječenju određenih bolesti.

6. Zaključci

Prikupljeni podaci i analize upućuju na sljedeće zaključke:

1- Permanentna aktivnost telomeraze u ljudskim fibroblastima smanjuje heterogenost u duljini telomera tijekom rasta u kulturi.
2- Razlike u signalima sestrinskih telomera su proporcionalne signalima duže telomere iz para.
3- Standardna devijacija razlike signala između sestrinskih telomera pokazuje uniformnost kod imortaliziranih fibroblasta različitog broja populacijskih dioba.

7. Literatura

Aida J., Izumiyama-Shimomura N., Nakamura K., Ishikawa N., Terai M., Matsuda Y., Aida S., Arai T., Takubo K. 2014. Determination of Telomere Length by the Quantitative Fluorescence Hybridization (Q-FISH) Method. *American Journal of Analytical Chemistry*, 5(12), pp.775–783. Dostupno na: http://www.scirp.org/journal/ajac. [Accessed September 10, 2016].

Allsopp R.C., Vaziri H., Patterson C., Goldstein., Younglai E.V., Futcher A.B., Greider C.W., Harley C.B. 1992. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(21), pp.10114–8. Dostupno na: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=50288&tool=pmcentrez&rendertype=abstract. [Accessed August 15, 2016].

Aviv A., Hunt S.C., Lin J., Cao X., Kimura M., Blackburn E. 2011. Impartial comparative analysis of measurement of leukocyte telomere length/DNA content by Southern blots and qPCR. *Nucleic Acids Research*, 39(20). Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21824912. [Accessed September 3, 2016].

Blackburn E.H., Collins K. 2011. Telomerase: An RNP enzyme synthesizes DNA. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(5), pp.1–9. Dostupno na: http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a003558. [Accessed September 8, 2016].

Blackburn E.H., Greider C.W., Szostak J.W., 2006. Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nature Medicine*, 12(10) , pp.1133–1138. Dostupno na: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nm1006-1133. [Accessed September 8, 2016].

Bodnar A.G., Ouellette M., Frolkis M., Holt S.H., Chiu C., Morin G.B., Harley C.B., Shay J.W., Wright W.E., Lichtsteiner S. 1998. Extension of by Introduction of Telomerase Normal Human into. *Science*, 279(5349) pp.349–352., pp.349–352. Dostupno na: http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/279/5349/349 [Accessed September 5, 2016].

Brewer B., Fangman W., 1993. Initiation at closely spaced replication origins in a yeast chromosome. *Science*, 262(5140), pp.1728–1731. Dostupno na: http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.8259517. [Accessed December 10, 2016].

Bryan T.M., Englezou A., Gupta J., Bacchetti S., Reddel R.R. 1995. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *The European Molecular Biology Organization journal*, 14(17), pp.4240–8. Dostupno na: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7556065. [Accessed September 1, 2016].

Celli G.B., Denchi E.L., de Lange T., 2006. Ku70 stimulates fusion of dysfunctional telomeres yet protects chromosome ends from homologous recombination. *Nature cell biology*, 8(8), pp.885–90. Dostupno na: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16845382. [Accessed August 16, 2016].

Cerone M., Londono-Vallejo, J., Bacchetti S. 2001. Telomere maintenance by telomerase and by recombination can coexist in human cells. *Human molecular genetics*, 10(18), pp.1945–52. Dostupno na: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11555631. [Accessed September 1, 2016].

Cesare A.J., Kaul Z., Cohen S.B., Napier C.E., Pickett H.A., Neumann A.A., Reddel R.R. 2009. Spontaneous occurrence of telomeric DNA damage response in the absence of chromosome fusions. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(12), pp.1244–1251. Dostupno na: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19935685. [Accessed September 5, 2016].

Cesare A.J., Griffith J. D., Cesare A.J. 2004. Telomeric DNA in ALT Cells Is Characterized by Free Telomeric Circles and Heterogeneous t-Loops Telomeric DNA in ALT Cells Is Characterized by Free Telomeric Circles and Heterogeneous t-Loops. *Molecular and cellular biology*, 24(22), pp.9948–9957. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC525488/[Accessed September 1, 2016].

