

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA JIHOČESKÉ
UNIVERZITY**

České Budějovice 2012

Katedra genetiky



**Vliv oxidativního stresu na chromosomální
stabilitu u *Drosophila melanogaster***

Bakalářská práce

Iveta Pavlechová

Vedoucí práce: **Mgr. Radmila Čapková Frydrychová, Ph.D.**

Rok vypracování: 2012

Pavlechová I., 2012: Vliv oxidativního stresu na chromosomální stabilitu u *Drosophila melanogaster*. [Effect of oxidative stress on chromosomal stability in *Drosophila melanogaster*. Bc.Thesis, in Czech] - 42 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

Oxidative stress may cause a general disruption of the cellular homeostasis and structure. It has a negative impact on telomere shortening with significant bias on the level of cellular senescence and the development of various diseases. Oxidative stress is increased by production of reactive oxygen and nitrogen radicals, which interact with proteins, lipids, amino acid, DNA and other components of living matter. Increased amount of free radicals leads to the disruption of antioxidant barrier and telomere shortening. In this thesis, upon oxidative stress induction, I analyzed the transcription activity of catalase and telomere shortening at *Drosophila polytene* chromosomes.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval/a samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 14. prosince 2012

.....
Iveta Pavlechová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala mé školitelce Radmile Čapkové Frydrychové za odborné vedení při psaní bakalářské práce, za trpělivost a získání cenných rad. Dále mé poděkování patří všem členům laborky, kteří mi vždy s ochotou pomohli a poradili. V neposlední řadě můj velký dík patří mé rodině, zejména mé mamince a babičce, které mne podporovaly po celé mé studium.

Obsah

| | |
|--|-----------|
| 1. Úvod..... | 2 |
| 1.1. Oxidativní stres | 2 |
| 1.1.1. Oxidativní stres a jeho vliv na DNA | 4 |
| 1.2. Reparační mechanismy poškozené DNA | 4 |
| 1.3. Telomery | 6 |
| 1.3.1. Telomerická sekvence..... | 7 |
| 1.3.2. Telomera a replikace DNA..... | 7 |
| 1.3.3. Telomeráza | 8 |
| 1.3.4. Telomerická smyčka a telomerická čepička | 9 |
| 1.3.5. Neobvyklé telomery | 10 |
| 1.4. Retrotransposony | 10 |
| 1.5. Zkracování telomer vlivem oxidativního stresu | 12 |
| 1.6. Propojení oxidativního stresu – telomer – psychického stresu a zdravotních aspektů..... | 13 |
| 1.7. Oxidativní stres indukovaný parakvatem | 14 |
| 2. Cíle práce | 16 |
| 3. Materiál a metody | 17 |
| 3.1. Použitý kmen drozofily | 17 |
| 3.2. Indukce oxidativního stresu | 17 |
| 3.3. Příprava preparátů polytenních chromosomů ze slinných žláz..... | 17 |
| 3.4. Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH) | 17 |
| 3.5. Izolace totální RNA | 19 |
| 3.6. Syntéza cDNA SMARTScribe TM reverzní transkriptázou. | 19 |
| 3.7. Izolace genomové DNA (gDNA) | 19 |
| 3.8. Real-time PCR | 19 |
| 4. Výsledky | 21 |
| 4.1. Indukce oxidativního stresu | 21 |
| 4.2. Vyhodnocení katalázy jako markeru oxidativního stresu..... | 21 |
| 4.3. Morfologie chromosomů po působení oxidativního stresu | 22 |
| 4.4. Vyhodnocení délky telomer pomocí FISH | 24 |
| 4.5. Počet elementů <i>HeT-A</i> v genomu | 26 |
| 4.6. Transkripce elementu <i>HeT-A</i> | 27 |

| | |
|--|-----------|
| 5. Diskuze | 28 |
| 5.1. Oxidativní stres a antioxidační enzymy..... | 28 |
| 5.2. Morfologie polytenních chromosomů po působení oxidativního stresu | 29 |
| 5.3. Zkracování délky telomer | 30 |
| 5.4. Vliv oxidativního stresu na transkripci elementu <i>HeT-A</i> | 31 |
| | |
| 6. Závěr a perspektiva výzkumu | 32 |
| 7. Použitá literatura | 33 |
| 8. Přílohy | 41 |

1. Úvod

1.1. Oxidativní stres

Oxidativní stres je v současnosti horkým tématem výzkumu pro svou vazbu na stárnutí organismu a vznik nejrůznějších akutních či chronických onemocnění. Oxidativní stres je způsoben nadměrným vznikem volných kyslíkových a dusíkatých radikálů, neboli reaktivních forem kyslíku (ROS, reactive oxygen species) a dusíku (RNS, reactive nitrogen species), a neschopností organismu se s jejich převahou vypořádat. Radikály jsou vysoce reaktivní molekuly či molekulové fragmenty, které mají ve své valenční slupce jeden nebo více nepárových elektronů. Díky nepárovým elektronům dochází k jejich snadné interakci s proteiny, aminokyselinami, lipidy, DNA a jinými buněčnými součástmi (Ermak a Davies 2002). Poprvé byly volné radikály popsány v roce 1900, kdy byl pozorován vznik trifenylmetylových radikálů rozpadem hexafenyletanu. Kyslíkové radikály byly pozorovány o bezmála třicet let později při rozkladné reakci tetrametylu. Ve 40. letech 20. století byl popsán vznik kyslíkových radikálů uvnitř živých organismů (Halliwell 1999).

Ke vzniku reaktivních forem kyslíku a dusíku tedy dochází dvěma cestami: exogenně a endogenně. Mezi hlavní exogenní faktory vzniku oxidativního stresu patří UV záření, ozón, ionizující záření, kouření, znečištěné životní prostředí, tepelný šok, ale i různá léčiva, pesticidy či dokonce působení anestetik (Ermak a Davies 2002; Abdollahi *et al.* 2004; Cheng *et al.* 2010). Všechny tyto faktory negativně působí na organismus, jeho tkáň, buněčné struktury a genetickou informaci (Evans *et al.* 2004). Co se týče endogenního vzniku oxidativního stresu, nejvýraznějším zdrojem je dýchací řetězec v mitochondriích, kde se oxidativní fosforylací přeměňuje 2-3% kyslíku na peroxid vodíku a superoxid (hlavně v komplexu I a III) (Chance *et al.* 1979; Grigolova *et al.* 1980; Ott *et al.* 2007). Dalšími endogenními zdroji jsou imunitní reakce při napadení organismu patogenem (Cadenas a Sies 1998; Yasunari *et al.* 2002), reakce katalyzované enzymatickým komplexem cytochromu P450 na endoplazmatickém retikulu při odbourávání xenobiotik (Lewis *et al.* 1998), volné kyslíkové radikály se také účastní při přenosu energie a slouží jako signální molekuly (Lander 1997). Producenty ROS jsou membránově vázané enzymy, koenzymy flavinové struktury (Messner a Imlay 1999), hemové koenzymy, enzymy s Cu v aktivním centru (Schuff-Werner a Splettstoesser 1999). Reaktivnost ROS může být také zvýšena Fentonovými reakcemi s přechodnými kovy, což může vést k rozsáhlejšímu buněčnému poškození (Valko *et al.* 2005).

Optimální hladina ROS je uvnitř organismu udržována několika antioxidačními

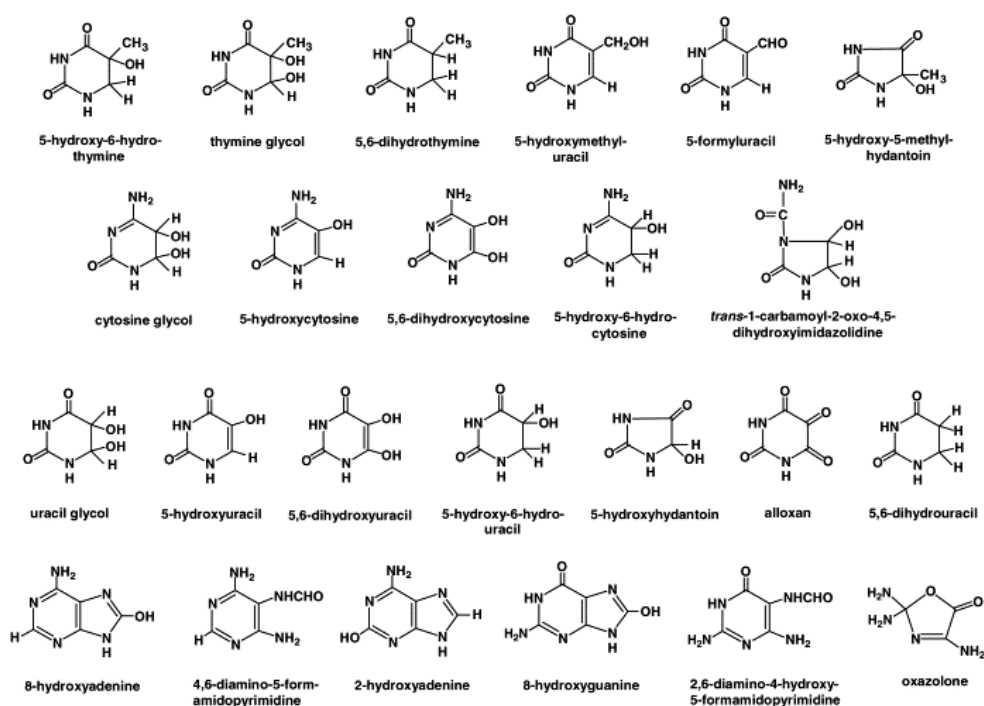
mechanismy, založenými na enzymatickém a neenzymatickém působení. V případě, že míra ROS převyší antioxidační kapacitu organismu, nastává oxidační stres, kdy buňka již nestačí odbourávat reaktivní formy, antioxidační bariéra se bortí, dochází k defektům na úrovni DNA a při vysokých úrovních oxidačního stresu dochází až k buněčné apoptóze (Bartsch a Nair 2006).

Antioxidační systém organismu je založen na třech základních principech ochrany. Za prvé na zabránění tvorby nadměrného množství kyslíkových a dusíkatých radikálů působením antioxidantů, které zabraňují vzniku řetězových radikálových reakcí. Další mechanismy působí proti již probíhajícím reakcím. Některé z nich jsou schopny přeměnit reaktivní formy na relativně stabilní radikály, a proto jsou nazývány lapače, zhášeče zase nabídnou volný elektron ke stabilizaci reaktivní formy a systémy přeměňující reaktivní formy na látky neradikálové povahy jsou nazývány vychytávače. Posledním ze tří typů ochrany jsou reparační mechanismy poškozených molekul (Konečná *et al.* 2001).

Antioxidanty mohou pracovat samostatně, ale nejčastěji jsou součástí systémů a o to účinněji pracují. Mezi enzymatické antioxidační systémy patří působení katalázy, superoxid dismutázy, glutathion peroxidázy, cytochrom c atd. Významným antioxidantem je kataláza, neboť se vyskytuje ve většině živých organismů, které jsou v kontaktu s kyslíkem. Katalyzuje heterolytické štěpení dvou molekul peroxidu vodíku za vzniku molekulárního kyslíku a vody a na rozdíl od jiných je schopna současné redukce i oxidace (Schonbaum a Chance 1976). Kataláza je součástí peroxisomů. U většiny eukaryot spolupracuje se superoxid dismutázami a tím zvyšuje ochranu proti vyšším koncentracím peroxidu vodíku (Fridovich 1995). V organismech bylo nalezeno několik typů kataláz, početné zastoupení bylo prokázáno hlavně u rostlin, např. ječmene, jež obsahuje až 4 katalázy (Skadsen *et al.* 1995). Dle jejich charakteru byly rozděleny na typické, nehemové, a katalázy-peroxidázy. Endogenní antioxidanty mají také neenzymatický charakter a jsou rozdělovány na membránové, jako je např. koenzym Q10, glutathion, - tokoferol, vitamín C, vitamín E, flavonoidy a nemembránové, ke kterým patří např. bilirubin, uráty, transferin. Dalšími důležitými antioxidanty jsou ty, které jsou podávány exogenně, a které působí jako inhibitory vzniku volných radikálů regulací enzymatických aktivit, tedy stopové prvky. Mezi ně patří např. zinek, ten má vliv na stabilizaci buněčných membrán, selen, jež podporuje absorpci vitamínu E a další. Nakonec i samotná vyvážená strava má nezanedbatelnou antioxidační aktivitu (Halliwell 1996).

1.1.1. Oxidativní stres a jeho vliv na DNA

K zásadním poškozením vlivem oxidativního stresu dochází na úrovni nukleových kyselin. Dosud bylo nalezeno přibližně 24 různých typů oxidativních modifikací bází v DNA (Obr. 1). Báze jsou různě citlivé na různé druhy radikálů, stejně tak antioxidanty mají „své“ volné radikály, na které působí. Velmi citlivým se stává guanin, který má různé modifikace a tou nejnámější je 8-oxo-2'-deoxyguanosin (Loft a Poulsen 1996). Také může například docházet k oxidaci thyminu na thymin glykol (Kao *et al.* 1993). K dalším, velmi častým poškozením po působení oxidativního stresu patří jednořetězcové zlomy a dvouřetězcové zlomy.



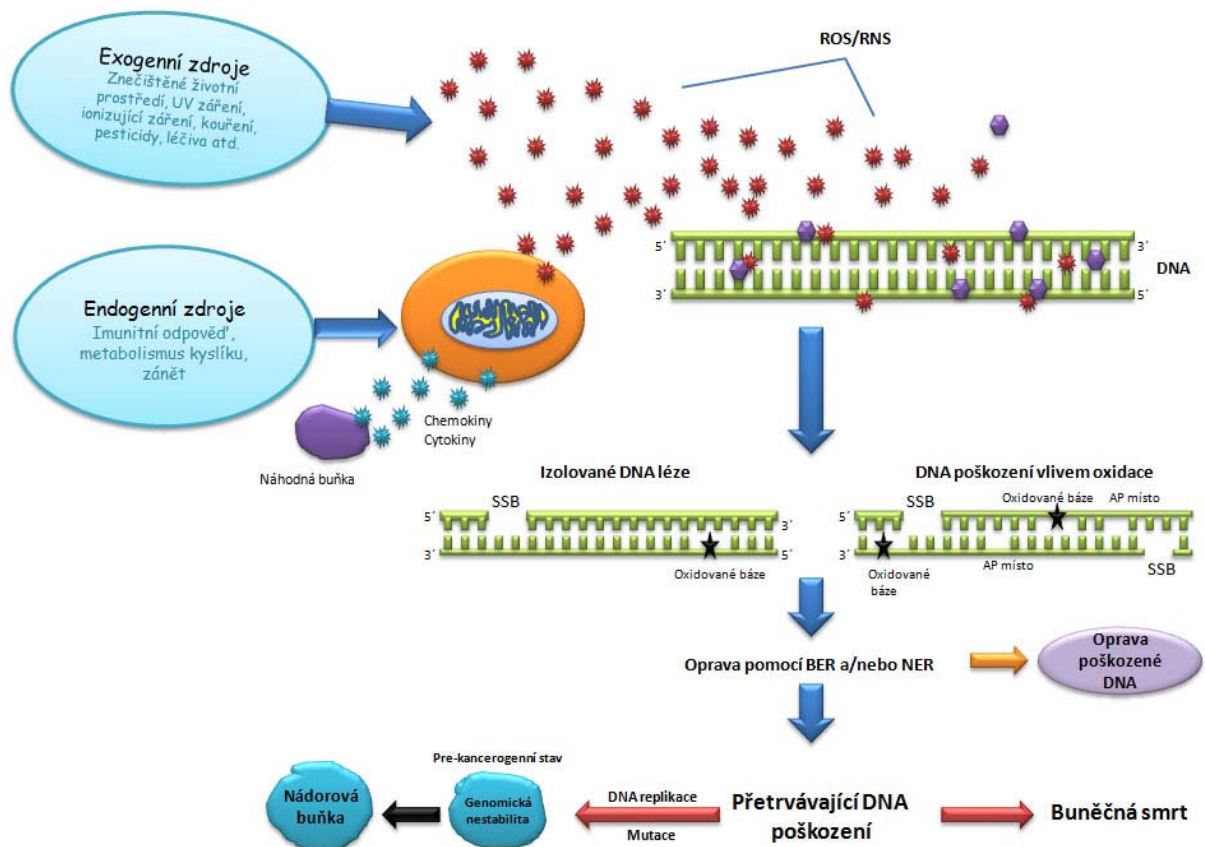
Obr. 1. Přehled modifikací bází způsobené oxidativním stresem (převzato z Cooke *et al.* 2003).

