

Utjecaj inhibicije mitohondrijskog kompleksa I na vijabilnost normalnih ljudskih fibroblasta

Božo, Jasmin

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:217:372221>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Jasmin Božo

Utjecaj inhibicije mitohondrijskog kompleksa I na
vijabilnost normalnih ljudskih fibroblasta

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za molekularnu i staničnu biologiju, Institut „Ruđer Bošković“, pod vodstvom dr. sc. Ivice Rubelja, predan je na ocjenu Biološkom odjseku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar molekularne biologije.

ZAHVALE

Veliku zahvalnost dugujem mentoru dr. sc. Ivici Rubelju, višem znanstvenom suradniku, na njegovom vodstvu, korisnim savjetima i pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Nadalje, želim se zahvaliti izv. prof. dr. sc. Maji Matulić za pomoć i sudjelovanje u izradi ovog rada kao su-voditeljica.

Veliko hvala Sandi i Luciji na svu pomoć, strpljenje, prijateljski pristup i korisnim savjetima.

Želio bih zahvaliti svim prijateljima koji su uvijek bili uz mene i uljepšali mi razdoblje studiranja, čineći ga vrlo zabavnim i nezaboravnim.

Najveću zahvalnost za svoja postignuća pripisujem svojim roditeljima i sestri na njihovoj bezuvjetnoj podršci, strpljenju, razumijevanju i ljubavi.

Ovaj diplomski rad posvećujem svojim zvijezdama vodiljama, Juliju i Marku.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Utjecaj inhibicije mitohondrijskog kompleksa I na vijabilnost normalnih ljudskih fibroblasta

Jasmin Božo
Roosveltov trg 6, 10000 Zagreb

Jedno od osnovnih svojstava stanica viših sisavaca je ograničeni broj dioba i sposobnost stanica da uđu u starenje ili senescenciju. Dva glavna mehanizma koja diktiraju stanično starenje su skraćivanje telomera i oštećenje staničnih struktura reaktivnim kisikovim vrstama. Dokazano je da su ova dva mehanizma u međusobnoj interakciji. To se najbolje vidi iz eksperimenta u kojemu, ovisno o parcijalnom tlaku kisika, stanice postignu veći ili manji broj dioba, te im se telomere sporije ili brže skraćuju. Cilj ovog istraživanja bio je razlučiti je li za produžetak staničnih dioba i usporavanje skraćivanja telomera u uvjetima smanjenog parcijalnog tlaka kisika odgovoran smanjeni rad mitohondrija ili je za takav efekt odgovorno djelovanje samog molekularnog kisika. U uvjetima normoksije u staničnoj liniji normalnih ženskih fibroblasta inhibiran je rad mitohondrija pomoću spoja rotenona koji suprimira kompleks I mitohondrijskog oksidativnog sustava. Praćen je rast staničnih kultura pod utjecajem rastućih koncentracija rotenona te kakav utjecaj rotenon ima na stanično starenje. Kao indikator starenja praćena je reakcija beta galaktozidaze povezane sa starenjem (SA- β -Gal). Također praćena je dinamika skraćivanja telomera metodom Southern blot. Nadalje, za praćenje mase mitohondrija korištena je metoda protočne citometrije, a za vizualizaciju mitohondrija fluoroscencijska mikroskopija. Rezultati istraživanja pokazali su promjenu rada mitohondrija ovisno o koncentraciji rotenona pri čemu niže koncentracije stimuliraju, a više inhibiraju mitohondrije. Također, stanice rastu brže odnosno sporije uz niže ili više koncentracije rotenona, pri čemu se povećava aktivnost SA- β -Gal. Niže koncentracije uzrokuju povećanje mase mitohondrija uz ubrzano skraćivanje telomera u odnosu na kontrolne stanice.

(67 stranica, 20 slika, 11 tablica, 89 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: rotenon, kompleks I, reaktivne kisikove vrste, SA- β -gal, masa mitohondrija, telomere

Voditelj: Dr. sc. Ivica Rubelj, viši znanstveni suradnik

Suvoditelj: Dr. sc. Maja Matulić, izv. prof.

Ocjenitelji: Dr. sc. Maja Matulić, izv. prof.

Dr. sc. Martina Šeruga Musić, doc.

Dr. sc. Nada Oršolić, prof.

Dr. sc. Antun Alegro, izv. prof.

Rad prihvaćen: 1. 9. 2016.

University of Zagreb
Faculty of science
Division of Biology

Graduation Thesis

Effects of mitochondrial complex I inhibition on the viability of normal human fibroblasts

Jasmin Božo
Roosveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

One of the basic characteristics of cells in higher mammals is limited cell division and the ability to enter cellular senescence. Two main mechanisms contribute to cellular senescence, telomere shortening and damaging effects of free radicals. These two mechanisms are in mutual interaction. These data were clearly demonstrated in the experiment in which cell growth and senescence, as well as telomere shortening, showed to be dependent on oxygen partial pressure. The purpose of this research was to determine whether the dynamics of cell growth and the telomere shortening depend on the changes in mitochondrial metabolism or on the action of oxygen itself, under the condition of changed partial pressure of oxygen. Accordingly, we inhibited mitochondrial oxidative system in normal human fibroblasts using rotenone, a complex I inhibitor. We monitored cell growth and senescence under increasing concentrations of rotenone. Cellular senescence was followed by SA- β -Gal reaction and telomere shortening by Southern blot analysis. Mitochondrial mass was measured by flow cytometry and fluorescence microscopy. The results showed changes in mitochondrial metabolism in dependence of rotenon concentrations, as well as changes in cell growth, SA- β -Gal index and telomere shortening dynamics.

(67 pages, 20 figures, 11 tables, 89 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library

Key words: rotenone, complex I, reactive oxygen species, SA- β -Gal, mitochondrial mass, telomeres

Supervisors: Dr. Ivica Rubelj, Senior Research Associate and Dr. Maja Matulić, Associate Prof.

Reviewers: Dr. Maja Matulić, Assoc. Prof.
Dr. Martina Šeruga Musić, Asst. Prof.
Dr. Nada Oršolić, Prof.
Dr. Antun Alegro, Associate Prof.

Thesis accepted: 1 September 2016

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Oksidativni stres	2
1.2. Rad mitohondrija	3
1.2.1. Kompleks I.....	5
1.3. Rotenon.....	7
1.4. Dinamika rasta stanica u kulturi	8
1.5. Struktura i funkcija telomera	9
1.5.1. Skraćivanje telomera.....	11
1.5.2. Održavanje telomera	13
1.6. Stare stanice i putevi koje vode starenju	15
1.7. Aktivnost SA- β -Gal.....	16
1.8. Fluorescentna boja NAO	17
1.9. Princip rada protočnog citometra	18
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	20
3. MATERIJALI I METODE	22
3.1. Kultura stanica.....	23
3.1.1. Uzgoj i rasađivanje stanica	24
3.2. Optimizacija koncentracije rotenona	24
3.2.1. Tretiranje stanica rotenonom	25
3.3. Aktivnost SA- β -Gal.....	25
3.4. Vizualizacija mitohondrija fluorescentnim mikroskopom	26
3.5. Analiza stanica na protočnom citometru	26
3.6. Određivanje duljine telomera	27
3.6.1. Izolacija genomske DNA	27
3.6.2. Provjera kvalitete DNA gel elektroforezom	27
3.6.3. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije DNA.....	28
3.6.4. Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima i elektroforeza u agaroznom gelu	28
3.6.5. Koncentriranje DNA	29
3.6.6. Hibridizacija po Southernu	29
4. REZULTATI.....	33
4.1. Osjetljivost normalnih ljudskih fibroblasta na rotenon	34
4.2. Dinamika rasta i senescencije fibroblasta u kulturi u prisutnosti rotenona	36
4.3. Ponašanje mitohondrija	39
4.3.1. Dvostruko bojanje i vizualizacija mitohondrija.....	39
4.3.2. Kvantitativni prikaz mitohondrija u stanicima	41
4.4. Dinamika skraćivanja telomera	45
5. RASPRAVA.....	48
6. ZAKLJUČCI	54
7. LITERATURA	56
8. ŽIVOTOPIS	64

POPIS KRATICA I SIMBOLA

- ALT – alternativno produživanje telomera (od engl. *alternative lengthening of telomeres*)
- BER – popravak izrezivanjem baze (engl. *base excision repair*)
- dH₂O – destilirana voda
- DIG – dioksin
- DMEM – Doubeccov modificirani Eagle-ov medij (engl. *Doubecco's Modified Eagle's Medium*)
- DMSO – dimetil-sulfoksid
- D-petlja – (D – od engl. *displacement*)
- DSB – popravak dvolančanih lomova (engl. *double-strand break repair*)
- E2F-1 – transkripcijski faktor
- EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina
- FACS – fluorescentni razvrstavač stanica (engl. *Fluorescence Activated Cell Sorter*)
- FCS – fetalni teleći serum (engl. *fetal calf serum*)
- FAD – flavin adenin dinukleotid (engl. *flavine adenine dinucleotide*)
- FADH₂ – reducirani oblik flavin adenin dinukleotida
- FMN – flavin mononukleotid (engl. *flavine mononucleotide*)
- FSC – svjetlost raspršena u smjeru laserke zrake (engl. *forward-scattered light*)
- G₁-faza – dijelovi staničnog ciklusa kada nema sinteze DNA (G engl. *gap*)
- HIF – hipoksija inducibilni faktor (engl. *hypoxia inducible factor*)
- hTER – ljudska telomerazna RNA (od engl. *human telomerase RNA*)
- hTERT – ljudska telomerazna reverzna transkriptaza (od engl. *human telomerase reverse*)
- Ku – protein DNA popravka i rekombinacije
- MMR – popravak krivo sparenih baza (engl. *mismatch repair*)
- Mre11 – protein DNA popravka i rekombinacije
- mtDNA – mitohondrijska DNA
- NAO – nonil akridin oranž (engl. *nonyl acridine orange*)
- NAD – nikotinamid adenin dinukleotid (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide*)
- NAD⁺ – oksidirani nikotinamid adenin dinukleotid
- NADH – reducirani nikotinamid adenin dinukleotid
- NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)
- NER – popravak izrezivanjem nukleotida (engl. *nucleotide excision repair*)

p16, p53, p21 – tumor supresor proteini (p = protein)

PBS – fosfatni pufer (engl. *phosphate buffered saline*)

PD – (engl. *population doublings*)

PMT – fotomultiplicirajuće cijevi (od engl. *photomultiplying tubes*)

POT1 – protein koji štiti telomere 1 (od engl. *protection of telomeres 1*)

rRNA – ribosomska ribonukleinska kiselina (engl. *ribosomal ribonucleic aci*)

Rad50 – protein DNA popravka i rekombinacije

Raf – serin/treonin kinaza

Ras – monomerni GTP-vežući protein

ROS – reaktivne kisikove jedinke (engl. *reactive oxygen species*)

pRb – tumor supresor protein (od engl. *retinoblastoma*)

Pen/Strep – Penicilin/Streptomicin

RNaza – ribonukleaza

SA- β -Gal – β galaktozidaza povezana sa starenjem (engl. *senescence associated β galactosidase*)

TAE pufer – Tris-acetat-EDTA pufer

TP1 – telomerazni protein 1 (od engl. *telomerase protein 1*)

T-petlja – telomerna petlja

TRF – krajnji restrikcijski fragment (od engl. *terminal restriction fragment*)

TRF1 – faktor koji veže ponavljajuću sekvencu TTAGGG, broj 1 (od engl. *TTAGGG repeat binding factor 1*)

TRF2 – faktor koji veže ponavljajuću sekvencu TTAGGG, broj 2 (od engl. *TTAGGG*)

SDS – natrijev dodecil sulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*)

SOD – superoksid dizmutaza (engl. *superoxide dismutase*)

SSC – svjetlost odbijena pod pravim kutom od smjera laserske zrake (engl. *side scattered light*)

Tris – hidroksimetilaminometan, pKa 7.7

Tween20 – polisorbat 20-surfraktant

X-Gal – 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -galaktozid

1. UVOD

1.1. Oksidativni stres

Reaktivne kisikove vrste (ROS) uključene su u regulaciju mnogih fizioloških procesa. Umjerena razina reaktivnih kisikovih vrsta ključna je za normalnu funkciju stanica. Međutim, s povišenjem ROS-ova iznad razine koja omogućava normalnu staničnu homeostazu dolazi do oštećenja bioloških molekula (proteina, fosfolipida, nukleinskih kiselina) i eventualno do stanične smrti. Mitohondriji su jedni od glavnih izvora ROS-ova u stanici te ih produciraju i u normalnim uvjetima. Kisikove vrste nisu nužno štetne za stanicu i mogu sudjelovati u signalnim i regulacijskim putevima. Za vrijeme različitih staničnih stresova kao što je hipoksija, reoksigenacija ili tretman toksičnim tvarima, ROS-ovi se proizvode u suvišku i brzo se otpuštaju u citoplazmu u kojoj imaju štetan učinak koji vodi do oksidativnog stresa i staničnog oštećenja (Kuznetsov i sur., 2011).

Proizvodnja superoksidnih radikala u mitohondrijima primarno se odvija na dva mjesta u elektronskom transportnom lancu. To su kompleks I i kompleks III koji se smatra glavnim mjestom proizvodnje ROS-ova (Turrens, 1997). Najranjivije mjesto u tom sustavu je stvaranje slobodnih radikala semikinonskih anionskih jedinica ($\cdot Q^-$) koje sudjeluju kao posrednik u regeneraciji koenzima Q. Jednom stvorena, semikinonska anionska jedinica prenosi elektrone molekularnom kisiku te kao nusprodukt stvara superoksidne radikale (Golubev, 1996).

S obzirom da mitohondriji proizvode najviše energije u stanici te samim time troše glavnu intracelularnu količinu kisika, potvrđuje se Hermanova hipoteza povezanosti starenja i slobodnih radikala: što je veća razina metabolizma organizma, veća je proizvodnja ROS-ova te je stoga kraći životni vijek organizma (Finkel i Holbrook, 2000). Kod nekih vrsta kao što su ptice i primati koji žive duže nego im to predviđa njihova razina metabolizma, proizvodnja ROS-ova je manja, što ukazuje da je proizvodnja ROS glavna poveznica s dugovječnosti (Ku i sur., 1993).

ROS obuhvaćaju različite kemijske jedinice uključujući superoksidne anione, hidroksilne radikale i vodikov peroksid. Neke od njih, kao što su superoksid i hidroksilni radikali jako su nestabilni, dok je primjerice vodikov peroksid relativno dugovječan. Takvi slobodni radikali mogu biti stvarani egzogeno ili intracelularno iz velikog broja različitih izvora (Nemoto i sur., 2000). Citosolni enzimski sustavi doprinose oksidativnom stresu, među kojima je i obitelj NADPH oksidaza koje stvaraju superoksidne anione. S obzirom na

ekspresiju specifične NADPH oksidaze može doći do stanične transformacije ili replikativnog starenja (Suh i sur., 1999; Geiszt i sur., 2000).

Proizvodnji ROS suprotstavlja se vrlo kompleksan sustav obrane antioksidansa koji uključuju superoksid dismutazu (SOD), katalazu i glutation peroksidazu. SOD ubrzava pretvorbu superoksida u vodikov peroksid, dok katalaza i glutation peroksidaza pretvaraju vodikov peroksid u molekularni kisik i vodu. Razne ne-enzimatske molekule niske molekularne mase također su važne za prepoznavanje i neutralizaciju ROS-ova u koje se ubrajaju askorbat, piruvat, flavonoidi, karotenoidi, te vjerojatno najvažniji glutation, prisutan u stanici u milimolarnoj koncentraciji (Chae i sur., 1999).

Ravnoteža između proizvodnje ROS i obrane antioksidansima određuje stupanj oksidativnog stresa. Posljedice stresa uključuju modifikacije staničnih proteina, lipida i DNA. Najznačajnija od njih je modifikacija proteina i stvaranje karbonilnih derivata (Stadtman, 1992). Iako sve organske molekule i proteini mogu biti modificirani oksidativnim stresom, određena tkiva i specifične proteinske mete mogu biti posebno osjetljivi (Yan i sur., 1997; Goto i sur., 1999). Zbog svoje blizine glavnom izvoru stvaranja ROS i zbog svojeg ograničenog sustava DNA popravka, mitohondrijska DNA je osjetljivija na oksidativno oštećenje od jezgrine DNA (Esposito i sur., 1999).

1.2. Rad mitohondrija

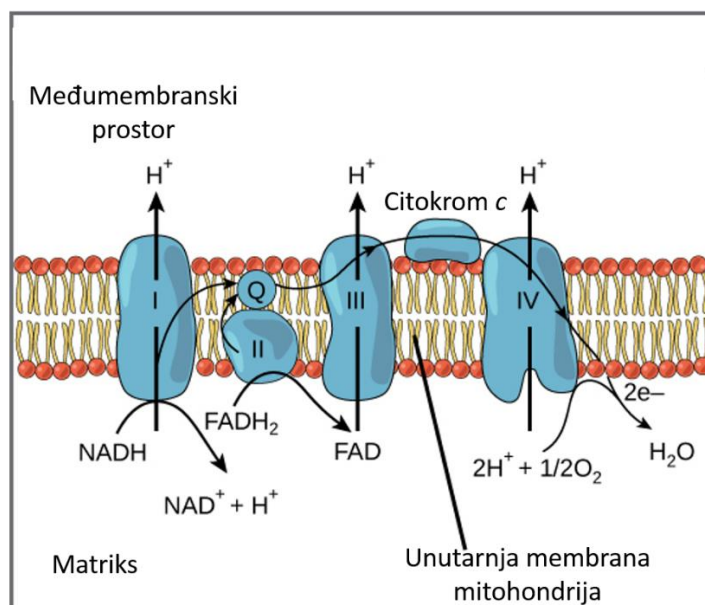
Osnovna razlika između prokariota i eukariota je eukariotski genom unutar membranozne jezgrine ovojnice s porama te postojanje mitohondrija (Andersson i Kurland, 1999). Mitohondrij je organel obavijen s dvije membrane. Unutrašnja membrana obavija matriks, a između membrana je prisutan međumembranski prostor. Nabori unutarnje membrane nazivaju se kriste i služe povećanju površine. Dinamično ponašanje mitohondrija u stanici rezultat je složene interakcije proteina vanjske membrane mitohondrija i citoskeleta koji uključuje filamente, mikrotubule i intermedijarne filamente (Scheffler, 2001).

Mitohondriji sadrže vlastitu DNA koja je neovisna od jezgrine DNA te se može samostalno replicirati. Većina životinja ima malu mtDNA od oko 16.5 kb, dok najveću imaju biljke od oko 350 kb (Boore, 1999). Mitohondrijski genom uglavnom kodira mali broj proteina elektronskog transportnog lanca za kompleks I, III i IV te za sintezu ATPa u

kompleksu V. MtDNA kodira 37 gena u koje spadaju 13 esencijalnih polipeptida za oksidativnu fosforilaciju, 22 tRNA i dvije rRNA koji su važni za sintezu proteina unutar mitohondrija (Krishnan i sur., 2007). Postoji oko 1000 proteina koji sudjeluju u različitim biokemijskim putevima mitohondrija, a kodirani su genomom jezgre i uneseni su iz citosola: sintetiziraju se na slobodnim ribosomima u citosolu te se usmjeravaju specifičnim signalima za navođenje (Gabriel i sur., 2001).

Mitohondriji imaju važnu ulogu u proizvodnji metaboličke energije kod eukariota. Najveći dio uporabljive energije, dobivene razgradnjom ugljikohidrata i masnih kiselina, pretvara se u ATP u procesu oksidativne fosforilacije koji se zbiva na unutarnjoj membrani mitohondrija. U citosolu procesom glikolize dolazi do pretvorbe glukoze u piruvat, a u mitohondriju se njegovom kompletnom oksidacijom do CO₂ proizvodi većina korisne energije. Tijekom procesa glikolize i ciklusa limunske kiseline nastaje ukupno četiri molekule ATP, deset molekula NADH i dvije molekule FADH₂. U ovom procesu dolazi do oksidacije piruvata u koenzim A (CoA) koji se preko ciklusa limunske kiseline razgrađuje do CO₂. Sama oksidacija piruvata povezana je s redukcijom NAD⁺ i FAD u NADH i FADH₂. Elektroni iz NADH i FADH₂ prenose se na molekularni kisik i u tom procesu nastaje 32 do 34 molekula ATP. Za sintezu ATP iz ADP na unutrašnjoj membrani koristi se energija pohranjena u gradijentu protona kroz membranu dobivena reakcijama prijenosa elektrona s NADH i FADH₂ (Hatefi, 1985).

Energija se oslobađa kroz stupnjeviti prijelaz elektrona od NADH do molekularnog kisika preko serije nosača koji čine transportni lanac elektrona (Slika 1). Ti nosači organizirani su u četiri kompleksa na unutarnjoj membrani mitohondrija. Za povezivanje energijom bogate reakcije transporta elektrona i sinteze ATP služi peti kompleks proteina. U kompleksu I elektroni s NADH ulaze u transportni lanac elektrona. Tamo se prenose s NADH na flavin-mononukleoid, preko željezo-sumpornog kompleksa na koenzim Q (ubikinon) s popratnim oslobađanjem energije. Ubikinon zatim prenosi elektrone s kompleksa I na kompleks III koji se sastoji od deset polipeptida gdje se elektroni prenose s citokoma *b* na citokrom *c* također s popratnim oslobađanjem energije. Citokrom *c* prenosi elektrone s kompleksa III na kompleks IV (citokrom-oksidazu) gdje na kraju prelaze na molekularni kisik (Mitchell, 1979).