Cesare A.J., Reddel R.R., 2010. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nature reviews. Genetics*, 11(5), pp.319–30. Dostupno na: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20351727 [Accessed August 15, 2016].

Chan S.R.W.L., Blackburn E.H. 2004. Telomeres and telomerase. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 359(1441), pp.109–21. Dostupno na: http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/359/1441/109.long [Accessed August 17, 2016].

Chen Q., Ames B.N. 1994. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(10), pp.4130–4134. Dostupno na: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.91.10.4130. [Accessed May 10, 2016].

Collins K., Greider C.W., 1993. Tetrahymena telomerase catalyzes nucleolytic cleavage and nonprocessive elongation. *Genes and Development*, (7) pp.1364–1376. Dostupno na: http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.7.7b.1364. [Accessed July 1, 2016].

Court R., Chapman L., Fairall L., Rhodes D. 2005. How the human telomeric proteins TRF1 and TRF2 recognize telomeric DNA: a view from high-resolution crystal structures. *The European Molecular Biology Organization reports*, 6(1), pp.39–45. Dostupno na: http://embor.embopress.org/cgi/doi/10.1038/sj.embor.7400314 [Accessed September 10, 2016].

d'Adda di Fagagna F., 2008. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nature reviews. Cancer*, 8(7), pp.512–522. Dostupno na: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrc2440. [Accessed July 1, 2016].

d'Adda F.F., Reaper P.M., Clay-Farrace L., Fiegler H, Carr P., Zglinicki T., Saretzki G., Cartert N.P., Jackson S.P. 2003. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*, 426(6963), pp.194–198. Dostupno na: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature02118. [Accessed November 13, 2016].

Ferguson B.M., Fangman W.L. 1992. A position effect on the time of replication origin activation in yeast. *Cell*, 68(2), pp.333–339. Dostupno na: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/009286749290474Q. [Accessed January 8, 2017].

Fujita K., Mondal A.M., Horikawa I., Nguyen G.H., KumamotoK., Sohn j.J., Bowman E.D. 2009. p53 isoforms Delta133p53 and p53beta are endogenous regulators of replicative cellular senescence. *Nature cell biology*, 11(9), pp.1135–42. Dostupno na: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2802853&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accessed September 16, 2016].

Gilson E., Laroche T., Gasser S.M., 1993. Telomeres and the functional architecture of the nucleus. *Trends in Cell Biology*, 3(4), pp.128–134. Dostupno na: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/096289249390175Z. [Accessed November 13, 2016].

Greider C.W., Blackburn E.H. 1989. A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature*, 337(6205), pp.331–337. Dostupno na: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2463488. [Accessed January 26, 2017].

Hayflick L., Moorhead P.S. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25(3), pp.585–621. Dostupno na: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0014482761901926. [Accessed January 26, 2017].

Henson J.D., Cao Y., Huschtscha L.I., Chang A.C., Au A.Y.M., Pickett H., Reddel R.R. 2009. DNA C-circles are specific and quantifiable markers of alternative-lengthening-of-telomeres activity. *Nature biotechnology*, 27(12), pp.1181–1185. Dostupno na: http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1587. [Accessed December 22, 2016].

Jiang, W.Q., Zhong Z., Henson D.J., Neumann A.A., Chang A.C-M., Reddel R.R. 2005. Suppression of alternative lengthening of telomeres by Sp100-mediated sequestration of the MRE11/RAD50/NBS1 complex. *Molecular and cellular biology*, 25(7), pp.2708–21. Dostupno na: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15767676. [Accessed April 22, 2016].

