Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Vliv oxidativního stresu na antioxidační systémy, délku telomer a telomerázovou aktivitu u *Locusta migratoria*

Diplomová práce

Bc. Kristýna Vrbová

Školitel: RNDr. Radmila Čapková Frydrychová Ph.D.

České Budějovice

2014

Vrbová, K., 2013: Vliv oxidativního stresu na antioxidační systémy, délku telomer a telomerázovou aktivitu u *Locusta migratoria*. [Effect of oxidative stress on antioxidant systems, telomere length and telomerase activity in *Locusta migratoria*. Mgr. Thesis, in Czech]- 36 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Oxidative stress is caused by an imbalance between oxidants and antioxidants. Oxidative stress generated by reactive oxygen species (ROS) or reactive nitrogen species (RNS) occurs when protection of antioxidants fails or when an amount of ROS is too high. Telomeres, regions of repetitive nucleotide sequences at the end of chromosomes, are especially sensitive to oxidative stress because they contain a lot of guanine which is often oxidised. Antioxidants play an important role in protection against oxidative stress. In this thesis I analysed the effect of oxidative stress caused by paraquat on activity of antioxidant enzymes (catalase and superoxide dismutase) and telomere length in *Locusta migratoria*. I also studied differences in telomere length between locusts of various development stages and telomerase activity in locusts and other Orthoptera.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala 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 diplomové 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.

Dne 25. 4. 2014 v Českých Budějovicích

....……

Kristýna Vrbová

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce Radmile Čapkové Frydrychová za odborné vedení a rady během vypracovávání této diplomové práce. Dále pak všem členům laboratoře za klidné a přátelské prostředí. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svým rodičům, kteří mě za všech okolností podporovali jak finančně, tak i psychicky a vydrželi mé špatné nálady. Dále pak mé sestře Tereze Hájkové a spolubydlící Lucii Krejčové, které byly ochotné si práci přečíst. Velké díky patří také všem mým kamarádkám a mému příteli hlavně za to, jací jsou.

Obsah

1 Úvod 1
1.1 Oxidativní stres 1
1.2 Antioxidanty 2
1.3 Telomery 3
1.4 Telomeráza 5
1.5 Telomery, telomeráza a oxidativní stres 6
2 Cíle práce 8
3 Materiál a metody 9
3.1 Pokusný hmyz 9
3.2 Indukce oxidativního stresu 9
3.3 Sekvenace genů pro katalázu a SOD u *L. migratoria* 9
3.4 Vyhodnocení transkripční aktivity superoxiddizmutázy a katalázy 11
3.5 Příprava proteinových extraktů 12
3.6 Stanovení enzymatické aktivity superoxiddizmutázy 12
3.7 Stanovení enzymatické aktivity katalázy 13
3.8 Vyhodnocení telomerázové aktivity 13
3.9 Izolace genomové DNA 14
3.10 Příprava telomerické sondy 14
3.11 Southernova hybridizace 15
3.12 Délka telomer kvatitativní PCR 16
4 Výsledky 17
4.1 Sekvenace genů pro katalázu a SOD u *L. migratoria* 17
4.2 Transkripční aktivita superoxiddizmutázy a katalázy 17
4.3 Měření enzymatické aktivity superoxiddizmutázy a katalázy 17
4.4 Vyhodnocení telomerázové aktivity 18
4.5 Vyhodnocení délky telomer 19
5 Diskuze 23
5.1 Parakvat a antioxidační systémy 23
5.2 Telomerázová aktivita 25
5.3 Délka telomer 26
6 Závěr 28
7 Použitá literatura 29

8 Přílohy 36
8.1 Sekvence katalázy a superoxiddizmutázy 36

1 Úvod

1.1 Oxidativní stres

Oxidativní stres vzniká nerovnováhou mezi oxidanty a antioxidanty. Oxidativní stres způsobený reaktivními formami kyslíku (ROS) nebo dusíku (RNS) se vyskytuje, když je antioxidační ochrana vyčerpána nebo když je poměr ROS vyšší než antioxidanty mohou pohltit (Pollack a Leeuwenburgh 1999, Turrens 2003).

ROS jsou vysoce reaktivní molekuly zahrnující superoxidové anioty (O_2^{-}•), hydroxylové radikály (OH•) a peroxid vodíku (H_2O_2) (Cui *et al.* 2011, Nasir *et al.* 2014). Redukcí kyslíku vzniká superoxidový aniont (O_2^{-}•), který je prekurzorem většiny ROS a mediátorem v reakcích oxidačního řetězce. Dismutací O_2^{-}• (buď spontánně nebo pomocí superoxidismutázy) se tvoří peroxid vodíku (H_2O_2), který může být plně redukován na vodu, nebo částečně redukován na hydroxylový radikál (OH•), jenž je jeden z nejsilnějších přírodních oxidantů. O_2^{-}• může reagovat s dalšími radikály jako je oxid dusnatý (NO•). Produkt této reakce, peroxynitrid, je také velmi silný oxidant. Oxidanty odvozené od NO• se nazývají reaktivní formy dusíku (RNS) (Turrens 2003).

ROS mohou vznikat vlivem exogenních faktorů nebo jsou tvořeny vnitrobuněčně z různých zdrojů. Mezi exogenní faktory patří například ultrafialové nebo ionizující záření, chemoterapeutika, chemické oxidanty nebo různé toxiny z prostředí. Endogenní faktory ROS zahrnují peroxizómy, makrofágy, endoteliální buňky, lipoxygenázy, cytochrom P450 a NADPH oxidázy. NADPH oxidázy produkují superoxid z kyslíku za pomocí elektronů z NADPH (Turrens 2003, Cui *et al.* 2011, Nasir *et al.* 2014). Proteolytická konverze xantin dehydrogenázy na xantin oxidázu je další reakcí vytvářející O_2^{-}• a H_2O_2. Za největší zdroj ROS jsou však považovány mitochondrie. Během reakcí dýchacího řetězce v mitochondriích jsou ROS produkovány transmembránovými komplexy, komplexem I (NADH dehydrogenáza) a komplexem III (ubichinon-cytochrom-c-reduktáza). Komplex III je hlavním producentem ROS za normálních podmínek. Volný radikál semiquinon (Q-) je tvořen jako intermediát v regeneraci cytochromu Q. Q- může odebrat elektron z molekuly kyslíku a tím následně vzniká superoxidový radikál. Čím rychlejší je metabolismus, tím je větší produkce ROS (Turrens 1997, Finkel a Holbrook 2000, Turens 2003).

Mnoho lidských nemocí je spojováno se zvýšenou hladinou ROS, nejčastěji se jedná o kardiovaskulární onemocnění (jako selhání srdce), cukrovku či rakovinu (Essick a Sam 2010). Dále byl prokázán vliv oxidativního stresu na vznik neurodegenerativních

onemocnění, mezi něž patří Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba, roztroušená skleróza a amyotrofická laterální skleróza (Uttara *et al.* 2009).

ROS mohou reagovat s různými makromolekulami, jako jsou lipidy, proteiny a nukleové kyseliny a způsobovat tak jejich poškození (Cui *et al.* 2011). ROS atakují DNA a vytváří řadu defektů, jako jsou oxidované báze, abazická místa a zlomy DNA řetězců (Krokan *et al.* 1997). Mutační rychlost mitochondriální DNA je 10x vyšší než u nukleární DNA, což je způsobeno nepřetržitou přítomností ROS, rychlejší replikací a méně efektivními opravnými mechanismy (Yang *et al.* 1994). Poškození mitochondriální DNA nevyhnutelně vede k narušení funkce a integrity mitochondrií. Poškozené mitochondrie pak uvolňují více ROS a dochází k ještě většímu ničení DNA (Finkel a Holbrook 2000). Obzvláště citlivé na poškození oxidativním stresem jsou koncové úseky DNA, tzv. telomery.

1.2 Antioxidanty

Aerobní organismy si pro ochranu před oxidativním stresem vyvinuly sofistikované antioxidační systémy (Pollack a Leeuwenburgh 1999). Antioxidanty jsou exogenní (přírodní nebo syntetické) nebo endogenní sloučeniny, které jsou zodpovědné za odstranění volných radikálů, snížení produkce ROS a vázání kovových iontů potřebných pro tvorbu ROS. Přírodní antioxidační systém je rozdělen na dvě hlavní skupiny, enzymatickou a neenzymatickou.

Enzymatické antioxidanty zahrnují proteiny jako je superoxiddizmutáza (SOD), kataláza a glutathion peroxidáza (Uttara *et al.* 2009). Vyšší hladiny těchto enzymů byly objeveny u déle žijících kmenů některých druhů, například u *Neurospora crassa*, *Drosophila melanogaster* a *Caenorhabditis elegans*. Studie na drozofile prokázaly, že zvýšená exprese katalázy a SOD může prodloužit život až o jednu třetinu a snížit oxidativní poškození proteinů (Pollack a Leeuwenburg 1999).

Superoxiddizmutázy jsou antioxidační enzymy, jejichž funkcí v buňce je ochrana proti superoxidovým radikálům tím, že katalyzují jejich přeměnu na peroxid vodíku a kyslík (Powers a Lennon 1999, Poljsak a Milisav 2013). Superoxiddizmutázy bývají klasifikovány do tří skupin podle kovového kofaktoru: Fe SOD, Mn SOD a Cu-Zn SOD. Fe SOD se nachází v chloroplastech, Mn SOD v mitochondriích a peroxizómech a Cu-Zn SOD v chloroplastech, cytosolu a v extracelulárním prostoru (Alscher *et al.* 2002).

Peroxid vodíku vytvořený SOD, dalšími metabolickými reakcemi nebo vzniklý neenzymatickou cestou, je rozkládán katalázou za vzniku vody a kyslíku (Santoro a Thiele

1997). Tento antioxidační enzym je vysoce zastoupen v buňce, převážně v mitochondriích a peroxizómech (Powers a Lennon 1999).

Glutathion peroxidáza katalyzuje redukci peroxidu vodíku za využití glutathionu jako substrátu. Může také rozkládat další peroxidy (lipidové peroxidy) na alkoholy (Poljsak a Milisav 2013). Glutathion peroxidáza se vyskytuje v cytosolu a mitochondriích (Pollack a Leeuwenburg 1999).

Neenzymatické antioxidanty mohou být přímé, které jsou extrémně důležité v obraně proti oxidativnímu stresu a dále nepřímé. Přímé antioxidanty zahrnují kyselinu askorbovou (vitamín C) a lipoovou, polyfenoly a karotenoidy přijímané potravou. Buňka sama syntetizuje minimum těchto molekul. U nepřímých antioxidantů se většinou jedná o chelatační činidla, která váží kovy (Uttara *et al.* 2009).

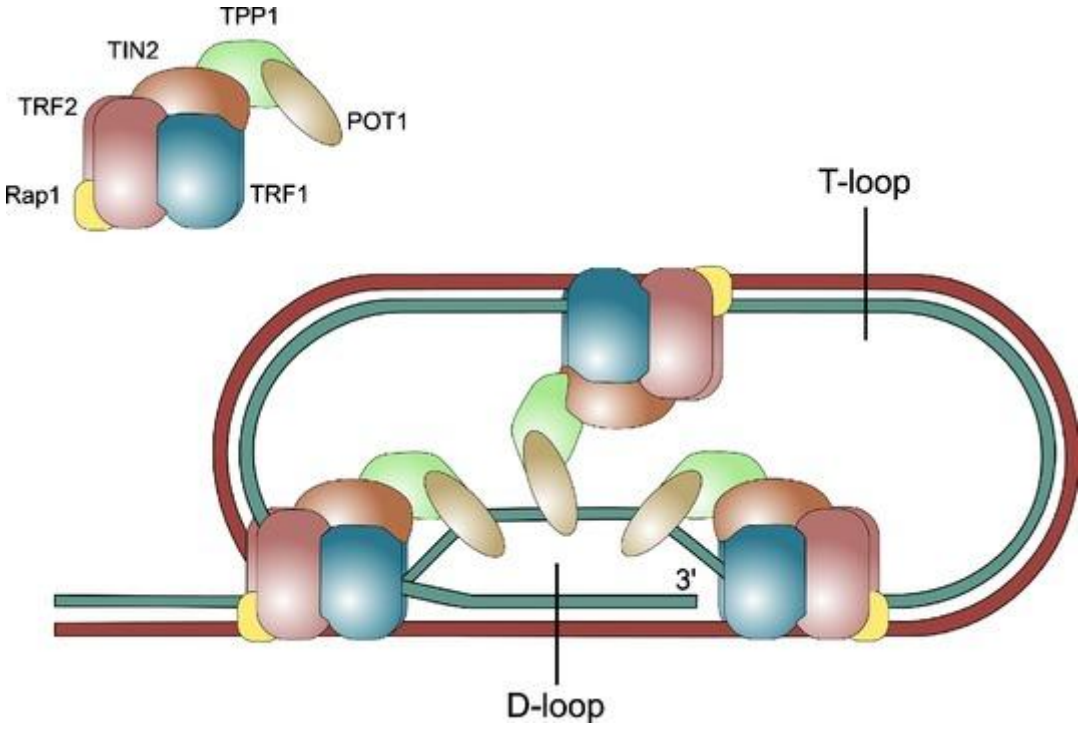
1.3 Telomery

Telomery jsou specifické nukleoproteinové struktury na koncích lineárních chromozomů eukaryot, které zajišťují jejich stabilitu. Chrání chromozomy před degradací způsobenou exonukleázami, fúzí chromozomálních konců a kompenzují ztráty způsobené nekompletní replikací (Blackburn 1991). Z důvodu neschopnosti DNA polymeráz replikovat úplné konce chromozomů dochází s každým cyklem DNA replikace k jejich zkracování v telomerické oblasti (Capkova Frydrychova a Mason 2013). U lidských somatických buněk jde o ztrátu délky o 30-200 pb (Olovnikov 1971). Nepřítomnost mechanismů udržujících délku telomer může vést k buněčnému stárnutí a apoptóze (Capkova Frydrychova a Mason 2013). U lidských fibroblastů dochází k nejpomalejšímu zkracování telomer, které činí okolo 10-20 pb na cyklus replikace. Naopak rychlejší se vyskytuje u buněk, které mají vyšší obsah peroxidů, jež naznačují méně efektivní antioxidační ochranu (Zglinicky 2002).