Slika 1. Shematski prikaz transportnog lanca elektrona. Transportni lanac elektrona koristi elektrone elektronskih nosača za stvaranje kemijskog gradijenta koji se koristi za oksidativnu fosforilaciju. (preuzeto i prilagođeni sa:

<https://www.boundless.com/biology/textbooks/boundless-biology-textbook/cellular-respiration-7/oxidative-phosphorylation-76/electron-transport-chain-362-11588/>)

Slobodna energija dobivena prolaskom elektrona kroz kompleks I, II i IV koristi se za sintezu ATP. Kompleks II prima elektrone sa sukcinata, međuprodukta ciklusa limunske kiseline, te se ovi elektroni prenose na FADH_2 , a zatim na ubikinon. S ubikinonana se dalje prenose na kompleks III te potom na kompleks IV (Rastogi i Girvin, 1999). Prijenos elektrona s FADH_2 nije povezan sa značajnim sniženjem slobodne energije pa tako ni sa sintezom ATP (Cooper i Hausman, 2004). Zbog svoje blizine procesu oksidativne fosforilacije, mtDNA je izrazito podložna oštećenjima uzrokovanim s ROS. Iako se mitohondriji mogu oduprijeti stvaranju ROS sa svojom antioksidansnom obranom, neki ROS-ovi ipak mogu nanijeti štetu (Krishnan i sur., 2007).

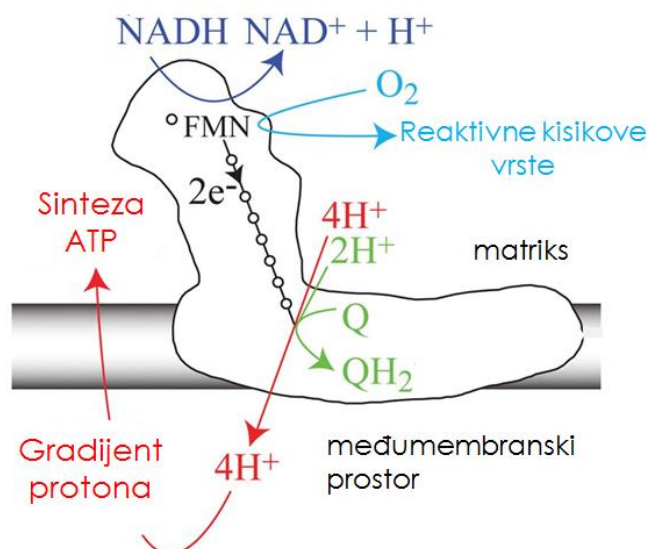
1.2.1. Kompleks I

Kompleks I je veliki enzimatski sustav s enzimom NADH dehidrogenazom. Sastoji od proteina smještenih na unutarnjoj membrani mitohondrija te je neobičnog L-oblika s jednim dijelom u unutarnjoj membrani, a drugom u matriksu. Oblik je konzerviran kod svih vrsta, a sama kompozicija proteina enzima kod eukariota i prokariota je značajno različita. Zajedničko

svim kompleksima I su 14 osnovnih podjedinica koje se dijele na dvije grupe. To su sedam hidrofilnih podjedinica kodiranih u jezgri te sedam hidrofobnih podjedinica koje su kod eukariota kodirane mitohondrijskim genomom. Kod sisavaca se kompleks I sastoji od 45-47 proteinskih podjedinica (kod čovjeka 45) od kojih su 7 kodirani mitohondrijskim genomom (ND1-ND6, ND4L), dok je ostatak kodiran jezgrinim genomom (Greenamyre i sur., 2001).

Početak reakcije u elektronskom lancu započinje vezanjem NADH molekule za kompleks I i doniranjem dva elektrona. Dva elektrona ulaze u kompleks I putem prostetičke grupe smještene u kompleksu I, flavin mononukleotida (FMN). Zbog toga dolazi do redukcije FMN u FMNH₂ te se elektroni zatim prenose serijom željezo-sumpornih kompleksa, druge prostetičke grupe smještene u kompleksu I. Tijekom prolaska elektrona, četiri protona pumpaju se iz matriksa u međumembranski prostor. Naposljetku, elektroni se prenose sa željezo-sumpornog kompleksa na ubikinon smješten u membrani. Redukcija ubikinona u ubikinol (QH₂) također doprinosi stvaranju protonskog gradijenta te se dva protona prenose iz matriksa (Slika 2; Hirst, 2005). Konzervirani kofaktori kompleksa I su nekovalentno vezani flavin mononukleoid (FMN) izveden iz vitamina B₂ i osam željezo-sumpor kompleksa vezanih za hidrofilnu domenu. Vezno mjesto NADH smješteno je u podjedinici od 51 kDa pridruženo flavinu. Kompleks I oksidira NADH (kako bi se obnovio NAD⁺), reducira ubikinon i prenosi protone duž unutarnje mitohondrijske membrane važne za sintezu ATP. Supstrati i kofaktori kompleksa I imaju najmanji potencijal u mitohondrijskom respiratornom lancu pa zbog toga kompleks I uvelike doprinosi stvaranju ROS-ova (Hirst, 2010) te se smatra primarnim izvorom superoksidnih aniona (Fato i sur., 2010).

Kompleks I može biti inhibiran s preko 60 različitih spojeva, počevši s rotenonom, pa sve do različitih sintetskih insekticida/akaricida. Svi inhibitori su grupirani u tri razreda s obzirom na njihov efekt: razred A – antagonisti potpuno oksidiranog ubikinona (piericidin); razred B – inhibitori zamjenjuju djelomično reducirani ubisemikinon (rotenon); razred C – antagonisti potpuno reduciranog ubikinola (kapsaicin; Hirst, 2010).

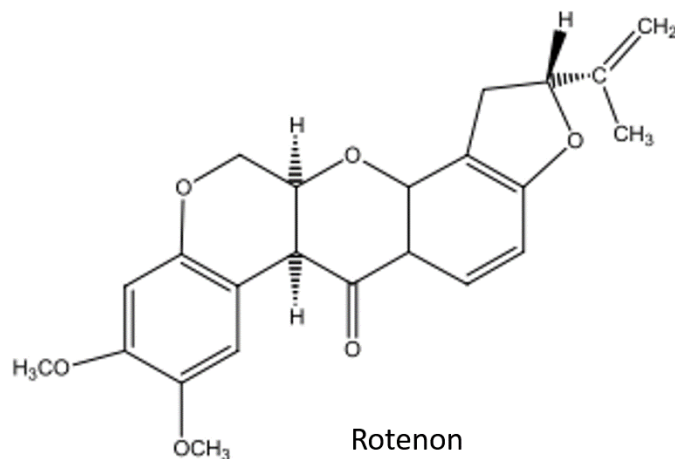


Slika 2. Shematski prikaz kompleksa I. Oksidacija NADH i prijenos elektrona preko FMN i Fe/S kompleksa te prijenos protona iz matriksa u međumembranski prostor (prilagođeno prema Hirst, 2010).

1.3. Rotenon

Rotenon je flavonoid koji se može izolirati iz korijena nekoliko biljaka (pr. *Derris scandens*, *D. elliptica*, *D. malaccensis*; Miles, 2003). Spoj je bez boje i mirisa i obično se koristi kao prirodni insekticid, pesticid i piscicid. Insekticid rotenon djeluje kao inhibitor kompleksa I mitohondrijskog oksidativnog sustava te je jedan od najjačih ireverzibilnih inhibitora tog kompleksa. Lako prolazi krvno-moždanu barijeru jer je izuzetno lipofilan (Slika 3). Spriječava transfer elektrona sa željezo-sumpornih kompleksa u kompleksu I do ubikinona te tako povećava stvaranje ubisemikinona, glavnog donora elektrona za stvaranje superoksida. Rezultat toga je nagomilavanje elektrona u matriksu mitohondrija te stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (Li i sur., 2003). Povećana razina ROS induciranih rotenonom može ubrzati skraćivanje telomera i oštećenje DNA što vodi ka senescenciji (Marthandan i sur., 2015).

Zbog povećanja ROS, rotenon može uzrokovati staničnu smrt kod većine staničnih linija, kod nekih uzrokujući apoptozu, a kod nekih nekrozu. Inhibicijom kompleksa I također dolazi do smanjenja nivoa staničnog ATP čija razina u stanici može odrediti hoće li doći do apoptoze ili nekroze (Hsuan i sur., 2006).



Slika 3. Molekula rotenona (prilagođeno prema Miles, 2003).

1.4. Dinamika rasta stanica u kulturi

Ograničeni životni vijek ljudskih diploidnih stanica *in vitro*, odnosno starenje kulture, ovisi o broju staničnih dioba ili udvostručenja populacije (engl. *population doublings*, PD), a ne o vremenskom periodu tijekom kojeg su stanice bile uzgajane u kulturi. Ljudski diploidni fibroblasti u kulturi mogu biti održavani kroz 40 do 60 dioba. Mlade i stare kulture koje su uzgajane u esencijalnom nemitotičkom stanju bez faktora rasta dovedene u stanje mirovanja prestaju s diobama. Međutim, ako se takvim stanicama koje su neko vrijeme provele u stanju mirovanja ponovno omogućiti da nastave s rastom, napraviti će jednak broj dioba kao i stanice koje su u kulturi rasle kontinuirano. Slično inhibiciji rasta uskraćivanjem faktora rasta, inhibicija je rasta zamrzavanjem stanica u tekućem dušiku nakon čijeg odmrzavanja stanice nastavljaju s daljnjim rastom u normalnim uvjetima (Dell'Orco i sur., 1974).

S obzirom na vremensku razliku u duljini mitoze, neke stanice mogu proći nekoliko dioba, dok se ostale nijednom ne podijele. Ova vremenska razlika objašnjava se samim vremenskim rasponom koji može trajati od 15 sati do pet dana kod pojedinih stanica. Isto tako kod stanica unutar iste kulture postoji određena varijabilnost u diobenom potencijalu (Smith i Hayflick, 1974). No, bez obzira na brzinu diobe, sve stanične kulture u prvoj fazi prolaze razdoblje brzog rasta u kojem se stanice intenzivno dijele. U drugoj fazi brzina rasta stanica se

postepeno smanjuje, dok u trećoj fazi rast u potpunosti prestaje čime se doseže Hayflickov limit (Hayflick, 1965).

S povećanjem broja udvostručenja populacije kulture dolazi do smanjenja ukupnog diobenog potencijala te povećanja udjela starih stanica koje su izgubile moć daljnjeg dijeljenja. Bez obzira na trenutnu starost stanica, pojava starih stanica u kulturi je nasumična pa se one pojavljuju i u mladim kulturama (Smith i Whitney, 1980). Potencijal proliferacije dvije stanice nastale iz iste mitoze može varirati za više od osam PD. Budući da tijekom vremena dolazi do akumulacije starih stanica u populaciji, stanice koje se dijele trebaju kompenzirati dodatne PD i za stanice koje se ne dijele. Tako pojedine stanice naprave više staničnih dioba odnosno imaju veći broj dioba pojedinih stanica (engl. *cell generations*, CG) u odnosu na prosječne vrijednosti cijele populacije. Zbog postepenog skraćivanja telomera tijekom svake diobe dolazi do smanjenja ukupnog diobenog potencijala, a zbog naglog skraćivanja telomera zbog rekombinacije subtelomernog i telomernog područja dolazi do nasumičnog starenja stanica u kulturi (Rubelj i sur., 1999). U konačnici stanice prestaju s rastom te naposljetku ulaze u replikativno starenje koje karakterizira prestanak dioba stanica (Hayflick i Moorehead, 1961).

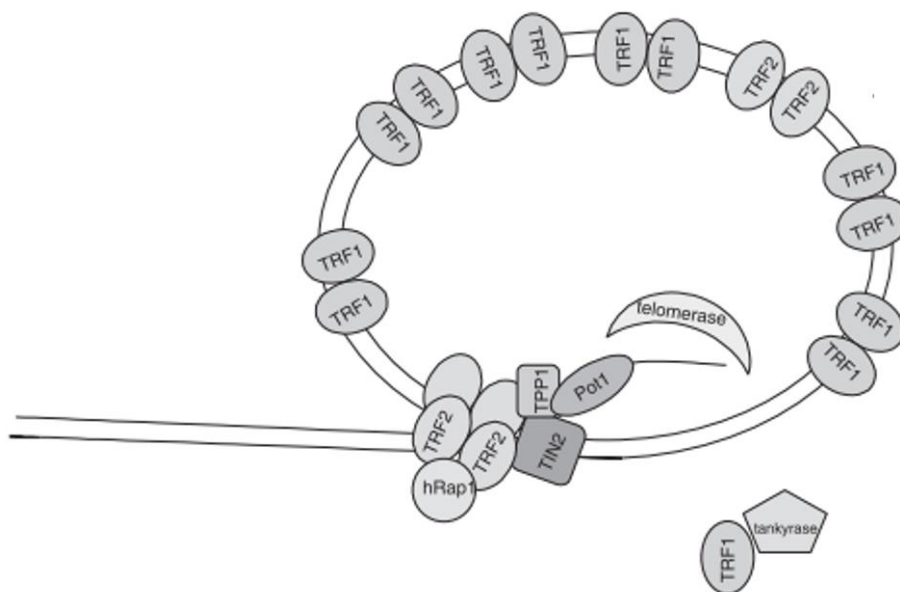
Budući da skraćivanje telomera određuje diobeni potencijal, a kratke telomere aktiviraju proces senescencije kao odgovor na ROS i mutacije, von Zglinicki (2002) predlaže da telomere djeluju kao „stražari“ u slučaju oštećenja genoma, za brojanje staničnih dioba te za zaustavljanje stanica potencijalno tumorigeničnih, od daljnjih dioba.

1.5. Struktura i funkcija telomera

Telomere su linearni sljedovi na krajevima eukariotskih kromosoma i igraju važnu ulogu u replikaciji i održavanju kromosoma. Eukariotske telomere sastoje se od ponavljajućih sljedova od pet do osam nukleotida, često bogatim s G. Slijed telomernih ponavljanja kod većine eukariota je heksanukleotid TTAGGG. Kod čovjeka ti sljedovi se ponavljaju 500-3000 puta te variraju po veličini u rasponu od 5-30 kb i uvijek završavaju jednim jednolančanim produžetkom. Na ove telomerne sekvence DNA vežu se razni proteini koji čuvaju krajeve kromosoma od razgradnje ili međusobnog povezivanja (Cooper i Hausman, 2004). Produženi 3' kraj telomere sastoji se od jednolančanog produžetka bogatog s G, duži je za 75-300

nukleotida od njegovog komplementarnog C-lanca te ima izuzetno važnu ulogu u funkciji telomera (Garvik, 1995; Makarov i sur., 1997).

Kod kralježnjaka telomere imaju oblik petlje koju čini njena dvolančana DNA. Spomenuti jednolančani 3' kraj telomernog lanca bogat s G formira telomernu petlju (t-petlja) invazijom na dvolančanu DNA u subtelomernom i telomernom području. Minimalna duljina sekvence potrebna za stvaranje t-petlje je oko 1 kb, a zajedno s proteinima važnim za stabilizaciju telomere tvore suprastrukturu tzv. telosom. Telosom je izgrađen od proteina koji se vežu za dvolančanu i jednolančanu telomernu DNA (Slika 4). Njihova uloga je zaštita krajeva od razgradnje egzonukleazama, fuzije telomernih krajeva i stvaranje neželjenih formacija koje mogu narušiti integritet telomera (Wright i Zakain, 1995).



Slika 4. Složena struktura telomere. Središte telomernog kompleksa sastoji se od šest telomerna proteina koji vežu DNA koji su u interakciji s ostalim proteinskim faktorima (hRap1, TIN2, TRF1, TRF2, PINX1, Pot1, tankiraza 1) (prilagođeno prema Matulić i sur., 2007).

Održavanje telomera je esencijalno za zaštitu kromosomskih krajeva i regulaciju duljine telomera. Tijekom svakog staničnog ciklusa se skraćuju. Prva kritično skraćena telomera u stanici prepoznata je kao dvolančani lom koji šalje signal za nepovratno zaustavljanje staničnih dioba. Glavnu ulogu u regulaciji duljine ljudskih telomera igraju proteini tzv. šelterinskog kompleksa. U središtu tog kompleksa su TRF1 i TRF2. Protein TRF1 se direktno veže za dvolančani TTAGGG ponavljajući slijed te djeluje u interakciji s njegovim proteinskim partnerima tankirazom 1, TIN2 i PINX1. TRF1 se kao dimer veže na

dvolančanu telomernu DNA i tako stabilizira t-petlju te sudjeluje u paralelnom sparivanju telomera. Prekomjerna ekspresija TRF1 rezultira skraćivanjem telomera, dok njegovo otpuštanje s telomere, npr. prekomjernom ekspresijom tankiraze 1 koja ga modificira, uzrokuje produljenje telomera (Loayza i de Lange, 2003). Homolog proteina TRF1, TRF2, koji je prisutan s više od 100 kopija po kromosomskom kraju, primarno se veže na dvolančanu telomernu DNA u D-petlji, inicira stvaranje t-petlje te je štiti i stabilizira. TRF2 se udružuje s hRap1 i kompleksom MRN (Mre11-Rad50-NBS1). Zbog povećane ekspresije TRF2 u stanici dolazi do progresivnog skraćivanja telomera, a njegovom inhibicijom dolazi do raspada t-petlje, oslobađanja 3' kraja i nastanka kromosomskih fuzija kovalentnim spajanjem telomera raznih kromosoma, a time i nestabilnosti genoma. Zajednička karakteristika TRF1 i TRF2 je da se kao homodimeri vežu za dvolančanu telomernu DNA preko dvije domene Myb koja se nalazi na C-kraju svakog monomera. Razlika između ova dva proteina je u njihovim N-krajevima koji su bogati kiselim aminokiselinama kod TRF1 i bazičnim aminokiselinama kod TRF2 (Stansel i sur., 2001; Matulić i sur., 2007).

Važnu ulogu u kontroli produljenja telomera pomoću telomeraze ima protein POT1 koji se preko TRF1 veže za jednolančani 3' kraj. POT1 uspoređuje se s kvaščevim proteinom Cdc13 koji veže i regulira telomerazu. Primjećeno je da mutirani oblik POT1 koji nema domenu koja veže DNA ne uspijeva regulirati duljinu telomera te zbog toga dolazi do velikog produljenja telomera. U strukturi telosoma još se nalaze faktori koji sudjeluju u popravku DNA, Ku i kompleks Mre11-Rad50-NBS1 (Loayza i de Lange, 2003).

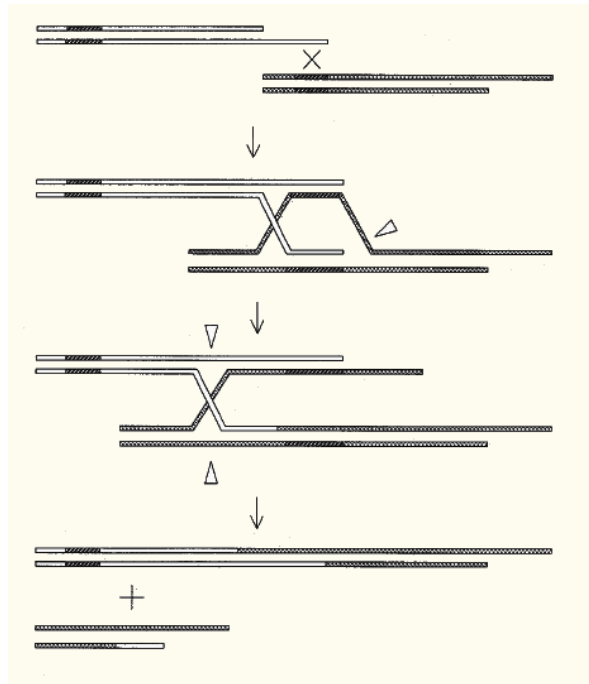
1.5.1. Skraćivanje telomera

Kod normalnih stanica, telomere se skraćuju prilikom svake replikacije zbog nemogućnosti DNA polimeraze da sintetizira same krajeve tromog lanca i prisutnosti 5' egzonukleazne aktivnosti (Makarov i sur., 1997). Dokazano je da se prilikom svakog staničnog ciklusa telomere skrate ~50-150 pb jer se krajevi telomera ne mogu u potpunosti sintetizirati (Olovnikov, 1973). Zbog nesintetiziranog kraja jednolančane DNA svaka molekula nakon replikacije kraća je na 5' kraju (Harley i sur., 1990) te se taj proces zove „problem replikacije krajeva“ (engl. *end replication problem*). Duljina ljudskih telomera koje u početku mogu u prosjeku biti duge oko 16 kb, sa starenjem se skrate na 4-7 kb. Zbog skraćenih telomera dolazi do replikativnog starenja: narušavanje telomerne strukture šalje

signal oštećenja DNA te prestaju daljnje diobe. Takvo stanično starenje može pokrenuti samo jedna kritički skraćena telomera u stanici koja je dovoljna da je mehanizam kontrole stanične diobe prepozna kao oštećenje DNA. Kao rezultat tog procesa dolazi do stanične senescencije posredstvom inhibitora staničnog ciklusa (Hemann i sur., 2001).

Postupno i naglo skraćivanje telomera dva su oblika skraćivanja telomera koji vode ka starenju. Zbog nedovoljne duljine telomera ne može se formirati t-petlja te tu prestaje zaštita krajeva kromosoma. Nedovoljno duge telomere poprimaju tzv. otvorenu konformaciju koju kontrolni mehanizmi zatim prepoznaju kao oštećenje DNA i zaustavljaju daljni stanični ciklus u fazi G1 pomoću tumor supresora, proteina p53 (De Lange, 2002).