1.2. Reparační mechanismy poškozené DNA

V případě poškození DNA je v buňce aktivován systém reparačních mechanismů (Obr. 2). Součástí těchto opravných mechanismů je detekovat různé distorze, zlomy ve struktuře DNA navázáním různých speciálních proteinů pro její stabilizaci. Nejčastějším reparačním mechanismem, ať už po oxidativním či jiném poškození, je NER (nucleotide excision repair). Dochází k vystřížení poškozené oblasti (oblast okolo 21-23 nukleotidů). Po vystřížení je na toto prázdné místo navázána DNA polymeráza a ligáza nakonec spojí řetězce, poškození je opraveno (Croteau a Bohr 1997).

Oxidativním poškozením, jak již bylo uvedeno, vznikají modifikace bází. Pro opravu modifikovaných bází zajišťuje buňka reparační mechanismus BER (Base exciton repair). DNA glykosylázy tohoto systému rozpoznají sadu modifikovaných bází, jako je 8oxoG či tymin glykol, a vystříhnou ji za vzniku abazického místa (AP). Pro jeho odstranění jsou tu AP endonukleázy, jež vytvoří jednořetězcový zlom a pomocí 3'- 5' exonukleázy dojde k odstraňování přilehlých nukleotidů. Vzniklé prázdné místo je zaplněno pomocí DNA polymerázy a opět v závěru ligáza kovalentně spojí tyto řetězce v jeden (Croteau a Bohr 1997).

Dalším mechanismem oprav proti oxidativnímu poškození mohou být „mismatch DNA repair“ (MMR). V tomto případě dochází k opravám až po replikaci, kdy dojde k chybnému párování, např. adeninu, zařazeného v dceřinném helixu v pozici vůči 8-oxoguaninu (Slupphaug *et al.* 2003).



Obr. 2. Celkový proces vzniklý působením volných radikálů exogenní i endogenní cestou. Dochází k poškození DNA a následně nástupu reparačních mechanismů, které vedou k opravě poškozené DNA či neschopnosti toto poškození opravit. V případě neopravené DNA může být buňka podrobena buněčné smrti nebo se může stát buňkou nádorovou.

Vlivem oxidativního stresu vznikají jednořetězcové zlomy. V menší míře může docházet i ke zlomům dvouřetězcovým, které mohou mít na osud buňky mnohem vážnější dopad. Typickým zdrojem vzniku dvouřetězcových zlomů je ionizující záření a také působení některých chemických látek, vedoucích ke vzniku volných radikálů. Dvouřetězcové zlomy mohou také vznikat replikací poškozené DNA a také po rozpadu replikační vidličky (Heyer *et al.* 2006). Často se vyskytují v terminální části chromosomů na telomerách (Khanna a Jackson 2001). Existují dva odlišné a vzájemně se doplňující mechanismy pro opravu dvouřetězcových zlomů v DNA, a to homologní rekombinace (HR – homologous recombination) a nehomologní spojování (NHEJ – non-homologous end-joining) (Haber 2000). U NHEJ dochází k přímému spojení konců dvouřetězcových zlomů. Toto spojení obstará ligáza, která účinkuje bez ohledu na to, zda došlo k nějakému poškození či ztrátě DNA (Tan *et al.* 2003). Rozpoznání místa zlomu zajišťují proteinové komplexy KU70 a KU80 (Buck *et al.* 2006; Ahnesorg *et al.* 2006). Homologní rekombinace je velmi častá u savců, vyskytuje se také v souvislosti s V(D)J rekombinací (Dai 2003), uplatňuje se v meioze při crossing-overu, při mitotické rekombinaci, opravuje rozpadlé či zablokované replikační vidličky a také se uplatňuje při již zmíněných reparacích dvouřetězcových zlomů, kdy dle homologní sekvence dochází k syntéze a opravě poškozené DNA (Heyer *et al.* 2006).

Významný vliv volných kyslíkových radikálů je pozorován na koncových částech chromosomů, označovaných jako telomery (von Zglinicki 2002).

1.3. Telomery

Telomery (*telos* – koncový, *meros* – část) jsou konce eukaryotických lineárních chromosomů, které jsou tvořeny specifickou sekvencí DNA a specifickými proteiny. Telomery mají nezaměnitelnou úlohu v mnoha důležitých buněčných procesech. Telomerickými strukturami jsou konce chromosomů chráněny před vzájemnými chromosomálními fúzí (McClintock 1942) a degradací působením DNáz. Telomery kompenzují zkracování chromosomů, které vzniká z neschopnosti DNA polymerázy kopírovat chromosom až do jeho konce (Watson 1972) a jsou důležité pro prostorovou organizaci chromosomů uvnitř jádra (Greider 1996). Telomery a změny v jejich biologii souvisí s procesy, které vedou ke karcinogenezi, vzniku lidských nemocí a stárnutí organismu (Harley *et al.* 1990, Artandi a DePinho 2000).

1.3.1. Telomerická sekvence

Telomerická DNA, jež se vyskytuje v eukaryotních chromosomech, je nejčastěji složena z tandemových repetice a sama o sobě je nekódující sekvencí. Tandemová repetice 5'-T₁₋₄A₀₋₁G₁₋₈-3' se opakuje u dnes již probádaných eukaryotních organismů s odchylkami v uspořádání cytosinu či guaninu (Snustad a Simmons 2009). Tyto sekvence jsou velmi konzervativní a vyskytují se vždy u protilehlých řetězců DNA, a to s 3' bohatým koncem na G báze a 5' koncem bohatým na C báze. Telomerická DNA tvoří krátké G-bohaté repetice s 5'-3' přesahujícím řetězcem (Makarov *et al.* 1997), tvořícím G:G páry nebo G-kvartery, charakteristické pro velké skupiny organismů (Williamson *et al.* 1989).

Telomery obratlovců jsou tvořeny hexamerickou opakující se sekvencí (TTAGGG)_n (Meyne *et al.* 1989); stejná sekvence se rovněž nachází u kroužkoců (*Anellida*) (Vitturi *et al.* 2000) a měkkýšů (*Mollusca*) (Guo a Allen 1997). U většiny vyšších rostlin jsou telomery tvořeny heptamerickou sekvencí (TTTAGGG)_n (Fajkus *et al.* 2005), dále například tandemová repetice (TTAGGC)_n u *Caenorhabditis* a *Ascaris* (Müller *et al.* 1991). U hmyzu je telomera nejčastěji tvořena pentamerickou sekvencí (TTAGG)_n (Sahara *et al.* 1999). Od většiny organismů odlišný typ telomer se nachází u drozofily, kde se namísto krátkých opakovaných sekvencí vyskytují retrotransposibilní elementy neboli retrotransposony (Capkova Frydrychova *et al.* 2008). Ačkoliv je drozofila nejznámějším příkladem „odlišných“ telomer, další „odlišné“ typy jsou nalézány např. u pakomára rodu *Chironomus* nebo komára *Anopheles gambiae*, s telomery tvořenými dlouhými satelitními sekvencemi (Saiga a Edström 1985).

1.3.2. Telomera a replikace DNA

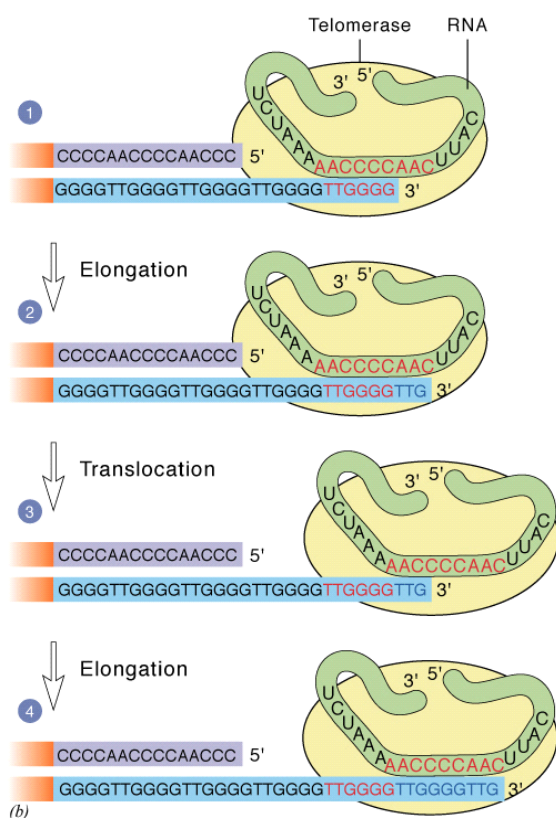
V souvislosti s replikací chromosomálních konců James Watson v roce 1972 napsal: „Zatímco syntéza ve směru 5'-3' by měla probíhat hladce od začátku až do konce svého templátu, u opačného vlákna žádný jednoduchý způsob k dosažení 3' konce nevidím.“

Replikace konců DNA, tj. konců chromosomů, je vskutku problém, vycházející z neschopnosti DNA polymerázy plně syntetizovat tyto části. DNA polymeráza může syntetizovat DNA pouze ve směru 5'-3' a pro iniciaci syntézy vyžaduje přítomnost krátké sekvence RNA, tzv. RNA primerů, které přisedají k templátovému řetězci a od kterých začíná syntéza DNA. RNA primery, které tedy slouží jako místo startu pro syntézu DNA, jsou následně degradovány, ale pozice v nově vzniklém řetězci, která je po jejich degradaci uvolněna, nemůže být již dodatečně dosyntetizována. Volný G-konec po odpojení RNA-

primeru nemůže poskytnout volnou 3'-OH skupinu pro polymeraci deoxyribonukleotidů (Snustad a Simmons 2009). Tímto jsou koncové úseky chromosomů zkracovány. Existence mechanismů, které by kompenzovaly tyto koncové ztráty, byly předpovězeny Olovnikovem (Olovnikov 1973) a poprvé popsány v roce 1985 Carol Greider a Elizabeth Blackburn, kteří přišli s objevem enzymu telomerázy.

1.3.3. Telomeráza

Poprvé byla telomeráza identifikována u nálevníka *Tetrahymena thermophila* (Greider a Blackburn 1985). Nicméně postupem času byla její činnost prokázána u většiny eukaryotních organismů (Nugent a Lundblad 1998).



Obr. 3: Jednoduché schéma procesu elongace telomer za pomoci telomerázy (Greider and Blackburn 1989).

Telomeráza je velký komplex, složený z RNA a bílkovin, pracující jako reverzní transkriptáza podle svého RNA templátu, který obsahuje sekvenci komplementární k telomerické sekvenci (Greider a Blackburn 1989). Molekulová hmotnost tohoto enzymu v lidských buňkách je přibližně 500 kDa. Skládá se ze dvou podjednotek. První podjednotkou je TERT (TELomerase Reverse Transcriptase), která je zodpovědná za reverzní transkripci a byla poprvé identifikována u kvasinek. Struktura podjednotky TERT sestává ze tří hlavních částí: první je N-terminální prodloužení, obsahující RNA vazebné

domény, druhou je centrální katalytická RT doména a třetí je krátká C-terminální extenze (Autexier 1994). Druhá podjednotka, která nese templátovou molekulu RNA se označuje TR (Telomerase RNA) (Blasco *et al.* 1997). Na svém 5'konci nese sekvenci templátu a 3'konec je tvořen specifickou oblastí H/ACA boxů (Smith a Steitz 1997). Podjednotka TR je ve své délce značně proměnlivá. Například u prvoka *Tetrahymena* je dlouhá 150 nukleotidů (Greider a Blackburn 1989) a u hub více než 1300 nukleotidů (Chen a Graider 2004). Telomeráza dosedá na konec chromosomu, ke kterému doplňuje terminální úseky

syntetizované podle templátové molekuly RNA. Sekvence komplementárního řetězce je dosyntetizována za pomoci DNA polymerázy. *In vitro* u *Euplotes aediculatus* bylo zjištěno, že aktivita telomerázy se sestává ze čtyř kroků (Hammond a Cech 1998). Nejprve se telomeráza váže na 3' konec substrátové DNA, a to za pomoci podjednotky TR a dalších specifických proteinů. Následně dojde k samotnému procesu přidávání deoxyribonukleotidů a k přepsání celé telomerické sekvence (Obr. 3). Po přepsání dojde k odpojení telomerázy a jejímu přesunu na jiné místo DNA, kde pokračuje v dalším přepisování nebo k jejímu odpojení a dokončení procesu (Wyatt *et al.* 2010). Původním předpokladem bylo, že telomeráza je aktivní pouze u telomer, které jsou tvořeny krátkou opakující se sekvencí, avšak díky *in vitro* experimentům na *Tetrahymena* bylo prokázáno, že telomeráza umožňuje prodlužování také netelomerických sekvencí (Wang a Blackburn 1997). U různých organismů se telomeráza liší také svými vlastnostmi a přesností syntézy. Například u hub či kvasinek telomeráza vyrábí DNA *in vitro* více méně o jedné repetici, kdežto telomeráza člověka je schopna přidávat až stovky nukleotidů (Morin 1989; Greider 1991; Prowse a Greider 1995). Detailní činnost telomerázy byla prostudována také v lidských buňkách (Shay a Bacchetti 1997).

Telomeráza je obvykle aktivní v dělících se zárodečných buňkách, nejvyšší aktivita byla zaznamenána během embryonálního vývoje. U většiny somatických buněk dospělého člověka je hladina telomerázy nulová či jen velmi nízká. Výjimkou jsou proliferativně aktivní buňky, jako lymfocyty, epiteliální buňky nebo buňky kmenové (Shay a Bacchetti 1997, Yasumoto *et al.* 1996). Vysoká telomerázová aktivita je rovněž zjišťována u nádorových buněk (Harley a Villeponteau 1995). Samotná aktivita telomerázy je ovlivněna mnoha faktory. Dochází k interakcím telomerázy s telomerami a dalšími proteiny. Činnost telomerázy je např. ovlivňována přítomností G-kvadruplexů na volném G-přesahu. Díky těmto kvadruplexům, dochází ke snížení aktivity telomerázy, neboť zamezují jejímu přístupu k telomerám (Collins 2006).