U většiny eukaryot telomery tvoří dlouhé úseky repetitivní DNA obsahující sekvence $(T_nG_n)_n$. Obratlovci mají telomerickou sekvenci $(TTAGGG)_n$, rostliny $(TTTAGGG)_n$ a většina hmyzu $(TTAGG)_n$ (McKnight 2004, Maeshima *et al.* 2001). Existuje několik výjimek z tohoto pravidla, jako je komár *Anopheles gambiae*, zástupci rodu *Drosophila*, pakomáři *Chironomus* a rostliny rodu *Allium*. Většina těchto výjimek má na koncích chromozomů složité tandemové repetice, avšak telomery rodu *Drosophila* se liší (Louis 2002). Jsou tvořeny mobilními elementy, a to retrotranspozony *HeT-A*, *TAHRE* a *TART* (Mason et al. 2008). U některých skupin, jako jsou pavouci a motýlice, telomerické struktury nejsou doposud známé (Traut *et al.* 2007).

Délka telomer se liší mezi druhy i mezi jednotlivými chromozomy. Lidské chromozomy mají telomery dlouhé mezi 0,5 a 15 kb (Aubert a Lansdorp 2008). Nejdelší z nich se nalézají u buněk zárodečné linie (průměrná délka okolo 16 kb), zatímco jejich průměrná délka u lymfocytů nebo fibroblastů starých lidí se pohybuje okolo 5-6 kb (Makarov *et al.* 1997).

Telomerická DNA je zakončená tzv. telomerickou čepičkou, které je tvořena 3´ přesahem tvořícím smyčku D-loop a příslušnými proteiny. Mnoho z těchto proteinů jsou důležitými regulátory délky telomer. Proteiny telomerické čepičky byly izolovány u různých organismů, například Rap1 u *Saccharomyces cerevisiae* a Taz 1 u *Schizosaccharomyces pombe*. U savců telomerická čepička obsahuje komplex 6 proteinů, TRF 1 a TRF2, TIN2, TPP1, POT1 a RAP1 (Obr. 1). Telomerická čepička umožňuje buňkám rozlišit přirozené chromozomální konce od dvouřetězcových zlomů (Cohn 2008, Fujita *et al.* 2012, Capkova Frydrychova a Mason 2013).



Obrázek 1: Schéma telomerické čepičky savců a její proteiny (Oeseburg *et al.* 2010). TRF1 a TRF2 proteiny se specificky vážou na telomerickou dsDNA, zatímco POT1 (TPP1) rozpoznává ssDNA (tzv. D-loop). TIN2 spojuje ssDNA s dsDNA vázajícími komplexy. Vznik smyčky T-loop zahrnuje invazi G-převisu do dsDNA za vzniku D-loop (Boutou *et al.* 2013).

1.4 Telomeráza

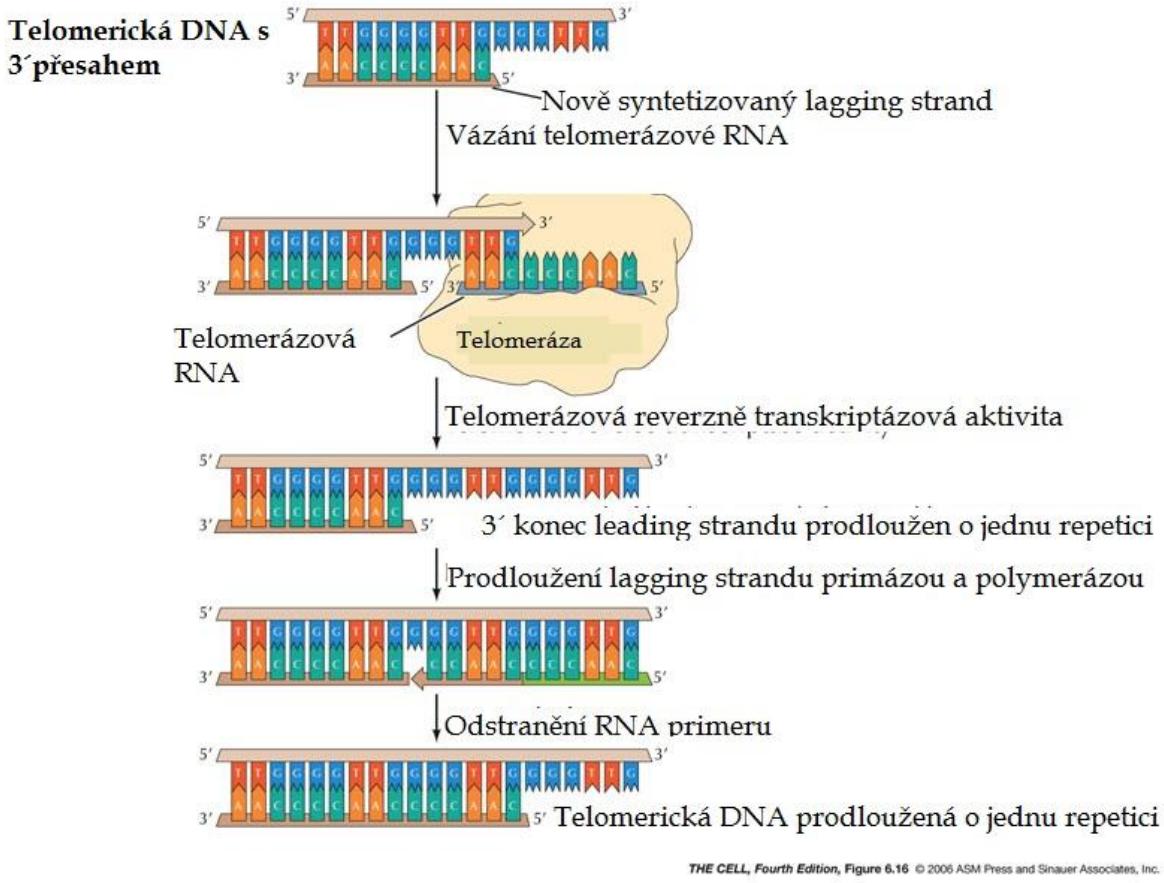
Telomeráza je eukaryotický ribonukleoproteinový komplex s reverzně transkriptázovou aktivitou, který přidává telomerické repetitivní sekvence na konce lineárních chromozomů a tím brání jejich zkracování (Shay *et al.* 2001). Prvně byla objevena u nálevníka *Tetrahymena thermophila* (Greider a Blackburn 1985).

Telomeráza však není aktivní ve všech buňkách. Telomerázovou aktivitou u člověka se zabýval Wright *et al.* (1996), jenž ji detekoval u plodu, novorozenců, dále ve varlatech a vaječnících dospělých jedinců. Aktivitu však nepozoroval ve zralých spermatozoích a oocytech. Vysokou aktivitu telomerázy vykazují blastocysty, stejně jako většina somatických buněk plodu starého 16 – 20 týdnů, výjimkou je mozek. Tato aktivita však mizí po narození a ve většině tkání dospělých se již neobjevuje. Avšak jsou i somatické buňky, kde se činnost telomerázy udržuje i v dospělosti. Jedná se o hematopoetické progenitorové buňky, intestinální buňky, endometrium, epiteliální buňky, fibroblasty a cervikální keratinocyty. Telomerázová aktivita v těchto buňkách je úzce spojená s buněčnou proliferací a umožňuje jim regeneraci. Vysoká telomerázová aktivita je pozorována v 90 % lidských nádorů (Kyo a Inoue 2002, Wege *et al.* 2003).

Telomeráza má jedinečnou schopnost katalyzovat reakci, při níž dochází k prodlužování telomer. Je tvořena z RNA podjednotky, která slouží jako templát pro syntézu a proteinové podjednotky, která provádí samotnou syntézu (Meyerson 2000). Při reakci dochází ke kopírování templátu a přidávání stovek nukleotidů k jedné substrátové molekule DNA. Daná reakce je tvořena třemi kroky: 1) rozpoznáním substrátu, 2) syntézou první telomerické repetice a 3) translokací a přeskupením nové DNA na 3´konec, aby mohlo dojít k další telomerické syntéze. Během syntézy dochází k reverzní transkripci RNA templátu. Reakce dále pokračuje přidáváním deoxynukleotid trifosfátů (dNTP) na volnou 3´ hydroxy skupinu telomerického DNA primeru. Jako tento DNA primer slouží 3´ telomerický převis. Během prodlužování telomer vzniká RNA-DNA hybrid, který si udržuje konstantní délku 7-8 párů bází tak, že na distálním konci dochází k rozpojování vazeb, zatímco se nové vazby tvoří na proximálním konci. Po dokončení reverzní transkripce následuje translokace a může začít další kolo reakce (Wyatt *et al.* 2010). Komplementární řetězec je syntetizován pomocí komplexu polymerázy α a primázy, kdy primáza přidá RNA primer a polymeráza dosyntetizuje chybějící úsek. Odstraněním RNA primeru pak vzniká 3´ převis jednoho vlákna (Cooper 2000) (Obr. 2).

Přítomnost telomerázy byla studována u celé řady organismů (Prowse a Greider 1995, Meyerson 2000, Sasaki a Fujiwara 2000, Betts *et al.* 2006). Přítomnost krátké

telomerické sekvence $(TTAGG)_n$ u většiny hmyzu naznačuje, že přidávání telomerických repetic na základě telomerázy je u hmyzu hlavním systémem prodlužování telomer. Telomeráza u hmyzu však byla studována jen okrajově na několika málo druzích hmyzu (Sasaki a Fujiwara 2000).



Obrázek 2: Telomerázová reakce (upraveno dle http://oregonstate.edu/instruction/bi314/summer09/Fig-06-16-0.jpg).

1.5 Telomery, telomeráza a oxidativní stres

Oxidativní stres přispívá ke zkracování telomer mnohdy více než problém neúplné replikace. Telomery jsou velmi citlivé na vliv oxidativního stresu, alkylaci nebo UV záření, jelikož obsahují velké množství guaninu (Zglinicky 2002). Guanin je báze, u níž nejčastěji dochází k oxidaci, protože oxidační potenciál je nižší než u ostatních bází (Nasir *et al.* 2014).

Vysoká hladina stresu může indukovat zkracování telomer vytvořením dvouřetězcových zlomů ve vysoké frekvenci. Dvouřetězcové zlomy však nejsou hlavním důvodem zkracování, ale neopravené nukleotidy a poškozené báze (Zglinicky 2002). Reaktivní formy kyslíku mohou ničit DNA tím, že způsobí oxidační modifikaci bází

(Houben *et al.* 2008). Tvorba 7,8-dihydro-8-oxodeoxyguanosinu (8-oxo-dG) je jedno z nejhojnějších poškození způsobených ROS (Dizdaroglu *et al.* 2002). Kromě toho ROS, obzvláště hydroxylový radikál, indukují jednořetězcové zlomy DNA a potlačují opravu DNA bází. Telomery, na rozdíl od zbytku genomu, nejsou schopné tyto jednořetězcové zlomy opravit. To je způsobeno tím, že TRF2 na telomerách brání reparačním enzymům v navázání. Navíc interakce mezi TRF2 a polymerázou β má negativní vliv na opravy poškození (Nasir *et al.* 2014).