S druge strane, naglo skraćivanje telomera događa se nakon rekombinacije DNA ili nukleazne digestije u području subtelomerne i telomerne regije kromosoma. Rekombinacija uključuje invaziju telomernog jednolančanog 3' kraja na subtelomernu/telomernu granicu istog kromosoma ili na drugu subtelomernu/telomernu regiju. Nakon rekombinacije dvije telomere dolazi do produženja jedne i naglog skraćivanja druge telomere (Slika 5), a nakon rekombinacije na kraju jedne telomere i razrješenja Hollidayeve strukture nastaje skraćena telomera i mala kružna telomerna DNA. Skraćivanje jedne ili više telomera u stanici uzrokuje iznenadno nastupanje staničnog starenja koje se naziva sindrom naglog starenja (engl. *sudden senescence syndrome*, SSS). Zbog naglog starenja stanice naglo gube proliferacijski potencijal i na kraju se trajno zaustavljaju u fazi G1 staničnog ciklusa (Rubelj i Vondraček, 1998). Ukoliko dođe do mutacija gena za p53 ili pRB stanice ne mogu biti zaustavljene u proliferaciji te im genom postaje nestabilan i proces vodi u tzv. staničnu krizu i smrt apoptozom. Rijetko, pojedine stanice aktiviraju gen za komponente telomeraze ili rekombinacijski mehanizam produljenja telomera te izbjegnu staničnu smrt i nastave se dijeliti kao transformirane tumorske stanice (Greenberg, 2005).

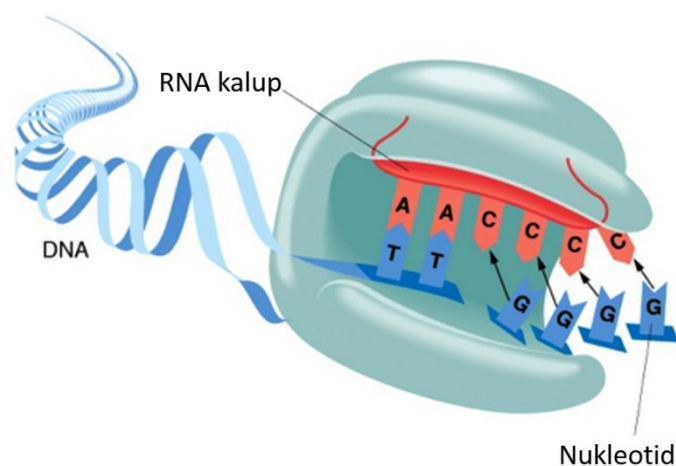


Slika 5. Rekombinacija između dvije telomere. Nakon razrješenja strukture dolazi do naglog skraćivanja jedne i produženja druge telomere (prilagođeno prema: Rubelj i Vondraček, 1998).

1.5.2. Održavanje telomera

Budući da zbog kritične duljine telomera stanice mogu izgubiti čitave kromosome kroz procese fuzije i prekrajanja kromosoma, velika većina njih u kulturi umire zbog masovnih oštećenja. Održanje telomera stanicama je od izuzetne važnosti ako se misli na imortalne tumorske stanice ili matične stanice koje bez ovog procesa ne bi mogle opstati. Postoje dva mehanizma koja omogućavaju održavanje telomera u stanici. To su procesi posredovani enzimom telomerazom i alternativno produženje telomera (ALT-mehanizam).

Telomeraza je ribonukleoprotein koji produljuje telomernu DNA koristeći unutrašnju RNA podjedinicu kao kalup (Slika 6). RNA podjedinica (hTR) s proteinskom katalitičkom podjedinicom hTERT čini funkcionalan enzim. hTERT sintetizira telomernu DNA sa svoje RNA podjedinice te je stoga reverzna transkriptaza. Za punu aktivnost telomeraze zaslužan je i TP1 protein koji veže RNA (Greider i Blackburn, 1985). Pri produživanju 3' kraja telomerne DNA također se odvija i sinteza komplementarnog 5' lanca pomoću DNA polimeraze α (Adams i Holm, 1996).



Slika 6. Struktura telomeraze. Produljenje telomerne DNA odvija se pomoću RNA kalupa dodavanjem nukleotida. (preuzeto i prilagođeno sa: <http://www.martinfrost.ws/htmlfiles/sept2008/cancer-telomerase.html>)

Aktivnost telomeraze prisutna je kod velikog broja stanica s regeneracijskim potencijalom (ljudske spolne stanice, hematopoetske matične stanice, cervikalni keratinociti, endometrijske stanice, intestinalne stanice kripti, stanice bazalnog sloja kože itd.), dok je kod diferenciranih somatskih stanica inaktivna. Nasuprot somatskih stanica, imortalne tumorske stanice karakterizira neograničeni broj dioba što im omogućuje aktivna telomeraza. Telomeraza nije onkogen koji uzrokuje transformaciju zdravih stanica u maligne već im samo omogućava neograničeni broj dioba (Couter i sur., 1992; Harley, 2002). RNA podjedinica telomere hTR u normalnim i tumorskim stanicama je konstitutivno prisutna, a katalitička podjedinica hTERT prisutna je u tumorskim stanicama nakon aktivacije promotora uslijed mutacije i u nekim normalnim stanicama čija je telomerazna aktivnost povremeno prisutna. Nakon unosa gena hTERT u normalne stanice dolazi do rekonstrukcije aktivne telomeraze te produživanja telomera i besmrtnosti stanica (Bodnar i sur., 1998).

Zbog toga što telomeraza nije prisutna u somatskim stanicama, svakom njihovom diobom one se približavaju senescenciji. Proces onkogeneze najčešće ovisi o staničnoj proliferaciji i izbjegavanju skraćivanja telomera i starenju. Oko 85% svih ljudskih tumora izbjegavanje senescencije osigurava pomoću telomeraze. Ostalih 15% tumorskih stanica svoju duljinu telomera u odsutnosti telomeraze održavaju mehanizmom ALT (engl. *alternative lengthening of telomeres*; Reddel, 2000). Jedna od karakteristika stanica s mehanizmom ALT je heterogena duljina telomera koje su dulje i sa širim rasponom duljina (3-50 kb). Sljedeća karakteristika je prisutnost ekstrakromosomske telomerne DNA koje može poprimiti puno

oblika, uključujući dvolančane telomerne krugove (t-krugovi; Cesare i Griffith, 2004), djelomično jednolančane krugove (C-bogate ili G-bogate krugove; Nabetani i Ishikawa, 2009), linearnu dvolančanu DNA i visoko molekularnu „t-kompleksnu“ DNA koja sadrži nenormalne i visoko razgranate strukture. Za stanice s mehanizmom ALT karakteristična su i nuklearna tjelešca PML (engl. *ALT-associated promyelocytic leukemia protein bodies*), brže promjene u duljini telomera te povećana učestalost rekombinacije na telomerama (Cesare i Reddel, 2010).

1.6. Stare stanice i putevi koje vode starenju

Progresivne diobe stanica i postupno skraćivanja telomera sa svakim staničnim ciklusom vode do starih stanica i replikativnog starenja. Stanice koje nemaju eksprimiranu telomerazu ili pak imaju strogu regulaciju telomeraze, prije ili kasnije će doći do kraja svog proliferativnog potencijala zbog barem jedne kritičko skraćene nefunkcionalne telomere (Shay i Wright, 2001).

Ulaskom u senescenciju stanice ne ugibaju. Vijabilnost i metabolička aktivnost karakteristike su starih stanica koje su i dalje podložne na signale iz okoliša te nisu sklone programiranoj staničnoj smrti. Zbog toga se takve stanice mogu godinama održavati u kulturi uz redovito mijenjanje medija. Stare stanice zaustavljene su u fazi G1, a njihov daljnji rast ne može se pobuditi ni dodavanjem faktora rasta (Cristofalo i Pignolo, 1993).

Za stare stanice karakterističan je veći obujam s većom citoplazmom, lateralne ekstenzije i povećanje granularnosti zbog različitih morfoloških i biokemijskih procesa kroz koje prolaze. Stare stanice pokazuju aktivnost beta galaktozidaze povezane sa starenjem (SA- β -Gal engl. *senescence associated beta galactosidase*), lizosomske hidrolaze aktivne pri pH 6 (Dimiri i sur., 1995). Prilikom starenja stanica, dolazi i do promjene prepisivanja gena te do povećane ekspresije pojedinih genskih produkata kao što su faktori rasta, citokini, degradacijski enzimi, metaloproteinaze i kolagen. Još jedna karakteristika je smanjena sposobnost proizvodnje HSP (engl. *heat shock proteins*) te samim time smanjena sposobnost regulacije pravilnog smatanja proteina (Campisi, 2000).

Genetički putevi koji vode ka starenju izučavani su na razlikama normalnih i imortalnih stanica. Ljudski geni odgovorni za starenje pronađeni su na kromosomima 1, 4 i 7

(Murnane, 1994). Kad stanice uđu u senescenciju ne dolazi samo do skraćivanja njihovih telomera već i do promjene u staničnim kontrolnim putevima. Ulaskom u starenje stanicama se smanjuje razina transkripcijskih faktora koji potiču rast stanice, a povećava se količina i ekspresija inhibitorских proteina staničnog ciklusa (Dimri i Campisi 1994). Najznačajnije povećanje je u aktivnosti tumor supresora p53 koji u stanici djeluje kao transkripcijski aktivator gena uključenih u inhibiciju staničnog ciklusa i apoptozu. U starim stanicama, osim p53, također je povišena razina proteina p21 i p16 potrebnih za inhibiciju proteinskih kinaza ovisnih o ciklinima, CDK (Bringold i Serrano, 2000; Campisi, 2000). Poznato je da se stanična senescencija može javiti neovisno o skraćivanju telomera i to kao odgovor na različite vrste stresa kao što je aktivacija RAS ili RAF, hiperproliferativni signali aktivirani s E2F1 ili ETS2, oksidativni stres, oštećenje DNA ili indukcija tumor supresorskih proteina ARF, p16 i PML (Itahana i sur., 2013).

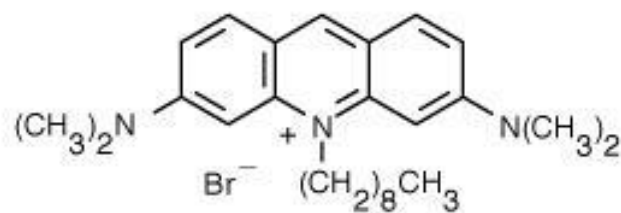
1.7. Aktivnost SA- β -Gal

Kako bi se razumjela uloga stanične senescencije kod tumora i starenja stanica bilo je od izuzetne važnosti razviti pouzdane biomarkere staničnog starenja. Stare stanice su velike, s povećanim volumenom citoplazme i malom jezgrom te ne reagiraju na mitogene. Stoga se stare stanice mogu identificirati nemogućnošću sinteze DNA ili pomoću gena koji nemaju normalnu ekspresiju. Bez obzira na ove spoznaje ipak postoji problem u identifikaciji starih stanica u tkivu budući da se one ne razlikuju od stanica u mirovanju ili terminalno diferenciranih stanica. Stare stanice te njihova akumulacija u tkivu može se histokemijski detektirati kod sniženog pH (5-6) jer stare stanice imaju specifično aktivnu β -galaktozidazu. Ova β -galaktozidaza je specifično aktivna samo kod starih stanica, ali ne i kod stanica u mirovanju ili terminalno diferenciranih stanica (Itahana i sur., 2013). Pri pH 4, što je ujedno i optimalno za aktivnost lizosomalne β -galaktozidaze, jednako se boje i mlade i stare stanice. Međutim, pri umjerenoj kiselosti na pH 6 obojat će se samo stare stanice te je stoga ova metoda nazvana SA- β -gal (senescence associated- β -gal) (Dimir i sur., 1995). Za citokemijsku detekciju starih stanica koristi se X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -galaktozidaza) koji cijepanjem s β -galaktozidazom prelazi u indol te stvara netopljivi plavi talog u perinuklearnom području. SA- β -Gal koristi se za detekciju starih stanica *in vivo* i *in vitro*, te se može upotrijebiti kao pouzdani biljeg replikativnog starenja. Takav biljeg prisutan je kod

ljudskih fibroblasta i keratinocita. Melanociti starijih ljudi u prvim fazama rasta u kulturi imaju izrazito veliki rast te istovremeno pokazuju aktivnost SA- β -Gal veću od 90%. Aktivnost SA- β -Gal isključivo je povezana s fiziološkom starosti stanice, a ne njezinom kronološkom starosti (Debaq-Chainiaux i sur., 2009). Pokazano je da je aktivnost SA- β -Gal popraćena s povećanjem lizosomalne mase u stanici. Povećana ekspresija gena GLB1 koji kodira lizosomski enzim, doprinosi aktivnosti SA- β -Gal. Jedan od karakteristika staničnog starenja je upravo i povišena razina lizosomskih enzima i povećana lizosomska aktivnost (Itahana i sur., 2013).

1.8. Fluorescentna boja NAO

Svi membranski sustavi živih stanica jednako kao i umjetne membrane vrlo su podložne vezanju pojedinih fluorescentnih boja i proba. Takve probe su fluorescentni analozi lipida i lipofilnih organskih boja koje posjeduju strukturu sličnu prirodnim biomolekulama. 10-N-nonil akridin oranž (NAO) veže se za mitohondrije te omogućava proučavanje tih organela. Sintetizira se iz akridin oranž boje dodavanjem njegovog alifatskog lanca varijabilne duljine kvaternarnom amonijaku (Slika 7). Ima drukčija svojstva vezanja za strukturu u odnosu na akridin oranž za kojeg se zna da se interkalira između baza u dvolančanoj nukleinskoj kiselini jezgre (Maftah i sur., 1989).



Slika 7. Struktura NAO (Maftah i sur., 1990).

NAO ulazi u mitohondrije i akumulira se na unutarnjoj membrani mitohondrija gdje se veže za kardiolipin. Vezanje NAO za kardiolipin neovisno je o transmembranskom potencijalu i energetskom stanju mitohondrija, za razliku od drugih proba. Boja NAO je toksična pri visokim koncentracijama i može narušiti strukturu mitohondrijske membrane i

funkciju mitohondrija. Ostaje u mitohondrijima čak i nakon nekoliko ispiranja što je čini učinkovitim za praćenje mitohondrija tijekom izolacije i fuzije stanica. Vežan za kardiolipin i akumuliran na unutarnjoj membrani mitohondrija, NAO apsorbira svjetlost valne duljine 495 nm te emitira maksimum svjetlosti kod valne duljine 519 nm. Jednom inkorporiran u mitohondrije, ne prelazi na neobilježene mitohondrije u drugim stanicama (Maftah i sur., 1990). Najčešće se koristi istovremeno s bojom Rodamin123 (Rh123) ili MitoTrackerom za analizu mase mitohondrija, odnosno funkcije mitohondrija tijekom staničnih ciklusa. Koristi se također za analizu mitohondrija protočnom citometrijom, karakterizaciju rezistencije na lijekove (povezanu s P-glikoproteinom, P-gp) te za mjerenje promjena mitohondrijske mase tijekom apoptoze (Cottet-Rousselle i sur., 2011).

1.9. Princip rada protočnog citometra

Protočna citometrija je tehnologija koja istovremeno mjeri i potom analizira nekoliko fizičkih karakteristika čestica, najčešće stanica, koje protječu u tekućini kroz zraku svijetla. Mjerena svojstva najčešće uključuju relativnu veličinu čestica, relativnu granuliranost ili unutarnju kompleksnost te relativni fluorescentni intenzitet. Ove karakteristike određuju se pomoću optičko-elektronskog sustava koji bilježi kako čestice ili stanice raspršuju lasersko svjetlo i emitiraju fluorescenciju. Svaka suspendirana čestica veličine od 0.2 do 150 μm je prikladna za analizu.

Protočni citometar sastoji se od tri glavna sustava: protočnog, optičkog i elektroničkog. Protočni sustav donosi čestice u zraku lasera za analizu. Optički sustav sastoji se od lasera koji osvjetljava čestice i optičkih filtera koji usmjeravaju signal na odgovarajuće detektore. Elektronički sustav pretvara svjetlosni signal u elektronički signal koji se potom može obraditi na računalu.

Raspršenje svjetla događa se kada čestica odbija lasersko svjetlo. Jačina odbijene svjetlosti ovisi o fizikalnim svojstvima čestica, posebice veličini i unutarnjoj kompleksnosti (membrane, jezra, granulirane tvorbe unutar stanice). Oblik stanice i topografija površine također utječu na ukupno svjetlosno raspršenje. Svjetlost raspršena u smjeru laserske zrake daje parametar FSC (engl. *forward-scattered light*) koji je proporcionalan staničnoj površini ili veličini čestice. FCS parametar omogućava detekciju čestica većih od zadane veličine neovisno o njihovoj fluorescenciji. Svjetlost odbijena pod pravim kutom od smjera laserske

zrake daje parametar SSC (engl. *side-scattered light*) koji je proporcionalan granuliranosti stanice ili unutrašnjoj kompleksnosti stanice. Korelirana mjerenja FCS i SSC parametra omogućuju diferencijaciju različitih stanica u heterogenoj staničnoj populaciji.

Fluorescentno antitijelo i fluorokrom mogu biti vezani na stanicu te dolazi do emisije svjetlosti kad odgovarajuća laserska zraka ekscitira fluorokrom. Prilikom ekscitacije elektron iz fluorescentnog antitijela prelazi u više energetske stanje, a pri svom spuštanju u normalno stanje emitira energiju kao foton svjetlosti. Ova tranzicija energije zove se fluorescencija. Količina dobivenog fluorescentnog signala nakon analize proporcionalna je količini fluorokroma u stanici.

Optički sustav sastoji se od ekscitacijske i kolekcijske optike. Ekscitacijska optika sastoji se od lasera i leća koji oblikuju i fokusiraju lasersku zraku. Kolekcijska optika sastoji se od kolekcijskih leća koje služe za sakupljanje emitiranog svjetla nastalog prilikom interakcije čestice i laserske zrake te sustava optičkih ogledala i filtera. Jednom kada čestica prođe kroz lasersko svjetlo, emitirani parametar SSC i fluorescencijski signali preusmjeravaju se u fotomultiplicirajuće cijevi (PMT) veće osjetljivosti, dok manje osjetljive fotodiode (PD) skupljaju jače signale FSC. Svi signali zatim se prenose na detektor sustavom ogledala i optičkih filtera.

Dobiveni svjetlosni signali ili fotoni pretvaraju se u elektronski signal (volte, V) pomoću fotodetektora. Fotoni se u detektoru pretvaraju u proporcionalni broj elektrona koji se umnažaju i stvaraju veću električnu struju. Električna struja putuje do umnoživača i pretvara se u puls napona koji se pohranjuje u digitalnom obliku.

U računalnom programu intenzitet signala pretvoren u električni signal prikazuje se u obliku linearne ili logaritamske funkcije. Jedan od načina prikaza rezultata je u obliku histograma koji daje podatak o učestalosti pojedine skupine stanica u svakoj klasi intenziteta. Ukoliko se želi definirati podskupina podataka koristi se ograda (engl. *gating*). Ograda je numerička ili grafička granica koja se koristi kako bi se definirale karakteristike željenih čestica za daljnju analizu. Ako se u svakom uzorku želi analizirati ista subpopulacija stanica, program omogućuje pamćenje prvo postavljene ograde pa prilikom prolaska stanica kroz lasersku zraku automatski određuje da li stanice u uzorku zadovoljavaju zadane uvjete (<http://www.d.umn.edu/~biomed/flowcytometry/introflowcytometry.pdf>).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Analizom rezultata i usporedbom kontrolnih s tretiranim stanicama doći ću do bitnih zaključaka o utjecaju rastućih koncentracija rotenona na kulturu normalnih ljudskih fibroblasta NFŽ.

Stoga su ciljevi mojeg diplomskog rada:

- (i) utvrditi je li za produžetak staničnih dioba i usporavanje gubitka telomera u uvjetima smanjenog parcijalnog tlaka kisika odgovoran slabiji rad mitohondrija ili je za takav efekt odgovorno direktno djelovanje samog molekularnog kisika;
- (ii) odrediti osjetljivost normalnih ljudskih fibroblasta NFŽ na rastuće koncentracije rotenona;
- (iii) analizirati utjecaj rotenona na brzinu rasta normalnih ljudskih fibroblasta NFŽ;
- (iv) pratiti dinamiku starenja normalnih ljudskih fibroblasta NFŽ određivanjem indeksa obilježavanja s SA- β -Gal;
- (v) pratiti prisutnost mitohondrija i njihovu masu kod kontrolnih stanica i stanica tretiranih s rotenonom pomoću fluorescentne mikroskopije i analize protočnim citometrom;
- (vi) pratiti dinamiku skraćivanja telomera kod kontrolnih stanica i stanica tretiranih s rotenonom metodom Southern blot.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kultura stanica

Naziv stanične linije: NFŽ – normalni ženski fibroblasti

Organizam: Homo sapiens

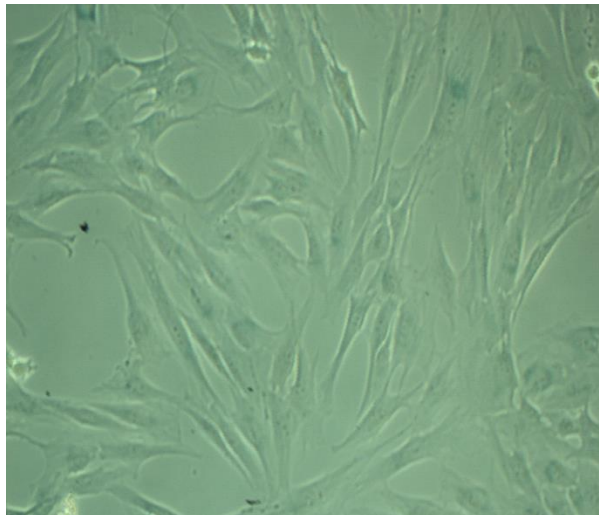
Spol: ženski

Tkivo: uho

Način rasta: adherentan

Stanični produkti: fibrin, kolagen

Citogenetska svojstva: normalne stanice



Slika 8. Fibroblasti NFŽ u kulturi pod faznim kontrastom.