Kocak H., Ballew B.J., Bisht K., Eggebeen R., Hicks B.D., Suman S., O'neil A., Giri N., Maillard I., Alter B.P., Keegan C.E. 2014. Hoyeraal-Hreidarsson syndrome caused by a germline mutation in the TEL patch of the telomere protein TPP1. *Genes and Development*, 28(19), pp.2090–2102. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25233904. [Accessed January 26, 2017].

de Lange T. 2005. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes and Development*, 19(18), pp.2100–2110. Dostupno na: http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1346005. [Accessed November 13, 2016]

Lee J.H., Paull T.T. 2007. Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. *Oncogene*, 26(56), pp.7741–7748. Dostupno na: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18066086%5Cnhttp://www.nature.com/onc/journal/v26/n56/pdf/1210872a.pdf. [Accessed December 22, 2016].

Lee M.S., Blackburn E.H., 1993. Sequence-specific DNA primer effects on telomerase polymerization activity. *Molecular and Cellular Biology*, 13(10), pp.6586–6599. Dostupno na: http://mcb.asm.org/lookup/doi/10.1128/MCB.13.10.6586 [Accessed September 27, 2016].

Levsky J.M. 2003. Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *Journal of Cell Science*, 116(14), pp.2833–2838. Dostupno na: http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.00633. [Accessed July 15, 2016]

Levy M.Z., Allsopp R.C., Futcher A.B., Greider C.W., Harley C.B. 1992. Telomere end-replication problem and cell aging. *Journal of Molecular Biology*, 225(4) pp.951–960. Dostupno na: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022283692900963. [Accessed June 12, 2016]

Lines T.I.C., Tokutake Y., Matsumoto T., Watanabe T., Maeda S., Tahara H., Sakamoto S. 1998. Extra-Chromosomal Telomere Repeat DNA in. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 772(247), pp.765–772. Dostupno na: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9647768. [Accessed June 16, 2016]

Londono-Vallejo J.A., Der-Sarkissian A. H., Lucien cazes L., Bacchetti S., Reddel R.R. 2004. Alternative Lengthening of Telomeres Is Characterized by High Rates of Telomeric Exchange. *Cancer Research*, 64(7), pp.2324–2327. Dostupno na: http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-03-4035. [Accessed December 22, 2016].

Maldarelli C., Rakesh K.J, Ivanov I.B., Ruckenstein E. 1980. Stability of symmetric and unsymmetric thin liquid films to short and long wavelength perturbations. *Journal of Colloid and Interface Science*, 78(1), pp.118–143. Dostupno na: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16290341%5Cn. [Accessed December 28, 2016].

Mateo E., Briones C., Pradier C.M., Martin J.A. 2007. A DNA biosensor based on peptide nucleic acids on gold surfaces. *Biosensors and Bioelectronics*, 22. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16996729. [Accessed January 28, 2017].

Masutomi K., Yu E.Y., Khurts S., Ben-Porath Ittai., Currier J.L., Metz G.B., Brooks M.W. 2003. Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell*, 114(2), pp.241–253. Dostupno na: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867403005506. [Accessed July 18, 2016]

Muntoni A., Neumann A.A., Hills M., Reddel R.R. 2009. Telomere elongation involves intra-molecular DNA replication in cells utilizing alternative lengthening of telomeres. *Human Molecular Genetics*, 18(6) pp.1017–1027. Dostupno na: http://www.hmg.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/hmg/ddn436. [Accessed January 6, 2017].

Muntoni A. 2005. The first molecular details of ALT in human tumor cells. *Human Molecular Genetics*, 14(suppl_2), pp.1017–1027. Dostupno na: http://www.hmg.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/hmg/ddi266.[Accessed January 8, 2017]

Murnane J.P., Sabatier L., Marder B. A., Morgan W.F. 1994. Telomere dynamics in an immortal human cell line. *The EMBO journal*, 13(20), pp.4953–62. Dostupno na: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7957062 [Accessed September 14, 2016].