U telomerázy byla zaznamenána ochranná role před oxidativním stresem, která se projevuje snížením intracelulárních ROS a zlepšením funkce mitochondrií (Mattiussi *et al.* 2012). Vlivem oxidativního stresu dochází k vyloučení telomerázy z jádra do mitochondrií, avšak biologická funkce telomerázy mimo jádro zůstává nejasná. Ahmed *et al.*(2008) popsal po exportu telomerázy do mitochodrií zlepšení jejich funkce a zvýšení ochrany mtDNA, což mělo za následek snížení produkce ROS mitochondriemi a zvýšený mitochondriální membránový potenciál.

Vliv oxidativního stresu na telomery nebyl doposud u hmyzu studován. Výzkum nebyl prováděn ani u drozofily, jakožto modelového organismu, kde to však může být dáno jiným systémem telomer a odlišným kompenzačním mechanismem telomerických ztrát než je u většiny organismů, takže z toho důvodu využití drozofily pro tento směr studia není tak atraktivní.

2 Cíle práce

Primárním cílem práce bylo určit, zda saranče stěhovavé (*Locusta migratoria)* může fungovat jako vhodný hmyzí modelový organismus pro studium oxidativního stresu na telomery a telomerický kompenzační systém. Saranče stěhovavé bylo vybráno jednak z důvodu jeho hospodářské významnosti, dále kvůli kompaktní délce telomer a přítomnosti klasických hmyzích telomer se sekvencí TTAGG (Sahara *et al.* 1999), díky nimž byla předpokládána i aktivita telomerázy. Cílem práce bylo sledování vlivu oxidativního stresu na délku telomer a aktivitu telomerázy u sarančete stěhovavého. Práce zahrnovala zjištění optimálních podmínek pro indukci oxidativního stresu za použití parakvatu, tj. především sledování vlivu parakvatu o různých dávkách na aktivitu antioxidačních enzymů. Dalším cílem byla optimalizace metody TRAP (telomerase amplification assay protocol) pro vyhodnocení aktivity telomerázy a metody qPCR pro vyhodnocení telomerické délky. Konečným cílem bylo vyhodnocení délky telomer a aktivity telomerázy po indukci oxidativního stresu.

3 Materiál a metody

3.1 Pokusný hmyz

Sarančata *Locusta migratoria* byla zakoupena od firmy ACHETA farm a dále byla chovávána v insektáriu Entomologického ústavu. Pro chov sarančat byla udržována konstantní teplota 30°C a nastavena 12-ti hodinová fotoperioda. Jako potrava bylo sarančatům podáváno čínské zelí, seno a šrot, občas jablka či mrkev. K pokusům s parakvatem byli vybíráni dospělí jedinci. Pro zjištění rozdílů v délce telomer mezi různými vývojovými stádii byla využívána sarančata 1. až 5. instaru.

Pro stanovení telomerázové aktivity byly dále pořízeni švábi *Periplaneta americana*, cvrčci *Acheta domestica*, *Gryllus assimilis*, sarančata *Schistocerca gregaria*, motýl *Ephestia kuehniella* a octomilka *Drosophila melanogaster*. Všechny tyto organismy byly uchovávány při pokojové teplotě.

3.2 Indukce oxidativního stresu

K pokusům byl používán herbicid parakvat-dichlorid od společnosti Sigma-Aldrich (značka: Fluka, číslo produktu: 36541). Parakvat byl sarančatům podáván do zadečkové části těšně pod tělní stěnu pomocí mikroinjekční Hamiltonovy stříkačky (Hamilton 1701N syringe, 10 µl, Sigma) v dávce 5 µl a koncentracích 1 nM, 2 nM, 200 nM. Kontrolním jedincům bylo injikováno 5 µl fyziologického roztoku. Po aplikaci parakvatu byla sarančata ponechána při pokojové teplotě po dobu 16 hodin. Následně byla provedena pitva a odebrán mozek a pohlavní žlázy.

3.3 Sekvenace genů pro katalázu a SOD u *L. migratoria*

Jako templát pro sekvenaci sloužila cDNA, která byla syntetizována podle RNA. Izolace RNA byla prováděna za použití komerčního kitu NukleoSpin RNA II (MACHEREY-NAGEL, číslo produktu: 740955.50). Pro denaturaci byla reakční směs o 20 µl (5 µg RNA, 0,5 mM dNTP, 50 µM Oligo (dT)) inkubována 5 minut v 65°C a dána na led. Po inkubaci bylo přidáno 9 µl směsi (2 x RT pufr, 11 mM $MgCl_2$, 22 mM DTT), to vše bylo promícháno a inkubováno 2 minuty ve 42°C. Následně bylo do výsledné směsi dáno 50 U reverzní transkriptázy SMARTScribe RT (100 U/µl) (Clontech, číslo produktu: 639537) a směs byla nechána 50 minut ve 42°C. Reakce byla ukončena 15 minutovou inkubací v 70°C a zchlazením na ledu. Pro eliminaci zbylé RNA byl nakonec přidán 1 µl RNasy H (60U/µl) a směs byla inkubována 20 minut v 37°C.

Připravená cDNA sloužila jako templát pro PCR. Finální složení 25 µl reakční směsi bylo 2 µl cDNA, 0,2 mM dNTP, 1 x Dream buffer, 400 nM forward primeru, 400 nM reverse primeru, 0,2 U DreamTaq DNA polymerázy (Thermo Scientific, číslo produktu: EP0701). Pro PCR byly použity degenerované primery Cat492F, Cat537F, Cat987R, SOD147F, SOD429R (Tab. 1). Průběh reakce PCR byl následující: 95°C, 1 min (95°C, 30 s – 55°C, 30 s – 72°C, 1 min)$_{30x}$, 72°C, 5 min. Produkty PCR byly analyzovány na 1 % agarózovém gelu, následně z gelu vyříznuty a extrahovány pomocí QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, číslo produktu: 28704).

Poté byla provedena ligace do vektoru pGEM (Promega). Transformace probíhala do bakterií *Escherichia coli* kmene DH5α teplotním šokem. Po transformaci byly bakterie naneseny na kultivační misky s LB/Amp/IPTG/X-Gal a inkubovány přes noc v 37°C. Bílé kolonie byly přeneseny na misku s čerstvým mediem, inkubovány přes noc v 37°C a byl proveden test na přítomnost specifického produktu pomocí PCR s degenerovanými primery. Finální složení 12,5 µl reakce bylo 0,2 mM dNTP, 1 x Dream buffer, 400 nM forward primeru, 400 nM reverse primeru, 0,2 U DreamTaq DNA polymerázy (Thermo Scientific, číslo produktu: EP0701). Průběh reakce PCR byl následující: 95°C, 1 min (95°C, 30 s – 55°C, 30 s – 72°C, 1 min)$_{30x}$, 72°C, 5 min. Produkty byly následně elektroforeticky separovány.

Plazmidy byly izolovány pomocí komerčního kitu NukleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel, číslo produktu: 740588.50). Pro ověření specificity inzertu byly po izolaci plazmidy štěpeny pomocí EcoR1 a správnost štěpného produktu byla ověřena pomocí elektroforetické separace.

Sekvenace pozitivních klonů byla prováděna v Laboratoři Genomiky v Biologickém centru AVČR. Pro sekvenování byly použity primery SP6 a T7 (Tab. 1), které ohraničují klonované místo. Po získání sekvence genů katalázy a superoxiddizmutázy byly navrženy specifické primery Cat50F, Cat209R, SOD48F a SOD207R (Tab. 1).

Tabulka 1: Sekvence degenerovaných a specifických primerů. U degenerovaných primerů: H = A, T, C; Y = C, T; N = A, C, G, T; R = A, G; M = A, C; K = G, T.

Název	Sekvence	Produkt (pb)
Cat492F	5´-ATH CAY ACN CAR AAR MGN AAY CC-3´	495
Cat537F	5´-GAY ATG TTY TGG GAY TTY AT -3´	456
Cat987R	5´-ACY TCN GCR AAR TAR TTY TTN GG -3´	495 nebo 456
SOD147F	5´-GAR TTY GGN GAY AAY ACN AAY GG -3´	362
SOD429R	5´-CKN GCN CCN GCR TTN CCN GT -3´	362
Cat50F	5´-TTG GCA AAG TAA TTC TTG GGG-3´	138
Cat209R	5´-ATT GCA ACA GGA AAC TTC CCC-3´	138
SOD48F	5´-ATT CGG TGA CAA CAC TAA CGG-3´	143
SOD207R	5´-TCT CCA GTC AGA GAG ATA ACC-3´	143
SP6	5´-ATTTAGGTGACACTATAG-3´	-
T7	5´-TAATACGACTCACTATAGGG-3´	-
Act1F	5´-GTA GAC AAT GGC TCT GGT ATG -3´	121
Act143R	5´-ACC TCT CTT TGA CTG TGC TTC -3´	121
TS primer	5´-AAT CCG TCG AGC AGA GTT -3´	-
Bm-Cxa primer	5´-GTG TAA CCT AAC CTA ACC -3´	-
TeloIns1	5´-GGT TTT TGA GGT GAG GTG AGG TGA GGT GAG GT -3´	-
TeloIns2	5´-TCC CGA CTA TCC TAT CCT ATC CTA TCC TAT CCT A -3´	-

3.4 Vyhodnocení transkripční aktivity superoxiddizmutázy a katalázy

Pro amplifikaci byly navrženy specifické primery pro katalázu Cat50F a Cat209R, pro superoxiddizmutázu SOD48F a SOD207R (Tab. 1) a jako referenční gen byl vybrán aktin Act1F a Act143R (Tab. 1). Objem PCR reakce byl 20 µl a její finální složení bylo následující: 1x Syber Premix Ex Taq II (Takara, číslo produktu: RR081A), 400 nM forward primer, 400 nM reverse primer, 5 µl cDNA. Reakce byla prováděna v duplikátech. Termální cycler BioRad CFX96 Real-time System byl nastaven na 95°C, 1 min (95°C, 30 s – 59°C, 30 s – 72°C, 1 min)$_{30x}$, 72°C, 5 min. Transkripční aktivita vzorků byla vypočítána na základě hodnoty C_t (cycle treashold), která určuje číslo cyklu, při kterém fluorescence vytvářená uvnitř reakce překoná prahovou hodnotu. Získané hodnoty byly přepočítány podle vzorce: $R = Eff^{C_t ref} / Eff^{C_t tar}$, kde Eff = efektivnost, ref = referenční gen (aktin), tar = cílový gen (Cat nebo SOD). Pokus byl proveden 3x.

3.5 Příprava proteinových extraktů

Tkáň mozku dospělých sarančat byla nejprve ručně homogenizována v 50 mM draselno-fosfátovém pufru (pH 7.8) a následně centrifugována 10 minut při 10 000 otáčkách za minutu a teplotě 4°C. Poté byl odebrán supernatant, který byl znovu centrifugován po dobu 10 minut při 20 000 otáčkách za minutu a ve 4°C. Po centrifugaci byl supernatant opět odebrán a přímo před použitím důkladně vortexován. Homogenizace a manipulace se supernatantem se odehrávala na ledě, aby nedošlo k degradaci enzymů.

3.6 Stanovení enzymatické aktivity superoxiddizmutázy

Stanovení enzymatické aktivity superoxiddizmutázy bylo prováděno v proteinových extraktech mozkové tkáně pomocí SOD Assay Kit (Sigma-Aldrich, číslo produktu: 19160). SOD Assay Kit umožňuje stanovení aktivity SOD za pomoci tetrazolinové soli, která produkuje při redukci superoxidovým aniontem ve vodě rozpustné formazanové barvivo. Poměr redukce superoxidovým radikálem je lineárně závislý na přítomnosti xantin oxidázy a je inhibován SOD. Čím je ve vzorku nižší aktivita SOD, tím více se uvolňuje formazanového barviva a vzorek je tmavší.

Nejprve bylo nutno vytvořit kalibrační křivku, kde na ose y byla míra procentuální inhibice pro ředění roztoku 5x, 10x a 25x, na ose x ředění SOD. Hodnoty inhibice jednotlivých ředění se počítaly podle vzorce: $SOD\ aktivita = \{[(A_{slepý\ vzorek1} - A_{slepý\ vzorek3}) - A_{vzorek} - A_{slepý\ vzorek2}]/(A_{slepý\ vzorek1} - A_{slepý\ vzorek3})\} \times 100$, kde A je absorbance při 450 nm. Složení vzorku a jednotlivých slepých vzorků je uvedeno v tabulce 4. Před měřením absorbance byla destička s našimi a slepými vzorky inkubována 20 minut ve 37°C. Po sestavení kalibrační křivky byly pomocí programu Excel určeny hodnoty směrnice přímky a průsečík s osou y. Podle zjištěného ředění bylo poté vypočteno množství jednotek SOD ve vzorku a přepočítáno na celkové množství proteinů. Měření bylo 3x opakováno.

Tabulka 2: Množství každého roztoku pro vzorek, slepý vzorek 1, 2, 3.