Zamrznute stanice stanične linije NFŽ, nakon što su izvađene iz tanka s tekućim dušikom, kratko sam uronio u vodu zagrijanu na 37 °C uz lagano protresenje. Stanice sam prebacio u konusnu epruvetu i dodao 9 ml potpunog medija (DMEM (Gibco) + 10% FCS (Gibco)). Zatim sam stanice istaložio centrifugiranjem (1000 rpm, 5 min), uklonio supernatant i resuspendirao u 5 ml potpunog medija (DMEM + 10% FCS). Kako bih spriječio kontaminaciju u medij sam dodao kombinaciju antibiotika (25 µl/ml Penicilin/Streptomycin/Amfotericin, 25:1 (BioWhittaker, Lonza)). Suspenziju sam prebacio u kultivacijsku bočicu površine 25 cm² (T25) u koju je prethodno stavljeno 5 ml medija. Stanice

sam pohranio u inkubator s 5%-tnim CO₂ na 37 °C. Nakon 24 h pod mikroskopom sam provjerio jesu li se stanice prihvatile za podlogu kultivacijske bočice.

3.1.1. Uzgoj i presađivanje stanica

Stanice sam uzgajao u mediju DMEM uz dodatak 10%-tnog FCS-a u kultivacijskim bočicama površine 25 cm², u inkubatoru s 5%-tnim CO₂, na 37 °C. Stanice sam presađivao u laminaru u sterilnim uvjetima kada bi dosegnule 90%-tnu konfluentnost. Pri presađivanju sam prvo uklonio medij vakuom sisaljkom i isprao stanice s 5 ml fiziološke otopine koju sam također uklonio vakuom sisaljkom. Stanicama sam zatim dodao 0.5 ml tripsina i stavio ih na inkubaciju 5 minuta na 37 °C. Lagano sam protresao bočicu da se sve stanice odvoje od podloge i provjerio pod mikroskopom. Nakon odvajanja stanica, dodao sam 5 ml kompletnog medija i aspirirao pipetom da se razbiju stanične nakupine. Za brojanje stanica uzeo sam 0.5 ml dobro resuspendiranih stanica i stavio ih u bočicu s 19.5 ml fiziološke otopine, dobro promiješao i brojao 3 puta brojaču Beckman Coulter Particle Count and Size Analyzer. Izračunao sam srednju vrijednost i broj stanica po mililitru. Za daljnju upotrebu određeni broj stanica (10⁵) nasadio sam u nove kultivacijske bočice površine 25 cm² uz odgovarajući volumen medija, najčešće 5 ml. Izračunati broj stanica koristio sam za praćenje broja dioba stanične kulture.

3.2. Optimizacija koncentracije rotenona

Nasadio sam stanice (10⁵) u 6 bunarića za uzgoj. Nakon što su se stanice zalijepile za podlogu nakon 24 h, isprao sam ih fiziološkom otopinom i dodao 3 ml kompletnog medija. Pripremio sam 100 mM matičnu otopinu rotenona u dimetilsulfoksidu (Sigma-Aldrich) koju sam koristio za određivanje osjetljivosti stanica u rasponu 10 nM, 1 nM, 10⁻¹ nM, 10⁻² nM, 10⁻³ nM i 10⁻⁴ nM koncentracija rotenona. Nakon 96 h uklonio sam medij vakuom sisaljkom i stanice isprao fiziološkom otopinom te snimio pod svjetlosnim mikroskopom. Stanični rast je praćen kroz 8 dioba.

3.2.1. Tretiranje stanica rotenonom

Nasadio sam stanice (10^5) u deset kultivacijskih bočica površine 25 cm^2 s 5 ml kompletnog medija. Kontrolnim stanicama dodao sam adekvatan volumen DMSO, a ostalim stanicama 10^{-1} nM , 10^{-2} nM , 10^{-3} nM , 10^{-4} nM otopinu rotenona u DMSO-u u duplikatu. Konačna koncentracija DMSO je 0.1%. (Tablica 1). Ove stanice koristio sam za sljedeće analize.

Tablica 1. Shema tretiranja stanica rotenonom.

Kontrola - DMSO	10^{-4} nM otopina rotenona u DMSO	10^{-3} nM otopina rotenona u DMSO	10^{-2} nM otopina rotenona u DMSO	10^{-1} nM otopina rotenona u DMSO
Kontrola - DMSO	10^{-4} nM otopina rotenona u DMSO	10^{-3} nM otopina rotenona u DMSO	10^{-2} nM otopina rotenona u DMSO	10^{-1} nM otopina rotenona u DMSO

3.3. Aktivnost SA- β -Gal

Uklonio sam medij vakuum sisaljkom i stanice isprao u PBS-u koji sam također uklonio vakuum sisaljkom. Stanice sam fiksirao u otopini 1%-tnog glutaraldehida u DMEM-u, 10 minuta na sobnoj temperaturi. Za to vrijeme pripremio sam otopinu za bojanje. Stanice sam isprao 3 puta po 5 minuta u PBS-u i dodao im otopinu za bojanje (0.5 ml 20 mg/ml X-gal (5-bromo-4-3-indolil- β -galaktozid) u dimetil formamidu, 2 ml 0.2M limunska kiselina/Na fosfatni pufer (pH 6), 0.5 ml 100 mM otopina kalijevog ferocijanida $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \times 3\text{H}_2\text{O}$, 0.5 ml 100 mM otopina kalijevog ferocijanida $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 \times 3\text{H}_2\text{O}$, 0.36 ml 4 M otopina NaCl, 20 μl 1 M otopina MgCl_2 , 6.18 ml dH_2O). Poklopljenu pločicu sa 6 bunarića oblijepio sam po rubovima parafilmom da spriječim isparavanje. Inkubirao sam stanice na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ u inkubatoru bez CO_2 , 19 sati. Nakon inkubacije stanice sam isprao 3 puta u PBS-u te ih dehidrirao ispiranjem u otopini 70%-tnog etanola s 50 mM glicinom, 20 minuta na sobnoj temperaturi. Pripremljene preparate ostavio sam da se suše na zraku na sobnoj temperaturi, a zatim brojao

stanice na svjetlosnom mikroskopu pod faznim kontrastom. Postupak sam ponovio u nekoliko navrata tijekom rasta stanične kulture.

3.4. Vizualizacija mitohondrija fluorescentnim mikroskopom

U pločice sa 6 bunarića stavio sam pokrovna stakalca i na njih nasadio ~100 000 tretiranih i kontrolnih stanica u duplikatu kod određenog broja dioba. Stanice sam inkubirao na 37 °C u inkubatoru s 5%-tnim CO₂ kako bi se prihvatile za podlogu pokrovnog stakalca. Nakon dva dana stanicama sam uklonio medij te ih obojao bojom Hoechst (20 mM, Sigma) koja boja DNA stanice u plavo i probom MitoTracker Green FM (100 mM, Molecular Probes) koja specifično boja mitohondrijsku membranu u zlatno žuto (1000 µl DMEM bez fenol crveno + 2 kapi Hoechst + 0.1 µl MitoTracker Green FM). Stanice sam inkubirao 45 minuta na 37 °C, 5% CO₂ te ih isprao fiziološkom otopinom u trajanju od 10 minuta. Pločice sa 6 bunarića omotao sam aluminijskom folijom kako bih obojane stanice zaštitio od svjetla te ih snimio fluorescentnim mikroskopom pod adekvatnim filterima. Slike sam preklopio u programu ImageJ.

3.5. Analiza stanica na protočnom citometru

Stanice sam sakupio tripsinizacijom, istaložio centrifugiranjem 5 minuta na 1000 rpm, odstranio medij i resuspendirao u 900 µl DMEM + 10% FCS te dodao 2100 µl pufera FACS (dekomplementirani 4% FCS, 0.01% NaN₃, u PBS-u). Nakon bojanja stanica s 20 mM NAO u PBS-u (Molecular Probes) NAO koji se specifično veže za kardiolipin u mitohondrijima i inkubacije 20 minuta u mraku, stanice su podvrgnute analizi na protočnom citometru. Svaki uzorak sadržavao je ~700 000 stanica.

Uzorci su analizirani protočnim citometrom (FACSCalibur, Becton Dickinson, Mountain View, SAD) koji se sastoji od argonskog lasera, emisije pobudne valne duljine od 488 nm, crvenog diodnog lasera, emisije pobudne valne duljine od 635 nm te klasičnih optičkih filtera. Po svakom uzorku propušteno je 10 000 stanica, a uzorci su analizirani postavljanjem ograde na histogramu s dvoparametarskim raspodjelom stanica i to prema veličini (engl. *forward scatter*, FCS) i znatosti (engl. *side scatter*, SSC). Dobiveni rezultati analizirani su programom FlowJo v10.1 (FLOWJO, LLC, Data Analysis Software).

3.6. Određivanje duljine telomera

3.6.1. Izolacija genomske DNA

Genomsku DNA izolirao sam iz stanica koje su rasle u kulturi do potpune gustoće u kultivacijskim bočicama površine 75 cm². Stanice su sakupljene, izbrojane, određen im je broj dioba i nakon toga su centrifugirane 5 minuta na 1000 rpm te su resuspendirane u 1 ml kompletnog medija. Ponovno su centrifugirane 5 minuta na 2800 rpm, resuspendirane u 200 µl PBS-a te im je dodano 20 µl Proteinaze K (100 µg/ml, Sigma) i 4 µl RNaze A (100 mg/ml, Sigma). Inkubacija je trajala 2 minute na sobnoj temperaturi. DNA je izolirana pomoću Qiagen Dneasy Blood & Tissue Kit (kataloški broj 69506). Dodao sam 200 µl AL-pufera (100 mM natrijev hidroksid i SDS), pomiješao na mješalici da se dobije homogena smjesa i inkubirao 10 minuta na 56 °C. Dodao sam 200 µl 96 %-tnog etanola i još jednom promiješao. Uzorke sam nanio na kolone koje se nalaze u sabirnim epruvetama i sve je centrifugirao 1 minutu na 8000 okr/min u stolnoj centrifugi. Kolone sam isprao centrifugiranjem s 500 µl AW-1 pufera (40% izopropanol) (1 min. na 8000 rpm), a zatim s 500 µl AW-2 pufera (70% etanol) (3 min. na 14 000 rpm). Dodao sam 200 µl AE-pufera (10 mM Tris-CL i 0.5 mM EDTA; pH 9.0) za eluiranje, inkubirao 1 minutu na sobnoj temperaturi te centrifugirao 1 minutu na 8000 okr/min.

3.6.2. Provjera kvalitete DNA gel elektroforezom

Otopio sam 0.5 g agaroze u 40 ml pufera 1×TAE (40 mM Tris acetat i 1 mM EDTA) zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici i dodao 2.25 µl etidij-bromida (10 mg/ml) te tako pripremio 1%-tni agarozni gel. Nakon što se gel ohladio na ~40 °C, izlio sam otopinu u kalup i namjestio češalj za jažice. Gotov gel stavio sam u kadicu za elektroforezu i prelio ga 1×TAE puferom. U 6 µl svakog uzorka za nanošenje bilo je: 1 µl pufera za nanošenje, 1 µl uzorka DNA i 4 µl dH₂O. U prvu jažicu dodao sam 3 µl markera, ljestvicu Bst fragmenta λ DNA. Elektroforeza je trajala ~30 minuta na 70 V. Signale sam detektirao pod UV lampom, a rezultate fotografirao i analizirao programom GeneSnap 7.04. Iz dobivene slike ocijenila se kvaliteta uzoraka DNA.

3.6.3. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije DNA

Ukoliko se izolirana DNA želi upotrijebiti za daljnje postupke, potrebno je odrediti njezinu čistoću. Stoga se uzorku odredi apsorbancija pri valnim dužinama 230 nm (pokazuje onečišćenje fenolom, ureom, aromatskim spojevima i sl.), 260 nm (apsorbancija nukleinskih kiselina) i 280 nm (apsorbancija proteina). Ukoliko je omjer A_{260}/A_{280} od 1.8 do 2, to ukazuje na dobro pročišćenu DNA. Uzorku se prema baždarnoj krvulji odredi koncentracija DNA ($A_{260}/\epsilon \cdot c = 1.0$; $c = 50 \mu\text{l/ml}$).

Čisti pufer TE (Tris-EDTA) poslužio mi je kao slijepa proba. Mjerio sam omjer A_{260}/A_{280} da odredim čistoću izolirane DNA pomoću uređaja NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Termo Scientific).

3.6.4. Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima i elektroforeza u agaroznom gelu

Prema koncentraciji DNA određenoj spektrofotometrijski, izračunao sam potrebne volumene uzoraka tako da svaki sadrži 5 μg DNA. U epruvete sam stavio uzorke DNA, pufer 2, restrikcijske enzime RsaI i HinfI (15 jedinica, Roche (Tablica 2) te ih ostavio preko noći u inkubatoru bez CO_2 na 37 °C.

Tablica 2. Sadržaj restrikcijskih smjesa za cijepanje DNA.

	Kontrola	10^{-4} nM	10^{-3} nM	10^{-2} nM
Pufer 2 (μl)	18.55	17.6	42.60	22.10
DNA (μl)	164	156	381	196
RsaI (μl)	1.50	1.50	1.50	1.50
HinfI (μl)	1.50	1.50	1.50	1.50
ukupno (μl)	185.50	176.60	426	221

3.6.5. Koncentriranje DNA

Postupak:

Nakon što sam uzorku otopljene DNA dodao 0.66 $\mu\text{l}/100 \mu\text{l}$ DNA glikogen (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 1/10 volumena 3M natrijeva acetata (NaAc), pH 5.2 i 2.5 volumena 96% hladni etanol (Tablica 3), uzorke sam stavio na inkubaciju 2 sata na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Uzorke sam zatim centrifugirao 30 minuta na $4 \text{ }^\circ\text{C}$ pri 13 000 rpm. Supernatant sam odlio i dodao 200 μl 70%-tnog hladnog etanola te ponovno centrifugirao 15 minuta na $4 \text{ }^\circ\text{C}$ pri 13 000 rpm. Supernatant sam odlio, talog upario u vakuumu uz rotiranje te DNA eluirao u 20 μl AE-pufera (10 mM Tris-CL i 0.5 mM EDTA; pH 9.0).

Tablica 3. Sadržaj smjese za pretaloživanje DNA.

	Kontrola	10^{-4} nM	10^{-3} nM	10^{-2} nM
DNA (μl)	185.50	176.60	426	221
glikogen (μl)	1.22	1.16	2.81	1.45
NaAc (μl)	18.55	17.66	42.60	22.10
etanol (μl)	463.80	441.50	1065	552.50

Nakon pretaloživanja DNA, još sam jednom izmjerio koncentraciju pretaložene DNA spektrofotometrijski pomoću NanoDrop uređaja.

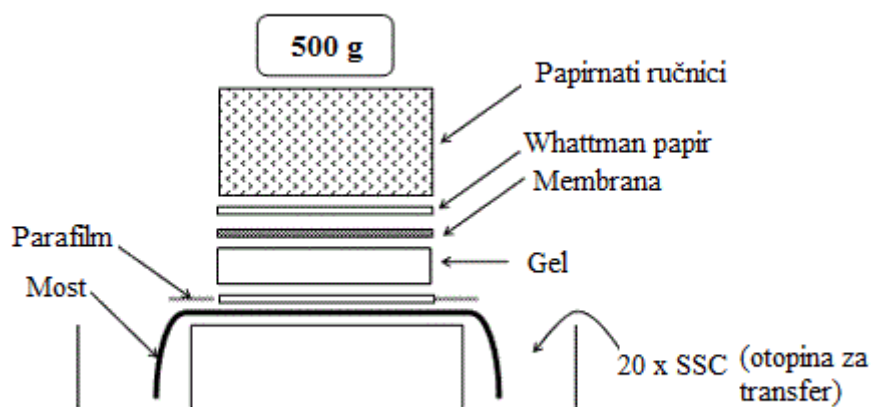
DNA fragmenti su razdvojeni elektroforezom u 0.8% agaroznom gelu (1.92 g agaroze, 240 ml $1\times\text{TAE}$ pufera, 10.8 μl EtBr). Kao biljeg molekularnih veličina upotrijebljen je DNA Molecular Weight marker II Dig (4 μl marker (0.12-23.1 kb) + 2 μl pufer za nanošenje ($6\times\text{LB}$ + 6 μl $1\times\text{TAE}$ pufer). U svaku jažicu stavio sam 20 μl DNA uzorka + 4 μl $6\times\text{LB}$. Elektroforeza se odvijala u $1\times\text{TAE}$ puferu + 60 μl EtBr pri naponu od 110 V tokom 3 sata te sam razdvajanje fragmentirane DNA provjeravao pod UV svjetlom (LKB Transilluminator, 2001).

3.6.6. Hibridizacija po Southernu

Nakon elektroforeze gel sam stavio u kadnicu na tresilicu u otopinu za depurinizaciju (36% HCl) 5 minuta. Gel se zatim isprao u dH_2O . Poslije ispiranja, uslijedila je denaturacija,

2x15 minuta uz lagano miješanje u otopini za denaturaciju (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl). Gel je ponovno ispran u dH₂O, a zatim je uslijedila neutralizacija 2x15 minuta u otopini za neutralizaciju (0.5 M Tris HCl pH 7.5, 3 M NaCl). Gel sam na kraju stavio na ispiranje u 2×SSC puferu (NaCl, Na-Citrat×2H₂O). Pozitivno nabijenu najlonsku membranu izrezao sam prema veličini gela i pripemio aparaturu za kapilarni prijenos (Slika 9).

Prijenos fragmenata DNA sa gela na membranu se odvijao preko noći na sobnoj temperaturi u 20×SSC-u kako se DIG-obilježeni marker ne bi raspao pri lužnatom transferu.



Slika 9. Aparatura za kapilarni prijenos. (preuzeto i prilagođeno prema http://www.biodynamics.co.jp/e/prd_use5.htm).

Sljedeći dan membranu sam kratko isprao u 2×SSC puferu, a gel provjerio pod UV svjetlom kako bih provjerio je li sva DNA uspješno prenešena. Membrana je kratko isprana u 2xSSC puferu, posušena na Whatman papiru te zagrijana na 120 °C u sterilizatoru tijekom 30 minuta.

Membranu sam stavio u tubus za hibridizaciju stranom na kojoj je DNA okrenutom prema unutra, ulio 17 ml predhibridizacijske otopine (0.25 M Na₂HPO₄ – pH 7.2, 1 mM EDTA, 20% SDS, 0.5% reagens za blokiranje (Roche) zagrijane na ~60 °C te stavio na predhibridizaciju 2 sata na 68 °C uz umjerenu rotaciju. Telomernu DNA, koju sam koristio kao hibridizacijsku probu za dobivanje signala prosječnih telomernih duljina, obilježio sam dioksigeninom, pomoću lančane reakcije polimerazom bez kalupa (engl. *non template PCR*).

Koristio sam početnice specifične za telomerni slijed DNA, tel4 (CCCTAA)₄ i tel5 (TTAGGG)₄ (Tablica 4). Amplifikacija se odvijala prema sljedećem programu: denaturacija – 95 °C, 1 minuta, 30 ciklusa; hibridizacija primera – 55 °C, 1 minuta i 40 sekundu, 30 ciklusa; elongacija – 72 °C, 1 minuta i 50 sekundi, 30 ciklusa; finalna elongacija – 72 °C, 7 minuta.

Tablica 4. Sastav reakcijske smjese u lančanoj reakciji polimerazom ukupnog volumena 50 μ l.

<i>PCR smjesa</i>	μ l
Tel4 početnica (10 μ M)	1
Tel5 početnica (10 μ M)	1
10 x Taq pufer	5
20 mM dNTP mix + dig-dUTP	1
25 mM MgCl ₂	8
Taq 0,5 U/ μ l	3
H ₂ O	31

Pripremio sam hibridizacijsku otopinu otapanjem telomerne probe u predhibridizacijskoj otopini. Telomernu probu, prije dodavanja u hibridizacijsku otopinu, denaturirao sam zagrijavanjem 10 minuta na 100 °C. Nakon predhibridizacije, odmah sam dodao hibridizacijsku otopinu kako ne bi došlo do renaturacije DNA te nastavio s hibridizacijom preko noći na 68 °C.

Sljedeći dan isprao sam nespecifično vezanu probu 3×20 minuta u puferu za ispiranje (20 mM Na₂HPO₄, 1 mM EDTA, 1% EDTA) koji je zagrijan na 65 °C (Roche).

Membranu sam isprao u puferu za ispiranje (0.1 M maleinska kiselina, 3 M NaCl, 0.3 % Tween20) 5 minuta uz lagano miješanje te inkubirao u blokirajućem puferu (pufer za ispiranje, 0.5 %-tni blokirajući reagens (Roche) 60 minuta na sobnoj temperaturi. Inkubaciju sam nastavio u otopini koju sam pripremio dodavanjem 30 ml blokirajućeg pufera i 1.5 μ l anti-DIG-AP konjugata (5 ng/ μ l) sljedećih 30 minuta. Nevezana antitijela uklonio sam ispiranjem membrane u puferu za ispiranje u novoj kadici 5×10 minuta te ju zatim inkubirao 2×5 minuta u supstratnom puferu (0.1 M Tris-HCl – pH 9.5, 0.1 M NaCl). Sva ispiranja radio sam u kadici na tresilici.