1.3.4. Telomerická smyčka a telomerická čepička

U obratlovců bylo prokázáno, že telomerická DNA je sbalena do nukleosomu a zakončená tzv. t-smyčkou. Již zmíněný přesahující konec bohatý na G báze je v této struktuře přetočen a vniká do dvouřetězcové oblasti zpět a vytvoří tzv. očko neboli D-loop. Důležité pro stabilitu této t-smyčky jsou u savců proteiny shelterinového komplexu, který se sestává z šesti proteinových podjednotek (TRF1, TRF2, TIN2, TPP1, POT1 a Rap1) (Griffith

et al. 1999), které spolu s dalšími proteiny vytváří tzv. telomerickou čepičku. U savců a pravděpodobně i dalších organismů, jejichž telomery jsou tvořeny krátkými repeticemi, je formace telomerické čepičky striktně závislá na přítomnosti telomerické sekvence a dostatečné délce telomery. Telomerická čepička mimo jiné slouží pro rozpoznání přirozených chromosomálních konců od chromosomálních zlomů. V případě, že je formace telomerické čepičky porušena, ať už z důvodu defektu některého z proteinů nebo nedostatečné telomerické délky, dochází k aktivizaci buněčných reparačních mechanismů, jejichž činností dochází k chromosomálním fúzím, eventuelně k apoptóze (Mason *et al.*, 2007; Capkova Frydrychova *et al.* 2008).

U organismů jako jsou kvasinky a prvoci, obsahující v telomerové oblasti taktéž krátké opakované sekvence, je tato telomerická DNA sbalena do tzv. telosomů, nenukleosomálních struktur (Wright *et al.* 1992).

1.3.5. Neobvyklé telomery

Vedle výše popsaného telomerázového systému pro udržování délky telomer existují i odlišné mechanismy. Jsou to tzv. alternativní způsoby prodlužování telomer, které jsou aktivní u organismů, u kterých je hlavním kompenzačním mechanismem činnost telomerázy, jako např. u člověka rekombinace v 5 – 20% nádorových buněk (Henson *et al.* 2002). Jsou to ale taktéž mechanismy, které zajišťují kompenzaci telomerických ztrát u organismů postrádajících telomerázu, jejichž telomery nejsou tvořeny krátkými repeticemi. Příkladem těchto organismů jsou zástupci dvoukřídlých (Gilson a Géli 2007).

Například u *Ch. pallidivittatus* byly nalezeny telomery s opakujícími se repeticemi o 340 bp (Saiga a Edström 1985). Tyto dlouhé repetitivní sekvence jsou pravděpodobně prodlužovány mechanismem genové konverze (Rovira *et al.* 1993; López *et al.* 1996). Obdobný mechanismus byl popsán u komára *A. gambie* (Pluta a Zakian 1989; Wang a Zakian 1990), taktéž u cibule *Allium cepa* (Pich a Schubert 1998).

1.4. Retrotransposony

Nejvýznamnějším příkladem alternativní skladby telomer a typu kompenzačního mechanismu je drozofila. Telomery drozofily jsou tvořeny tzv. non-LTR retroposony (non-long-terminal-repeat retrotransposable elements) *HeT-A*, *TART* (Mason a Biessmann 1995; Biessmann *et al.* 1992) a *TAHRE* (Abad *et al.* 2004), které jsou v telomeře v náhodném

uspořádání (Obr. 4). Lokalizace těchto transposonů je specifická pro chromosomové konce a tudíž jsou označovány jako telomerické retroelementy. Telomerické elementy byly popsány u *D. melanogaster*, avšak později byly nalezeny u dalších druhů např. u *D. virilis*, což ukazuje, že tento mechanismus se zachoval z doby před 40 – 60 milionů lety, tj. doby před speciací daných druhů (Russo *et al.* 1995). Elementy se v telomeře vyskytují v mnohonásobných kopiích (Kaminker *et al.* 2002), nicméně většina z těchto kopií je, vzhledem k nekompletní replikaci, zkrácená na svém 5' konci a tedy nefunkční. Oblast, zahrnující tyto tři retrotransposony, byla zkráceně nazvána HTT. HTT oblast má značně variabilní délku, a to od 26 do 147 kb.

Všechny tři telomerické retroelementy obsahují neobvykle dlouhé 3' nepřekládané oblasti (UTRs). *HeT-A* element má více než 2,5 kb nekódujících sekvencí (Danilevskaya *et al.* 1997), v jeho struktuře se nenachází ORF 2 (Open reading frame), takže reverzní transkriptáza, která je např. u *TART* v ORF2, je získávána zatím neznámým způsobem (Abad *et al.* 2004). Dlouhý 3' nepřekládaný region v případě *HeT-A* elementu obsahuje nedokonalé repetice (Abad *et al.* 2004) a promotorovou sekvenci, která zajišťuje transkripci sousedního elementu, ležícího v 3' směru (Obr. 4). *HeT-A* je několikanásobně hojnější než *TART*. *TART* obsahuje dva čtecí rámce ORF1 a ORF2 (také nazývány gag a pol, protože jejich sekvence jsou podobné retrovirovým gag a pol genům). V ORF2 je obsažena endonukleázová a RT doména (Obr. 4). Sekvence těchto telomerických prvků byly nalezeny také v centrickém heterochromatinu, pravděpodobně jako pozůstatek chromosomálních fúzí (Traverse a Pardue 1989; Danilevskaya *et al.* 1993). *TAHRE*, stejně jako *TART*, kóduje reverzní transkriptázu, gag a pol proteiny. *TAHRE* sdílí sekvenci podobnost s *HeT-A* (ORF1, 5'UTR, 3'UTR) (Obr. 4), stejně jako vzor transkripce, což vede k hypotéze, že *TAHRE* je zdroj RT enzymatické aktivity pro *HeT-A* transpozici (Abad *et al.* 2004). Segmenty elementů jsou extrémně bohaté na adeninové sekvence (Rashkova *et al.* 2002).



Obr. 4. Strukturální uspořádání telomerických non-LTR retrotransposonů u *D. melanogaster*.

Kompenace telomerické délky u drozofily je prostřednictvím transpozice telomerických elementů cílené specificky ke koncům chromosomů. Celý proces elongace telomer zahrnuje několik kroků. Prvním krokem je transkripce telomerických elementů. Vzniklé transkripty jsou transportovány ven z jádra do cytoplasmy, poté dochází k jejich translaci na ribozomech a tvorbě proteinů. Dojde k navázání proteinů Gag na transkripty retroelementů a tyto nukleoproteinové komplexy jsou transportovány zpět do jádra, kde se pomocí svého 3' oligoA konce navazují na chromosomální konec, na kterém dochází k jejich přepisu do DNA pomocí reverzní transkriptázy. V posledním kroku se na koncích vytvoří telomerická čepička, tedy komplex specifických proteinů, zajišťující ochranu telomery (Biessmann a Mason 2003). Cílení elementů ke koncům chromosomů je nezávislé na sekvenci daného chromosomálního konce (Traverse a Pardue 1988; Biessmann *et al.* 1990; Biessmann *et al.* 1992).

Na rozdíl od např. obratlovců, kde ztráta telomery vede k letalitě buňky, u drozofily buňka po ztrátě telomer vykazuje životaschopnost i po mnoho generací. Chromosomy, kterým chybí HTT oblast byly nalezeny jak v laboratorních kmenech, tak i v přírodních populacích (Mechler *et al.* 1985; Mason *et al.* 2004). Zachování životaschopnosti v případě telomerických deficiencí je u drozofily umožněno sekvenčně nezávislou formací telomerické čepičky, tj. její schopností se vytvářet na jakémkoliv chromosomálním konci, tzn. i netelomerickém (Capkova Frydrychova *et al.* 2008).

1.5. Zkracování telomer vlivem oxidativního stresu

Po ztrátě či významném zkrácení telomerické oblasti chromosomu je u většiny organismů spuštěn signál pro buněčnou senescenci nebo buněčnou smrt. Předpokládá se, že zkracování telomer je nejenže neodbytnou součástí procesu stárnutí, ale že významné ztráty telomerické sekvence v somatických buňkách dospělého člověka výrazným způsobem stárnutí urychlují (Salk 1982; Zglinicki *et al.* 2002). Vedle telomerických ztrát nekompletní replikací jsou telomery zkracovány působením oxidativního stresu a dokonce se předpokládá, že v porovnání s nekompletní replikací má působení oxidativního stresu na telomerickou délku mnohem výraznější vliv.

V porovnání s ostatními částmi chromosomů jsou telomery k oxidativnímu poškození mnohem náchylnější. Je to dáno především bohatým zastoupením guaninu, který je pro vznik oxidativních modifikací obzvláště citlivý, zejména ke vzniku 8-oxo-deoxyguanosinu a také sníženou aktivitou DNA reparačních procesů v telomerách. Rovněž dochází ke vzniku

jednořetězcových zlomů, vznikající buď přímo, nebo jako mezikrok při opravě modifikovaných bází. Přítomnost jednořetězcových zlomů může být důvodem pro odpadnutí koncové části telomery při tvorbě replikační vidličky, kdy dvouřetězec DNA disociuje na jednořetězcové úseky, a tím dochází k výraznému zkrácení telomery. Na rozdíl od zbytku genomové DNA dochází v té telomerické k nedostatečnému opravování poškozené DNA. To bylo například pozorováno v brzlíku teleste při reakci H_2O_2 s Cu^{2+} (Oikawa a Kawanishi 1999), kdy byla prokázána zvýšená četnost zlomů a jejich pomalé či neúplné opravy ve srovnání s minisatelity. V porovnání s netelomerickými oblastmi, poškozená telomerická DNA je opravována daleko méně efektivněji. Důvodem je nízká aktivita reparačních mechanismů v telomerách, pravděpodobně díky přítomnosti telomerického proteinu TRF2 (telomeric repeat binding protein), který blokuje přístup reparačních enzymů k defektní DNA (Richter *et al.* 2007; Beyne-Rauzy *et al.* 2004). Existuje předpoklad, že působení oxidativního stresu ovlivňuje rovněž i aktivitu telomerázy (Epel *et al.* 2004).

1.6. Propojení oxidativního stresu, telomer, psychického stresu a zdravotních aspektů.

Vazba mezi chronickým stresem a špatným zdravotním stavem byla potvrzena četnými studii (McEwen 1998; Segerström a Miller 2004). Akcelerace buněčného stárnutí působením stresu zahrnuje změny v telomerách a aktivitě telomerázy. Změny telomerické délky mohou chorobný stav v organismu doprovázet či, jak je předpokládáno, dokonce jej evokovat. Např. u lidí s *dyskeratosis congenita*, vzácným genetickým onemocněním, které snižuje schopnost syntetizovat dostatečné množství telomerázy, dochází ke zkrácení telomer a předčasnému úmrtí z progresivního selhání kostní dřeně a díky náchylnosti k infekcím. Vliv vnímaného psychosociálního stresu na buněčné prostředí byl prokázán jako zvýšené oxidativní poškození v leukocytech (Irie *et al.* 2001). Je tedy předpokládáno, že chronický psychický stres přispívá ke zkrácování telomer, snižuje funkci telomerázy a vede k oxidativnímu stresu, který přispívá velkou měrou ke vzniku různých onemocnění.

Vzhledem k prokázanému vztahu mezi stresovými hormony a oxidačním stresem na buněčné úrovni se předpokládá, že stres vede k oxidačnímu stresu prostřednictvím chronické aktivity autonomní a neuroendokrinní reakce. Např. glukokortikoidy, primární adrenální hormony vylučované při stresu, zvyšují oxidativní stres z části tím, že zvyšují hladiny glutamátu a vápníku a snižující antioxidantní enzymy (McIntosh a Sapolsky 1996). Zkrácování telomer tedy může být způsobeno psychickým stresem, který bezpochyby

souvisí se špatným životním stylem a nedostatkem pohybu. Dle různých studií byl prokázán pozitivní vliv pravidelné pohybové aktivity na délku telomer (Cherkas *et al.* 2008). Ačkoliv všechny tyto faktory ovlivňují délku telomer a vznik oxidativního stresu, délka telomer je také do značné míry dána genetickou predispozicí (von Zglinicki *et al.* 2000).

1.7. Oxidativní stres indukovaný parakvatem

Parakvat-dichlorid (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridin-1,1'-diium-dichlorid, $C_9H_{13}N_5O$) je neselektivní herbicid, určený pro hubení plevele, působí rychle (několik minut po nástřiku) a kontaktně a je absorbován hlavně pomocí listů. Ničí rostlinné tkáně, narušuje proces fotosyntézy a dochází k protrhávání buněčných membrán, z nich poté dochází k úniku vody a listů, rostlina rychle vadne (Dinis-Olivera *et al.* 2006). Je také používán jako desikant a defoliant nebo jako vodní herbicid (Ecobichon 1991). Jako herbicid je parakvat na trhu, v rukou společnosti Syngenta, již od 60-tých let minulého století. I přes jeho vysokou toxicitu je dodnes používán u více než sta plodin, a to přibližně ve stovce zemí (Paraquat Information Centre 2010a). V řadě některých států, zejména EU, je však používání parakvatu v posledních letech pro zemědělské účely zakázáno. Parakvat je genotoxický, potenciálně karcinogenní a teratogenní (Wesseling *et al.* 2001).

K chronickým poškozením působením parakvatu patří zejména mitochondriální poškození prostřednictvím tvorby volných radikálů. Působením parakvatu dochází ke snížení počtu červených krvinek, bílých krvinek, hemoglobinu, nárůstu polymorfonukleárních leukocytů, změně poměrů jaterních enzymů, zvýšení draslíku a glukózy, úbytku hmotnosti řady orgánů jako mozek, srdce, játra, vaječníky, štítná žláza, ledviny, močový měchýř (EPA, internetový zdroj). IPCS (internetový zdroj) rovněž uvádí zvýšení kortikosteroidů v krevní plazmě. V laboratorních pokusech na jaterních buňkách potkanů, bylo prokázáno, že parakvat inhibuje účinky inzulínu (Kimura *et al.* 2007). Dále bylo prokázáno, že parakvat inhibuje inzulín-dependentní glukózu, prostřednictvím oxidativního stresu (Shibata *et al.* 2010). Součástí diskuse o negativních účincích parakvatu je také jeho neurotoxicita. Dle dostupných epidemiologických studií existuje souvislost mezi Parkinsonovou chorobou a expozicí parakvatu (Seidler *et al.* 1996). Při dlouhodobém působení má parakvat také účinky na imunitní systém, u něhož dochází k poklesu makrofágických buněk či k potlačení T lymfocytů (Caroleo *et al.* 1996).

Jako biomarkery pro intoxikaci parakvatem mohou být použity změny v jednotlivých složkách antioxidantního systému, jako jsou glutathion reduktáza, glukóza-6-fosfát

dehydrogenáza, glutation-S-transferáza, glutation peroxidáza, kataláza a superoxid dismutáza (Ray *et al.* 2007).

2. Cíle práce

Hlavním cílem mé bakalářské práce je studium vlivu oxidativního stresu na délku telomer u polytenních chromosomů drozofily a aktivitu telomerických kompenzačních mechanismů. Dílčí cíle zahrnují: (1) optimalizaci působení parakvatu pro indukci oxidativního stresu, (2) sledování změn ve struktuře chromosomů a délky telomer, (3) sledování transkripce elementu *HeT-A* jako markeru aktivity telomerického kompenzačního mechanismu.

3. Materiál a metody

3.1. Použitý kmen drozofily

Pro pokusy byly použity larvy 3. instaru *D. melanogaster* kmene *Oregon R*, chované v laboratorních podmínkách při pokojové teplotě na standardním kukuřično-melasovém médiu (163 g kukuřičného šrotu, 16g agaru, 33g sušených kvasnic, 200ml melasy, 2,6l vody) s desinfekčním roztokem (12g kyseliny benzoové, 2,5g kyseliny sorbové, 240 ml denaturovaného etylalkoholu).