	Vzorek	Slepý vzorek1	Slepý vzorek2	Slepý vzorek3
Ředěný vzorek	20 µl		20 µl	
ddH_2O		20 µl		20 µl
WST pracovní roztok	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
Enzymový pracovní roztok	20 µl	20 µl		
Ředící roztok			20 µl	20 µl

3.7 Stanovení enzymatické aktivity katalázy

Enzymatická aktivita katalázy byla hodnocena v extraktech z mozkové tkáně dospělých sarančat pomocí Amplex Red Catalase Assay Kit (Invitrogen, číslo produktu: A22180). Kataláza nejdříve reaguje s H_2O_2 za vzniku vody a kyslíku. Poté Amplex Red reagent reaguje s H_2O_2 za přítomnosti avidin peroxidázy a produkuje vysoce fluorescenční produkt resorufin. Proto se společně se zvyšující se aktivitou katalázy snižuje fluorescence resorufinu. Výsledky fluorescence jsou následně porovnávány mezi vzorkem a kontrolou bez katalázy. Pro hodnoty fluorescence se měří absorbance při 571-585 nm.

Kromě vyhodnocování změny fluorescence vzorků bylo nutno vytvořit standardní křivku, která zobrazuje hodnoty změny fluorescence u roztoků s přesně určeným množstvím katalázy. Pomocí této křivky pak bylo vypočítáno množství jednotek katalázy v našich vzorcích a to bylo poté přepočítáno na celkové množství proteinů. U pokusu byla provedena tři opakování.

3.8 Vyhodnocení telomerázové aktivity

Ke stanovení telomerázové aktivity byla využívána TRAP (telomere repeat amplification protocol) assay. Tuto metodu tvoří 2 kroky, ve kterých nejprve telomeráza přidává telomerické repetice na 3´ konec oligonukleotidu jako substrátu (primer TS) a poté jsou prodloužené produkty amplifikovány PCR reakcí za využití forward primeru (TS) a reverzního primeru (Bm-cxa) (Uehara *et al.* 1999).

Přibližně 50 mg zmražené tkáně pohlavních žláz dospělých sarančat bylo zhomogenizováno v 250 µl extrakčního CHAPS pufru (Kim *et. al.* 1994: 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1mM $MgCl_2$; 1 mM EGTA; 0,1 mM PMSF; 5mM β-mercaptoethanol; 0,5 % CHAPS; 10% glycerol). Vzorky byly inkubovány 30 minut na ledě a poté 20 minut

centrifugovány na 20 000 g při 4°C. Supernatant byl odebrán, zmražen v tekutém dusíku a skladován v -80°C do dalšího použití. Koncentrace proteinů byla měřena pomocí kitu BioRad Protein Assay (BioRad, číslo produktu: 500-0001).

Reakční směs 25 µl obsahovala 10 µg proteinu, 0,1 µg TS primeru, 0,05 µg Bm-Cxa primeru, 1 x Sybr Premix Ex Taq II (Takara, číslo produktu: RR081A). Sekvence primerů jsou uvedeny v tabulce 1. Reakční směs byla nejprve inkubována 60 minut ve 25°C, což umožní telomeráze v našem proteinovém extraktu prodloužit TS primer přidáváním TTAGG sekvencí. Následně byla provedena kvantitativní PCR na přístroji BioRad CFX96 Real-time System. Průběh PCR reakce byl následující: 95°C, 3 min (95°C, 30 s – 60°C, 90s)$_{30x.}$ Jako negativní kontrola byla zvolena *Drosophila melanogaster*, která má jiný mechanismus prodlužování telomer a tedy prokazatelně telomerázu neobsahuje. Jako pozitivní kontrola byl vybrán šváb *Periplaneta americana,* u nějž byla telomeráza již dříve detekována a dále motýl *Ephestia kuehniella*. Pro ověření, zda jiní zástupci řádu Orthoptera mají telomerázu, byly testovány tyto tři druhy: *Schistocerca gregaria*, *Acheta domestica*, *Gryllus assimilis*. Jako další negativní kontrola byly připraveny vzorky všech zmíněných organismů inaktivované RNázou A.

3.9 Izolace genomové DNA

Genomová DNA byla izolována z pohlavních žláz dospělých jedinců či ze zadečkové části u mladších instarů. Po zchlazení tekutým dusíkem byla tkáň rozmělněna v třecích miskách s tloučkem, které byly rovněž předem zchlazeny pomocí tekutého dusíku. Rozmělněná tkáň byla smíchána s 800 µl extrakčního pufru (100 mM NaCl, 10mM Tris-HCl o pH 8, 50 mM EDTA o pH 8, 0,5% Sarkosyl, 100 µg/ml Proteináza K). Extrakce DNA byla prováděna klasicky fenol-chloroformem. Získaná DNA byla kvantifikována spektrofotometricky a její integrita ověřena na elektroforéze.

3.10 Příprava telomerické sondy

Sonda pro Southernovu hybridizaci byla připravena pomocí beztemplátové PCR a značena digoxigeninem pomocí DIG DNA Labeling Mix (ROCHE, číslo produktu: 11277065910).

Reakční směs 100 µl pro beztemplátovou PCR obsahovala 0,5 µM primer TELO1 (3´-TTAGG-5´), 0,5 µM TELO2 (3´-CCTAA-5´), 1x PCR pufr, 0,8 mM dNTP mix, 2 U Taq polymerázu a průběh reakce byl 94°C, 90s (94°C, 45 s – 52°C, 30 s – 72°C, 1 min)$_{30x}$, 72°C, 5 min, 4°C, 1h. PCR produkt byl přečištěn etanolovou precipitací.

Pro samotné značení bylo 3 µg sondy doplněno do objemu 15 µl, denaturováno 10 minut při 95°C a následně prudce zchlazeno na ledu 5 minut. K denaturované sondě jsme přidali 5 µl reakční směsi obsahující 4x Hexanucleotide Mix, 4x DIG DNA Labeling Mix, 20 U Klenow enzyme. Značící směs se sondou byla krátce centrifugována a inkubována přes noc při 37°C. Nakonec byla reakce ukončena přidáním 2 µl 0,2 M roztoku EDTA o pH 8,0.

3.11 Southernova hybridizace

Southernova hybridizace umožňuje přenos fragmentů DNA z agarózového gelu na nylonovou membránu. DNA je na membráně vizualizovaná pomocí hybridizace se sondou značenou digoxygeninem.

Vzorky DNA byly nejprve štěpeny pomocí dvou restrikčních endonukleáz Hinf I a Rsa I. Tyto enzymy byly zvoleny pro vysokou četnost jejich rozpoznávacích míst v genomu, ale jejich absenci v telomerické oblasti. Restrikční reakce obsahovala 1 µg DNA, Hinf I (NEB, číslo produktu: R0155S), Rsa I (NEB, číslo produktu: R0167S) oba po 10 U, 1x NEBuffer 4 (NEB, číslo produktu: B7004S). Reakční směs byla inkubována při 37°C 2 hodiny. Celý objem vzorku byl nanesen na 1% agarózový gel společně s velikostními markery Dig Marker II (ROCHE, číslo produktu: 11218590910) a Pulse Marker 0.1-200 kb (SIGMA, číslo produktu: D2291). Vzorky byly separovány na pulzní elektroforéze (CHEF-DR III Pulsed Field Electrophoresis Systems, BIO-RAD, číslo produktu: 170-3690), která byla nastavena na hodnoty: initial switch time 0,1, final switch time 1,5, variable speed pump 70, voltage 6 V/cm, run time 18 h. Poté byl gel obarven ethidium bromidem a vizualizován pod UV kamerou, aby bylo možno lokalizovat pozici fragmentů pulzního markeru.

Po obarvení byl gel opláchnut a DNA depurinována 10 minut v 0,25 M HCl, denaturována 2x 15 minut v roztoku (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) a poté na 2x 15 minut neutralizována (0,5 M Tris-HCl; 3 M NaCl; pH 7,5). Následně byla DNA přenesena kapilárním přenosem na nylonovou membránu a fixována v přístroji Stratagene UV crosslinker. Po 16 hodinách byla membrána prehybridizována 60 minut v předehřátém roztoku DIG Easy Hyb (ROCHE, číslo produktu: 11603558001) při 42°C a dále hybridizována v 6,5 ml Dig Easy Hyb se značenou telomerickou sondou při stejné teplotě přes noc.

Druhý den byla membrána promyta nejprve ve Stringent wash buffer I (2x SSC; 0,1% SDS) 2x 5 minut a poté ve Stringent wash buffer II (0,2x SSC; 0,1% SDS) předehřátém na 68 °C na 20 minut.

Dále byla membrána promývána v 1x Washing buffer (0,3% Tween; 50 mM Tris-Cl pH 7,5; 150 mM NaCl) 5 minut, inkubována v 1x Blocking solution (5% sušené netučné mléko, 50 mM Tris-Cl pH 7,5; 150 mM NaCl) 30 minut a následně v 1x Blocking solution s Anti-Digoxigenin-AP ředěným 1:10 000 (ROCHE, číslo produktu: 11082736103) dalších 30 minut. Membrána byla opět promyta v 1x Washing buffer 2x 15 minut a vložena do 1x Detection buffer (0,1 M Tris-HCl; 0,1 M NaCl) na 5 minut. Membrána byla dána do hybridizačního sáčku, zakapána substrátem CDP-Star (ROCHE, číslo produktu: 11 759 051 001) a inkubována půl hodiny při pokojové teplotě bez přístupu světla. Výsledek byl dokumentován pomocí CCD kamery LAS-3000.

3.12 Délka telomer kvatitativní PCR

Jako kontrolní neboli referenční vzorek byla použita DNA saranče injikovaného fyziologickým roztokem. Při zavádění metody bylo vycházeno z protokolu publikovaného pro vyhodnocení telomerické délky člověka, tj. délky sekvence TTAGGG (O´Callaghan *et al.* 2011, Samsonraj *et al.* 2013). Pro amplifikaci hmyzí telomery byly navrženy specifické telomerické primery TeloIns1 a TeloIns2. Jako referenční gen byl vybrán aktin a byly využity primery Act1F a Act143R (Tab. 1). RT PCR s telomerickým a aktinovým primerem byla prováděna odděleně. Objem reakce byl 20 µl a její finální složení bylo 1x Syber Premix Ex Taq II (Takara, číslo produktu: RR081A), 400 nM forward primer, 400 nM reverse primer, 12 ng DNA. Reakce byla prováděna v triplikátech. Termální cycler BioRad CFX96 Real-time Systém byl pro telomerové primery nastaven na 95°C, 10 min (95°C, 15 s – 65°C, 1 min)$_{40x}$ a pro aktin na 95°C, 10 min (95°C, 15 s – 47°C, 1 min)$_{40x}$.

Po získání C_T hodnot byl vypočítán stupeň exprese cílového/referenčního genu našich vzorků. Nejprve byl vypočítán rozdíl v C_T hodnotách telomerového a aktinového genu:

$$\Delta C_T^{vzorek} = Vzorek\ C_{T(tel)} - Vzorek\ C_{T(akt)}$$

Poté byl vypočítán poměr exprese telomer k aktinovému genu (T/S) reference a testovaných vzorků podle následujícího vzorce:

$$\frac{T}{S} = \left[\frac{2^{C_{T(tel)}}}{2^{C_{T(akt)}}}\right]^{-1} = [2^{C_{T(tel)} - C_{T(akt)}}]^{-1} = [2^{\Delta C_T}]^{-1} = 2^{-\Delta C_T}$$

4 Výsledky

4.1 Sekvenace genů pro katalázu a SOD u *L. migratoria*

Jelikož sekvence genů katalázy a superoxiddizmutázy *L. migratoria* nebyly doposud zveřejněny v databázi GenBank, bylo nutno nejdříve sekvenci identifikovat. Prvním krokem bylo navržení degenerovaných primerů srovnáním sekvencí mRNA saranče *Schistocerca gregaria* (kataláza: GenBank HQ851386, SOD: GenBank HQ851372), vši *Pediculus humanus* (kataláza: GenBank XM_002427665, SOD: GenBank XM_002427857), vážky *Enallagma aspersum* (kataláza: GenBank AY580210) a krtonožky *Gryllotalpa orientalis* (SOD: Genbank AY835397). Srovnávání sekvencí bylo prováděno pomocí programu Lasergene 8 - SeqBuilder a MegAlign- od firmy DNASTAR. Degenerované primery byly využity pro amplifikaci genů katalázy a SOD pomocí PCR. Získané produkty byly následně osekvenovány v Laboratoři Genomiky v Biologickém centru AVČR. Sekvence katalázy a superoxiddizmutázy jsou uvedeny v příloze.