Sljedeće korake radio sam u tamnoj komori u kojoj sam razrijedio CDP-Star (Roche, 0.25 mM) u supstratnom puferu (1M Tris HCl, pH 9.5; 1M NaCl) u omjeru 1:100 (3.5 μ l CDP-Star u 350 μ l supstratnog pufera). Membranu sam prenio u plastičnu vrećicu i dodao CDP-Star te ga dobro raspodijelio po cijeloj membrani. Višak tekućine i zrak sam istisnuo, zatalio plastičnu vrećicu s membranom i inkubirao 10 minuta na sobnoj temperaturi. Pred kraj inkubacije, uz crveno svjetlo, izrezao sam rentgenski film (Kodak) prikladnih dimenzija, membranu stavio u kazetu i na nju pozicionirao film, sve zatvorio u kazeti za ekspoziciju filмова te stavio na tamno mjesto 60 minuta.

Film sam razvio uranjanjem u univerzalni razvijač (EFKE) 10 minuta, kratkim ispiranjem u vodi te uranjanjem u fiksir FR4 (EFKE) na 5 minuta. Nakon razvijanja, film sam isprao običnom i destiliranom vodom te ostavio da se suši na zraku.

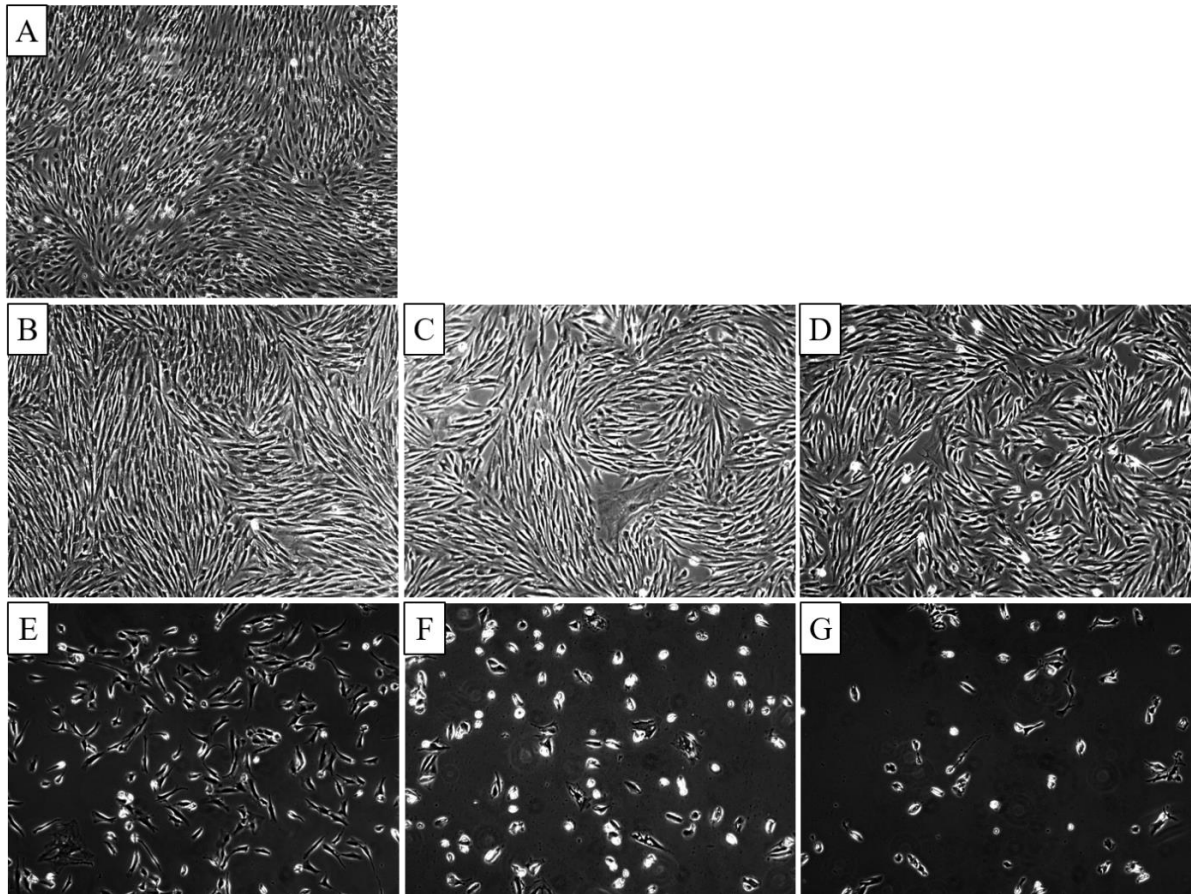
4. REZULTATI

4.1. Osjetljivost normalnih ljudskih fibroblasta na rotenon

Budući da se pri određenim koncentracijama rotenona, poznatim iz literature (Li i sur., 2003), stanice ne dijele te naposljetku odlaze u staničnu smrt, bilo je važno odrediti odgovarajuće koncentracije pri kojima stanice mogu održati homeostazu i proliferaciju. Kako bih odredio koncentracije rotenona koje dozvoljavaju rast normalnih ljudskih fibroblasta korištenih u ovom radu, 10^5 stanica s jednakim brojem dioba (PD 12.43) tretirao sam sa šest rastućih koncentracija rotenona (10^{-4} nM, 10^{-3} nM, 10^{-2} nM, 10^{-1} nM, 1 nM, 10 nM).

Nakon 96 sati rasta u kulturi stanice tretirane s 10^{-4} nM, 10^{-3} nM i 10^{-2} nM otopinom rotenona su održale homeostazu i rast. Od tretiranih stanica najveću gustoću postigle su stanice tretirane 10^{-4} nM otopinom rotenona, zatim 10^{-3} nM otopinom rotenona, dok su stanice u prisutnosti 10^{-2} nM rotenona rasle najsporije u odnosu na kontrolu. Preostale stanice tretirane 10^{-1} nM, 1 nM i 10 nM otopinom rotenona nisu se podijelile i njihov se broj smanjio. Stanice tretirane ovim koncentracijama rotenona odlazile su u staničnu smrt. Fibroblasti tretirani 10 nM i 1 nM koncentracijom rotenona imali su najveći pad broja stanica, dok se broj onih tretiranih s 10^{-1} nM otopinom rotenona neznatno smanjio (Slika 10).

Za daljnje eksperimente odabrao sam 10^{-4} nM, 10^{-3} nM, 10^{-2} nM i 10^{-1} nM koncentracije otopine rotenona koje su se pokazale kao odgovarajuće za tretiranje stanica i praćenje dinamike njihovog rasta.



Slika 10. Rast normalnih ljudskih fibroblasta u rastućim koncentracijama rotenona.

Stanice su slikane pod faznim kontrastom svjetlosnim mikroskopom. Stanice su tretirane kroz razdoblje od 96 sati s otopinama rotenona rastućih koncentracija: A) Kontrola, B) 10^{-4} nM, C) 10^{-3} nM, D) 10^{-2} nM, E) 10^{-1} nM, F) 1 nM, G) 10 nM.

4.2. Dinamika rasta i senescencije fibroblasta u kulturi u prisutnosti rotenona

Sa svrhom praćenja potencijala stanične proliferacije normalnih fibroblasta pod utjecajem rastućih koncentracija otopine rotenona, stanicama je prilikom svakog presađivanja određen broj dioba. Stanice su brojane u trenutku 80%-tne konfluencije.

Praćenjem staničnih dioba primjećen je trend razlike u brzini rasta pri pojedinim koncentracijama rotenona u odnosu na kontrolne stanice. Stanice tretirane s 10^{-4} nM i 10^{-3} nM otopinom rotenona imale su brži rast u odnosu na kontrolu dok su stanice tretirane 10^{-2} nM otopinom rotenona imale sporiji rast u odnosu na kontrolu. Stanice tretirane s 10^{-1} nM otopinom rotenona nisu pokazale značajniji rast te su bile zaustavljene u rastu (Slika 11).

Stare stanice koje su izgubile potencijal dioba mogu se identificirati i razlikovati od stanica koje nisu ušle u senescenciju po intenzivnom bojanju u plavo uz aktivnost SA- β -Gal. Dinamika starenja stanica u kulturi tretiranih spomenutim koncentracijama rotenona praćena je pomoću indeksa obilježavanja SA- β -Gal aktivnosti. Za tu svrhu stanice su tretirane rastućim koncentracijama otopine rotenona (10^{-4} nM, 10^{-3} nM, 10^{-2} nM, 10^{-1} nM) kroz određeno razdoblje.

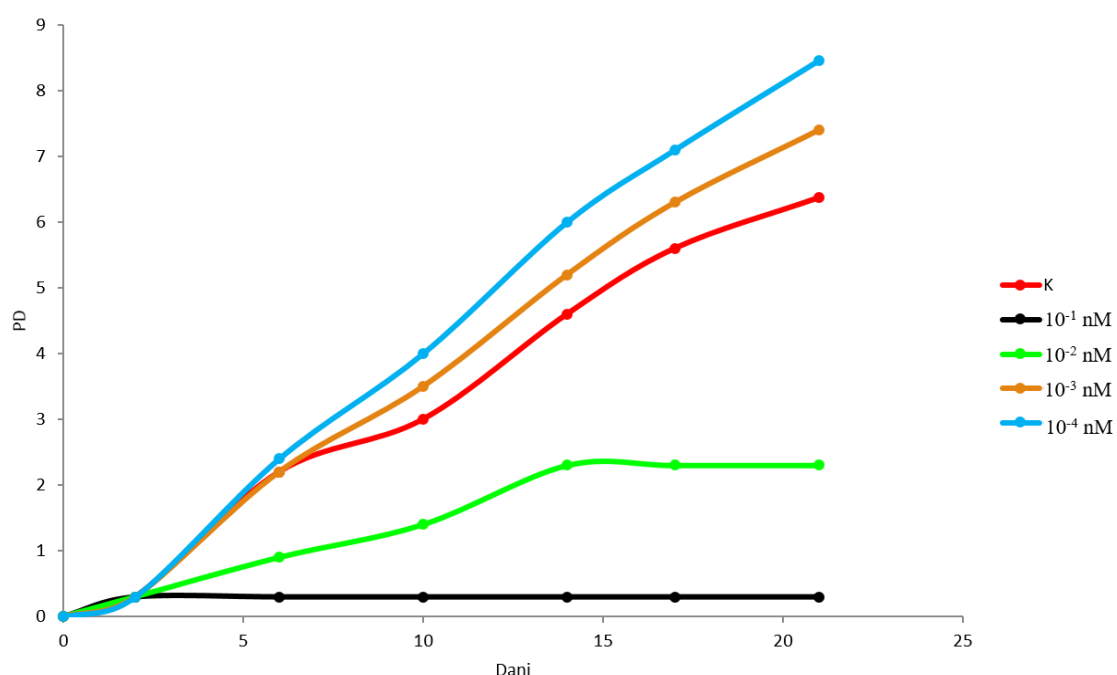
Tijekom praćenja krivulje rasta, pri svakom presađivanju određen je PD te je dio NFŽ stanica izdvojen za praćenje indeksa obilježavanja s SA- β -Gal (Tablica 5). Nakon bojanja, za statističku analizu izbrojao sam > 400 stanica svakog uzorka stanica.

Tablica 5. Broj udvostručenja populacije stanica kod kojih je mjeren SA- β -Gal.

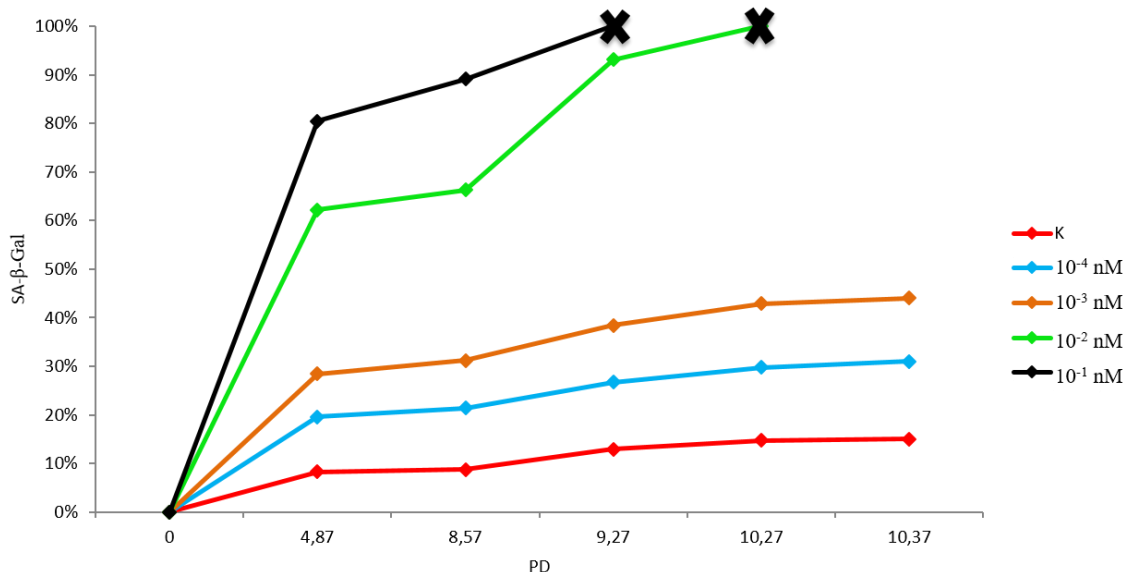
Kontrola	10^{-4} nM	10^{-3} nM	10^{-2} nM	10^{-1} nM
4.87	4.87	4.87	4.87	4.87
8.57	8.22	8.32	6.49	
9.27	9.08	8.80		
10.27	10.67	10.43		
10.37	10.97	10.67		

S porastom broja dioba, indeks obilježavanja s SA- β -Gal sve je više rastao u svim uzorcima stanica. U senescenciju, te naposljetku u apoptozu uz 100%-tnu aktivnost SA- β -Gal prvo su otišle stanice tretirane s 10^{-1} nM, a zatim i 10^{-2} nM rotenonom koje su postigle 4.84, odnosno 6.49 dioba. Stanice tretirane 10^{-4} nM i 10^{-3} nM otopinom rotenona su se i dalje dijelile te su imale nešto višu aktivnost SA- β -Gal od stanica kontrole. Za stanice tretirane s 10^{-4} nM rotenonom aktivnost SA- β -Gal bila je 31% kod 10.97 dioba, a za stanice tretirane s 10^{-3} nM rotenonom 44% kod 10.67 dioba. Kod kontrolnih stanica, njih je 15% pokazalo fenotip svojstven starim stanicama kod 10.37 dioba (Slika 12).

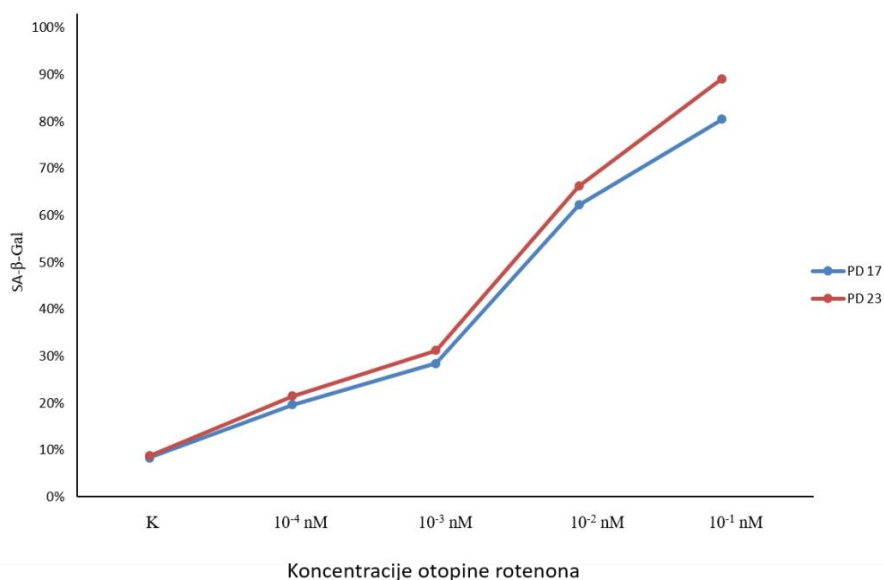
Također, s porastom koncentracija rotenona stanična aktivnost SA- β -Gal je rasla, a kod dvije koncentracije bila je 100% već nakon svega 3 (10^{-1} nM), odnosno 4 (10^{-2} nM) presađivanja (Slika 13). Kod takvih stanica mogle su se primijetiti i druge karakteristike starih stanica osim perinuklearnog intenzivno plavog obojenja kao što je značajno povećanje stanične površine, veće citoplazme te lateralne ekstenzije (Slika 14).



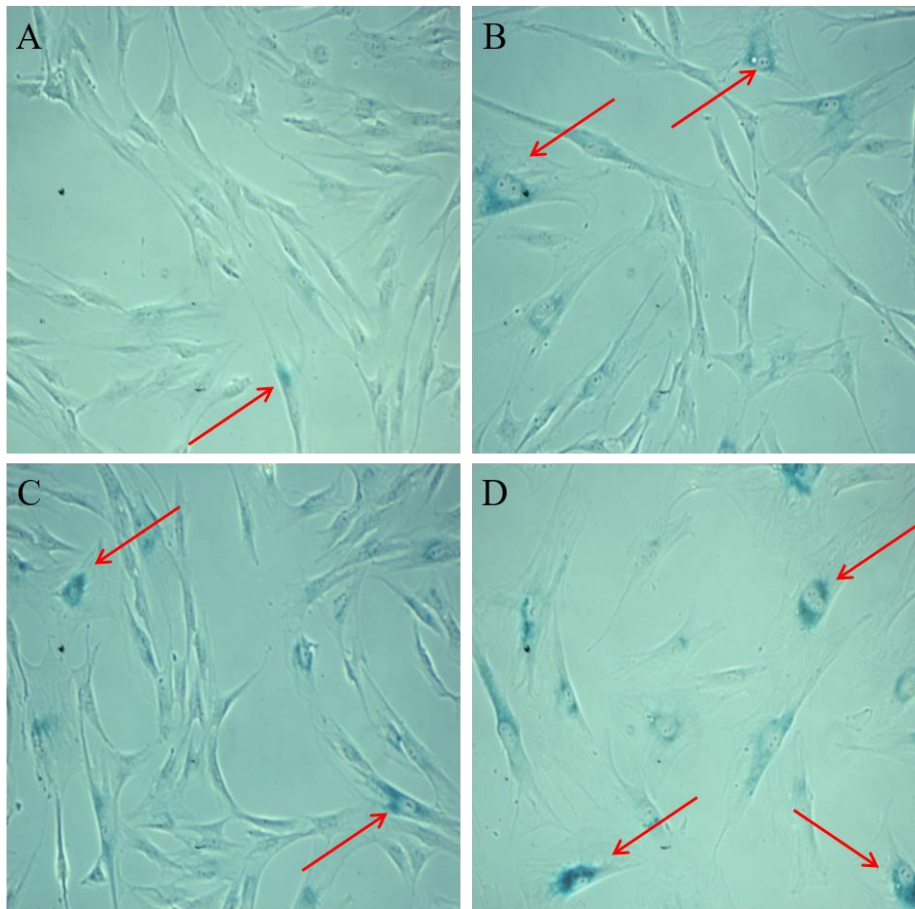
Slika 11. Krivulja rasta normalnih ženskih fibroblasta tretiranih rastućim koncentracijama rotenona. Stanice su praćene tijekom pet presađivanja. PD: broj udvostručenja populacije; K: kontrolne stanice; 10^{-4} nM: 10^{-4} nM otopina rotenona; 10^{-3} nM: 10^{-3} nM otopina rotenona; 10^{-2} nM: 10^{-2} otopina rotenona; 10^{-1} nM: 10^{-1} nM otopina rotenona.



Slika 12. Aktivnosti SA-β-Gal kod stanica NŽF u odnosu na broj udvostručenja populacije. Stanice su tretirane rotenonom i aktivnost SA-β-Gal detektirana kod odgovarajućeg broja udvostručenja. Stanice tretirane s 10⁻² nM i 10⁻¹ nM rotenonom prestale su se dijeliti te su dosegle 100% aktivnost SA-β-Gal (označeno X). K: aktivnost SA-β-Gal kod kontrolnih stanica; 10⁻⁴ nM: aktivnost SA-β-Gal kod stanica tretiranih 10⁻⁴ nM otopinom rotenona; 10⁻³ nM: aktivnost SA-β-Gal kod stanica tretiranih 10⁻³ nM otopinom rotenona; 10⁻² nM: aktivnos SA-β-Gal kod stanica tretiranih 10⁻² nM otopinom rotenona; 10⁻¹ nM: aktivnost SA-β-Gal kod stanica tretiranih 10⁻¹ nM otopinom rotenona.



Slika 13. Aktivnost SA-β-Gal u ovisnosti o koncentraciji rotenona. Normalni ženski fibroblasti tretirani s rastućim koncentracijama rotenona. PD 17: aktivnost SA-β-Gal kod stanica koje su prošle 17 populacijskih dioba; PD 23: aktivnost SA-β-Gal kod stanica koje su prošle 23 populacijskih dioba.