3.2. Indukce oxidativního stresu

Oxidativní stres byl indukován podáváním parakvatu (Sigma – Aldrich, 36541). Pro optimální indukci oxidativního stresu byla testována koncentrace parakvatu v rozmezí od 2,5mM do 50mM. Parakvat byl přidáván do 0,7g instantního živného media (Formula 4-24, Carolina Biological Supply Company) rozpuštěného ve 2ml vody v Petriho miskách. Obdobným způsobem byly připraveny kontrolní vzorky, tzn. vzorky bez přídavku parakvatu. Na připraveném médiu byly larvy inkubovány po dobu 12 – 14 hodin.

3.3. Příprava preparátů polytenních chromosomů ze slinných žláz

Preparáty byly provedeny klasickou roztlakovou metodou. Tzn., larva byla přenesena do 45% kyseliny octové, zde byly vypitvány slinné žlázy a přeneseny na 2-3 min do kapky roztoku kyseliny mléčné, vody a ledové kyseliny octové v poměru 1:2:3 na podložním mikroskopickém skle. Tkáň byla přikryta krycím sklem a rovnoměrným tlakem palce roztlačena. Preparáty byly využity pro fluorescenční *in situ* hybridizaci, případně barveny orceinem a vyhodnocovány ve světelném mikroskopu.

3.4. Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

FISH byla provedena dle Sahara et al. (1999) s využitím sondy specifické k sekvenci elementu *HeT-A* a značené biotinem. Na každý preparát bylo použito 10 ng sondy s 3ng DNA lososích spermii. Směs byla precipitována klasickým způsobem pomocí 3M octanu sodného a 100% etanolu, a to po dobu jedné hodiny v -80°C a poté centrifugována při 4°C při 13000 rpm. Získaný pelet DNA byl rozpuštěn v 10μl hybridizační směsi (50% formamid (Sigma, kat. číslo F7508), 10% dextran sulfát, 20x SSC, 1% Tween 20). Proba byla

denaturována při 95°C po dobu 5 min a poté rychle přenesena na led, a to nejméně na 3 minuty. Chromosomální preparáty byly nejprve zchlazeny vložení do tekutého dusíku a ihned poté byla z preparátů za pomoci žiletky odstraněna krycí sklíčka a preparáty byly neprodleně odvodněny vložení do alkoholové řady (po 30-ti sekundách, 70%, 80%, 96% EtOH). Po vyschnutí byla skla přenesena do Coplinovy nádoby s 2x SSC, 1% Tween 20, pH7 (2xSSCT) a to na 20 min za mírného třepání při 37°C. Poté byla skla denaturována v 70% formamidu v 2x SSCT při 75°C, za mírného třepání po dobu 10min. Rychlým okapáním a osušením hran byl preparát zbaven přebytečného roztoku a následně bylo aplikováno 10µl připravené sondy v hybridizační směsi. Preparát byl přikryt krycím sklem (24x32 mm), jehož okraje byly utěsněny pomocí Rubber cementu (Fixo gum, Marabu GmbH & Co.) Takto připravené preparáty byly vloženy do vlhké komůrky a hybridizovány 20-24 hodin při 37°C. Preparáty byly promyty v 50% formamidu/2x SSC při 45°C, a to 4x 5 minut za mírného třepání. Další promytí bylo 4x 2minuty ve 2x SSCT pufru při 37°C a 5 minut v promývacím pufru 4x SSCT při pokojové teplotě. Po promytí byla reakce blokována pomocí 250 µl 2,5% BSA (Sigma, kat. číslo A9418) ve 4x SSC po dobu 10-ti minut. Následně byly preparáty inkubovány 45-60 minut při pokojové teplotě se 100µl roztoku streptavidinu konjugovaného s fluorochromem cyanomycinem 3 (Cy3; Jackson Research Laboratories, kat. číslo 016-160-084) v 2,5% BSA (1:1000). Poté byly preparáty promývány, a to 3x 5min ve 4x SSCT při 37°C. Preparáty byly následně opět blokovány ve 2,5% BSA v 4x SSC po dobu 10 min a poté inkubovány 60 min při 37°C s 50µl roztoku biotinylovaného anti-streptavidinu (Vector, kat. číslo BA-0500) v 2,5% BSA (1:25). Preparáty byly promyty 3x5min ve 4xSSCT za mírného třepání při 37°C a po opětovném blokování v 2,5% BSA inkubovány s antistreptavidinem konjugovaným s Cy3, v tomto případě po dobu 30-ti minut. Finální promývání bylo také provedeno v pufru 4xSSCT, 3x5min při 37°C. Chromosomy byly barveny pomocí DAPI o finální koncentraci 3ng/µl, (Sigma-Aldrich) v 60µl roztoku Antifade/preparát. Zásobní roztok Antifade je o složení 0,23 g DABCO (Sigma), 800 µl vody, 200 µl 1M Tris-HCl pH8, 9ml glycerolu. Preparát byl přikryt krycím sklem (24x32 mm), jehož okraje byly překryty lakem na nehty.

Preparáty byly pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem Zeiss Axioplan 2 a nasnímány digitální, černobílou CCD kamerou F-View. Snímky byly zpracovány v programu AnalySIS Software. Vyhodnocení, sestavování a úprava obrázků probíhala pomocí programu Adobe Photoshop CS4.

3.5. Izolace totální RNA

Na izolaci RNA bylo použito 30 larev 3. instaru *D. melanogaster* inkubovaných na pokusném médiu. Pro izolaci byl použit kit NucleoSpin RNA II (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, kat. číslo 740955.50). Při izolaci bylo postupováno dle návodu poskytnutým výrobcem. Koncentrace získané RNA byla stanovována spektrofotometricky.

3.6. Syntéza cDNA SMARTScribe™ reverzní transkriptázou

Pro syntézu cDNA byl použit kit (Super Script III First-Strand, Invitrogen, kat. číslo 18080-051). Na jednu reakci bylo použito 0,2 – 2 µg totální RNA. Reakce byla prováděna s 0,2 ng oligo dT, µl reverzní transkriptázy SmartScribe RT (100 jednotek/µl) v celkovém objemu 10 µl, při 42°C, 90 minut. Reakce byla zakončena zahřátím na 70°C po dobu 15-ti minut.

3.7. Izolace genomové DNA (gDNA)

Pro izolaci gDNA bylo využito 20 larev 3. instaru a byl použit kit PureLink Genomic DNA Kits (Invitrogen, kat. číslo K1820-01). Při izolaci bylo postupováno dle návodu poskytnutým výrobcem. Koncentrace získané DNA byla stanovována spektrofotometricky.

3.8. Real-time PCR

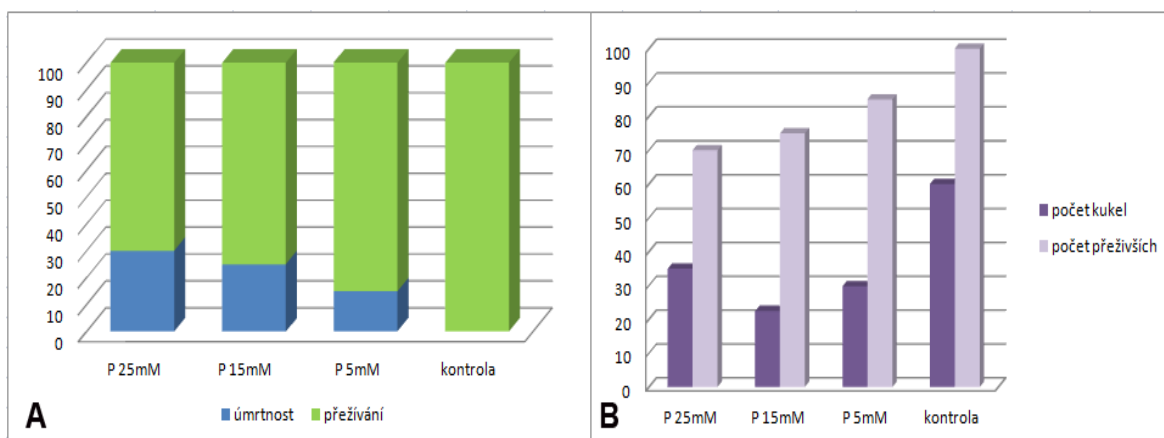
Kvantitativní real-time PCR byla využita pro vyhodnocování hladiny transkripce genu pro katalázu a telomerického elementu *HeT-A*, stejně tak jako počet kopií elementu *Het-A* v genomu. Jako referenční kontrola byl použit gen pro ribozomální protein *RpL 32*. Primery byly navrženy ke kódujícím sekvencím daných genů. Sekvence primerů byly pro katalázu byly 5'-AAGCAAATGGCTGGACGCG-3' a 5'-CAGGATAGGTCCTCGCGGA-3', pro *Rpl32* 5'-GGACAGTATCTGATGCCCAAC-3' a 5'- TCTCGCCGCAGTAAACGC-3', pro *HeT-A* 5'-ATTGTCTTCTCCTCCGTCCACC-3' a 5'-TTCTCTATGCTATTGTCGCTGTGC-3'. Pro real-time PCR byl využit Syber Premix Ex Taq II (Takara, ka. číslo RR081A) a reakce byla prováděna na BioRad CFX96 Real-time System. Profil reakcí byl následující: 3min, 95°C - (95°C, 30s- 58°C, 30s -72°C, 20s)_{30x}. Reakce byly prováděny v 25µl objemu, a to vždy v duplikátech. Finální koncentrace příslušných primerů byla 0,2 pmol/µl. Ze získaných ct hodnot byly výsledné poměry

počítány dle vztahu $R = \frac{Eff_{Ref}^{ct_{Ref}}}{Eff_{target}^{ct_{target}}}$, kde Eff je účinnost reakce, ct je získaná ct hodnota, Ref je referenční gen, target je cílový gen. Účinnost byla kalkulována dle standardní křivky. Reakce byly prováděny nejméně dvakrát, a to vždy s nově připravenými vzorky.

4. Výsledky

4.1. Indukce oxidativního stresu

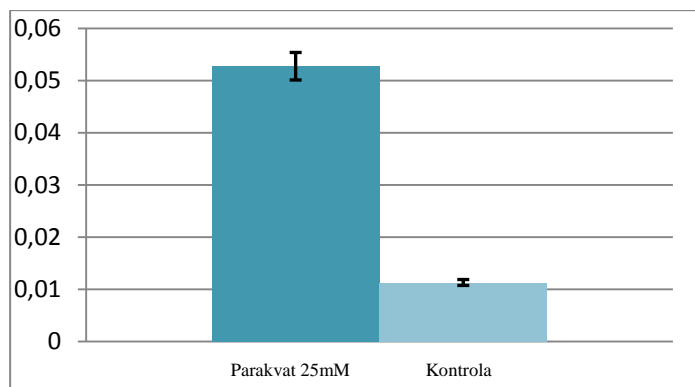
Prvním cílem mého výzkumu bylo určení vhodné dávky parakvatu pro indukci oxidativního stresu. Larvy 3. instaru byly ponechány při pokojové teplotě po dobu 12 – 14 hodin v instantním živném mediu s přidavkem parakvatu o koncentracích 25mM, 15mM a 5mM. Pro každý vzorek bylo použito 50 larev a byla vyhodnocována úmrtnost a schopnost zakuklení. V kontrolních vzorcích bez parakvatu byla úmrtnost nulová, přičemž 60 % jedinců bylo zakuklených. Úmrtnost při podání 25mM parakvatu byla 30%, u přeživších jedinců bylo zaznamenáno 50% zakuklených, úmrtnost u vzorku s 15mM parakvatem byla 25%, z přeživších 30% zakuklených a u působení 5mM parakvatu byla zaznamenána 15% úmrtnost, z přeživších 35% zakuklených (Obr. 5).



Obr. 5. A. Počet přeživších a mrtvých larev po působení 25mM, 15mM a 5mM parakvatu ve srovnání s kontrolním vzorkem bez působení parakvatu. B. Počet zakuklených jedinců u přeživších larev u kontroly a po působení parakvatu v uvedených koncentracích.

4.2. Vyhodnocení katalázy jako markeru oxidativního stresu

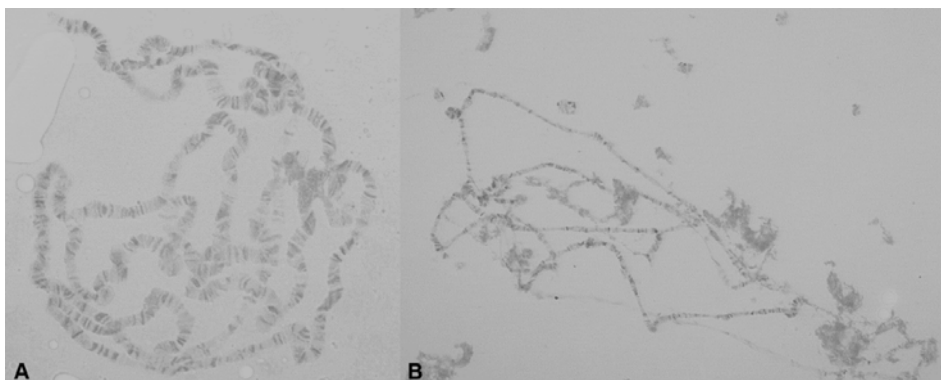
Jako marker oxidativního stresu byla použita kataláza, resp. hladina její transkripce. Pro vyhodnocení vzorků byla izolována totální RNA z larev 3. instaru, která byla přepsána do cDNA reverzní transkriptázou za použití oligo dT. Zajímavým zjištěním byla koncentrace izolované RNA, která u vzorku s 25mM parakvatem až osminásobně převyšovala koncentrace RNA u dalších vzorků. Transkripční hladina katalázy byla vyhodnocována oproti transkripci genu ribozomálního proteinu *Rpl32* jako interní kontroly s využitím Real-time PCR. V případě 25mM parakvatu byl nárůst transkripční hladiny katalázy výrazně vyšší oproti kontrolnímu vzorku (Obr. 6).



Obr 6. Transkripční hladina katalázy po působení 25mM parakvatu na larvy 3. instaru.

4.3. Morfologie chromosomů po působení oxidativního stresu

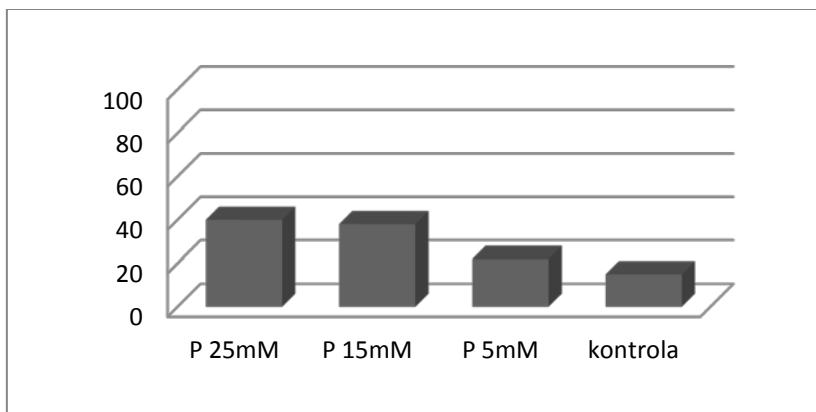
Pro vyhodnocení morfologie chromosomů byly použity polytenní chromosomy slinných žláz na roztakových preparátech. Byly použity larvy po působení 25mM, 15mM, 5mM parakvatu a negativní kontrola. Vzhledem ke kontrole byly u vzorků s parakvatem pozorovány značné odlišnosti v chromosomální struktuře, a to nejpatrněji na preparátech s nejvyšší koncentrací parakvatu (Obr. 7, 10).