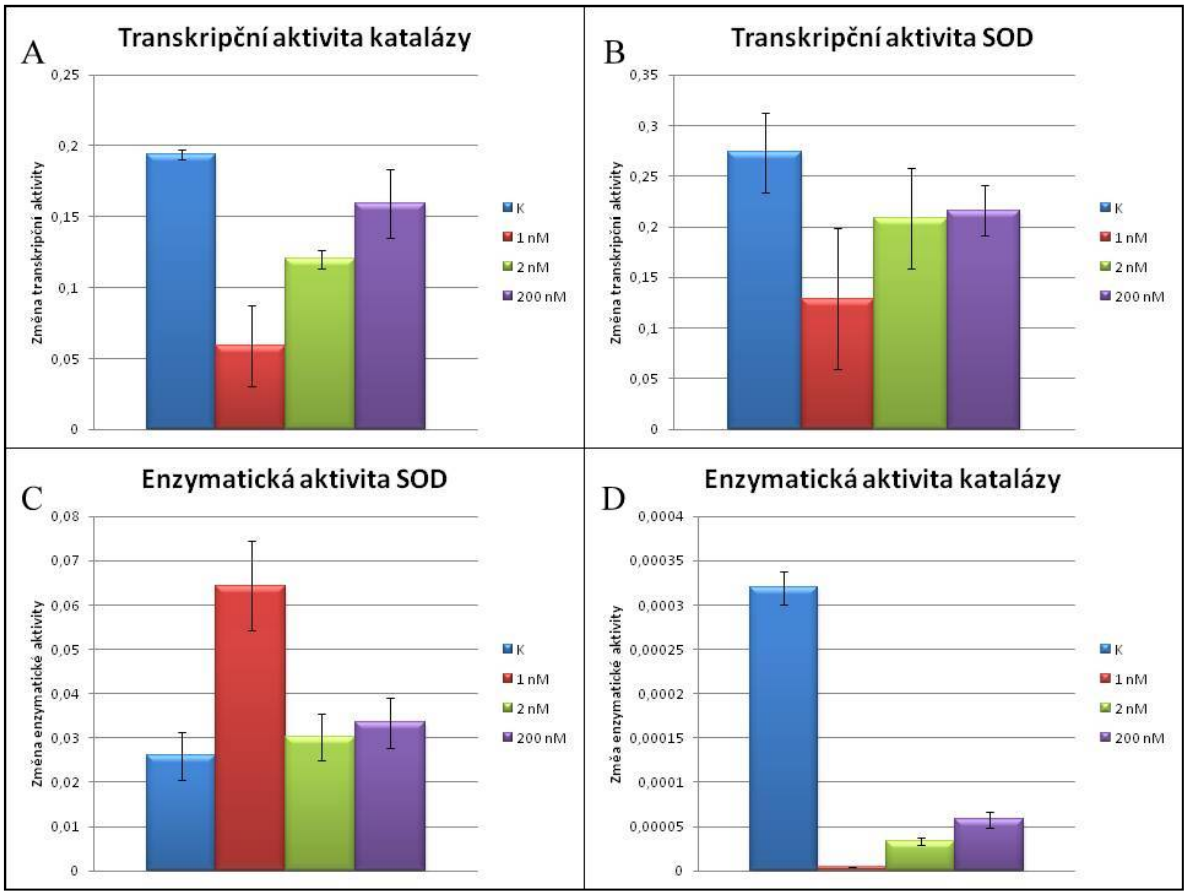
4.2 Transkripční aktivita superoxiddizmutázy a katalázy

Jako jeden z markerů oxidativního stresu byla zvolena transkripce antioxidačních enzymů. Předpokládali jsme, že při vyvolání oxidativního stresu by mělo dojít k nárůstu hladiny transkriptu superoxiddizmutázy a katalázy. Transkripční aktivita byla hodnocena u jedinců injikovaných roztokem parakvatu o koncentracích 1 nM, 2 nM a 200 nM a fyziologickým roztokem. Doba působení parakvatu byla 16 hodin, po kterých byla sarančata uchovávána v oddělených boxech při pokojové teplotě. Oproti očekávání docházelo u katalázy i superoxiddizmutázy k poklesu hladiny transkriptu ve srovnání s kontrolou (Obr. 3). Ke stejným výsledkům jsme docházeli i při opakovaných pokusech. U katalázy i SOD byl pokles transkripce největší při koncentraci 1 nM.

4.3 Měření enzymatické aktivity superoxiddizmutázy a katalázy

Další krokem bylo měření enzymatické aktivity katalázy a SOD. Podmínky pokusů a indukce oxidativního stresu byly shodné jako u transkripční aktivity. Stejně jako u transkripční aktivity, jsem po indukci oxidativního stresu očekávala u těchto enzymů i zvýšenou hladinu enzymatické aktivity. U SOD došlo k nárůstu po působení parakvatu o koncentraci 1 nM, u koncentrací 2 nM a 200 nM však došlo ke snížení aktivity téměř na hodnotu kontroly (Obr. 3).

U katalázy došlo k výraznému poklesu u všech vzorků oproti kontrole (Obr. 3), který vrcholil u hodnot pro koncentraci 1 nM.



Obrázek 3: Vliv parakvatu na transkripční a enzymatickou aktivitu katalázy a SOD. Při působení parakvatu o koncentracích 1 nM, 2 nM a 200 nM byla vyhodnocována hladina transkriptu katalázy **(A)**, hladina transkriptu SOD **(B)**, enzymatická aktivita superoxiddizmutázy **(C)** a enzymatická aktivita katalázy (**D**). Výsledky byly vyhodnoceny jako průměr tří měření ± SE.

4.4 Vyhodnocení telomerázové aktivity

Jelikož u *L. migratoria* byla potvrzena přítomnost typické hmyzí telomerické sekvence TTAGG (Sahara et al. 1999), předpokládala jsem, že k jejímu prodlužování dochází typickou cestou pomocí telomerázy. Jelikož tato metoda nebyla doposud u *L. migratoria* testována, bylo nutno nejprve metodu optimalizovat. Pro detekci telomerázové aktivity byly zvoleny pohlavní žlázy dospělých jedinců *L. migratoria*, kde lze na základě předcházejících studií očekávat významnou hladinu telomerázové aktivity. Tyto orgány byly vybrány pro pozitivní výsledky telomerázy u jiných druhů hmyzu (Sasaki a Fujiwara 2000). *D. melanogaster* posloužila z důvodu prokázané nepřítomnosti telomerázy jako negativní

kontrola. Jako pozitivní kontrola byl zvolen šváb *P. americana*, jehož telomerázová aktivita byla předcházející studií prokázána (Sasaki a Fujiwara 2000). Přestože byl experiment prováděn opakovaně, nebyla telomerázová aktivita u dospělých sarančat detekována. To naznačovalo absenci či nízkou hladinu telomerázy u dospělců, případně celého druhu či technický problém v podobě přítomných inhibitorů PCR, které se v homogenátech mohou přirozeně vyskytovat. Pro snížení rizika vlivu inhibitorů byly pro reakci vzorky naředěny 10x a 100x, nicméně ani v těchto případech nebyl produkt PCR získán. Dále jsem testovala subadultní jedince, jedince 2. instaru a vajíčka. Pro přípravu homogenátů byly využity jak pohlavní žlázy, tak celé hlavy jedinců.Telomeráza však nebyla detekována ani tentokrát. Nedetekování telomerázy mohlo být jednak způsobeno jejím malým množství, nebo je možné, že *L. migratoria* telomerázu nemá a k doplňování telomerické délky dochází jiným mechanismem.

Jelikož telomerázová aktivita nebyla u *L. migratoria* překvapivě zjištěna, rozhodla jsem se otestovat přítomnost telomerázové aktivity u dalších zástupců řádu Orthoptera. Pro tento pokus byly zvoleny tři druhy tohoto řádu *S. gregaria*, *A. domestica*, *G. assimilis*, telomerázovou aktivitu však nevykazoval žádný z nich. Posledním vzorkem, u kterého jsem testovala přítomnost telomerázy a telomerázu posléze prokázala byly gonády *E. kuehniella*. *E. kuehniella* patří k řádu Lepidoptera (motýli), tzn. řádu, u jehož dalších dvou zástupců telomeráza byla detekovaná v předcházející studii (Sasaki a Fujiwara 2000).

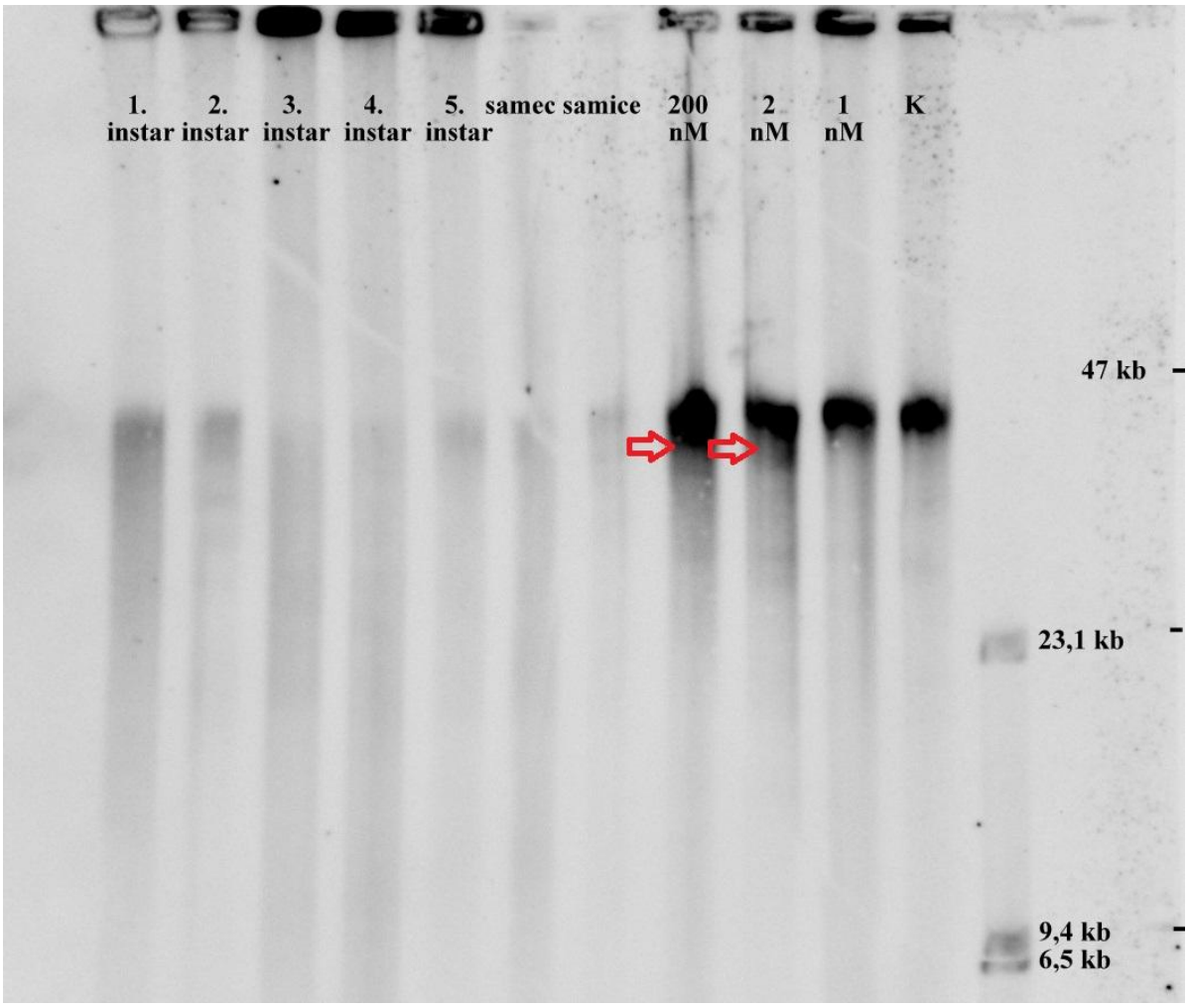
Fukčnost metody TRAP v mých experimentech, resp. specificita reakce byla ověřena na *E. kuehniella* a *P. americana*, u nichž byl získaný produkt PCR zaklonován a osekvenován a skutečně byla prokázána přítomnost sekvence TTAGG.

4.5 Vyhodnocení délky telomer

Délka telomer se zkracuje s každým cyklem replikace, z tohoto důvodu by měla být délka telomer kratší u starších jedinců. Tento předpoklad jsem testovala mezi sarančaty *L. migratoria* 1. -5. instaru a dospělým samcem a samicí Southernovou hybridizací. Na rozdíl od předešlé studie telomer *L. migratoria* (Sahara *et al.* 1999) jsem pracovala s pulzní elektroforézou, která mi umožnila lepší rozdělení fragmentů a tím i přesnější odhad velikosti produktů, která činila 45 kb. Oproti očekávaným výsledkům jsem mezi různě starými jedinci ve velikosti hybridizačních produktů, tj. délce telomer, nepozorovala žádné rozdíly (Obr. 4).