Slika 14. Aktivnost SA- β -Gal. Normalni ženski fibroblasti tretirani rastućim koncentracijama rotenona : A) Kontrola, B) 10^{-4} nM, C) 10^{-3} nM, D) 10^{-2} nM. Stanice s tipičnim fenotipom SA- β -Gal označene su crvenom strelicicom. Stanice su promatrane svjetlosnim mikroskopom pod faznim kontrastom.

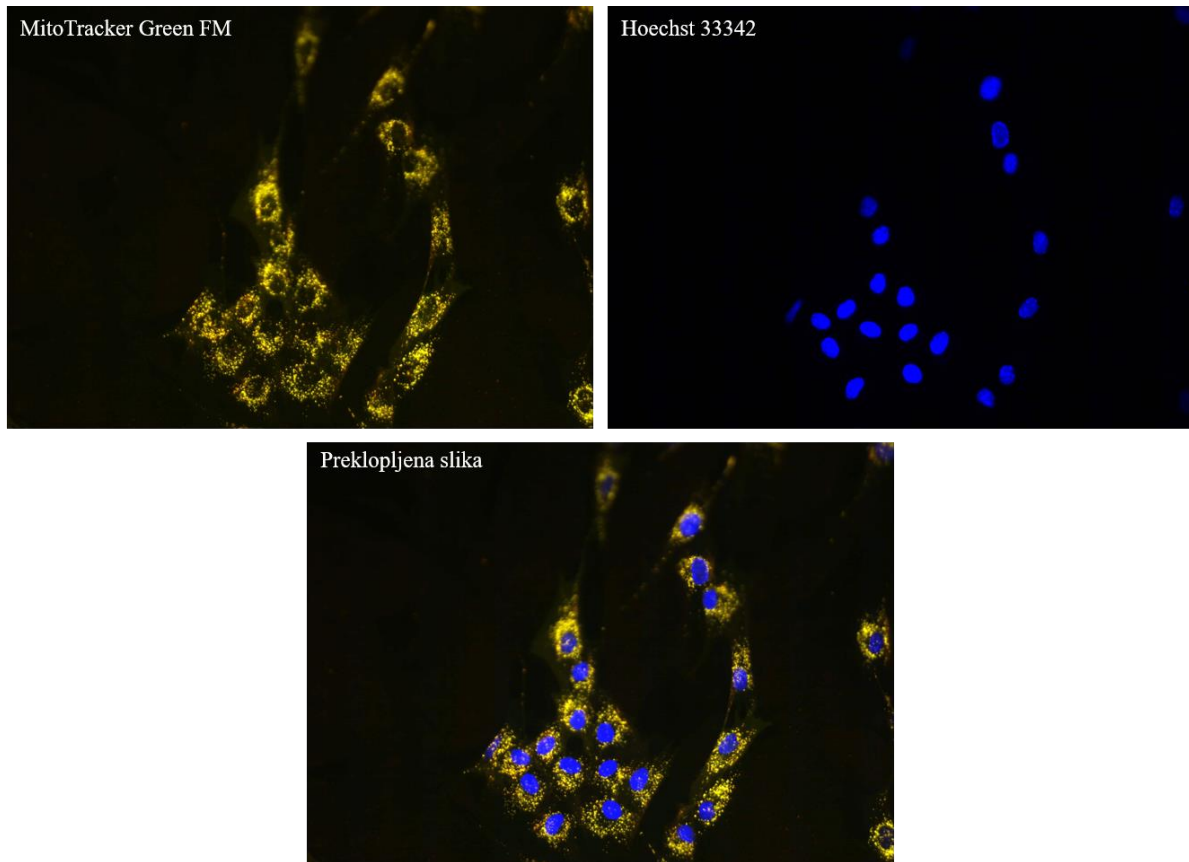
4.3. Ponašanje mitohondrija

4.3.1. Dvostruko bojanje i vizualizacija mitohondrija

Da bismo mogli vidjeti mitohondrije u tretiranim stanicama, koristio sam probu MitoTracker Green FM koja specifično boji unutrašnju membranu mitohondrija. Za vizualizaciju staničnih jezgara koristio sam boju Hoechst 33342.

Za bojanje i vizualizaciju mitohondrija korištene su stanice kod različitih PD (Tablica 6). Tijekom dvostrukog bojanja, a potom i vizualizacije, proba MitoTracker Green FM i boja Hoechst ne interferiraju u apsorpciji/emisiji i lokaciji. MitoTracker Green FM fluorescira u zeleno-žutom spektru, a Hoechst u plavo-ljubičastom spektru (Slika 15). Prilikom preklapanja

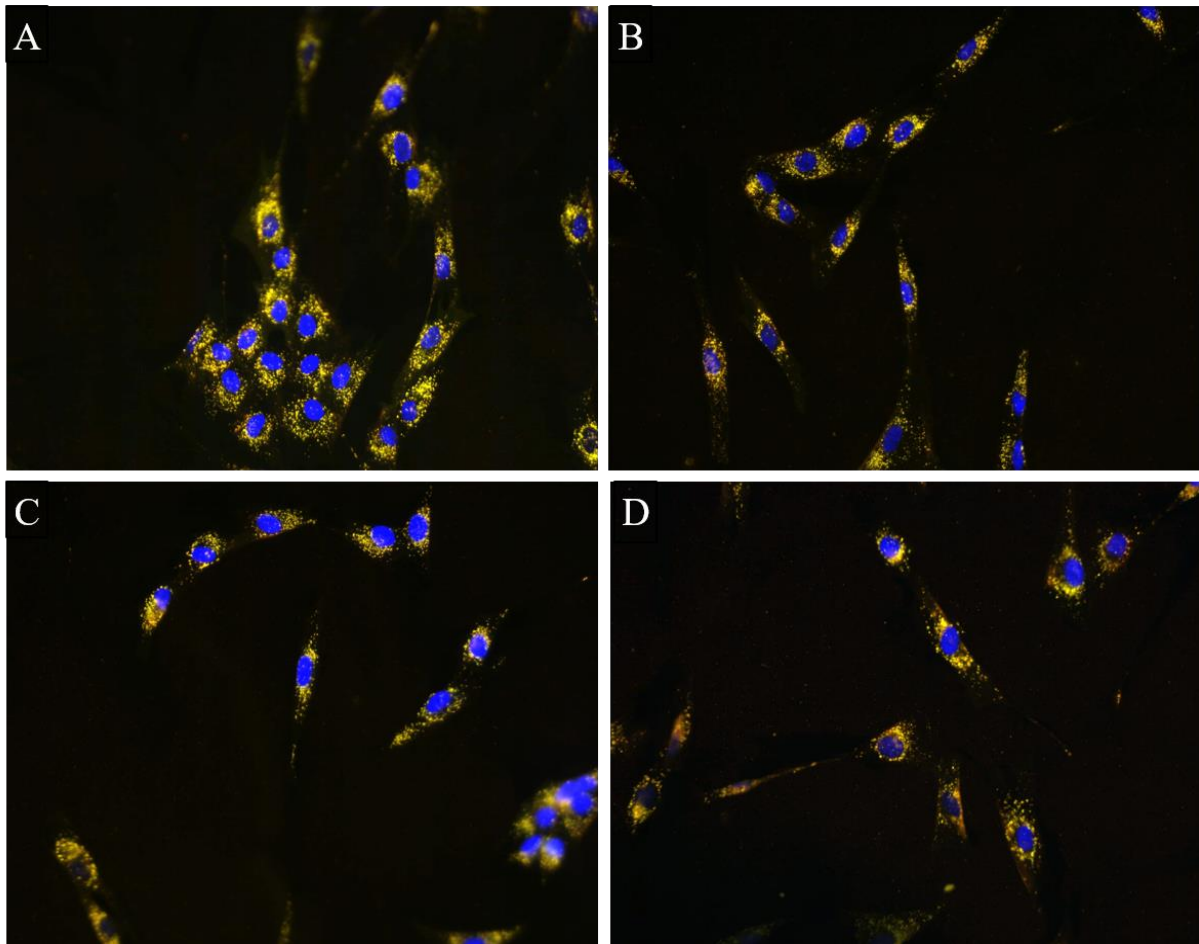
slika dobivenih fluorescentnim mikroskopom dobivene kompozitne slike su vrlo jasne (Slika 16).



Slika 15. Mitochondriji obojani u žuto probom MitoTracker Green FM i jezgre obojane u plavo bojom Hoechst 33342. Preklopljena slika mitohondrija i jezgara.

Tablica 6. Broj udvostručenja populacije stanica kod vizualizacije mitohondrija.

Kontrola	10^{-4} nM	10^{-3} nM	10^{-2} nM
23.52	22.65	22	19.32



Slika 16. Stanice NFŽ obojane MitoTracker Green i Hoechst 33342 snimljene fluorescentnim mikroskopom. Slike A) kontrola, B) 10^{-4} nM, C) 10^{-3} nM, D) 10^{-2} nM rotenon. Unutrašnje membrane mitohondrija obojane u žuto s MitoTracker Green FM, a jezgre obojane u plavo s Hoechst 33342.

4.3.2. Kvantitativni prikaz mitohondrija u stanici

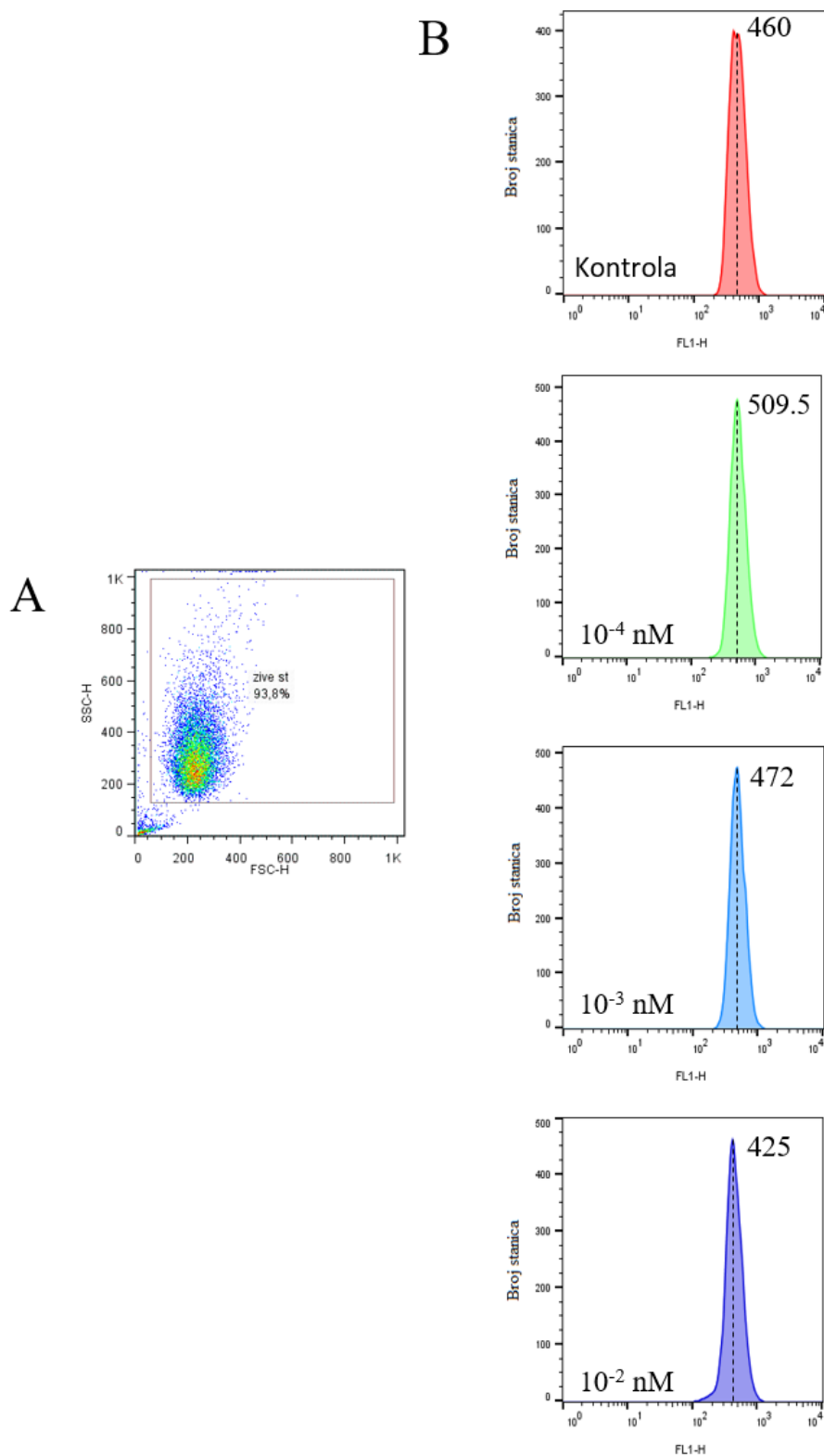
Za analizu mase mitohondrija u fibroblastima tretiranih različitim koncentracijama rotenona korištena je boja NAO, a analizirane su protočnim citometrom FACSCalibur. Kako bih izbjegao pozadinski šum koji stvaraju nežive stanice i razne čestice koje se mogu naći u mediju, važno je odrediti parametre veličine (FCS-parametar) i granularnosti (SSC-parametar) živih stanica te ih odvojiti od neživih i raspadnutih stanica. Pomoću ova dva parametra određene su morfološke karakteristike populacije živih stanica koje su bile označene ogradom te koje su bile uzete za daljnju analizu.

Prije analize mase mitohondrija kontrolne stanice normalnih ženskih fibroblasta te stanice tretirane određenim koncentracijama rotenona (10^{-4} nM, 10^{-3} nM, 10^{-2} nM) rasle su u kulturi, a za samu analizu stanice su sakupljene, određen im je broj dioba te su bojane fluorescentnom bojom NAO koja specifično boja mitohondrije (Tablica 7). Analiza mase mitohondrija na protočnom citometru napravljena je kod 24.5 dioba staničnih kultura kako je opisano u Materijalima i metodama. Ovi rezultati su pokazali kako se ponašaju mitohondriji u odnosu na rast i starenje stanica pod utjecajem rastućih koncentracija rotenona.

Najveći intenzitet boje NAO, a time i masu mitohondrija imale su kulture tretirane s 10^{-4} nM rotenonom (509.50), zatim 10^{-3} nM rotenonom (472), dok su stanice tretirane s 10^{-2} nM rotenonom imale manji intenzitet (425) u odnosu na kontrolne stanice s vrijednošću 460 (Slika 17).

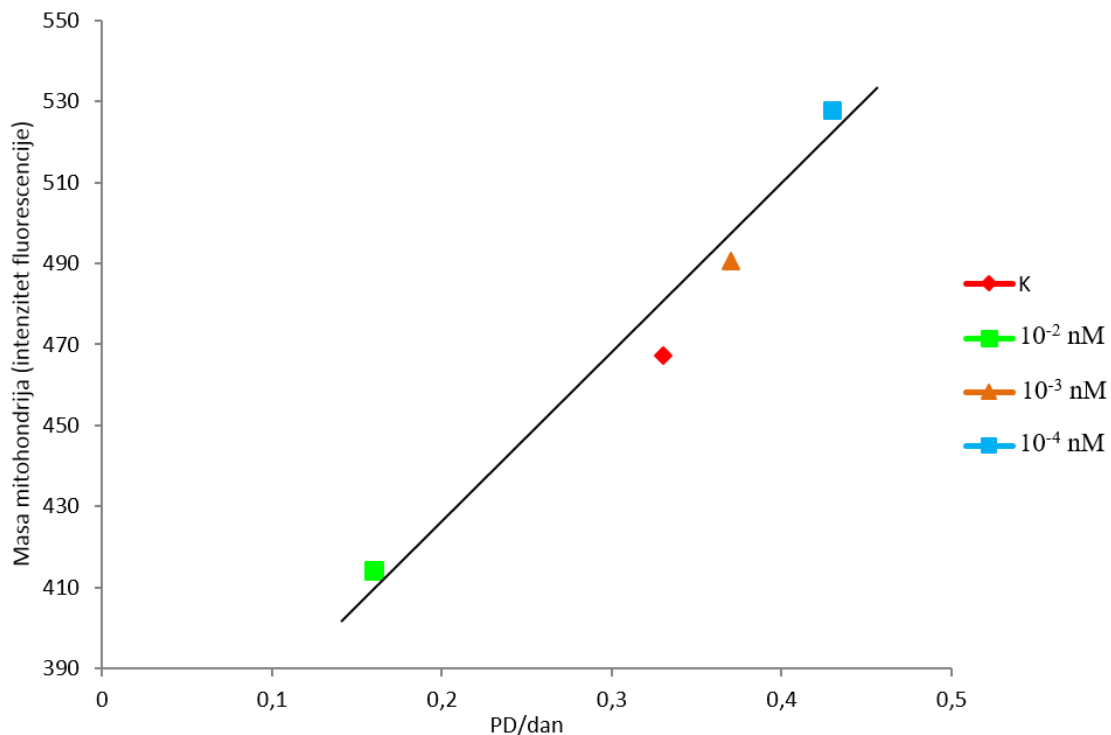
Tablica 7. Broj udvostručenja populacije stanica kod analize protočnim citometrom

Kontrola	10^{-4} nM	10^{-3} nM	10^{-2} nM
24.60	24.60	24.40	24.30



Slika 17. Analiza mase mitohondrija protočnim citometrom. A) U prikazu „Dot-plot“ određuju se morfološke karakteristike fibroblasta protočnim citometrom prema parametru FCS (predstavlja veličinu stanice) i parametru SSC (predstavlja granuliranost). B) Intenzitet fluorescentne boje NAO kod stanica tretiranih različitim koncentracijama rotenona (10^{-4} nM, 10^{-3} nM, 10^{-2} nM). FL1-H: intenzitet fluorescencije boje NAO.

Povećani broj dioba povezan je s masom mitohondrija. Rezultati pokazuju da se s porastom brzine rasta stanica, masa mitohondrija povećava linearno. Prema tome, stanice tretirane s 10^{-4} nM rotenonom su imale najveću masu mitohondrija uz najbrži rast, druge po masi mitohondrija bile su stanice tretirane s 10^{-3} nM rotenonom koje slijede stanice tretirane s 10^{-4} nM rotenonom. Najmanju masu mitohondrija imale su stanice tretirane s 10^{-2} nM rotenonom koje su ujedno imale i najsporiji rast. Kontrolne stanice imaju manju mitohondrijsku masu u odnosu na stanice tretirane s 10^{-4} nM i 10^{-3} nM rotenonom, ali veću od stanica tretiranih s 10^{-2} nM rotenonom (Slika 18). Dakle, male koncentracije otopine rotenona djeluju stimulatивно na metabolizam mitohondrija i brzinu rasta NFŽ fibroblasta.



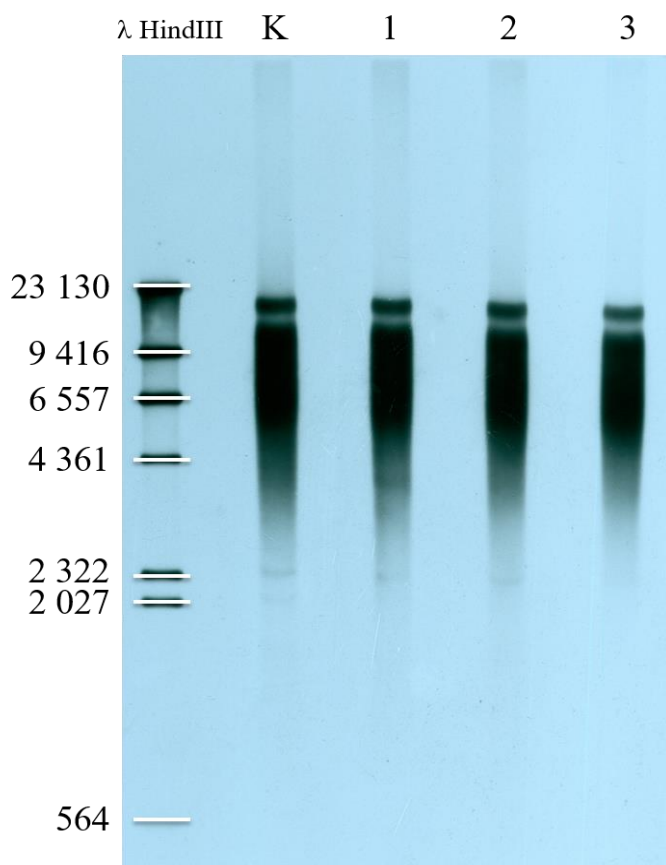
Slika 18. Odnos mase mitohondrija i brzine rasta NFŽ fibroblasta tretiranih s rastućim koncentracijama rotenona. PD/dan: broj udvostručavanja populacije stanica po danu.

Stanice tretirane rastućim koncentracijama rotenona: K) kontrolne stanice; 10^{-4} nM: 10^{-4} nM otopina rotenona; 10^{-3} nM: 10^{-3} nM otopina rotenona; 10^{-2} nM: 10^{-2} otopina rotenona; 10^{-1} nM: 10^{-1} nM otopina rotenona.

4.4. Dinamika skraćivanja telomera

Važnost skraćivanja telomera za potencijal stanične proliferacije danas je dobro poznata te se smatra najvažnijim mehanizmom kontrole rasta stanica u kulturi.