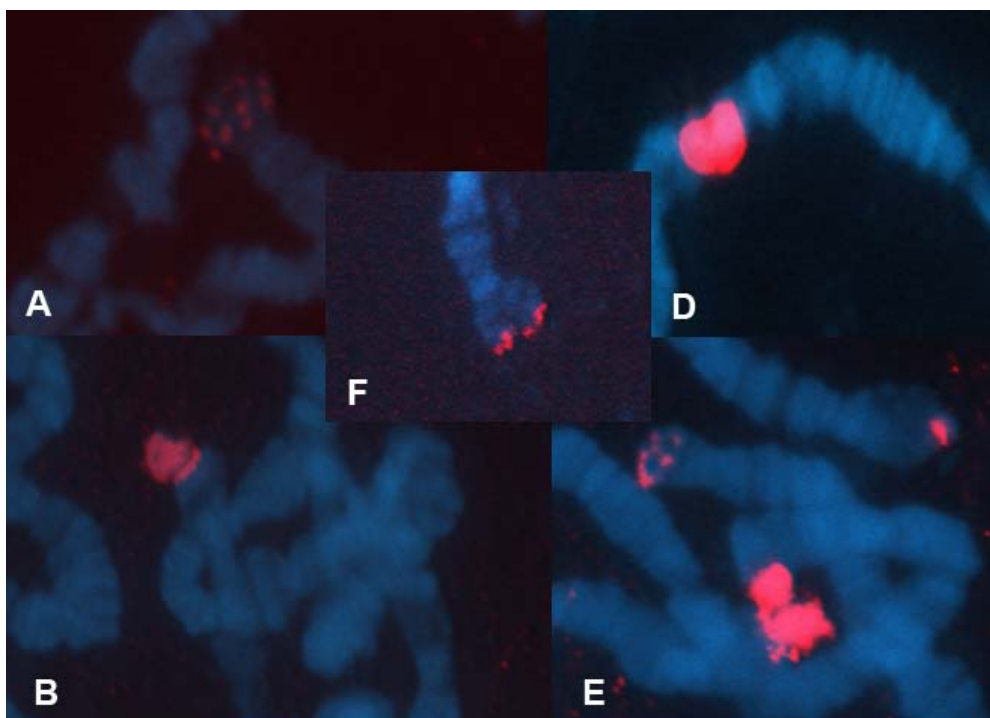
Obr. 7. Polytenní chromosomy barvené lakto-aceto-orceinem. **A.** kontrolní vzorek bez působení parakvatu. **B.** chromosomy po působení 25mM parakvatu.

Byla pozorována fragmentace chromosomů a v několika případech i přítomnost inverzních smyček. Detailní struktura chromosomů byla rovněž poškozená, často nebylo patrné ani typické proužkování chromosomů (Obr. 7, 10). Procentuelní zastoupení jader s chromosomálními fragmenty u vzorku s 25mM parakvatem bylo nad 40%, u kontroly k fragmentaci docházelo zhruba v 15% případů (Obr. 8). Podobný charakter chromosomální struktury jako u preparátů po působení 25mM parakvatu byl pozorován u preparátů s působením 15mM parakvatu. Poškození chromosomů u vzorku s 5mM parakvatem bylo celkově mírnější (Obr. 10). Celkově jsem vyhodnotila 480 polytenních jader a na základě

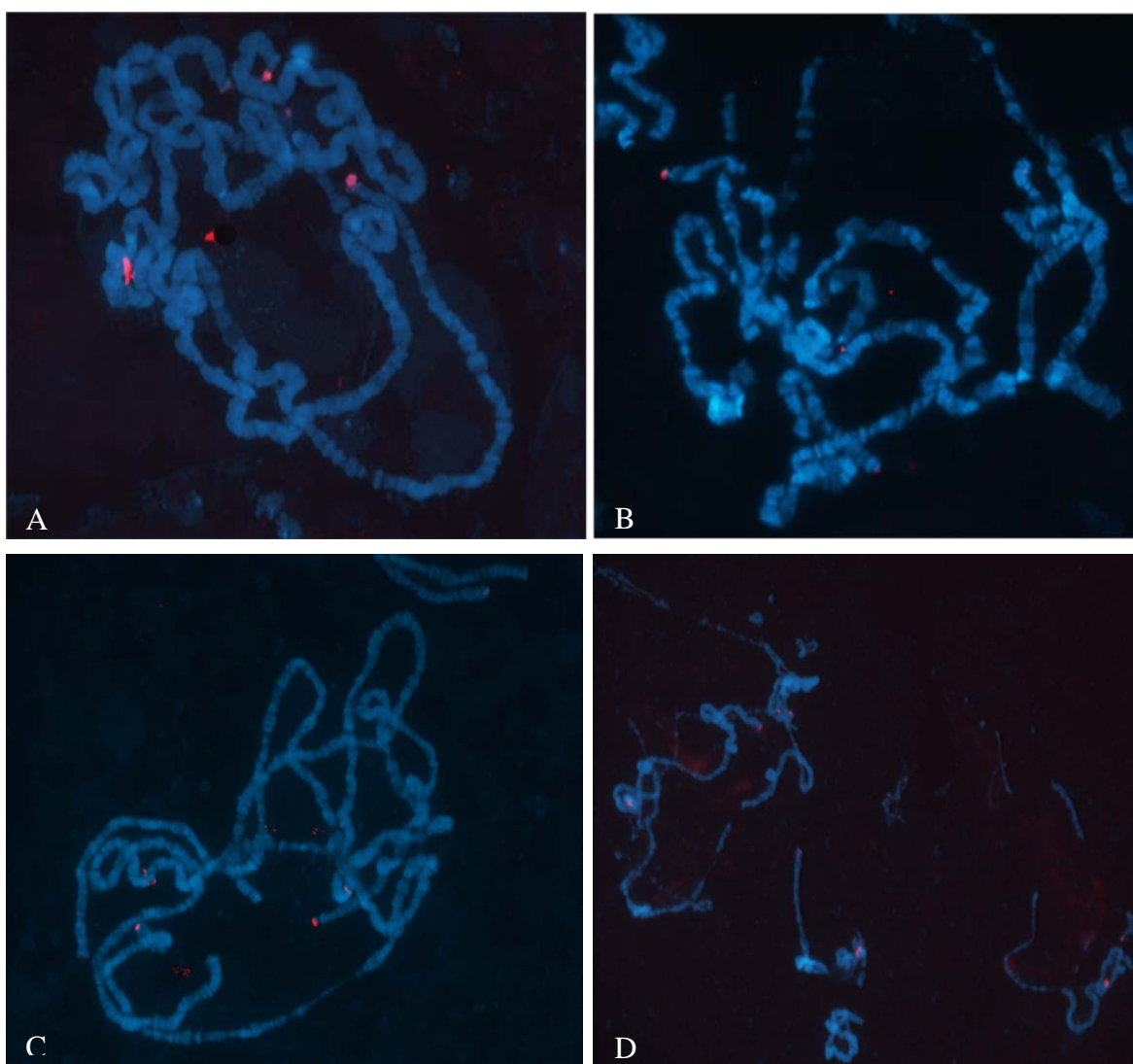
své analýzy mohou jednoznačně tvrdit, že působení parakvatu vede k významnému poškození celkové morfologie chromosomů.



Obr. 8. Procentuální zastoupení jader s chromosomálními fragmenty u negativní kontroly a chromosomů po působení parakvatu v uvedených koncentracích.



Obr. 9. Charakter hybridizačních signálů. **A.** Telomerický signál tvořený separovanými body. **B.** Celistvý telomerický signál. **D, E.** Přítomnost asociovaných telomer.



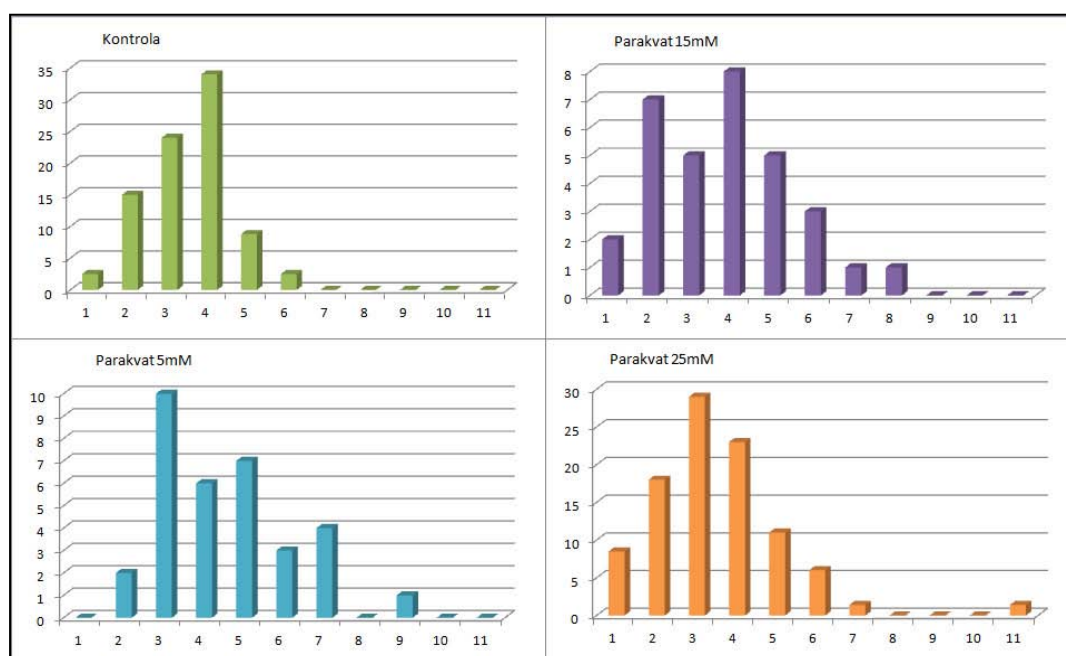
Obr. 10. Obrázky polytenních chromosomů po provedení metody FISH s telomerickou sondou k *HeT-A* elementu, značenou biotinem (červená barva) a následné barvení DAPI (modrá barva). **A.** Polytenní chromosomy bez působení parakvatu. **B.** Polytenní chromosomy po působení 15mM parakvatu. **C.** Polytenní chromosomy po působení 5mM parakvatu. **D.** Polytenní chromosomy po působení 25mM parakvatu.

4.4. Vyhodnocení délky telomer pomocí FISH

Pro vyhodnocení telomerické délky byly použity larvy 3. instaru, a to opět po působení parakvatu o koncentracích 25mM, 15mM a 5mM a u kontrolního vzorku bez působení parakvatu. Telomerická délka byla vyhodnocována na preparátech polytenních chromosomů hybridizovaných s nepřímo značenou telomerickou sondou k retrotranspononu *HeT-A*. Chromosomy byly barveny pomocí DAPI. Cílem bylo prozkoumání morfologie chromosomů, počet, velikost a intenzita hybridizačních signálů. Pomocí programu AdobePhotoshop byla vyhodnocována intenzita a plocha signálů, jejich počet v jádře a

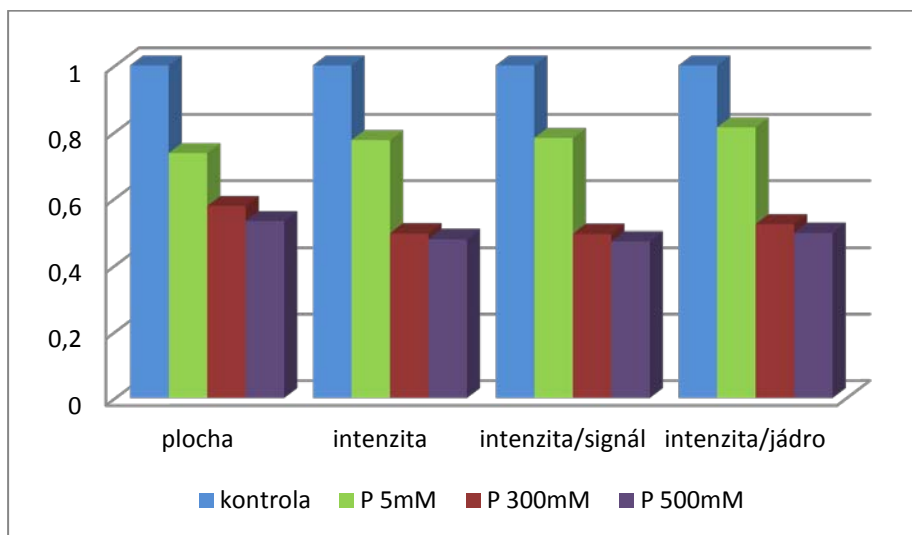
celkový charakter. U každého vzorku bylo vyhodnoceno cca 100 jader. Pozorované signály byly dvojího charakteru, jednak to byly celistvé signály a jednak signály tvořené množstvím malých separovaných bodů. Rovněž byly pozorovány asociace mezi telomerami různých chromosomů (Obr. 9). Je obecným pravidlem, že ne všechny chromosomální konce nesou *HeT-A* elementy a že počet telomer v jádře, pozitivních na tyto elementy, může být variabilní. Lze předpokládat, že působení oxidativního stresu může tyto rozdíly ještě více prohlubovat, a to jednak díky zkrácení či ztrátě telomer a jednak naopak vybuzením transpozice *HeT-A* elementu při stresových podmínkách. Proto jsem se v první řadě zaměřila na vyhodnocení počtu hybridizačních signálů v jednotlivých jádrech (Obr. 11). Z výsledků je patrné, že působením parakvatu došlo ke změně v celkové distribuci počtu jader o určitém počtu signálů, což je nejvýrazněji patrné v nárůstu jader s více než 6-ti signály (Obr. 11).

Předpokládáme, že zvýšený počet signálů mohl být působením oxidativního stresu vyvolán indukci nových transpozic *HeT-A* elementu nebo i fragmentací chromosomů a následnou formací de novo telomer na koncích vzniklých fragmentů. Nicméně celkově špatná morfologie chromosomů po působení parakvatu, pro kterou jsem nedokázala určit, zda se v daných případech jednalo o přirozený telomerický konec či konec chromosomálního zlomu, mi znemožňovala platnost těchto hypotéz testovat.



Obr. 11. Čestnost hybridizačních signálů v jednotlivých jádrech na základě provedené FISH s telomerickou sondou k *HeT-A* elementu po působení parakvatu v 5mM, 15mM, 25mM koncentraci.

Pro každý signál byla vyhodnocena jeho plocha a intenzita. Hodnoty obou těchto parametrů klesaly se stoupající koncentrací parakvatu, takže např. u vzorku s působením 25mM parakvatu byly hodnoty vzhledem ke kontrole dvojnásobně nižší (Obr. 12). Z naměřených výsledků byla spočítána průměrná intenzita v signálu a součtem intenzit signálů byla stanovena průměrná intenzita signálů na jádro. Tyto hodnoty vykazovaly stejný charakter, tedy se stoupající koncentrací docházelo ke snížení intenzity.