Nabetani A., Ishikawa F. 2009. Unusual telomeric DNAs in human telomerase-negative immortalized cells. *Molecular and cellular biology*, 29(3), pp.703–13. Dostupno na: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19015236. [Accessed February 1, 2017]

Ohtani N. K. Yamakoshi A. Takahashi E.H. 2004. The p16INK4a-RB pathway : molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *The Journal of Medical Investigation*, Vol. 51 (2(3,4). Dostupno na: http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jmi/51.146?from=CrossRef [Accessed September 27, 2016].

Olovnikov A.M. 1973. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *Journal of Theoretical Biology*, 41(1) pp.181–190. Dostupno na: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022519373901987. [Accessed September 20, 2016].

Palm W., Hockemeyer D., Kibe T., de Lange T. 2009. Functional dissection of human and mouse POT1 proteins. *Molecular and cellular biology*, 29(2), pp.471–82. Dostupno na: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18955498. [Accessed January 15, 2017].

Perrem, K. et al., 2001. Coexistence of alternative lengthening of telomeres and telomerase in hTERT-transfected GM847 cells. *Molecular and cellular biology*, 21(12), pp.3862–75. Dostupno na: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11359895. [Accessed January 8, 2017].

Perrem K., Bryan T.M., Englezou A., Hackl T., Moy E. R., Reddel R.R. 1999. Repression of an alternative mechanism for lengthening of telomeres in somatic cell hybrids. *Oncogene*, 18(22), pp.3383–90. Dostupno na: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10362359 [Accessed September 15, 2016].

Rodier F., Coppe J., Patil C.K., Hoeijmakers W.M., Munoz D.O., Raza S.R., Freund A., Campeau E., Davalos A.R., Campisi J. 2009. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nature cell biology*, 11(8), pp.973–9. Dostupno na: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2743561&tool=pmcentrez&rendertype=abstract. [Accessed August 13, 2016].

Rubelj I. 2014. Telomere Q-PNA-FISH--reliable results from stochastic signals. *PloS one*, 9(3), p.e92559. Dostupno na: http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0092559. [Accessed January 5, 2016].

Salas M., Miller J.T., Leis J., DePamphilis M.L. 1996. Mechanisms for priming DNA synthesis. In *DNA Replication in Eukaryofic Cells*. pp. 131–176. Dostupno na: http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=JWPOFyYMeoYC&oi=fnd&pg=PA131&dq=Mechanisms+for+Priming+DNA+Synthesis&ots=TnIZZ6YN3c&sig=Hl6XvoUN0F0zbZyX4PX1-zuWfHE [Accessed September 4, 2016].

Schmidt J.C., Cech T.R. 2015. Human telomerase : biogenesis , trafficking , recruitment , and activation. *Genes & Development*, 11(29), pp.1095–1105.. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4470279/[Accessed September 8, 2016].

Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), pp.671–675. Dostupno na: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nmeth.2089 [Accessed September 20, 2016].

Shay J.W., Pereira-Smith O.M., Wright W.E. 1991. A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Experimental Cell Research*, 196(1), pp.33–39. Dostupno na: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0014482791904532. [Accessed September 26, 2016].

Shay J.W., Wright W.E. 2005. Senescence and immortalization: Role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis*, 26(5), pp.867–874. Dostupno na: http://www.carcin.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/carcin/bgh296. [Accessed October 16, 2016].

Shelton D.N., de Lange T., Griffith J.D. 1999. Microarray analysis of replicative senescence. *Current Biology*, 9(17), pp.939–945. Dostupno na: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982299804205. [Accessed September 24, 2016].

Stansel R.M., Lange T. D., Grif, J.D. 2001. T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *The EMBO journal*, 20(19). Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC125642/. [Accessed October 1, 2016].

Varley H., PicKett H.A., Foxon J:L., Reddel R.R., Royle N.J. 2002. Molecular characterization of inter-telomere and intra-telomere mutations in human ALT cells. *Nature Genetics*, 30(3), pp.301–305. Dostupno na: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11919561. [Accessed March 10, 2016].