Sa svrhom praćenja utjecaja rastućih koncentracija rotenona na dinamiku skraćivanja telomera tijekom rasta normalnih ženskih fibroblasta u kulturi, izolirana je ukupna genomska DNA kod približno 25 dioba (Tablica 8). Za hibridizaciju po Southernu upotrijebljena je izolirana DNA kojoj je izmjerena koncentracija prije i nakon razgrađivanja restrikcijskim enzimima te koncentriranja DNA (Tablica 9 i 10). Hibridizacija se odvijala s telomernom probom obilježenom dioksigeninom, a telomerni fragmenti detektirani su pomoću kemiluminiscencije (Slika 19).



Slika 19. Hibridizacija po Southernu telomernih fragmenata. DNA je izolirana iz stanica tretiranih rastućim koncentracijama rotenona: K) kontrola, 1) 10^{-2} nM, 2) 10^{-3} nM, 3) 10^{-4} nM otopina rotenona. Lambda Hind III: biljeg molekulske mase u broju parova baza.

Tablica 8. Broj udvostručenja populacija stanica iz kojih je izolirana DNA.

	Kontrola	10 ⁻⁴ nM	10 ⁻³ nM	10 ⁻² nM
PD	25.80	26	25.10	24.30

Tablica 9. Omjer A_{260/280} i koncentracija DNA uzoraka.

	Kontrola	Kontrola	10 ⁻⁴ nM	10 ⁻⁴ nM	10 ⁻³ nM	10 ⁻³ nM	10 ⁻² nM	10 ⁻² nM
A _{260/280}	1.80	1.80	1.90	1.85	1.80	1.80	1.90	1.85
μl/ml	27.90	22.20	25.60	25.90	27.50	16.45	19.90	21.70

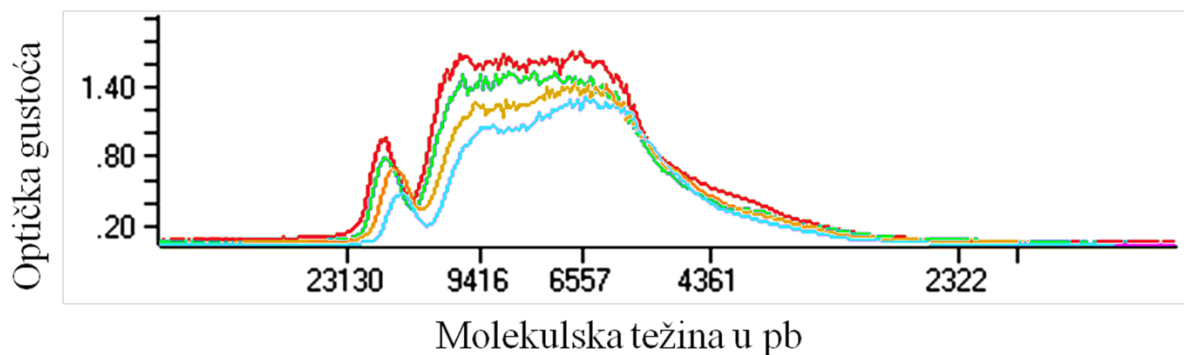
Tablica 10. Koncentracija pretaložene DNA.

	Kontrola	10 ⁻⁴ nM	10 ⁻³ nM	10 ⁻² nM
ng/ml	3779.20	356.50	589.50	515.65
A _{260/280}	1.85	1.95	1.85	1.95
μg u 20 μl AE-pufera	7.50	7.10	11.70	10.30

Pomoću računalnog programa Image Master VDS Software koji pretvara gustoću signala u numeričke vrijednosti, denzitometrirao sam sliku filma i dobio grafikone razdiobe molekulske veličine telomerne DNA (Slika 20). Denzitometrija jednoznačno pokazuje unutarnji profil veličina telomera te je statističkom obradom denzitometrijskih podataka određena srednja vrijednost duljine telomera. Za denzitometrijsko određivanje srednje vrijednosti telomera uzet jer raspon telomerne DNA od ~23 129 pb do ~3511 pb.

Uočen je trend smanjenja dužine telomera kod stanica tretiranih različitim koncentracijama rotenona. Nakon 7 dioba u otopinama rotenona stanice su napravile približno jednak broj dioba u odnosu na kontrolne stanice. Prosječna duljina telomera kontrolnih stanica bila je 7729.70 pb, stanica tretiranih s 10⁻² nM rotenonom 7710.80 pb, 10⁻³ nM rotenonom 7330.10 pb i 10⁻⁴ nM rotenonom 6995 pb (Tablica 11). Prosječna duljina telomera stanica tretiranih s 10⁻² nM rotenonom se nije značajno smanjila (~20 pb), dok je opadanje u

prosječnoj duljini telomera kod stanica tretiranih s 10^{-3} nM i 10^{-4} nM rotenonom bilo značajnije te je iznosilo ~400 pb odnosno ~735 pb u odnosu na prosječnu duljinu telomera kontrolnih stanica.



Slika 20. Denzitometrijska analiza telomerne DNA tretiranih rastućim koncentracijama rotenona. Vrijednost na ordinati predstavlja optičku gustoću, a vrijednost na apscisi standardne molekulske težine markera DIG- λ HindIII u broju parova baza (pb). Crveno – kontrola, zeleno – 10^{-2} nM, narančasto – 10^{-3} nM, plavo – 10^{-4} nM rotenon.

Tablica 11. Prosječne duljine telomera kod stanica tretiranih rastućim koncentracijama rotenona.

	Kontrola	10^{-4} nM	10^{-3} nM	10^{-2} nM
Prosječna duljina telomera (pb)	7729.70	6995	7330.10	7710.80

5. RASPRAVA

Do danas su provedna mnoga istraživanja o utjecaju rotenona, inhibitora mitohondrijskog kompleksa I, na vijabilnost različitih stanica. Rotenon inhibira prijenos elektrona s kompleksa I do ubikinona te tako narušava homeostazu u transportnom lancu elektrona u mitohondriju (Marthandan i sur., 2015). Ovaj slijed događaja može dovesti do povećanog stvaranja ROS-ova u mitohondrijima (Li i sur., 2003) koji uzrokuju reverzibilna ili trajna oštećenja na staničnom nivou, a time i na nivou tkiva i organa. Ovakva pojava oksidativnog stresa povezana je s ubrzanim skraćivanjem telomera i naposljetku vodi do replikativnog starenja stanica te starenja na razini organizma (Richter i von Zglinicki, 2007). Jednom pokrenut, ireverzibilni gubitak potencijala staničnih dioba očituje se senescentnim fenotipom stanica kojeg među ostalom karakterizira i povećano bojanje starih stanica u plavo, odnosno povećana aktivnost SA- β -Gal (von Zglinicki, 2002). U ovom istraživanju istražili smo vijabilnost stanica normalnih ženskih fibroblasta koje su pokazale različit odgovor s obzirom na rastuće koncentracije rotenona u kulturi.

Normalni ženski fibroblasti kože vrlo su osjetljivi na rotenon. S obzirom na stanice drugog tipa, stanice NF ζ odlaze u apoptozu već kod 10^{-1} nM koncentracije rotenona. Pri većim koncentracijama preživljavaju te se stanični rast čak i ubrzava. Zbog inhibicije respiratornog sustava mitohondrija pri većim koncentracijama rotenona u kompleksu I dolazi do apoptoze stanica. Otpornije stanice na rotenon su plućni fibroblasti (MRC-5) koji u apoptozu odlaze tek nakon 10^{-1} μ M koncentracije rotenona, a razlog tome smatra se stalna izloženost atmosferskom kisiku u plućima (Marthandan i sur., 2015). Tumorske stanice također su otpornije na rotenon, pa tako i stanice akutne promijelocitne leukemije (stanična linija HL-60). Tek kod 500 nM koncentracije rotenona 96% HL-60 stanica ulazi u apoptozu (Li i sur., 2003). Armstrong i sur. (2001) pokazali su da kod stanica ljudskog B limfoma (stanična linija PW) uslijed otpuštanja mitohondrijskog citokroma *c* u citosol i aktivacije kaspaze 3, povezanih sa staničnim arestom u fazi G₂/M staničnog ciklusa, dolazi do apoptoze kod stanica tretiranih koncentracijama rotenona od 1-5 μ M. PW stanice tretirane s 10^{-1} μ M koncentracijom rotenona pokazale su sličnu vijabilnost kao i kontrolne stanice. Stanična smrt kod stanica tiroidnog karcinoma (stanična linija TPC-1) tretiranih rotenonom povezana je s fosforilacijom p53 na serinu 15 i njegovom povećanom aktivnošću. Također povećava se ekspresija inhibitora kinaze ovisne o ciklinu p21 u stanici (Gonçalves i sur., 2011). Dokazano je da s povećanjem koncentracije rotenona dolazi do povećanja aktivnosti kaspaze 3 (Giordano i sur., 2012). Smanjena produkcija ATP oksidativnom fosforilacijom zbog inhibicije prijenosa protona i pretjerana akumulacija ROS-ova je ključan korak za aktivaciju

apoptoze (Shaikh i Nicholson, 2009). Pri visokim koncentracijama, rotenon ima i sekundarno toksično djelovanje. Smatra se da stanični zastoj u fazi G₂/M može biti direktna posljedica inhibicije polimerizacije mikrotubula što onemogućava stanici da normalno kompletira stanični ciklus prolaskom kroz mitozu (Barrientos i Moraes, 1999).

Uzgajane u kulturi, normalne ljudske stanice imaju reproducibilno ograničen broj dioba (Hayflick i Moorhead, 1961). U ranoj fazi kultivacije prolaze razdoblje brzog rasta koje karakterizira i brzo dijeljenje stanica. Nakon određenog broja dioba rast kulture se usporava te se stanice naposljetku trajno zaustave u G₁ fazi staničnog ciklusa. Taj proces naziva se replikativno starenje prilikom kojeg stanice dosegnu Hayflickov limit (Hayflick 1965). Kroz pet presađivanja u našem eksperimentu primjećen je trend u diobenom potencijalu stanica tretiranih rastućim koncentracijama rotenona. Niske doze rotenona (10⁻⁴ i 10⁻³ nM) omogućile su ubrzani rast staničnih kultura normalnih ženskih fibroblasta, dok se stanicama tretiranim većim dozama rast usporio ili su ušle u apoptozu. Inhibicija kompleksa I u mitohondrijima stimulira hipoksiju u stanici, smanjena je potrošnja kisika kao rezultat inhibicije mitohondrija, iako je u uvjetima normoksije u kojima se stanice uzgajaju prisutnost kisika u stanici na normalnoj razini. Pokazalo se da je doza rotenona potrebna za 40%-tno smanjenje potrošnje kisika u mitohondrijima poklapa s dozom odgovornom za gubitak 50% vijabilnih stanica u kulturi (Giordano i sur., 2012). U normalnim uvjetima u kulturi stanice rastu pri 20%-tnog parcijalnog tlaka kisika, no u posebno konstruiranim inkubatorima taj se postotak može smanjiti ili povećati. Parcijalni tlak kisika manji od 20%, naročito između 5 i 10%, ubrzava stanični rast i povećava broj staničnih dioba prije zaustavljanja rasta za otprilike 25% tj. za 20-ak dioba (Packer i Fuehr, 1977), dok parcijalni tlak kisika veći od 20% uzrokuje usporavanje rasta i smanjenje broja staničnih dioba (von Zglinicki i sur., 1995). Za produljenje replikativnog života normalnih primarnih ljudskih diploidnih plućnih fibroblasta (PHLF) u kulturi, Bell i sur. (2007) navode da je za taj proces odgovorna hipoksija uslijed stvaranja ROS-ova. Nastali ROS-ovi u stanici zatim aktiviraju faktor HIF koji može aktivirati gen za hTERT, a telomerazna aktivnost omogućiti produljeni replikativni životni vijek stanica. Dok povećana proizvodnja ROS kod stanica tretiranih većim koncentracijama rotenona uzrokuje velika oštećenja, u stanicama tretiranim niskim dozama rotenona stvara se niža količina ROS. Takva smanjena razina ROS može biti korisna i rezultirati produljenjem staničnih dioba. Efekt se zove hormeza i govori da potencijalno štetne tvari pri malim dozama mogu imati korisno djelovanje. Gonçalves i sur. (2011) uspjeli su inhibirati rast stanica TPC-1 nakon 24 sata tretmana s 5 μM rotenonom. Inhibicija aktivnosti mitohondrijskog kompleksa I

dovodi do aktivacije apoptoze i zbog smanjene prisutnosti ATP u stanici. Giordano i sur. (2012) pokazali su da se kod stanica neuroblastoma (stanična linija SH-SY5Y) sinteza ATP u potpunosti inhibira pri 100 nM koncentraciji rotenona. No, stanice tretirane niskim dozama rotenona koje imaju produženi stanični ciklus ne idu u apoptozu. Ova je pojava povezana s povećanom stopom glikolize kako bi se nadoknadila proizvodnja ATP onemogućenog stvaranjem u transportnom lancu elektrona (Bagui i sur., 1999).

Stare stanice koje su prestale proliferirati ostaju vijabilne i prolaze različite morfološke i biokemijske promjene. Njihove karakteristike su povećanje površine i volumena citoplazme, lateralne ekstenzije, povećana granuliranost i povećana aktivnost lizosomske β -galaktozidaze (Dimri i sur., 1995). Za praćenje dinamike starih stanica tretiranih rastućim koncentracijama rotenona, kao biomarker korištena je metoda određivanja aktivnosti SA- β -Gal. S porastom koncentracije rotenona kao i povećanjem broja dioba postotak plavih stanica je kontinuirano rastao. Veći indeks obilježavanja s SA- β -Gal u odnosu na kontrolne stanice imale su stanice tretirane s rotenonom. Stanice tretirane manjim dozama (10^{-4} i 10^{-3} nM) su ujedno imale i veći broj dioba od kontrolnih. S druge strane, stanice tretirane većim koncentracijama rotenona (10^{-2} nM) imale su također veći postotak SA- β -Gal, ali manji broj dioba od kontrole. Marthandan i sur. (2015) pokazali su povećanje SA- β -Gal aktivnosti kod stanica MRC-5 tretiranih 100 nM otopinom rotenona. Stanice TPC-1 tretirane rotenonom nakon pet dana pokazale su senescentni fenotip s povećanjem veličine i povećanom ekspresijom β -galaktozidaze. Morfološko povećanje stanične površine u direktnoj je vezi s prekomjernom ekspresijom F-aktina (Gonçalves i sur., 2011). Povećana aktivnost SA- β -Gal kod stanica koje imaju veći diobeni potencijal može se objasniti sniženjem pH u stanici. Fibroblasti BHK-21 tretirani tijekom 15 minuta otopinom rotenona pokazali su pad citoplazmatskog pH za 0.25-0.35 (Erecinksa i sur., 1995). Nadalje, zbog povećane stope glikolize u citosolu kako bi se stvorio potrebni ATP, dolazi do stvaranja laktata i ekstracelularnog zakiseljavanja (Giordano i sur., 2012), te svojim djelovanjem rotenon smanjuje sposobnost stanice da izbaci kiseline iz stanice (Milner i sur., 2007). Ovakav kiseli signal mogao bi navesti β -galaktozidazu da izađe iz lizosoma. Također može doći do oštećenja membrane lizosoma zbog povećane količine ROS-ova u stanici i otpuštanja sadržaja u citosol te oštećenja staničnih komponenti. Dodatno, takav raspad lizosoma može inducirati „kiselu upalu“ u citosolu uzrokujući nekrozu (Boya i Kroemer, 2008).

S obzirom da je rotenon inhibitor kompleksa I respiratornog sustava, procijenjen je njegov efekt na masu mitohondrija. Za određivanje mase mitohondrija protočnim citometrom

korištena boja NAO, a dodatno za vizualizaciju mitohondrija fluorescentnim mikroskopom korištena je proba MitoTracker Green FM. Intenzitet NAO fluorescencije kod NFŽ stanica tretiranih rotenonom rastao je sa smanjenjem koncentracija otopine rotenona. Fluorescentni intenzitet NAO podudara se sa staničnim rastom. Stanice kojima su se produžile stanične diobe imale su najveći intenzitet fluorescencije, dok je intenzitet fluorescencije stanica s manjim staničnim rastom u odnosu na kontrolu bio manji. Nakon tretmana stanične linije TPC-1 rotenonom intenzitet fluorescencije NAO se povećao što je sugeriralo povećanje mase mitohondrija. Značajnom postotku stanica smanjio se membranski potencijal mitohondrija, no drugim stanicama došlo je do povećanja membranskog potencijala koji se objašnjava stimulacijom mitohondrijske biogeneze (Gonçalves i sur., 2011). Prilikom narušavanja membranskog potencijala mitohondrija može doći do nepravilne permeabilnosti membrana i ulaska vode u matriks bogat proteinima. Povećanje volumena matriksa može uzrokovati puknuće vanjske membrane i otpuštanje proteina, smještenih u međumembranskom prostoru, u citosol. Otpuštanjem u citosol citokrom *c* i faktor indukcije apoptoze (AIF) aktiviraju kaspaze važne u aktivaciji apoptoze (Reed i sur., 1998). Tijekom hipoksije AMPK signalni put aktivira ekspresiju transkripcijskog koaktivatora PGC-1 α koji zatim inducira ekspresiju ključnih gena povezanih s mitohondrijskom biogenezaom. To su mitohondrijski DNA transkripcijski faktor A (TFAM), aminolevulinska sintetaza (ALAS) i citokrom *c*. PGC-1 α aktivira nuklearni respiratorni faktor 2 (NRF2) te zajedno s njim aktivira NRF1. Jednom aktivirani NRF1 i NRF2 aktiviraju TFAM koji je direktno odgovoran za transkripciju mitohondrijalnih strukturnih proteina i proteina uključenih u mtDNA transkripciju, translaciju i popravak koji su kodirani u jezgri (Zhu i sur., 2010).

Svakim staničnim ciklusom dolazi do skraćivanja telomera zbog nemogućnosti sinteze krajeva telomera (Olovnikov, 1973). Prilikom svakog presađivanja stanica telomere se skraćuju. Ovaj efekt je primijećen kod različitih linija normalnih ljudskih fibroblasta *in vitro* (Harley i sur., 1990). Uz proces postepenog skraćivanja telomera uslijed staničnih dioba, naglo skraćivanje telomera događa se rekombinacijom DNA na subtelomernoj i telomernoj regiji (Rubelj i Vondraček, 1998). Prosječne duljine telomera određene su prema markeru molekularnih težina λ HindIII denzitometrijom telomernih signala fibroblasta tretiranih rotenonom i matematičkom obradom podataka. Dinamika skraćivanja telomera pratila je brzinu rasta stanica tretiranih rastućim koncentracijama rotenona, brži stanični rast rezultirao je ubrzanim skraćivanjem telomera. Prosječna duljina telomera stanica tretiranih s 10^{-4} nM rotenonom skratile su se 734 pb, a 10^{-3} nM rotenonom skratile su se 399 pb više nego

kontrolne stanice, dok je kod preostale koncentracije rotenona skraćivanje telomera znatno manje (Slike 19 i 20). Ovakvo skraćivanje telomera može se povezati s brzinom dioba stanica. Stanice koje su imale najbrži rast napravile se najviše dioba te su stoga imale i najkraće telomere. Richter i von Zglinicki (2007) predložili su da postoji jaka eksponencijalna veza između stanične proizvodnje ROS-ova i dinamike skraćivanja telomera. U našem eksperimentu najmanje dioba i najbrži odlazak u apoptozu imale su stanice s najvećim koncentracijama rotenona te su one napravile neznatan broj dioba. Velika razina ROS u tim stanicama napravila je najviše oštećenja i uzrokovala brzi odlazak u apoptozu. Preostale stanice se nisu dijelile što se može primjetiti i na duljini telomera koja je slična kontrolnim stanicama. U tim stanicama koje su najbrže poprimile senescetni fenotip dolazi i do promjene u popravku oštećenja DNA. Tijekom starenja dolazi do manje efikasnosti različitih tipova popravka oštećenja DNA: popravak krivo sparenih baza (MMR), popravak izrezivanjem baze (BER), popravak izrezivanjem nukleotida (NER) i popravak dvolančanih lomova (DSB) što uzrokuje nagomilavanje mutacija i oksidativnih lezija (Gorbunova i sur., 2007). Povećana ekspresija tumor supresora p53 u stanici nema utjecaj na starenje uzrokovano skraćivanjem telomera, već ima važnu ulogu u uklanjanju stanica s oštećenim telomerama (Garcia-Cao i sur., 2006). Zbog različitog kapaciteta antioksidativne obrane kod različitih staničnih linija dolazi do različite razine skraćivanja telomera tijekom stresa (von Zglinicki, 2002).

Budući da znanje o utjecaju rotenona može doprinijeti i u liječenju neurodegenerativnih bolesti kao što je Parkinsonova bolest (Shaikh i Nickolson, 2009), potrebno je staviti naglasak na dodatna istraživanja o specifičnim djelovanjima rotenona na različite stanične linije, budući da rezultati mogu varirati s obzirom na stanični tip. Moje istraživanje može dati samo neke podatke o utjecaju rotenona na normalne fibroblaste, no potrebna su daljnja istraživanja koja će uključiti dodatne parametre kao što su mjerenje membranskog potencijala mitohondrija, razine proizvodnje ROS-ova, aktivnosti lizosoma te oštećenja DNA.