Dále jsem testovala délku telomer ovlivněnou oxidativním stresem. Stejně jako v předcházejících experimentech jsem pro vyvolání oxidativního stresu do sarančat injikovala parakvat. Délka telomer byla vyhodnocována opět pomocí Southernovy

hybridizace. U vzorků, které byly ošetřeny parakvatem jsem po hybridizaci opakovaně nacházela frakci kratších fragmentů, což mohlo naznačovat, že v souladu s původním předpokladem, skutečně s působením parakvatu dochází u telomer ke zkrácení jejich délky (Obr 4).

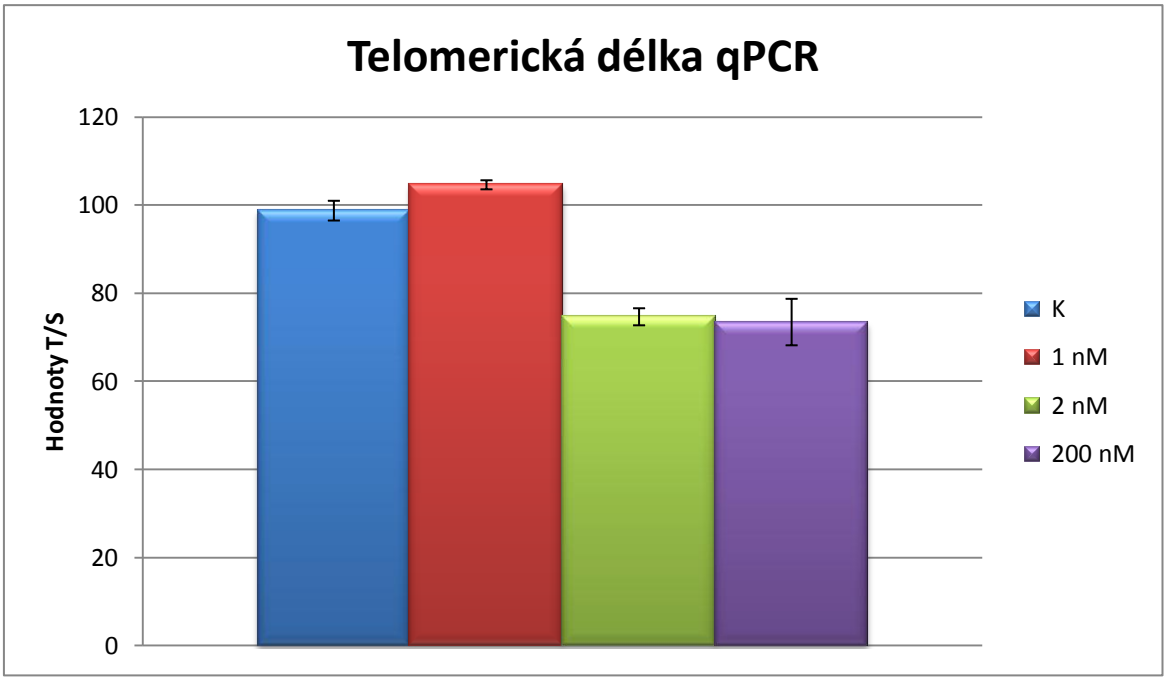


Obrázek 4: Porovnání délky telomer mezi vývojovými stádii, mezi dospělým samcem a samicí, a po podání parakvatu o koncentracích 1 nM, 2 nM a 200 nM. Produkty byly vizualizovány hybridizací se sondou značenou digoxigeninem a následnou chemiluminiscenční detekcí. Mezi jedinci různého stáří nejsou pozorovány změny, ty se objevují až po působení parakvatu 2 nM a 200nM ve formě kratších fragmentů (označeno šipkou).

Southernova hybridizace v mých experimentech tedy opakovaně naznačovala určité zkrácení telomerické délky vlivem parakvatu. Ačkoliv byly fragmenty separovány pulzní elektroforézou, i tak nebylo možno rozdíly ve velikosti fragmentů dostatečně definovat.

Proto jsem se rozhodla k využití kvantitativní PCR. Jelikož byla tato metoda doposud používána na hodnocení délky lidských telomer, tzn. telomer se sekvencí TTAGGG (Cawton 2002, O´Callaghan *et al.* 2011, Samsonraj *et al.* 2013), bylo nutno tuto metodu pro kvantifikaci hmyzí telomerické sekvence nejprve optimalizovat. Telomerické primery (Teloins1 a Teloins2) bylo nutno navrhnout tak, aby amplifikovaly telomerické sekvence, ale netvořily vzájemné konglomeráty, tzv. „dimery". Při hybridizaci mezi primery a templátem je každá šestá báze špatně párovaná, ale posledních šest bází na 3´konci primerů se s templátem páruje dokonale. Při vzájemném spojení primerů by nejsilnější možná hybridizace zahrnovala čtyři spravně spárované báze následované dvěmi chybnými. U 3´konce každého primeru pak nedochází k vytvoření páru a DNA polymeráza nemůže přidávat nukleotidy, tím je zajištěno, že se „dimery" primerů neamplifikují. Součástí optimalizace byla identifikace vhodné teploty nasedání primerů. Při optimalizaci reakčních podmínek jsem využívala řadu standardů, která byla připravena dvojkovým ředěním genomové DNA saranče. Ve chvíli, kdy jsem identifikovala vhodné reakční podmínky, jsem přistoupila k samotnému vyhodnocení telomerické délky.

Pomocí metody qPCR jsem potvrdila, že ke zkracování délky telomer dochází po působení parakvatu o koncentracích 2 nM a 200 nM (Obr. 5). Parakvat 1 nM nezpůsobil výrazné změny v délce. Tyto výsledky jsou ve shodě se závěry ze Souhernovy hybridizace.



Obrázek 5: Porovnání délky telomer pomocí qPCR po působení parakvatu o koncentracích 1 nM, 2 nM a 200 nM. Graf byl sestaven z průměrných hodnot tří měření ± SE. Vliv parakvatu se projevil zkrácením telomer u koncentrací 2 nM a 200 nM.

5 Diskuze

Hlavním cílem této diplomové práce bylo zhodnotit vhodnost *L. migratoria* jako modelového organismu pro studium vlivu oxidativního stresu na telomerický kompenzační mechanismus. Pro indukci oxidtivního stresu byl využíván hericid parakvat a byl testován vliv na antioxidační mechanismy a udržení délky telomer. Zaměřila jsem se na dva antioxidační enzymy - katalázu a superoxiddizmutázu.

5.1 Parakvat a antioxidační systémy

Vliv parakvatu jako oxidačního agens byl studován u širokého spektra organismů. Aplikace parakvatu má za následek zvýšenou produkci superoxidového radikálu (Farrington *et al.* 1973), která byla pozorována v cytosolu (Missirlis *et al.* 2003) a na vnější membráně mitochondrií (Hirai *et al.* 1999). Nicméně přesný mechanismus působení parakvatu nebyl doposud plně objasněn (Sanhita *et al.* 2007).

Působení parakvatu na transkripční aktivitu antioxidačních enzymů bylo sledováno jen v několika málo studiích, a to na kosterním svalstvu myší (Franco *et al.* 1999), na kortikálních neuronech a astrocytech laboratorních krys (Schmuck *et al.* 2002). Dále byl výzkum dělán u háďátka *Caenorhabditis elegans* (Tawe *et al.* 1998) a u rostliny *Nicotiana plumbaginifolia* (Tsang *et al.* 1991). Obecně docházelo ve všech studiích k zvyšování transkripční aktivity jak u katalázy, tak i u superoxiddizmutázy. Na rozdíl od transkripční úrovně, aktivita antioxidačních enzymů vlivem parakvatu byla zkoumána v celé řadě studií. Mnoho těchto prací bylo zaměřeno na obratlovce (Sanhita *et al.* 2007, Shopova *et al.* 2009, Czarniewska *et al.* 2003) a rostliny (Zacheo *et al.* 1991, Iturbe-Ormaetxe *et al.* 1998, Kim a Jung 2013), výzkum hmyzu byl zaměřen jen na *D. melanogaster* (Rzezniczak *et al.* 2011, Peng *et al.* 2012).

V mé diplomové práci bylo u všech použitých koncentrací parakvatu pozorováno snížení hladiny transkriptů obou testovaných enzymů a rovněž i pokles enzymatické aktivity katalázy. Původní předpoklad byl, že aplikace dostatečné dávky parakvatu musí nutně vést k aktivizaci antioxidačních enzymů. Nicméně zpětně lze usuzovat, že dávky parakvatu, které jsem použila, byly příliš vysoké, a proto mohly vést naopak k poklesu, resp. kolapsu antioxidační obrany. Dodatečnou indicií k tomuto předpokladu může být právě SOD, jejíž enzymatická aktivita narostla vhledem ke kontrole právě pouze při nejnižší dávce parakvatu. Obdobný příklad lze najít ve studii na rajčeti *Lycopersicon esculentum,* kde byly měřeny hodnoty aktivity po působení parakvatu u koncentrací v rozsahu 0-50 μM. Po podání 5 μM a

10 µM parakvatu se objevoval postupný nárůst aktivity SOD oproti kontrole, avšak při koncentraci 50 µM nastal její pokles (Zacheo *et al.* 1991). Podobně, Abrashev *et al.* (2011) zjistil u *Vibrio cholerae* postupné zvyšování aktivity SOD u 0,1-1 mM parakvatu, u vyšších koncentrací se opět objevoval pokles. Lze také spekulovat o nevhodně zvoleném vývojovém stádiu pro testování vlivu parakvatu. Tawe *et al.* (1998) ku příkladu zjistil, že transkripční aktivita různých stádií vývoje se může lišit. U larvalních stadií *Caenorhabditis elegans* byla objevena 2x vyšší exprese SOD než u kontroly, zatímco u starších háďátek nedošlo ke změně aktivity. Výsledek, který jsem pozorovala, mohl být také způsoben krátkým působením parakvatu, kdy se aktivita enzymu ještě nestačila rozvinout. Zvýšená hladina antioxidačních enzymů až po delší době působení parakvatu byla pozorována v několika studiích. Ke stejnému závěru dospěla i studie Czarniewska *et al.* (2003) prováděna na játrech skokanů *Rana esculenta*, kde nejprve po šesti dnech podávání parakvatu docházelo k 50 % snížení aktivity oproti kontrole, výrazný nárůst nastal až po dvanáci dnech. Nárůst aktivity katalázy až při delším působení také pozorovali Kim a Jung (2013), kteří první den po aplikaci parakvatu neobjevili u rýže *Oryza sativa* rozdíl v aktivitě v porovnání s kontrolou, avšak po dvou dnech se již projevilo zvýšení. Změny antioxidační aktivity na základě doby působení parakvatu studoval Abrashev *et al.* (2011) u baktérie *Vibrio cholerae*. V této studii docházelo k postupnému zvyšování aktivity katalázy v 15., 30. a 60. minutě, s delším působením pak docházelo k postupnému poklesu. U SOD byl však s postupujícím časem pozorován kontinuální nárůst aktivity.

Aplikací 1 nM parakvatu v mých experimentech docházelo vzhledem ke kontrole ke zvýšené aktivitě SOD, přičemž u katalázy byl zaznamenán významný pokles. Podobnou reakci pozorovali i Asma a Yesilada (2002) u houby *Funalia trogii*, kdy po působení parakvatu o koncentracích 1 mmol/l a 0,1mmol/l byl zjištěn vzrůst aktivity SOD a pokles u katalázy. Rozdíly v aktivitě těchto enzymů po podání parakvatu studoval také Abrashev *et al.* (2011) u *Vibrio cholerae*, který zjistil, že při 1 h působení parakvatu se při koncentracích 0,1-1 mM aktivita SOD zvyšovala, zatímco u katalázy téměř nedocházelo ke změnám oproti kontrole. Je předpokládáno, že k nižší odezvě katalázy než SOD může docházet z několika důvodů. Jednak tím, že parakvat indukuje vznik superoxidu, který je redukován právě pomocí SOD, a tak na zvyšující se koncentrace parakvatu přímo reaguje zvýšením aktivity. Dále pak tím, že je kataláza závislá na funkci SOD, protože SOD umožňuje dismutací superoxidového radikálu vznik peroxidu vodíku, který pak rozkládá kataláza. Je tedy možné, že ke zvýšení aktivity katalázy by mohlo dojít později, kdy SOD již převede větší množství superoxidu na peroxid vodíku. Rozdíly mezi aktivitami antioxidačních enzymů by mohly být

dále způsobeny jejich různou citlivostí na koncentrace parakvatu. Kataláza je nejspíš citlivější na dávku parakvatu a k narušení funkce enzymu dochází tedy již při koncentraci 1 nM.