Vaziri H., Benchimol S. 1998. Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Current Biology*, 8(5), pp.279–282. Dostupno na: http://biomednet.com/elecref/0960982200800279 [Accessed August 10, 2016].

Ventura A., Kirsch D.G., McLaughlin M.E., Tuveson D., Grimm J., Lintault L., Newman J., Reczek E.E., Weissleder R., Jacks T. 2007. Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature*, 445(7128), pp.661–665. Dostupno na: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature05541. [Accessed January 8, 2017].

Wang R.C., Smogorzewska A., De Lange T. 2004. Homologous recombination generates t-loop-sized deletions at human telomeres. *Cell*, 119(3), pp.355–368. Dostupno na: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867404009924. [Accessed October 5, 2016].

Xi L., Cech T.R., 2014. Inventory of telomerase components in human cells reveals multiple subpopulations of hTR and hTERT. *Nucleic Acids Research*, 42(13), pp.8565–8577. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24990373 [Accessed August 10, 2016].

Xin H., Liu D., Wan M., Safari A., Kim H., Sun W., O'Connor m., Songyang Z. 2007. TPP1 is a homologue of ciliate TEBP- b and interacts with POT1 to recruit telomerase. *Nature*, 445, pp.559–562. Dostupno na: http://www.nature.com/nature/journal/v445/n7127/full/nature05469.html. [Accessed January 8, 2017].

Ye J.Z.-S., 2004. POT1-interacting protein PIP1: a telomere length regulator that recruits POT1 to the TIN2/TRF1 complex. *Genes and Development*, 18(14), pp.1649–1654. Dostupno na: http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1215404. [Accessed July 15, 2016].

Zhong Z.H., Jiang W.Q., Cesare A.J., Neumann A.A., Wadhwa R., Reddel R.R. 2007. Disruption of telomere maintenance by depletion of the MRE11/RAD50/NBS1 complex in cells that use alternative lengthening of telomeres. *Journal of Biological Chemistry*, 282(40), pp.29314–29322. Dostupno na: http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M701413200. [Accessed August 15, 2016].

8. Prilozi

Exel Tablice PD45, PD60 i PD75 su zbog svoje veličine priložene na DVD-u uz diplomski rad.

9. Životopis

Rođen sam 12.08.1991. u Zagrebu i već od ranog djetinjstva pokazao sam interes za biologiju. Otkad sam prvi put s djedom posjetio zoološki vrt postao sam fasciniran sa svim što sam vidio i od tog dana imao sam veliku potrebu vratiti se tamo nekoliko puta mjesečno, što je moj strpljivi djed entuzijastično podržavao. S pet godina sam se preselio u Pulu, gdje sam ubrzo krenuo u osnovnu školu. Kroz moje odrastanje nastavila se moja fascinacija živim svijetom. Moja obitelj se uvijek mogla pohvaliti mojim uspjesima u školi i mojom pozamašnom kolekcijom školjki koju sam im priuštio. Također sam bio izviđač, što mi je omogućilo da često odlazim u prirodu i zadovoljim svoju znatiželju. Nakon završetka osnovne škole upisao sam Prirodoslovno matematičku gimnaziju u Puli. Tijekom srednjoškolskog obrazovanja imao sam više područja interesa iz kojih sam često išao na natjecanja, pa mi nije bilo lako odlučiti se koji fakultet pohađati, naime zanimali su me fizika, povijest, pravo i medicina. Na kraju prevladala je moja prva ljubav i strast biologija, upisao sam Prirodoslovno- matematički fakultet u Zagrebu i vratio se u svoj rodni grad. Završio sam preddiplomski studij biologije 2013. godine, tijekom obrazovanja moji interes se usredotočio na područje molekularne biologije čiji sam diplomski studij upisao te iste godine. Tijekom diplomskog studija sudjelovao sam u manifestaciji „Noć biologije“ te sam bio među ostalim aktivan član studentske organizacije AIESEC u kojoj sam imao priliku upoznati mnogo različitih ljudi i naučiti osnove organizacije i poduzetništva.