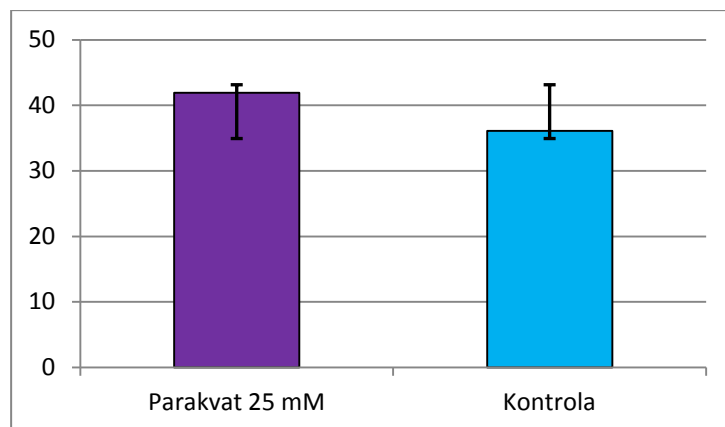


Obr. 12. Analýza hybridizačních signálů u vzorků po působení 25mM parakvatu a 5mM parakvatu.

Celkově lze tedy konstatovat, že výsledky hybridizace zcela jasně prokázaly, že působení oxidativního stresu má na telomery drozofily zásadní vliv, dochází k jejich zkracování a změnám v jejich formaci.

4.5. Počet elementů *HeT-A* v genomu

Vzhledem k tomu, že pomocí FISH jsem prokázala zkracování telomer v buňkách slinných žláz, mou další snahou bylo ověřit, zda k podobnému zkracování dochází i na úrovni celého organismu. Pomocí Real-time PCR byl vyhodnocován relativní počet elementů *HeT-A* v rámci genomu celých larev. Výsledky však nevykazovaly žádné výrazné rozdíly mezi vzorky po působení parakvatu a kontrolním vzorkem (Obr. 13). Vysvětlením této skutečnosti by mohl být fakt, že parakvat, který larvy přijímaly především s potravou, v porovnání se slinnými žlázami obdobně nepůsobil v celém organismu.



Obr. 13. Vyhodnocení telomerické délky na úrovni genomové DNA z celých larev na základě počtu kopií *HeT-A* elementu po působení 25mM parakvatu.

4.6. Transkripce elementu *HeT-A*

Předpokládá se, že oxidativní stres může ovlivňovat aktivitu mechanismů kompenzace telomerických ztrát. Proto mým dalším pokusem bylo vyhodnocení transkripční aktivity *HeT-A* elementu, opět s využitím Real-time PCR. Analýza, kterou jsem provedla, však přinesla celkově nejednoznačné výsledky se značnou variabilitou dat získaných při jednotlivých opakováních.

5. Diskuze

Hlavním cílem práce bylo sledovat účinek parakvatu, jako činitele pro vyvolání oxidativního stresu, na morfologii chromosomů, délku telomer a aktivitu telomerického kompenzačního mechanismu.

5.1. Oxidativní stres a antioxidační enzymy

Jako biomarker oxidativního stresu po působení parakvatu byla sledována kataláza. Kataláza je enzym, který rozkládá peroxid vodíku na H₂O a molekulární kyslík za pomoci porfyrinových hemových skupin (Ivancich *et al.* 1997). V larvách 3. instaru docházelo po působení vyšších dávek parakvatu ke zvýšené transkripci katalázy, což je důkazem zvýšené antioxidační reakce organismu. Aktivita katalázy, stejně jako dalších antioxidačních enzymů, je prostudována u celé řady organismů, stejně tak jsou do značné míry prostudovány toxické účinky parakvatu. U drozofily je toxicita parakvatu zřejmá, což dokazuje také studie, ve které působení 20mM parakvatu po 48 hodin vyvolalo na mouchách zcela letální účinky (Bonilla *et al.* 2006). Při působení parakvatu o koncentracích 25mM, 15mM a 5mM jsem zaznamenala 30%, 25% a 15% úmrtnost, což je ve shodě s publikovanými výsledky. Např. Hirano *et al.* (2012) pozorovali po působení 10mM parakvatu na tři dny staré mouchy snížení přežití o 60 – 70%. U 15 dní starých much docházelo po působení stejné dávky ke snížení přežití o 10%. Mouchy staré dva dny vykazovaly po podání 10mM parakvatu trojnásobný nárůst v expresi katalázy, u SOD k nárůstu oproti kontrolním vzorkům bez působení parakvatu nedocházelo (Hirano *et al.* 2012). V mých pokusech docházelo při 25mM parakvatu k 6-ti násobnému nárůstu exprese katalázy vzhledem ke kontrole. Je třeba ovšem dodat, že srovnávání procentuelní nárůstu letality či aktivity antioxidačních enzymů po působení parakvatu mezi různými typy experimentů lze dělat jen s určitou opatrností, s ohledem na genetický background, způsob podávání parakvatu (v médiu či jen roztoku sacharózy), poměru samců a samic v testovaném vzorku či způsobu anestezie much. Bylo prokázáno, že drozofilí samečci jsou mnohem více citlivější k oxidativnímu stresu než samičky (Magwere *et al.* 2006; Weber *et al.* 2012). V naší laboratoři jsme pozorovali až o 30% vyšší úhyn dospělých samečků oproti dospělým samičkám při působení 25mM parakvatu, rovněž byla pozorována výrazně vyšší citlivost k parakvatu při použití oxidu uhličitého jako anestetika (osobní sdělení školitelky).

Účinky parakvatu byly rovněž studovány u plošnice *Pyrrhocoris apterus*. Po injikování 38 pM parakvatu do dospělců *P. apterus* byly prokázány významné změny v mozku. Docházelo k peroxidaci lipidů, proteinové karboxylaci, docházelo ke změnám profilu krevních bílkovin, snížení plodnosti u samic a taktéž ke snížení životnosti u obou pohlaví (Krishnan *et al.* 2007). Byla zde prokázána také zvýšená enzymatická antioxidační odezva, v této práci ještě zvýšená účinkem přidáním adipokinetického hormonu (AKH), který se takto projevil jako součást antioxidačních mechanismů (Večeřa *et al.* 2007). Toto dokazuje i další práce (Kodrík 2008), ve které navození výrazného oxidativního stresu zvyšuje antioxidační hladinu a přirozené uvolňování AKH z cytoplasmy do hemolymfy. Zvýšená aktivita katalázy byla rovněž zjištěna u kultur femorálních arteriálních buněk hladkého svalstva králíků, lidských pupečních žil endotelových buněk či makrofágních buněk. Je také známo, že na působení parakvatu jsou obzvláště citlivé nigrostriální dopaminergické neurony (McCormack *et al.* 2005; Thiruchelvam *et al.* 2003) a rovněž se uvažuje o toxicitě u gliových buněk u potkanů (Morita *et al.* 1999).

5.2. Morfologie polytenních chromosomů po působení oxidativního stresu

Vliv oxidativního stresu byl testován pomocí polytenních chromosomů. Chromosomální struktura polytenních chromosomů má svá specifika, neprobíhá u nich buněčné dělení a zůstávají v interfázi. Vznikají endoreduplikací a u *D. melanogaster* mohou obsahovat až 2048 C. Charakteristický je pro ně systém proužků a meziproužků, mezi nimiž jsou nacházeny Balbianiho prstence, místa s intenzivní transkripcí (Case a Daneholt 1977). Po působení parakvatem v několika koncentracích na larvy 3. instaru jsem prokázala změny v chromosomální struktuře, chromozomální aberace jako chromosomální zlomy a inverzní smyčky. Výskyt chromosomálních zlomů po indukci oxidativním stresem byl několikrát prokázán, nicméně pro mnohé zůstává stále více méně kontroverzní. Na mitotických chromosomech buněk štítné žlázy prasete byly po indukci oxidativního stresu peroxidem vodíku prokázány v hojném počtu jednořetězcové a dvouřetězcové zlomy, obdobně rovněž u buněk štítné žlázy z lidské kultury (Driessens *et al.* 2009). U kmene drozofily s mutací v proteinu DRecQ4, podílejícím se na opravách dvouřetězcových zlomů, byla studována přítomnost fragmentovaných metafázních chromosomů po působení 10mM parakvatu. U kontrolního divokého typu byly tyto aberace nalézány ve 20% případů, naopak u mutantních typů byly chromozomální aberace pozorovány v 90% (Xu *et al.* 2009). Nicméně, vznik

dvouřetězcových zlomů působením parakvatu nebyl plně osvětlen (Xu *et al.* 2009). V mé studii jsem při působení parakvatu pozorovala zvýšenou frekvenci fragmentovaných chromosomů, ale je třeba si uvědomit, že vzhledem k přítomnosti mnohonásobných kopií vláken DNA v polytenních chromosomech o nich nelze hovořit jako o dvouřetězcových zlomech. Lze jen spekulovat o tom, jestli pozorované fragmentace vznikly skutečně působením parakvatu na všech vláknech DNA v daném místě nebo je pozorovaná fragmentace spíše artefaktem vzniklým při roztlaku preparátu, umocněným ovšem celkově špatnou strukturou chromosomů, danou působením parakvatu.

5.3. Zkracování délky telomer

Mnohé studie potvrdily vliv oxidativního stresu na telomery člověka (Zglinicki 2002; Petersen *et al.* 1998). Vliv oxidativního stresu byl studován v kulturách lidských fibroblastů, u nichž bylo zkracování telomer potvrzeno, jak působením peroxidu vodíku, tak působením chronické hyperoxie. V případě chronické hyperoxie bylo prokázáno pěti- až desetinásobně rychlejší zkracování telomer (Zglinicki *et al.* 2000). Různé kmeny fibroblastů mají také různou antioxidační obranu. Ty, které vykazují pomalejší zkracování telomer, mají zvýšenou expresi glutatioperoxidázy a/nebo Cu, Zn- dependentní SOD (Serra *et al.* 2000). Rovněž výzkumy naznačují, že senescence buňky nemusí být indukována při stejné délce telomery (von Zglinicki 2000; Toussaint *et al.* 2000). Tchirkov a Lansdorp (2003) prokázali, že akutní a chronický oxidační stres může vyvolat senescentní fenotyp. V řadě studií byl předčasný nástup senescence spojován se zrychleným zkracováním telomer (von Zglinicki 2002). Ve studii Wanga *et al.* (2010) byl zkoumán vliv oxidativního stresu na telomerickou délku a jejich triplet guaninových repetic u chromosomů myších tkání, primárních embryonálních buněk divokého typu a buněk s vypnutým genem *Ogg1*, kódující 8-oxoguanin DNA glykosylázu. Pomocí FISH a telomerické sondy bylo po působení parakvatu pozorováno snížení intenzity signálu u mutantních *Ogg1* oproti divokému typu. Taktéž docházelo ke snížení intenzity signálu u divokého typu po působení 0,5mM parakvatu oproti kontrolním buňkám, krom toho byly také pozorovány chromosomy bez detekovatelných telomerických signálů.

Ačkoliv je vliv oxidativního stresu na telomery člověka předmětem mnoha publikovaných studií, působení oxidativního stresu na drozofilí telomery studováno nikdy nebylo. To může být dáno odlišnou strukturou drozofilích telomer, tedy absencí krátkých telomerických repetic bohatých na guanin. Je to právě přítomnost guaninu, citlivého

k oxidativnímu poškození, která je obecně chápána jako důležitá predispozice telomerického zkracování vlivem oxidativního stresu. To může vést k domněnce, že vliv volných kyslíkových radikálů u drozofilích telomer nebude takový, jaký pozorujeme u lidských telomer a důvodem toho, proč tento modelový organismus ve výzkumu tohoto typu je opomíjen. Nicméně, v mém výzkumu jsem jednoznačně prokázala, že volné kyslíkové radikály ke zkracování telomer vedou i u drozofily. Krom zkrácené telomerické délky jsem pozorovala i jistý nárůst telomerických signálů v jednotlivých jádrech, což může naznačovat *de novo* formaci telomer na vzniklých chromosomálních zlomech nebo oxidativním stresem zesílenou aktivitu elementu *HeT-A*, transponujícího se k více telomerickým koncům. Díky špatné morfologii polytenních chromosomů po indukci oxidativního stresu nebylo možné určit, zda byly signály na přirozených či nově vytvořených chromosomálních koncích. Pomocí izolované genomové DNA z celých larev jsem testovala vliv parakvatu na počet kopií elementu *HeT-A*. Oproti kontrolním vzorkům jsem u vzorků s parakvatem nezjistila žádné změny. Na rozdíl od slinných žláz, tedy vliv parakvatu na telomerickou délku na úrovni celého organismu nebyl prokázán. Vzhledem k tomu, že parakvat byl larvami přijímán převážně s potravou, rozdíly telomerické délky mezi slinnými žlázami a celým organismem jsou pravděpodobně dány rozdíly v účinnosti parakvatu, danými jeho dosahem v organismu. To koresponduje s mým pozorováním u vzorků s 5mM parakvatem, u něhož zkrácení telomerické délky vzhledem ke kontrole bylo pouze minimální.

Celkově lze rovněž říci, že larvy v mých pokusech byly exponovány parakvatu v krátkodobých, ale relativně vysokých dávkách, které vedly k akutnímu stresu, doprovázeného značným úhynem larev. Je otázkou, k jakému pozorování bych dospěla při působení chronického stresu. Na kulturách z fibroblastů (V79 z čínských křečků) byla po vyvolání opakovaného stresu, za pomoci nízkých dávek H_2O_2 po dobu 4 týdnů, pozorována zvýšená činnost katalázy (Sen *et al.* 2005) a rovněž zkracování telomerické délky (Tchirkov a Lansdorp 2003).

5.4. Vliv oxidativního stresu na transkripci elementu *HeT-A*

Předpokládá se, že působení volných kyslíkových radikálů má, kromě na samotnou telomerickou délku, také vliv na aktivitu telomerických kompenzačních mechanismů. Spekuluje se především o vlivu na telomerázu, nicméně existuje jen minimální počet studií, které by tento předpoklad podpořily. V poslední době bylo prokázáno, že aktivita telomerázy může být modifikována oxidativním stresem *in vitro*, kdy nadměrná exprese TERT působí

ztrátu mitochondriálního membránového potenciálu a dochází ke zvýšení ROS v buňkách. Působením oxidativního stresu dochází i k anti-apoptické roli telomerázy, naopak poškozením hTERT je usnadněná indukce apoptózy po působení ROS v různých nádorových buněčných liniích (Massard *et al.* 2006). Endogenní TERT lze nalézt v jádře a cytoplasmě neuronů hypokampu myši a lidských buněk a tkání (Fu *et al.* 2000; Haendeler *et al.* 2009). Telomeráza může být spojována se signalizačním proteinem a společně se podílejí na sub-buněčném pohybu několika proteinů (Seimiya *et al.* 2000). Tento proces závisí na mnoha faktorech, taktéž na oxidativním stresu (Saretzki 2009).

Výzkumy vlivu oxidativního stresu na alternativní kompenzační mechanismy zcela chybí. Existuje snad jen jedna studie, která naznačuje vliv stresu, a to nikoliv stresu oxidativního, ale teplotního na transkripční aktivitu v telomerách pakomárů rodu *Chironomus*. U tohoto organismu byla v telomerách nalezena vysoce repetitivní nekódující sekvence, transkripčně aktivována po působení teplotního šoku (Martinez-Guitarte *et al.* 2008). Stejně tak byla ukázána aktivizace genomických transposabilních elementů při působení environmentálního stresu, kdy docháelo ke zvýšené genové transkripci v reakci na tepelné namáhání u *Pseudodiamesa branickii*. Vzhledem k napojení stresových hormonů na mechanismy vzniku oxidativního stresu (McIntosh a Sapolsky 1996) lze předpokládat, že tato publikovaná data naznačují propojení environmentálního stresu s hladinou oxidativního stresu a jeho vlivem na aktivitu telomerických kompenzačních mechanismů, o kterých můžeme uvažovat jako o součásti obranné mašinerie vůči působícím volným radikálům. Naše vyhodnocování transkripce *HeT-A* elementu však nepřineslo prokazatelné výsledky, nebylo možné určit zda dochází či nedochází ke kompenzaci, v tomto případě zvýšenou transkripcí *HeT-A* elementu. Rozporuplné výsledky by mohly vycházet z předpokladu, že telomery a jejich kompenzační mechanismy jsou významně citlivé na různé faktory, jako environmentální faktory či genetický background. Proto bude zapotřebí optimalizovat experimentální podmínky a tuto analýzu provést ještě jednou.