Výsledky antioxidační aktivity se výrazně lišily mezi měřením na transkripční a enzymatické úrovni. Podle toho můžeme vidět, že tyto dvě úrovně regulace jsou různě citlivé na vliv parakvatu. U katalázy docházelo ke snížení aktivity na obou úrovních, zatímco u SOD se výsledky lišily. Transkripční aktivita SOD se po působení parakvatu snížila, zatímco ta enzymatická se zvýšila. Již dříve bylo zjištěno, že pozorovaný nárůst enzymatické aktivity nekoreluje s úrovní mRNA, tudíž změny v transkripci neukazují, jak důležitou roli hraje antioxidační gen v ochraně proti oxidativnímu stresu (Mylona a Polidoros 2010).

5.2 Telomerázová aktivita

Telomeráze je v současné době věnována velká pozornost, jelikož je klíčovou složkou buněčné nesmrtelnosti a tumorogeneze. Telomeráza je aktivní až v 90% lidských karcinomů, ale ne v normálních somatických buňkách, proto by její detekce mohla sloužit jako diagnostický marker pro nádory (Chen a Chen 2011). Z tohoto důvodu je mnoho studií zaměřujících se právě na člověka a nádorové bujení (Broccoli *et al.* 1995, Counter *et al.* 1995, Hahn *et al.* 1999, Meyerson 2000). Aktivita telomerázy u hmyzu byla dosud zkoumaná jen velmi okrajově, a to na několika málo hmyzích druzích (Sasaki a Fujiwara 2000). V této práci byla přítomnost telomerázy pozorována u švába *Periplaneta americana*, u cvrčka *Teleogryllus taiwanemma*, u motýlů *Agrius convolvuly* a *Papilio xuthus*. Dle předpokladů se telomeráza nevyskytovala u dvoukřídlých *Drosophila melanogaster* a *Sarcophaga peregrina*. Zajímavým zjištěním byla absence nebo velmi nízká aktivita telomerázy u *Bombyx mori*, u kterého však byla potvrzena přítomnost hmyzí telomerické sekvence. Tento výsledek byl přičítán malému množství telomerázy u tohoto druhu, které nebylo možné metodou TRAP assay detekovat.

Vzhledem k publikovaným údajům byl velký předpoklad, že systém telomerické kompenzace u saranče je založen na aktivitě telomerázy. Navzdory očekávání však telomeráza nebyla detekovaná. Nepřítomnost telomerázové aktivity u *L. migratoria* mohla být způsobena technickými důvody, kdy malé množství telomerázy mohlo způsobit selhání TRAP assay jako tomu bylo v případě *Bombyx mori*.

Telomerázovou aktivitu dále nevykazovali ani další tři zástupci Orthoptera (*S. gregaria, A. domestica, G. assimilis*). Z tohoto důvodu usuzujeme, že by nepřítomnost

telomerázy mohla být specifická pro celý tento řád, nicméně toto je v rozporu s detekovanou telomerázou u *T. taiwanemma* (Sasaki a Fujiwara 2000).

5.3 Délka telomer

V této diplomové práci byla studována délka telomer *L. migratoria* u různých vývojových stádií a dále mezi dospělci po působení parakvatu o různých koncentracích. Námi zjištěná délka telomer *L. migratoria* odpovídala podle výsledků Southernovy hybridizace 45 kb. Tento výsledek je v rozporu s publikací Sahara *et al.*(1999), kde u stejného organismu byla naměřena délka 22 kb. Rozdíl byl pravděpodobně způsoben tím, že jsem pro práci využívala pulzní elektroforézu, která mi umožnila lepší rozdělení fragmentů a tím přesnější odhad délky.

Při porovnávání délky telomer mezi různými vývojovými stádii jsem vycházela z předpokladu, že se telomery zkracují s každým cyklem replikativního dělení kvůli neschopnosti DNA polymerázy dosyntetizovat konce chromozomů (Coviello-McLaughlin a Prowse 1997). Čím je tedy organismus starší, podstoupil více dělení, a tudíž by měl mít telomery kratší. Tuto hypotézu podporuje několik studií zaměřených na telomery člověka (Benetos *et al.* 2001, Cheng *et al.* 2013) a myši (Coviello-McLaughlin a Prowse 1997). Benetos *et al.* (2001), který studoval dospělé lidi různého věku, zjistil, že telomerické délka je negativně korelována s věkem. V práci Cheng *et al.* (2013) bylo zjištěno zkrácení telomer i u plodu v 6. -11. týdnu prenatálního vývoje, ačkoliv v tomto období by měla být ještě aktivní telomeráza, která zkrácenou délku doplňuje. U *L. migratoria* jsem však žádné rozdíly v délce telomer mezi různě starými jedinci nepozorovala. Rozdíly v telomerách závislé na věku budou nejspíše tak malé, že je není možné pomocí Southernovy hybridizace, alespoň způsobem jaký jsem použila já, detekovat.

Dále byl testován vliv oxidativního stresu působením parakvatu na délku telomer. Oxidativní stres je považován za hlavní příčinu zkracování telomer, ale doposud není zcela jasné, jaké změny v telomerách toto zkracování zapříčiňují. Dřívější studie ukázaly, že oxidativní stres způsobuje jednořetězcové zlomy v telomerické DNA, které jsou v současné době považovány za hlavní příčinu zkracování DNA (Zglinicki *et al.* 2000). Tuto hypotézu potvrdil Wang *et al.* (2010), který pozoroval nárůst výskytu jednořetězcových i dvouřetězcových zlomů v telomerické oblasti po působení peroxidu vodíku nebo 20% kyslíku.

V souladu s těmito předpoklady jsem změny v telomerické délce pozorovala, a to jak s využitím Southernovy hybridizace, tak kvantitativní Real-time PCR. Stejný výsledek byl

zaznamenán v několika studiích, avšak v žádné z nich nebyl oxidativní stres vyvoláván parakvatem, ale byly použity jiné způsoby indukce. Po oxidativním stresu vyvolaném výfukovými plyny (Hoxha *et al.* 2009), peroxidem vodíku (Uziel *et al.* 2008) a UVA zářením (Kawaniski a Oikawa 2004) byly pozorovány změny v telomerové oblasti, bylo pozorováno zkrácení telomer, jednořetězcové zlomy a výskyt oxidovaných bází (8oxodG).

Celkově mohu konstatovat, že ačkoliv jsem u *L. migratoria* byla schopna detekovat určité změny v telomerické délce vlivem působení oxidativního stresu, saranče *L. migratoria* nelze brát jako použitelný organismus pro studium vlivu oxidativního stresu na hmyzí telomery. To je dáno nedetekovatelnou telomerázovou aktivitou, tedy aktivitou, která je v tomto ohledu studia zcela zásadní.

6 Závěr

Tato diplomová práce se zabývá vlivem oxidativního stresu indukovaným parakvatem na antioxidační systémy a délku telomer, dále byla studována délka telomer mezi různými vývojovými stádii a telomerázová aktivita u saranče *L. migratoria*. V rámci této práce byly navrženy degenerované primery pro geny katalázu a superoxiddizmutázu, na jejichž základě byla provedena sekvenace daných genů. Po určení sekvencí byly následně navrženy specifické primery, které byly použity pro vyhodnocování transkripční aktivity. Na úrovni transkripce a enzymatické aktivity byl prokázán vliv parakvatu na aktivitu katalázy a superoxiddizmutázy. Metodou Southernovy hybridizace a kvantitativní PCR bylo po aplikaci parakvatu zaznamenáno zkrácení telomerické délky. Byla provedena TRAP assay pro vyhodnocení telomerázy. Telomerázová aktivita však u *L. migratoria* detekovaná nebyla. Závěrem lze konstatovat, že vzhledem k nedetekovatelným hladinám telomerázové aktivity, není *L. migratoria* vhodným modelem pro studium vlivu oxidativního stresu na telomery či telomerický kompenzační mechanismus.

7 Použitá literatura

ABRASHEV R., KRUMOVA E., DISHLISKA V., ENEVA R., ENGIBAROV S., ABRASHEV I., ANGELOVA M., 2011. Differential effect of paraquat and hydrogen peroxide on the oxidative stress response in *Vibrio cholerae*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment,* 25, s. 72-76.

AHMED S., PASSOS J. F., BIRKET M. J., BECKMANN T., BRINGS S., PETERS H., BIRCH-MACHIN M. A., ZGLINICKI T., SARETZKI G., 2008. Telomerase does not counteract telomere shortening but proteus mitochondrial function under oxidative stress. *Journal of Cell Science,* 121, s. 1046-1053.

ALSCHER R. G., ERTURK N., HEATH L. S., 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany,* 53, s. 1331-1341.

ASMA D., YESILADA O., 2002. Effect of paraquat on cellular defense enzymes and glutathione level of *Funalia trogii. Folia Microbiologica,* 47, s. 413-416.

AUBERT G., LANSDORP P. M., 2008. Telomeres and aging. *Physiological reviews,* 88, s. 557- 579.

BENETOS A., OKUDA K., LAJEMI M., KIMURA M., THOMAS F., SKURNICK J., LABAT C., BEAN K., AVIV A., 2001. Telomere length as an indicator of biological aging: The gender effect and relation with pulse pressure and pulse wave velocity. *Hypertension,* 37, s. 381-385.

BETTS D. H., PERRAULT S., HARRINGTON L., KING W. A., 2006. Quantitative analysis of telomerase activity and telomere length in domestic animal clones. *Methods in Molecular Biology*, 325, s. 149-180.

BLACKBURN E. H., 1991. Structure and fiction of telomeres. *Nature,* 350, s. 569-573.

BOUTOU E., VLACHODIMITROPOULO D., PAPPA V., STÜRZBECHER H. W., VORGIAS C. E., 2013. DNA repair and telomeres — an intriguing relationship. *New Research Directions in DNA Repair*. *InTech, Open Access Publisher,* ISBN 978-953-51-1114-6.

BROCCOLI D., YOUNG J. W., DE LANGE T., 1995. Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 92, s. 9082-9086.

CAPKOVA FRYDRYCHOVA R., MASON J. M., 2013. Telomeres: Their structure and

maintenance. *The Mechanisms of DNA Replication. InTech, Open Access Publisher*, s. 423-443.

CAWTHON R. M., 2002. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Research,* 30, s. 1-6.

COVIELLO-MCLAUGHLIN G. M., PROWSE K. R., 1997. Telomere length regulation during postnatal development and ageing in *Mus spretus. Nucleic Acids Research,* 25, s. 3051-3058.

COHN M., 2008. Molecular diversity of Telomeric sequences. *Origin and Evolution of Telomeres,* s. 70-82.

COOPER G. M., 2000. DNA replication. *The Cell: A Molecular Approach*. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9940/.

COUNTER C. M., GUPTA J., HARLEY C. B., LEBER B., BACCHETTI S., 1995. Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood,* 85, s. 2315-2320.

CUI H., KONG Y., ZHANG H., 2012. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Journal of Signal Transduction,* 2012, ID 646354.

CZARNIEWSKA E., KASPRZYK A, ZIEMNICKI K., 2003. Effect of paraquat and metoxychlor on antioxidant enzymes in frog *Rana esculenta* L. liver. *Biological Letters,* 40, s. 125-133.

DIZDAROGLU M., JARUGA P., BIRINCIOGLU M., RODRIGUEZ H., 2002. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free radical biology & medicine,* 32, s. 1102-1115.

ESSICK E. E., SAM F., 2010. Oxidative stress and authophagy in cardiac dinase, neurological disorders, aging and cancer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity,* 3, s. 168-177.

FARRINGTON T. A., EBERT M., LAND E. T., FLETCIIER K., 1973. Bipyridylium quaternary salts and related compounds. V. Pulse radiolysis studies on the reaction of paraquat radiál with oxygen. Implication for the mode of action of bipyridyl herbicides. *Biochimica et Biophysica Acta,* 314, s. 372-385.

FINKEL T., HOLBROOK N. J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature,* 408, s. 239-247.

FRANCO A. A., ODOM R. S., RANDO T. A., 1999. Regulation of antioxidant enzyme gene expression in response to oxidative stress and during differentiation of mouse skeletal muscle. *Free Radical Biology & Medicine,* 27, s. 1122-32.

FUJITA I., TANAKA M., KANOH J., 2012. Identification of the functional domains of the telomere protein Rap1 in Schizosaccharomyces pombe. *PLoS ONE,* 7, s. 1-5.

GREIDER C. W., BLACKBURN E. H., 1985. Identification of specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell,* 43, s. 405-413.

HAHN W. C., STEWART S. A., BROOKS M. W., YORK S. G., EATON E., KURACHI A., BEIJERSBERGEN R. L., KNOLL J. H., MEYERSON M., WEINBERG R. A., 1999. Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nature Medicine,* 5, s. 1164-1170.