6. ZAKLJUČCI

U ovom radu sam određivao osjetljivost normalnih ženskih fibroblasta na rastuće koncentracije rotenona. Rotenon utječe na rad mitohondrija što se reflektira na dinamiku rasta i metabolizam stanica. Kombinacijom bojanja mitohondrija i protočne citometrije analizirao sam masu mitohondrija te metodom hibridizacije po Southernu provjerio duljinu telomera kontrolnih i tretiranih stanica. Iz dobivenih rezultata mogu se izvući sljedeći zaključci:

- (i) Za efekt promjena u staničnom rastu u uvjetima promjenjenog parcijalnog tlaka kisika odgovoran je rad mitohondrija, a ne izravno molekularni kisik.
- (ii) Koncentracije rotenona 10^{-2} nM, 10^{-3} nM i 10^{-4} nM omogućavaju normalnim ženskim fibroblastima da prežive i da se dijele, dok veće koncentracije uzrokuju staničnu smrt.
- (iii) Promjena dinamike rasta stanica povezana je s različitim koncentracijama rotenona. Produžetak staničnih dioba prije starenja imale su stanice tretirane najmanjim koncentracijama rotenona od 10^{-4} i 10^{-3} nM, dok su stanice tretirane većim koncentracijama rotenona od 10^{-2} i 10^{-1} nM imale manji broj dioba u odnosu na kontrolne stanice.
- (iv) Intenzivno bojanje u plavo kao posljedica aktivnosti SA- β -Gal povezano je s dinamikom rasta stanica i mjera je starenja kulture. Aktivnost SA- β -Gal raste s porastom koncentracije rotenona.
- (v) Intenzitet fluorescencije boje NAO pokazuje podudarnost između mase mitohondrija i dinamike rasta stanica, pri čemu stanice koje imaju brži rast imaju veću masu mitohondrija.
- (vi) Postoji podudarnost između dinamike skraćivanja telomera i dinamike rasta stanica, pri čemu stanice koje imaju sporiji rast imaju duže telomere. Rezultati ukazuju da rotenon nije uzrokovao ubrzano skraćivanje telomera kod normalnih fibroblasta.

7. LITERATURA

- Adam, A.K. i Holm, C. *Specific DNA replication mutations affect telomere length in Saccharomyces cerevisiae*. *Method Mol Cell Biol*. 1996; 16: 4614-4620.
- Andersson, S.G., Kurland, C.G. *Origins of mitochondria and hydrogenosomes*. *Curr Opin Microbio*. 1999; 2: 535-541.
- Armstrong J.S., Hornung B., Lecane P., Jones D.P., Knox S.J. *Rotenone-induced G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human B lymphoma cell line PW*. *Biochem Biophys Res Cos*. 2001; 289: 973-978.
- Bagui S., Ray M., Ray S. *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Ehrlich ascites carcinoma cells*. *Eur J Biochem*. 1999; 262: 386-395.
- Barrientos A., Morase C.T. *Titrating the effects of mitochondrial complex I impairment in the cell physiology*. *J Bio Chem*. 1999; 4: 16188-16197.
- Bell E.L., Klimova T.A., Eisenbart J., Schumacker P.T., Chandel N.S. *Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-inducible factor-dependent extension of the replicative life span during hypoxia*. *Mol Cell Biol*. 2007; 27: 5737-5745.
- Bodnar A.G., Ouellette M., Frolkis M., Holt S.E., Chiu C.P., Morin G.B., Harley C.B., Shay J.W., Linchesteiner S., Wright W.E. *Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells*. *Science*. 1998; 279: 349-352.
- Boore J.L. *Animal mitochondrial genomes*. *Nucleic Acids Res*. 1999; 27, 1767-1780.
- Boya P., Kroemer G. *Lysosomal membrane permeabilization in cell death*. *Oncogene*. 2008; 27: 6434-64451.
- Bringold F. i Serrano M. *Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence*. *Exp Gerontol*. 2000; 35: 317-329.
- Campisi J. *Cancer, aging and cellular senescence*. *In vivo* 2000; 14: 183-188.
- Cesare, A. J., Griffith, J. D. *Telomeric DNA in ALT cells is characterized by free telomeric circles and heterogeneous t-loops*. *Mol Cell Biol*. 2004; 24, 9948-9957.
- Cesare. A.J. i Reddel R.R. *Alternative lengthening of telomeres: model, mechanism and implications*. *Nat Rev Genet*. 2010; 11: 319-330.
- Chae, H. Z., Kang, S. W. & Rhee, S. G. *Isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in presence of thioredoxin*. *Methods Enzymol*. 1999; 300, 219-226.
- Cooper G.M. i Hausman R.E. (2004). *Bioenergetika i metabolizam: Mitohondriji, kloroplasti i peroksisomi*. U: Lauc G. (ur.) *Stanica molekularni pristup.*, Zagreb, Medicinska naklada, str. 399-414.

- Counter C. M., Avilion A.A., LeFeuvre C.E., Stewart N.G., Greider C.W., Harley C.B., Bacchetti S. *Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cell which express telomerase activity*. EMBO J. 1992; 11: 1921-1929.
- Cristofalo V.J., Pignolo R.J. *Replicative senescence of human fibroblast-like cells in culture*. Physiol Rev. 1993; 73: 617-638.
- Cottet-Rousselle C., Ronot X., Leverve X., Mayol J.F. *Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes*. Cytom Part A. 2011; 79A: 405-425.
- Debacq-Chainiaux F., Erusalimsky J.D., Campisi J., Toussaint O. *Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cell in culture and in vivo*. Nat Protoc. 2009; 4: 1798-1806.
- De Lange T. *Protection of mammalian telomeres*. Oncogene 2002; 21: 532-540.
- Dell'Orco, R.T., Merten, J.G., Kruse, P.F. *Doubling potential, calendar time, and donor age of human diploid cells in culture*. Exp Cell Res. 1974; 84: 363-366.
- Dimri G. P., Campisi J. *Altered Profile of Transcription Factor-Binding Activities in Senescent Human Fibroblasts*. Exp Cell Res. 1994; 212: 13240.
- Dimri G. P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E. E., Linskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O., Peacocke M., Campisi J. *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*. Proc Natl Acad Sci. 1995; 92: 9363-9367.
- Erecinska M., Deas J., Silver I.A. (1995). *The effect of pH on glycolysis and phosphofruktokinase activity in cultures cells and synaptosomes*. Journal of Neurochemistry. 65: 2765-2772.
- Esposito, L. A., Melov, S., Panov, A., Cottrell, B. A. & Wallace, D. C. *Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress*. Proc Natl Acad Sci. 1999; 96: 4820–4825.
- Fato R., Bergamini C., Bortolus M., Maniero A.L., Leoni S., Ohnishi T., Lenaz G. (). *Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species*. Bioch Bioph. 2010; 1787: 384–392.
- Finkel, T. & Holbrook, N.J. *Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing*. Nature, 2000; 408: 239–247.
- Gabriel, K., Buchanan, S.K., Lithgow, T. *The Alpha and beta: Protein translocation across mitochondrial and plastid puter membranes*. Trends Biochem Sci. 2001; 26: 36-40.

- Garvik B., Carson M., Hartwell L. *Single-stranded DNA arising at telomeres in cdc13 mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint*. Mol Cell Biol. 1995; 15: 6128-6138.
- Geiszt, M., Kopp, J. B., Varnai, P., & Leto, T. L. *Identification of Renox, an NAD(P)H oxidase in kidney*. Proc Natl Acad Sci. USA 2000; 97: 8010–8014.
- Giordano S., Lee J., Darley-USmar V.M., Zhang J. *Distinct Effects of Rotenone, 1-methyl-4-phenylpyridinium and 6-hydroxydopamine on Cellular Bioenergetics and Cell Death*. PloS One. 2012; 7: e44610.
- Golubev, A. G. *The other side of metabolism: a review*. Biochem US. 1996; 61: 1443–1460.
- Gonçalves A.P., Maximo V., Lima J., Singh K.K., Soares P., Videira A. *Involvement of p53 in cell death following cell cycle arrest and mitotic catastrophe induced by rotenone*. Mol Cell Res. 2011; 1813: 492:499.
- Goto, S., A. Nakamura, Z. Radak, H. Nakamoto, R. Takahashi, K. Yasuda, Y. Sakurai, N. Ishii. *Carbonylated proteins in aging and exercise: immunoblot approaches*. Mech Age Dev. 1999; 107, 245–253.
- Gorbunova V., Seluanov A., Mao Z., Hine C. *Changes in DNA repair during aging*. Nucleic Acids Res. 2007; 10: 1-9.
- Greenamyre, J.T. Sherer T.S., Betarber R., Panov A.V. *Complex I and Parkinson's disease*. IUBMB life, 2001; 52: 135–141.
- Greenberg, R.A. *Telomeres, crisis and cancer*. Curr Mol Med. 2005; 5: 231-218.
- Greider, C.W. i Blackburn, E.H. *Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts*. Cell. 1985; 43: 405-413.
- Harley C. B. *Telomerase is not an oncogene*. Oncogene 2002; 21: 494-502.
- Harley, C.B., Futcher, A.B., Greider, C.W. *Telomeres shorten during aging of human fibroblasts*. Nature. 1990; 345: 458-460.
- Hatefi, Y. *The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system*. Ann Rev Biochem. 1985; 54: 1015-1069.
- Hayflick, L. *The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains*. Exp Cell Res. 1965; 37: 614-636.
- Hayflick, L., Moorhead P. S. *The serial cultivation of human diploid cell strains*. Exp Cell Res. 1961; 25: 585-621.

- Hemann M. T., Strong M. A., Hao L. Y., Greider C. W. *The shortest telomere, not average telomere length is critical for cell viability and chromosome stability.* Cell 2001; 107: 67-77.
- Hirst J. *Energy transduction by respiratory complex I – an evaluation of current knowledge.* Biochem Soc T. 2005; 33: 525-529.
- Hirst J. *Towards the molecular mechanism of respiratory complex I.* Biochem J. 2010; 425: 327-339.
- Hsuan S., Klintworth H.M., Xia Z.. *Basic Fibroblast Growth Factor Protects against Rotenone- Induced Dopaminergic Cell Death through Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 / 2 and Phosphatidylinositol-3 Kinase Pathways.* J Comp Neurol. 2006; 26: 4481– 4491.
- Itahana K., Itahana Y., Dimri G.P. *Colorimetric detection of senescence-associated β galaktosidase.* Methods Mol Biol. 2013; 965: 143-156.
- Krishnan, K.J., Greaves, L.C., Reeve, A.K., Turnbull, D. *The ageing mitochondrial genome.* Nucleic Acids Res. 2007; 10: 1-7.
- Kuznetsov, A. V. *Mitochondrial ROS production under cellular stress: Comparison of different detection methods.* Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011; 400: 2383– 2390.
- Li N., Ragheb K., Lawler G., Sturgis J., Rajwa B., Mendelez J.A., Robinson J.P. *Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production.* J Bichem Chem. 2003; 10: 8516-8525.
- Loayza D, de Lange T. *POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control.* Nature. 2003; 423: 1013-18.
- Maftah A., Petit J.M., Julien R. *Specific interaction of the new fluorescent dye 10-N-nonyl acridine orange with inner mitochondrial membrane.* FEBS Lett. 1990; 260: 236-240.
- Maftah A., Petit J.M., Ratinaud M.H., Julien R. *10-N nonyl-acridine orange: a fluorescent probe which stains mitochondria independently of their energetic state.* Biochem Bioph Res Co. 1989; 164: 185-190.

- Makarov V. L., Hirose Y., Langmore J. P. *Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening.* Cell. 1997; 88: 657-666.
- Marthandan S., Priebe S., Groth M., Guthke R., Platzer M., Hemmerich P., Diekmann S. *Hormetic effect of rotenone in primary human fibroblast.* Immunity & Ageing. 2015; 12: 1-11.
- Matulić, M., Sopta, M., Rubelj, I. *Telomere dynamics: the means to an end.* Cell Prolif. 2007; 40: 462-474.
- Miles, B., *Inhibitors & Uncouplers.* Free Radical Biol Med. 2003; 52: 1075–1085.
- Milner P.I., Wilkins R.J., Gibson J.S. *The role of mitochondrial reactive oxygen species in pH regulation in articular chondrocytes.* OsteoArthr Cartilage. 2007; 15: 735-742.
- Murnane J.P., Sabatier L., Marder B.A., Morgan W. F. *Telomere dynamics in an immortal human cell line.* EMBO J. 1994; 13: 4953-4962.
- Nabetani A., Ishikawa F. *Unusual telomeric DNAs in human telomerase-negative immortalized cells.* Mol Cell Biol. 2009; 29, 703–713.
- Nemoto S., Takeda K., Yu Z. X., Ferrans V. J., Finkel T. *A role for mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism.* Mol Cell Biol. 2000; 20, 7311–7318.
- Olovnikov A. M. *The incomplete copying of template margin in enzymatic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon.* J Theor Biol. 1973; 41: 181-190.
- Packer L., Fuehr K. *Low oxygen concentration extend the lifespan of cultured human diploid cells.* Nature. 1977; 267: 423-425.
- Rastogi V. I Girvin M.E. *Structural changes linket to proton translocation by subunit c of the ATP synthase.* Nature 1999; 402: 263-268.
- Reddel, R. R. *The role of senescence and immortalization in carcinogenesis.* Carcinogenesis 2000; 21, 477–484.
- Reed J.C., Jurgensmeier J.M., Matsuyama S. *Bcl-2 family proteins and mitochondria.* Bioch Bioph Acta. 1998; 1366: 172-137.
- Richter T., von Zglinicki T. *A contunuos correlation between oxidative stress adn telomere shortening in fibroblast.* Exp Gerontol. 2007; 42: 1039-1042.
- Rubelj, I, Huzak, M., Brdar, B. *Sudden senescence syndrome play a major role in cell culture proliferation.* Mech Af Develop. 1999; 112, 233-241.

- Rubelj I., Vondracek Z. *Stochastic mechanism of cellular aging – abrupt telomere shortening as a model of stochastic nature of cellular ageing*. J Theor Biol. 1998; 197: 425-438.
- Scheffler I.E. *A century of mitochondrial research: Achievements and perspectives*. Mitochondrion. 2001; 1(1), pp.3–31.
- Sena L.A., Chandel N.S. *Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species*. Mol Cell. 2012; 48: 158-167.
- Shaikh S.B., Nicholson L.F.B. *Effect of chronic low dose rotenone treatment on human microglial cells*. Mol Neurodegener. 2009; 4: 1-13.
- Shay J. W., Wright W. E. *Telomeres and telomerase: implications for cancer and aging*. Radiat Res. 2001; 155: 188-193.
- Smith, J.R., Hayflick, L. *Variatio in the life-span of clones derived from human diploid cell strains*. J Cell Biol. 1974; 62: 48-53.
- Smith, J. R., Whitney R. G. *Intraclonal variation in proliferative potential of human diploid fibroblasts: stochastic mechanism for cellular aging*. Science. 1980; 207: 82-84.
- Stadtman, E. R. *Protein oxidation and aging*. Science. 1992; 257, 1220–1224.
- Stansel R. M., De Lange T., Griffith J. D. *T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang*. EMBO J. 2001; 20: 5532-5540.
- Suh, Y. A. Arnold R.S., Lassegue B., Shi J., Xu X., Sorescu D., Chung A.B., Griendling K.K., Lambeth J.D. *Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1*. Nature. 1999; 401, 79–82.
- Turrens, J. F. *Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain*. Biosci Rep. 1997; 17, 3–8.
- von Zglinicki T, Saretzki G, Döcke W, Lotze C. *Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence?* Exp Cell Res. 1995; 220:186-93.
- von Zglinicki, T. *Oxidative stress shortens telomeres*. Trends Biochem Sci. 2002; 27, 339-344.
- Wright J. H., Zakian V. A. *Protein-DNA interactions in soluble telosomes from Saccharomyces cerevisiae*. Nucl Acids Res. 1995; 23: 1454-1460.
- Yan, L. J., Levine, R. L., Sohal, R. S. *Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase*. Proc Natl Acad Sci. 1997; 94, 11168–11172.

Zgu L., Wang Q., Zhang L., Fang Z., Zhao F., Lv Z., Gu Z., Zhang J., Wang J., Zen K., Xiang Y., Wang D., Zang C.Y. *Hypoxia induces PGC-1 α expression and mitochondrial biogenesis in the myocardium of TOF patients*. Cell Res. 2010; 20: 676-687.

<https://www.boundless.com/biology/textbooks/boundless-biology-textbook/cellular-respiration-7/oxidative-phosphorylation-76/electron-transport-chain-362-11588/>

http://www.biodynamics.co.jp/e/prd_use5.htm

<http://www.martinfrost.ws/htmlfiles/sept2008/cancer-telomerase.html>

<http://www.d.umn.edu/~biomed/flowcytometry/introflowcytometry.pdf>

8. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci	
Ime / Prezime	Jasmin Božo
Adresa(e)	Ivana Đuriševića 4, 48350 Đurđevac (Hrvatska)
Telefonski broj(evi)	(+385) 98 909 4383
E-mail	jasmin.bozo@gmail.com
Državljanstvo	Hrvatsko
Datum rođenja	10.4.1992.
Spol	M
Radno iskustvo	
Datumi	2016.
Zanimanje ili radno mjesto	Anketar
Glavni poslovi i odgovornosti	-provođenje telefonskih anketa
Naziv i adresa poslodavca	Growth from Knowlage, Zagreb (Hrvatska)
Obrazovanje i osposobljavanje	
Preddiplomski studij biologije	
Datumi	04/07/2011–14/07/2014
Naziv dodijeljene kvalifikacije / zvanje	Prvostupnik biologije
Glavni predmeti / stečene profesionalne vještine	- glavni predmeti: biologija stanice, mikrobiologija, zoologija, botanika, biokemija, kemija (organska, anorganska), kvantitativna biologija, anatomija (čovjeka, biljaka i životinja), genetika, ekologija (biljaka, životinja), biologija mora, fiziologija (čovjeka, biljaka i životinja), evolucija, biogeografija, neurobiologija i slično - determiniranje pojedinih vrsta biljaka, životinja i algi - rad na terenu i uzorkovanje - rad u laboratoriju
Naziv i vrsta ustanove pružatelja obrazovanja i osposobljavanja	Sveučilište J.J. Strossmayera, Odjel za biologiju, Osijek (Hrvatska)
Diplomski studij molekularne biologije	
Datumi	29/09/2014–danas
Naziv dodijeljene kvalifikacije / zvanje	

Glavni predmeti / stečene profesionalne vještine

- glavni predmeti: Mutageneza i karcinogeneza, Neurofiziologija, Molekularna genetika, Molekularna biologija stanice, Genetičko inženjerstvo u biotehnologiji, Metode istraživanja u molekularnoj biologiji, Molekularna biljna patologija, Ekofiziologija životinja, Biološka antropologija, Fiziološki mehanizmi u toksikologiji, Fiziologija endokrinog sustava, Transplatacijska imunologija, Opća onkologija itd.

Naziv i vrsta ustanove pružatelja obrazovanja i osposobljavanja

Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb (Hrvatska)

Osobne vještine i kompetencije

Materinski jezik

Hrvatski

Drugi jezik(ci)

Engleski, Njemački

Samoprocjena

Europska razina ()*

Engleski jezik

Njemački jezik

Razumijevanje				Govor				Pisanje	
Slušanje		Čitanje		Govorna interakcija		Govorna produkcija			
C1		C1		C1		C1		C1	
A1		A2		A1		A1		A2	

(*) [Zajednički europski referentni okvir za jezike](#)

Komunikacijske vještine

Prilagođavanje timskom radu, također mogućnost samostalnog rada. Dobre komunikacijske vještine te pouzdanost i točnost u radu. Vještine stečene tijekom fakultetskog obrazovanja, izlaganjem različitih seminara, prijedloga istraživanja i slično.

Organizacijske / rukovoditeljske vještine

Organizacijske vještine stečene na fakultetu, vođenjem i sudjelovanjem na određenim projektima. Sposobnost preuzimanja uloge vođe tima i upravljanje ljudima.

Poslovne vještine

Upoznat s radom u laboratorijima, opremom i strojevima koja se u njima nalaze. Znanje stečeno kroz brojne praktične zadatke i izradu diplomskog rada.

Računalne vještine i kompetencije	SAMOPROCJENA										
	<table border="1"> <tr> <td data-bbox="603 226 916 271">Obrada informacija</td> <td data-bbox="916 226 1549 271">Iskusni korisnik</td> </tr> <tr> <td data-bbox="603 271 916 315">Komunikacija</td> <td data-bbox="916 271 1549 315">Iskusni korisnik</td> </tr> <tr> <td data-bbox="603 315 916 360">Stvaranje sadržaja</td> <td data-bbox="916 315 1549 360">Temeljni korisnik</td> </tr> <tr> <td data-bbox="603 360 916 405">Sigurnost</td> <td data-bbox="916 360 1549 405">Samostalni korisnik</td> </tr> <tr> <td data-bbox="603 405 916 427">Rješavanje problema</td> <td data-bbox="916 405 1549 427">Samostalni korisnik</td> </tr> </table>	Obrada informacija	Iskusni korisnik	Komunikacija	Iskusni korisnik	Stvaranje sadržaja	Temeljni korisnik	Sigurnost	Samostalni korisnik	Rješavanje problema	Samostalni korisnik
Obrada informacija	Iskusni korisnik										
Komunikacija	Iskusni korisnik										
Stvaranje sadržaja	Temeljni korisnik										
Sigurnost	Samostalni korisnik										
Rješavanje problema	Samostalni korisnik										
Ostale vještine	Dovoljno dobro znanje za izradu MS Word i Excel dokumenata te PowerPoint prezentacija. Vrlo dobro se služim radom na računalu, uključujući korištenje brojnih programa i interneta te uklanjanja pogrešaka ukoliko se pojave.										
Vozačka dozvola	B kategorija										
Dodatne informacije Priznanja i nagrade	Suosnivač udruge studenata biologije ZOA – Osijek										
Datum popunjavanja ili zadnjeg ažuriranja životopisa	02.08.2016.										