6. Závěr a perspektiva výzkumu

Ve své bakalářské práci jsem potvrdila vliv parakvatu, tedy působení volných kyslíkových radikálů, na morfologii polytenních chromosomů, telomerickou délku u drozofily a zvýšený nárůst pozorovaných chromosomálních fragmentů. Na úrovni transkripce katalázy jsem rovněž potvrdila, že podáváním parakvatu je indukována antioxidační reakce. Primárním cílem studie byl vliv akutního oxidačního stresu na telomery, a to jak polytenních, tak mitotických chromosomů. Nicméně z metodických a časových důvodů byla studie nakonec zaměřena pouze na polytenní chromosomy. Proto mým dalším cílem, v rámci dalšího výzkumu, je rozšíření studie na mitotické chromosomy, a to s využitím nejen klasické fluorescenční mikroskopie, ale také konfokální mikroskopie, která by v trojrozměrné vizualizaci jádra mohla přinést informace o případných změnách v prostorové organizaci telomer a tvorbě telomerických klastrů. V mém dalším zájmu bude, pro studium *de novo* formace telomer na chromosomálních zlomech, také určení lokalizace proteinů telomerické čepičky a foforylovaného histonu H2A(X) jako indikátoru přítomnosti dvouřetězcových zlomů.

7. Použitá literatura

- Abad JP, de Pablos B, Osoegawa K, de Jong PJ, Martín-Gallardo A, Villasante A. *TAHRE*, a Novel Telomeric Retrotransposon from *Drosophila melanogaster*, Reveals the Origin of *Drosophila* Telomeres. *Mol Biol Evol* 2004; 21(9):1620-1624.
- Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaie A. Pesticides and oxidative stress: a review. *International medical Journal of Experimental and Clinical Research* 2004 Jun;10(6):141-147.
- Ahnesorg P, Smith P, Jackson SP. XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* 2006 Jan 27;124(2):301-13.
- Artandi SE, Depinho RA. A critical role for telomeres in suppressing and facilitating carcinogenesis. *Current Opinion in Genetics & Development* 2000 Feb;10(1):39-46.
- Autexier C, Greider CW. Functional reconstitution of wild-type and mutant Tetrahymena telomerase. *Genes Dev* 1994 Mar 1;8(5):563-75.
- Bartsch H, Nair J. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. *Langenbecks Archives of Surgery* 2006 Sep;391(5):499-510.
- Beyne-Rauzy O, Recher C, Dastugue N, Demur C *et al.* Tumor necrosis factor alpha induces senescence and chromosomal instability in human leukemic cells. *Oncogene* 2004; 23:7507-7516.
- Biessmann H, Mason JM, Ferry K, Dhulst M, Valgeirsdottir K, Traverse KL, *et al.* Addition of Telomere-Associated Het Dna-Sequences Heals Broken Chromosome Ends in *Drosophila*. *Cell* 1990;61(4):663-73.
- Biessmann H, Champion LE, O'Hair M, Ikenaga K, Kasravi B, Mason JM. Frequent transpositions of *Drosophila melanogaster* HeT-A transposable elements to receding chromosome ends. *EMBO J* 1992 Dec;11(12):4459-69.
- Biessmann H, Mason JM. Telomerase-independent mechanisms of telomere elongation. *Cell Mol Life Sci* 2003 Nov;60(11):2325-33.
- Blasco MA, Lee HW, Rizen M, Hanahan D, DePinho R, Greider CW. Mouse models for the study of telomerase. *Ciba Found Symp* 1997;211:160-70.
- Bonilla E, Medina-Leendertz S, Villalobos V, Molero L, Bohórquez A. Paraquat-induced Oxidative Stress in *Drosophila melanogaster*: Effects of Melatonin, Glutathione, Serotonin, Minocycline, Lipoic Acid and Ascorbic Acid. *Neurochemical Research* 2006; 31(12) :1425-1432.
- Buck D, Malivert L, de Chasseval P, Barraud A, Fondaneche MC, Sanal O, *et al.* Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell* 2006 Jan 27;124(2):287-99.
- Cadenas E, Sies H. The lag phase. *Free Radical Research* 1998; 28(6):601-9.
- Capkova FR, Biessmann H, Mason JM. Regulation of telomere length in *Drosophila*. *Cytogenet Genome Res* 2008;122(3-4):356-64.
- Caroleo MC, Rispoli V, Strongoli MAC, Rainaldi G *et al.* Chronic administration of paraquat produces immunosuppression of T lymphocytes and astrocytosis in rats. *Toxic Subs Mech* 1996; 15:183-194.
- Case ST, Daneholt B. Cellular and molecular aspects of genetic expression in *Chironomus* salivary

- glands. *International Review of Biochemistry* 1977;15: 45-77.
- Collins K. The biogenesis and regulation of telomerase holoenzymes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2006 Jul;7(7):484-94.
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and dinase. *The Faseb Journal* 2003;17(10):1195-1214.
- Croteau DL, Bohr VA. Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry* 1997 Oct 10; 272(41): 25409-12.
- Dai Y, Kysela B, Hanakahi LA, Manolis K, Riballo E, Stumm M, et al. Nonhomologous end joining and V(D)J recombination require an additional factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003 Mar 4;100(5):2462-7.
- Danilevskaya ON, Lofsky A, Kurenova EV, Pardue ML. The Y chromosome of *Drosophila melanogaster* contains a distinctive subclass of Het-A-related repeats. *Genetics* 1993; 134 (2): 531-543.
- Danilevskaya ON, Arkhipova IR, Pardue ML, Traverse KL. Promoting in Tandem: The Promoter for Telomere Transposon *HeT-A* and Implications for the Evolution of Retroviral LTRs. *Cell* 1997;88(5):647-655.
- Dinis-Oliveira RJ, Remiao F, Carmo H, Duarte JA et al. Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 2006;27(6):1110-22.
- Driessens N, Versteijhe S, Ghaddhab CH, Burniat A. Hydrogen peroxide induces DNA single- and double-strand breaks in thyroid cells and is therefore a potential mutagen for this organ. *Endocrine-Related Cancer* 2009;16: 845–856.
- Ecobichon DJ. Toxic effects of pesticides. *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*. Sixth edition 2001;763–810.
- Ermak G, Davies KJA. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Molecular Immunology* 2002 Feb;38(10):713-21.
- Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research* 2004 Sep;567(1):1-61.
- Epel ES, Blackburn EH, Lin J, Dhabhar FS, Adler NE, Morrow JD, et al. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 Dec 7;101(49):17312-5.
- Fajkus J, Sykorova E, Leitch AR. Telomeres in evolution and evolution of telomeres. *Chromosome Res* 2005;13(5):469-79.
- Fridovitch I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1995;64:97-112.
- Fu W, Killen M, Culmsee C, Dhar S *et al*. The catalytic subunit of telomerase is expressed in developing brain neurons and serves a cell survival-promoting function. *Journal of Molecular Neuroscience* 2000; 14(1-2):3-15.
- Gilson E, Géli V. Mechanism that compensates for telomere loss. *Mol Cell Biol* 2007; 8:825-838.
- Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 1985 Dec;43(2 Pt 1):405-13.
- Greider CW, Blackburn EH. A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 1989 Jan 26;337(6205):331-7.
- Greider CW. Telomeres. *Curr Opin Cell Biol* 1991 Jun;3(3):444-51.

- Greider CW. Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem* 1996;65:337-65.
- Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, et al. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 1999 May 14;97(4):503-14.
- Grigolava IV, Ksenzenko M, Konstantinob AA, Tikhonov AN, Kerimov TM. Tiron as a spin-trap for superoxide radicals produced by the respiratory chain of submitochondrial particles. *Biokhimiia* 1980;(45):75–82.
- Guo XM, Allen SK. Fluorescence in situ hybridization of vertebrate telomere sequence to chromosome ends of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Journal of Shellfish Research* 1997 Jun;16(1):87-9.
- Haber JE. Partners and pathways - repairing a double-strand break. *Trends in Genetics* 2000 Jun;16(6):259-64.
- Haendeler J, Dröse S, Büchner N, Jakob S *et al.* Mitochondrial Telomerase Reverse Transcriptase Binds to and Protects Mitochondrial DNA and Function From Damage. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2009;29:929-935.
- Hammond PW, Cech TR. Euplotes telomerase: Evidence for limited base-pairing during primer elongation and dGTP as an effector of translocation. *Biochemistry* 1998 Apr 14;37(15):5162-72.
- Halliwell B. Commentary Oxidative Stress, Nutrition and Health. *Experimental Strategies for Optimization of Nutritional Antioxidant Intake in Humans. Free Radical Research* 1996; 25(1): 57-74.
- Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning) *Free Radical Research* 1999;31(4):261-72.
- Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990 May 31;345(6274):458-60.
- Harley CB, Villeponteau B. Telomeres and telomerase in aging and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 1995 Apr;5(2):249-55.
- Henson JD, Neumann AA, Yeager TR, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene* 2002 Jan 21;21(4):598-610.
- Heyer WD, Li X, Rolfsmeier M, Zhang X-P. Rad54: the Swiss Army knife of homologous recombination? *Nucl. Acids Res.* 2006; 34 (15):4115-4125.
- Hirano Y, Kuriyama Y, Miyashita T, Horiuchi J, Saitoe M. Reactive oxygen species are not involved in the onset of age-related memory impairment in *Drosophila*. *Genes Brain and Behavior* 2012;11(1):79-86.
- Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide Metabolism in Mammalian Organs. *Physiological Reviews* 1979;59(3):527-605.
- Chen J-L, Greider CW. Telomerase RNA structure and function: implications for dyskeratosis congenita. *Trend in biochemical science* 2004; 29(4): 183-192.
- Cheng SE, Lee IT, Lin CC, Kou YR, Yang CM. Cigarette smoke particle-phase extract induces HO-1 expression in human tracheal smooth muscle cells: role of the c-Src/NADPH oxidase/MAPK/Nrf2 signaling pathway. *Free Radic Biol Med* 2010 May 15;48(10):1410-22.

- Cherkas LF, PhD; Hunkin JL, Kato BS, Richards JB *et al.* The Association Between Physical Activity in Leisure Time and Leukocyte Telomere Length. *Arch Intern Med.* 2008; 168 (2) :154-158.
- Irie M, Asami S, Nagata S, Ikeda M *et al.* Psychosocial Factors as a Potential Trigger of Oxidative DNA Damage in Human Leukocytes. *Cancer Science* 2001; 92(3):367.
- Ivancich A, Jouve HM, Sartor B, Gaillard J. EPR investigation of compound I in *Proteus mirabilis* and bovine liver catalases: Formation of porphyrin and tyrosyl radical intermediates. *Biochemistry* 1997;36(31):9356-9364.
- Kaminker JS, Bergman CM, Kronmiller B, Carlson J *et al.* The transposable elements of the *Drosophila melanogaster* euchromatin: a genomics perspective. *Genome Biology* 2002; 3(12):0084.1–0084.20.
- Kao JY, Goljer I, Phan TA, Bolton PH. Characterization of the Effects of A Thymine Glycol Residue on the Structure, Dynamics, and Stability of Duplex DNA by NMR. *Journal of Biological Chemistry* 1993 Aug 25;268(24):17787-93.
- Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics* 2001 Mar;27(3):247-54.
- Kimura K, Tawara S, Igarashi K, Takenaka A. Effect of various radical generators on insulin-dependent regulation of hepatic gene expression. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007; 71(1):16-22.
- Kodrík D. Adipokinetic hormone functions that are not associated with insect flight. *Physiological Entomology* 2008; 33(3): 171-180.
- Konečná I, Holeček V, Racek J, Trefil L, Rokyta R. Antioxidant effects of melatonin. *Časopis lékařů Českých* 2001;140(9): 262-266.
- Krishnan N, Večeřa J, Kodrík D, Sehnal F. 20-hydroxyecdysone prevents oxidative stress damage in adult *Pyrhrocoris apterus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 2007; 65(3):114–124.
- Lander HM. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *Faseb Journal* 1997 Feb;11(2):118-24.
- Lewis DFV, Eddershaw PJ, Dickens M, Tarbit MH, Goldfarb PS. Structural determinants of cytochrome P450 substrate specificity, binding affinity and catalytic rate. *Chemico-Biological Interactions* 1998 Oct 2;115(3):175-99.
- Loft S, Poulsen HE. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *Journal of Molecular Medicine-Jmm* 1996 Jun;74(6):297-312.
- López CC, Nielsen L, Edström JE. Terminal long tandem repeats in chromosomes from *Chironomus pallidivittatus*. *Molecular and Cellular Biology* 1996 Jul;16(7):3285-90.
- Magwera T, West M, Riyahi K, Murphy MP *et al.* The effects of exogenous antioxidants on lifespan and oxidative stress resistance in *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of Ageing and Development* 2006;127(4):356-70.
- Makarov VL, Hirose Y, Langmore JP. Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell* 1997 Mar 7;88(5):657-66.
- Martinez-Guitarte JL, Diez JL, Morcillo G. Transcription and activation under environmental stress of the complex telomeric repeat of *Chironomus thummi*. *Chromosome Res* 2008;16(8):1085-

1096.

- Mason JM, Biessmann H. The unusual telomeres of *Drosophila*. *Trends Genet* 1995 Feb; 11(2):58-62.
- Mason JM, Ransom J, Konev AY. A deficiency screen for dominant suppressors of telomeric silencing in *Drosophila*. *Genetics* 2004 Nov;168(3):1353-70.
- Mason JM, Capkova-Frydrychova R, Biessmann H. *Drosophila* telomeres: an exception providing new insight. *BioEssays* 2007; 30(1):25-37.
- Massard C, Zermati Y, Pauleau AL, Larochette N, Wetivier D, Sabatier L, et al. hTERT: a novel endogenous inhibitor of the mitochondrial cell death pathway *Oncogene* 2006;25(33):4505-4514.
- McClintock B. The fusion of broken ends of chromosomes following nuclear fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1942;28:458-63.
- McCormack AL, Atienza JG, Johnston LC, Andersen JK, Vu S, Di Monte DA. Role of oxidative stress in paraquat-induced dopaminergic cell degeneration. *Journal of Neurochemistry* 2005;93(4):1030-7.
- McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators. *N. Engl. J. Med.* 1998; 33: 171–179.
- Mechler BM, McGinnis W, Gehring WJ. Molecular-Cloning of Lethal(2)Giant-Larvae, A Recessive Oncogene of *Drosophila-Melanogaster*. *Embo Journal* 1985; 4(6):1551-7.
- McIntosh LJ, Sapolsky RM. Glucocorticoids may enhance oxygen radical-mediated neurotoxicity. *Neurotoxicology* 1996; 17(3-4):873-882.
- Messner KR, Imlay JA. The Identification of Primary Sites of Superoxide and Hydrogen Peroxide Formation in the Aerobic Respiratory Chain and Sulfite Reductase Complex of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999;274(15):10119-10128.
- Meyne J, Ratliff RL, Moyzis RK. Conservation of the Human Telomere Sequence (Ttaggg)N Among Vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989 Sep;86(18):7049-53.
- Morin GB. The Human Telomere Terminal Transferase Enzyme Is A Ribonucleoprotein That Synthesizes Ttaggg Repeats. *Cell* 1989 Nov 3;59(3):521-9.
- Morita K, Tokunaga I, Kubo S. Cytotoxic effect of paraquat on rat C6 glioma cells: Evidence for the possibility of non-oxidative damage to the cells. *Japanese Journal of Pharmacology* 1999;79(1):121-4.
- Müller F, Wicky C, Spicher A, Tobler H. New Telomere Formation After Developmentally Regulated Chromosomal Breakage During the Process of Chromatin Diminution in *Ascaris-Lumbricoides*. *Cell* 1991 Nov 15;67(4):815-22.
- Nugent CI, Lundblad V. The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes & Development* 1998 Apr 15;12(8):1073-85.
- Oikawa S, Kawanishi S. Site-specific DNA damage at GGG sequence by oxidative stress may accelerate telomere shortening. *Febs Letters* 1999; 453(3):365-368.
- Olovnikov AM. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol* 1973 Sep 14;41(1):181-90.

- Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 2007 May;12(5):913-22.
- Petersen S, Saretzki G, von Zglinicki T. Preferential accumulation of single-stranded regions in telomeres of human fibroblasts. *Experimental Cell Research* 1998; 239 (1): 152-60.
- Pich U, Schubert I. Terminal heterochromatin and alternative telomeric sequences in *Allium cepa*. *Chromosome Res* 1998 Jun;6(4):315-21.
- Pluta AF, Zakian VA. Recombination Occurs During Telomere Formation in Yeast. *Nature* 1989 Feb 2;337(6206):429-33.
- Prowse KR, Greider CW. Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 May 23;92(11):4818-22.
- Rashkova S, Karam SE, Kellum R, Pardue ML. Gag proteins of the two *Drosophila* telomeric retrotransposons are targeted to chromosome ends. *J Cell Biol* 2002 Nov 11;159(3):397-402.
- Ray S, Sengupta A, Ray A. Effects of paraquat on anti-oxidant system in rats. *Ind J Exper Biol* 2007; 45:432-438.
- Richter T, Saretzki G, Nelson G, Melcher M, Olijslagers S, von ZT. TRF2 overexpression diminishes repair of telomeric single-strand breaks and accelerates telomere shortening in human fibroblasts. *Mech Ageing Dev* 2007 Apr;128(4):340-5.
- Rovira C, Beermann W, Edstrom JE. A Repetitive Dna-Sequence Associated with the Centromeres of *Chironomus-Pallidivittatus*. *Nucleic Acids Research* 1993 Apr 25;21(8):1775-81.
- Russo CAM, Takezaki N, Nei M. Molecular phylogeny and divergence times of drosophilid species. *Mol Biol Evol* 1995; 12:391-404.
- Sahara K, Marec F, Traut W. TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. *Chromosome Res* 1999;7(6):449-60.
- Saiga H, Edström JE. Long Tandem Arrays of Complex Repeat Units in *Chironomus* Telomeres. *Embo Journal* 1985;4(3):799-804.
- Salk D. Werners Syndrome - A Review of Recent Research with An Analysis of Connective-Tissue Metabolism, Growth-Control of Cultured-Cells, and Chromosomal-Aberrations. *Human Genetics* 1982;62(1):1-15.
- Saretzki G. Telomerase, mitochondria and oxidative stress. *Experimental Gerontology* 2009;44(8):485-492.
- Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *European Journal of Cancer* 1997 Apr;33(5):787-91.
- Seegerström SC, Miller GE. Psychological Stress and the Human Immune System: A Meta-Analytic Study of 30 Years of Inquiry. *Psychological Bulletin* 2004;130(4): 601-630.
- Seidler A, Hellenbrand W, Robra B-P, Vieregge P *et al*. Possible environmental, occupational, and other etiologic factors for Parkinson's disease: a case control study in Germany. *Neurology* 1996; 46:1275-1284.
- Sen P, Chakraborty PK, Raha S. p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) upregulates catalase levels in response to low dose H₂O₂ treatment through enhancement of mRNA stability. *Febs Letters* 2005;579(20):4402-6.

- Seimiya H, Sawada H, Muramatsu Y, Shimizu M *et al.* Involvement of 14-3-3 proteins in nuclear localization of telomerase. *The EMBO Journal* 2000; 19 (11): 2652-2661.
- Serra JA, Dominguez RO, de Lustig ES, Guareschi EM *et al.* Parkinson's disease is associated with oxidative stress: comparison of peripheral antioxidant profiles in living Parkinson's, Alzheimer's and vascular dementia patients. *Journal of Neural Transmission* 2001; 108(10):1135-1148.
- Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer 1. *European Journal of Cancer* 1997 Apr;33(5):787-91.
- Shibata M, Hakuno F, Yamanaka D, Okajima H *et al.* Paraquat-induced oxidative stress represses PI3-kinase activities leading to impaired glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 2010; 285(27):20915-25.
- Schonbaum GR, Chance B. in *The Enzymes* (Boyer PD, Ed.) 3rd ed.,1976;13:363-408.
- Schuff-Werner P, Spletstoesser W. Antioxidative properties of serotonin and the bactericidal function of polymorphonuclear phagocytes. *Adv Exp Med Biol* 1999;467:321-325.
- Skadsen RW, Schulze-Lefert P, Herbst JM. Molecular cloning, characterization and expression analysis of two catalase isozyme genes in barley *Plant Molecular Biology* 1995 Dec;29(5):1005-14.
- Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2003 Oct 29;531(1-2):231-51.
- Smith CM, Steitz JA. Sno storm in the nucleolus: New roles for myriad small RNPs. *Cell* 1997 May 30;89(5):669-72.
- Snustad DP, and Simmons JM. *Principle of Genetics (Second Edition)*. Learning and Teaching Support Network. 2000.
- Tan M, Wei C, Price CM. The telomeric protein Rap1 is conserved in vertebrates and is expressed from a bidirectional promoter positioned between the Rap1 and KARS genes. *Gene* 2003 Dec 24;323:1-10.
- Thiruchelvam M, McCormack A, Richfield EK, Baggs RB *et al.* Age-related irreversible progressive nigrostriatal dopaminergic neurotoxicity in the paraquat and maneb model of the Parkinson's disease phenotype. *European Journal of Neuroscience* 2003;18(3):589-600.
- Tchirkov A, Lansdorp PM. Role of oxidative stress in telomere shortening in cultured fibroblasts from normal individuals and patients with ataxia-telangiectasia. *Hum. Mol. Genet.* 2003; 12(3):227-232.
- Toussaint O, Medrano EE, von Zglinicki T. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Experimental Gerontology* 2000;35(8):927-945.
- Traverse KL, Pardue ML. A Spontaneously Opened Ring Chromosome of *Drosophila-Melanogaster* Has Acquired He-T Dna-Sequences at Both New Telomeres. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988 Nov;85(21):8116-20.
- Valko M, Morris H, Cronin MTD. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry* 2005;12(10):1161-208.
- Večeřa J, Krishnan N, Alquicer G, Kodrík D, Socha R. Adipokinetic hormone-induced enhancement of antioxidant capacity of *Pyrrhocoris apterus* hemolymph in response to oxidative stress.

Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 2007;146(3):336-342.

- Vitturi R, Colomba MS, Pirrone A and Libertini A. Physical mapping of rDNA genes, (TTAGGG)_n telomeric sequence and other karyological features in two earthworms of the family Lumbricidae (Annelida: Oligochaeta). *Heredity* 2000; 85, 203–207.
- von Zglinicki T, Serra V, Lorenz M, Saretzki G *et al.* Short Telomeres in Patients with Vascular Dementia: An Indicator of Low Antioxidative Capacity and a Possible Risk Factor? *Lab Invest* 2000; 80:1739–1747.
- von Zglinicki T. Oxidative stress shorten telomeres. *Trend in Biochemical Sciences* 2002; 27(7): 339-334.
- Wang SS, Zakian VA. Telomere Telomere Recombination Provides An Express Pathway for Telomere Acquisition. *Nature* 1990 May 31;345(6274):456-8.
- Wang H, Blackburn EH. *De novo* telomere addition by *Tetrahymena* telomerase in vitro. *The EMBO Journal* 1997;16:866-879.
- Wang ZL, Rhee DB, Lu JA, Bohr CT, Zhou F, Vallabhaneni H, et al. Characterization of Oxidative Guanine Damage and Repair in Mammalian Telomeres. *Plos Genetics* 2010;6(5).
- Watson JD. Origin of the concatameric T4 DNA. *Nature New Biol.* 1972;239:197-201.
- Weber AL, Khan GF, Magwire MM, Tabor CL *et al.* Genome-Wide Association Analysis of Oxidative Stress Resistance in *Drosophila melanogaster*. *Plos One* 2012;7(4).
- Wesseling C, van Wendel de Joode B, Ruepert C *et al.* Paraquat in developing countries. *Int J Occup Environ Health* 2001; 7:275-286.
- Williamson JR, Raghuraman MK, Cech TR. Monovalent cation-induced structure of telomeric DNA: The G-quartet model. *Cell* 1989; 59(5):871-880.
- Wright JH, Gottschling DE, Zakian VA. *Saccharomyces* telomeres assume a non-nucleosomal chromatin structure. *Genes & Dev* 1992; 6:197-210.
- Wyatt HDM, West SC, Beattie TL. InTERTpreting telomerase structure and fiction. *Nucl Acids Res* 2010; 38(17): 5609-5622.
- Xu YJ, Lei ZY, Huang H, Dui W, Liang XH *et al.* dRecQ4 Is Required for DNA Synthesis and Essential for Cell Proliferation in *Drosophila*. *Plos One* 2009;4(7).
- Yasumoto S, Kunimura C, Kikuchi K, Tahara H, Ohji H, Yamamoto H, et al. Telomerase activity in normal human epithelial cells. *Oncogene* 1996 Jul 18;13(2):433-9.
- Yasunari K, Maeda K, Nakamura M, Yoshikawa J. Pressure promotes angiotensin II-mediated migration of human coronary smooth muscle cells through increase in oxidative stress. *Hypertension* 2002 Feb;39(2):433-7.

Internetové zdroje:

IPCS. Environmental Health Criteria 39, Paraquat and Diquat. International Programme on Chemical Safety. World Health Organization 1984. Geneva.
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc39.htm>.

Paraquat Information Centre. 2010a. Use. <http://paraquat.com/use>

8. Přílohy

Izolace DNA

Pro izolaci DNA z drozofil byl použit kit „ PureLink Genomic DNA Mini Kit“ od firmy Invitrogen.

Přibližně 20 larev bylo přeneseno do 1,5ul mikroskopické zkumavky, do které bylo následně přidáno 200 μ l pufru PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer, 20 μ l proteinázy K a 20 μ l RNázy A. Pomocí homogenizátoru larvy homogenizujeme a dobře zvortexujeme. Inkubujeme 10 minut při 55 °C, aby byly rozpuštěny proteiny. Pak přidáme 200 μ l 100% a opět dobře zvortexujeme po dobu 5 sekund.

Roztok (zhruba 640 μ l) přepipetujeme do kolonky, která je součástí kitu, a centrifugujeme 1 minutu při 10 000 otáčkách za minutu. Odstředěnou kapalinu vylijeme a filtr umístíme do nové mikroskopické zkumavky.

Následuje promývací fáze. K membráně přidáme 500 μ l roztoku Wash Buffer 1 a centrifugujeme za stejných podmínek jako v předchozím kroku. Opět kapalinu vylijeme a filtr dáme do nové mikroskopické zkumavky. Připipetujeme 500 μ l Wash Buffer 2 a centrifugujeme na maximální rychlost po dobu 3 minut. Kapalinu znova odstraníme.

Nyní zbývá jen samotné uvolnění vyizolované DNA z membrány. Membránu umístíme do sterilní mikroskopické zkumavky o objemu 1,5 ml (není součástí kitu). Přímo do středu membrány napipetujeme 50 μ l PureLink Genomic Elution Buffer. Necháme v pokojové teplotě po dobu 1 minuty a následně centrifugujeme na maximální rychlost 1 minutu.

Vyizolovanou DNA uchováваме v mrazáku při -20 °C.

Izolace RNA

Pro izolaci RNA z jedinců drozofily byl použit kit „Total RNA isolation“ od firmy Macherey-Nagel.

K našemu vzorku, který jsme dobře zhomogenizovali, přidáme do mikroskopické zkumavky 350 μ l roztoku RA1 a 3,5 μ l β -merkaptoetanolu. Mikroskopickou zkumavku důkladně zvortexujeme. Abychom vyčistili roztok, použijeme mikroskopickou zkumavku s filtrem, která je součástí kitu (mikroskopická zkumavka z fialovým kroužkem na hrdle). Centrifugujeme po dobu 1 minuty při 11 000 otáčkách za minutu. Odstraníme filtr a k odstředěnému roztoku přidáme 350 μ l 70% etanolu (lze přidat i stejné množství 100% etanolu) a roztok promícháme pipetováním (5x).

Následně kapalinu nepipetujeme do nové mikroskopické zkumavky, která je opět součástí kitu (mikroskopická zkumavka s modrým kroužkem na hrdle). Centrifugujeme 30 sekund opět při 11 000

otáčkách za minutu. Filtr následně umístíme do nové mikrozkuhavky a připipetujeme 350 μ l roztoku MDB (Membrane Desalting Buffer) a centrifugujeme 1 minutu za stejných podmínek.

Připravíme si reakční směs DNázy. Do sterilní mikrozkuhavky o objemu 1,5 ml napipetujeme pro každou reakci 10 μ l naředěnou rDNázu a 90 μ l reakčního pufru pro rDNázu. Zamícháme převrácením mikrozkuhavky. Ke každému našemu vzorku následně přidáme do středu filtru 95 μ l této směsi a necháme po dobu 15 minut v pokojové teplotě.

Následuje promývání membrány. Na filtr přidáme 200 μ l pufru RA2 a centrifugujeme 30 sekund při 11 000 otáčkách za minutu. Odstředěnou kapalinu vylijeme a filtr umístíme do nové mikrozkuhavky a přidáme 600 μ l pufru RA3 a opět centrifugujeme za stejných podmínek. Kapalinu vylijeme a filtr umístíme zpět do mikrozkuhavky. Přidáme 250 μ l pufru RA3 a centrifugujeme 2 minuty při stejných podmínkách jako v předchozím kroku. Tím se membrána vysuší.

Kolonku umístíme do nové „neclease-free“ mikrozkuhavky o objemu 1,5 ml. Přidáme 60 μ l „RNase-free“ vody a centrifugujeme 1 minutu opět při 11 000 otáčkách za minutu. Vyizolovanou RNA uchovááme v mrazáku při -80 °C.

Syntéza cDNA SMARTScribe™ reverzní transkriptázou

Pro syntézu cDNA používáme kit od firmy Clontech.

V prvním kroku si vytvoříme mix, který obsahuje 1 μ g vyizolované RNA, 0,5 μ l oligo dT (50 μ M) a doplníme RNase free vodou do 5 μ l. Celou směs zahřejeme na 72 °C po dobu 3 minut a pak vzorek neprodleně přeneseme na led, kde ho inkubujeme 2 minuty. Pak centrifugujeme a ke vzorku přidáme 2 μ l 5x First-Stand Buffer, 1 μ l DTP mixu a 1 μ l 20 mM DTT. Jemně promícháme pipetou a ještě přidáme 1 μ l SmartScribe RT a opět zvolna promícháme. Následuje inkubace při 42 °C po dobu 60 minut. Reakci ukončíme zahřátím na 70 °C po 15 minut.