HIRAI K., PAN J., SHIMADA H., IZUHARA T., KURIHARA T., MORIGUCHI K., 1999. Cytochemical energy-filtering transmission electron microscopy of mitochondrial free radical formation in paraquat cytotoxicity. *Journal of Electron Microscopy,* 48, s. 289-296.

HOUBEN J. M., MOONEN H. J., SCHOOTEN F. J., HAGEMAN G. J., 2008. Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress? *Free radical biology & medicine,* 44, s. 235-246.

HOXHA M., DIONI L., BONZINI M., PESATORI A. C., FUSTINONI S., CAVALLO D., CARUGNO M., ALBETTI B., MARINELLI B., SCHWARTZ J., BERTAZZI P. A., BACCARELLI A., 2009. Association between leukocyte telomere shortening and exposure to traffic pollution: a cross-sectional study on traffic officers and indoor office workers. *Environmental health,* 8, doi: 10.1186/1476-069X-8-41.

CHEN G., KONG F., LUAN Y., SUN C., WANG J., ZHANG L., JIANG B., QI T., ZHAO J., ZHENG C., XU D., 2013. Differential shortening rate of telomere length in the development of human fetus. *Biochemical and Biophysical Research Communications,* 442, s. 112-115.

CHEN CH., CHEN R. J., 2011. Prevalence of telomerase activity in human cancer. *Journal of the Formosan Medical Association,* 110, s. 275-289.

ITURBE-ORMAETXE I., ESCUREDO P. R., ARRESE-IGOR C., BECANA M., 1998. Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. *Plant Physiology,* 116, s. 173-181.

KAWANISHI S., OIKAWA S., 2004. Mechanism of telomere shortening by oxidative stress. *Annals of the New York Academy of Sciences,* 1019, s. 278-284.

KIM J. G., JUNG S., 2013. Differential antioxidant mechanisms of rice plants in response to oxyfluorfen and paraquat. *Weed and Turfgrass Science,* 2, s. 254-259.

KIM N. W., PIATYSZEK M. A., PROWSE K. R., HARLEY C. B., WEST M. D., HO P. L.,

COEVIELLO G. M., WRIGHT W. E., WEINRICH S. L., SHAY J. W., 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science,* 266, s. 2011-2015.

KIM N. W., WU F., 1997. Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *Nucleic Acids Research,* 25, s. 2595–2597.

KROKAN H. E., STANDAL R., SLUPPHAUG G., 1997. DNA glycosylases in the base exciton repair of DNA. *Biochemical Journal,* 325, s. 1-16.

KYO S., INOUE M., 2002. Complex regulatory mechanisms of telomerase activity in normal and cancer cells: How can we apply them for cancer therapy? *Oncogene,* 21, s. 688-697.

LOUIS E. J., 2002. Are *Drosophila* telomeres an exception or the rule? *Genome Biology,* 3.

MAESHIMA K., JANSSEN S., LAEMMLI U. K., 2001. Specific targeting of insect and vertebrate telomeres with pyrrole and imidazole polyamides. *EMBO Journal,* 20, s. 3218–3228.

MAKAROV V. L., HIROSE Y, LANGMORE J. P., 1997. Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell,* 88, s. 657-666.

MASON J., CAPKOVA FRYDRYCHOVA R., BIESSMANN H., 2008. Drosophila telomeres: an exception providing new insights. *BioEssays,* 30, s. 25-37.

MATTIUSSI M., TILMAN G., LENGLEZ S., DECOTTIGNIES A., 2012. Human telomerase represses ROS-dependent cellular responses to tumor necrosis factor-α without affecting NF-$_K$B activation. *Cellular Signalling,* 24, s. 708-717.

MCKNIGHT T. D., 2004. Plant telomere biology. *Plant Cell,* 16, s. 794-803.

MEYERSON M., 2000. Role of telomerase in normal and cancer cells. *Journal of Clinical Oncology,* 18, s. 2626-2634.

MISSIRLIS F., HU J., KIRBY K., HILLIKER A. J., ROUAULT T. A., PHILLIPS J. P., 2003. Compartment-specific protection of iron-sulfur proteins by superoxide dismutase. *The Journal of Biological Chemismy,* 278, s. 47365-47369.

MYLONA P. V., POLIDOROS A. N., 2010. ROS Regulation of Antioxidant Genes**.** *Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Higher Plants,* s. 101-127.

NASIR N. F. M, KANNAN T. P., SULAIMANN S. A., SHAMSUDDIN S., AHMAD A., STANGACIU S., 2014. Telomeres and oxidative stress. *British Journal of Medicine & Medical Research,* 4, s. 57-67.

O´CALLAGHAN N., BAACK N., SHARIF R., FENECH M., 2011. A qPCR-based assay to quantify oxidized guanine and other FPG-sensitive base lesions within telomeric DNA. *BioTechniques,* 51, s. 403-412.

OESEBURG H., BOER R. A., GILST W. H., HARST P., 2010. Telomere biology in healthy aging and disease. *Europien Journal of Physiology,* 459, s. 259-268.

OLOVNIKOV A. M., 1971. Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides. *Doklady Akademii Nauk,* 201, s. 1496-1499.

PENG C., ZUO Y., KWAN K. M., LIANG Y., MA K. Y., CHAN H. Y., HUANG Y., YU H., CHEN Z. Y., 2012. Blueberry extract prolongs lifespan of *Drosophila melanogaster. Experimental Gerontology,* 47, s. 170-178.

POLJSAK B., MILISAV I., 2013. Aging, oxidative stress and antioxidants. *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants InTech, Open Access Publisher,* ISBN 978-953-51-1123-8.

POLLACK M., LEEUWENBURGH CH., 1999. Molecular mechanisms of oxidative stress in aging: free radicals, aging, antioxidant and disease. *Handbook of Oxidants and Antioxidants in exercise,* s. 881-923.

POWERS S. K., LENNON S. L., 1999. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proceedings of the Nutrition Society,* 58, s. 1025-1033.

PROWSE K. R., GREIDER C. W., 1995. Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 92, s. 4818-4822.

RZEZNICZAK T. Z., DOUGLAS L. A., WATTERSON J. H., MERRITT T. J., 2011. Paraquat administration in Drosophila for use in metabolic studies of oxidative stress. *Analytical Biochemistry,* 419, s. 345-347.

SAHARA K., MAREC F., TRAUT W., 1999. TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. *Chromosome Research,* 7, s. 449-460.

SAMSONRAJ R. M., RAGHUNATH M., HUI J. H., LING L., NURCOMBE V., COOL S. M., 2013. Telomere length analysis of human mesenchymal stem cells by quantitative PCR. *Gene,* 519, s. 348-355.

SANHITA R., ARNAB S., ABITABHA R., 2007. Effects of paraquat on anti-oxidant system in rats. *Indian Journal of Experimental Biology,* 45, s. 432-438.

SANTORO N., THIELE D. J., 1997. Oxidative stress responses in the yeast *Sacharomyces cerevisiae*. *Yeast Stress Responses,* s. 171-211.

SASAKI T., FUJIWARA H., 2000. Detection and distribution patterns of telomerase activity in insects. *European Journal of Biochemistry,* 267, s. 3025-3031.

SHAY J. W., ZOU Y., HIYAMA E., WRIGHT W. E., 2001. Telomerase and cancer. *Human Molecular Genetics,* 10, s. 677-685.

SHOPOVA V. L., DANCHEVA V. Y., SALOVSKY P. T., STOYANOVA A. M., 2009. Protective effects of a superoxide dismutase/catalase mimetic compound against paraquat pneumotoxicity in rat lung. *Respirology,* 14, s. 504-510.

SCHMUCK G., RÖHRDANZ E., TRAN-THI Q.-H., KAHL R., SCHLÜTER G., 2002. Oxidative stress in rat cortical neurons and astrocytes induced by paraquat in vitro. *Neurotoxicity Research,* 4, s. 1-13.

TAWE W. N., ESCHBACH M. L., WALTER R. D., HENKLE-DÜHRSEN K., 1998. Identification of stress-responsive genes in *Caenorhabditis elegans* using RT-PCR differential display. *Nucleic acids research,* 26, s. 1621-1627.

TRAUT W., SZCZEPANOWSKI M., VÍTKOVÁ M., OPITZ C., MAREC F., 2007. The telomere repeat motif of basal Metazoa. *Chromosome Research,* 15, s. 371-382.

TSANG E. W., BOWLER C., HÉROUART D., VAN CAMP W., VILLARROELl R., GENETELLO C., VAN MONTAGU M., INZÉ D., 1991. Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. *The Plant Cell,* 3, s. 783-792.

TURRENS J. F., 1997. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Bioscience Reports,* 17, s. 3-8.

TURRENS J. F., 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology,* 552, s. 335-344.

UEHARA H., NARDONE G., NAZARENKO I., HOHMAN R. J., 1999. Detection of telomerase activity utilizing energy transfer primers: comparison with gel- and ELISA-based detection. *BioTechniques,* 26, s. 552-558.

UTTARA B., SINGH A. J., ZAMBONI P., MAHAJAN R. T., 2009. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmatology,* 7, s. 65-74.

UZIEL O., RESHEF H., RAVID A., FABIAN I., HALPERIN D., RAM R., BAKHANASHVILI M., NORDENBERG J., LAHAV M., 2008. Oxidative stress causes telomere damage in Fanconi anaemia cells – a possible predisposition for malignant transformation. *British Journal of Haematology,* 143, s. 82-93.

WANG Z., RHEE D. B., LU J., BOHR CH. T., ZHOU F., VALLABHANENI H.,

SOUZA-PINTO N. C., LIU Y., 2010. Characterization of oxidative guanine damage and repair in mammalian telomeres. *PLOS Genetics,* 6, DOI: 10.1371/journal.pgen.1000951.

WEGE H., LE H. T, CHUI M. S., LIU L., WU J., GIRI R., MALHI H., SAPPAL B. S., KUMARAN V., GUPTA S., ZERN M. A., 2003. Telomerase reconstitution immortalizes human fetal hepatocytes without disrupting thein differentiation potential. *Gastroenterology,* 124, s. 432-444.

WRIGHT W. E., PIATYSZEK M. A., RAINEY W. E., BYRD W., SHAY J. W., 1996. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Developmental Genetics,* 18, s. 173- 179.

WYATT H. D. M., WEST S. C., BEATTIE T. L., 2010. In*TERT*preting telomerase structure and function. *Nucleic Acids Research,* 38, s. 5609-5622.

YANG J. H., LEE H. C., LIN K. J., WEI Y. H., 1994. A specific 4977- bp deletion of mitochondrial DNA in human aging skin. *Archives of Dermatological Research,* 286, s. 386-390.

ZACHEO G., GUIDA G., BLEVE-ZACHEO T., MELILLO M. T., 1991. Effect of paraquat on the superoxide dismutase and katalase aktivity of tomato plants susceptible and resistant to *Meloidogyne incognita*. *Nematologia Mediterranea,* 19, s. 155-162.

ZGLINICKI T., PILGER R., SITTE N., 2000. Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. *Free Radical Biology & Medicine*, 28, s. 64–74.

ZGLINICKI T., 2002. Oxidative stress shortens telomeres. *Biochemical Sciences,* 27, s. 339-344.

8 Přílohy

8.1 Sekvence katalázy a superoxiddizmutázy

Kataláza:

CGATTACTTCGGCAAAGTAATTCTTGGGGATTGCGATTTAGCACAATTTTGCCCA
CTGGGATGAGTGGAAACTCGTCATGTGGCCAGACCTTAGTGAGATCAAACGGGT
TAAATTTCCAGTTCTCAGCCTGTTTAAATGTCATGACTTGTATGTACATAGTCCA
AGAGGGGAAGTTTCCTGTTGCAATAGCATTATAGAGATCCCGGATTGAATAATC
CGGATCACTGCCAGAGAGGTCACCAGCCTGTTTTGTTGGTAGATTTTTTATTCCT
TGGTCAGTCTTATAATGGAATTTGCAATAAACAGCTTCATTCTTGGCATTGACTA
ATTTGAATGTGTGTGAACCATAACCATTCATGTGGCGATATCCATCTGGGATTCC
CCTGTCAGAGAACAGGAACATAACCTGATGGGTTGTCTCTGGTCTAAGTGTAAT
GAAGTCCCAAAACATGTCA

Superoxiddizmutáza:

CGATTGAATTCGGTGACAACACTAACGGGTGTATGAGTGCCGGGGCACATTTCA
ACCCTCACAGCAAGGACCACGCAGGCCCCGAGGATGCCGACCGCCACGTCGGA
GATCTGGGCAATGTCGAGGCAGGCGGGGATGGAGTTGCCAAAGTTAACATTACT
GACAAGGTTATCTCTCTGACTGGAGATCACAATGTCATCGGCCGCACTCTTGTGG
TGCATGCTGACCCGGATGACCTGGGACGTGGCGGACACGAGCTGAGCAAGACG
ACCGGCAACGCAGGCGCTAGAAT