

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Katedra genetiky



**Vliv oxidačního stresu na aktivitu
telomerických elementů u *Drosophila
melanogaster***

Bakalářská práce

Veronika Hejdová

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

České Budějovice 2016

Hejdová, V., 2016: Vliv oxidačního stresu na aktivitu telomerických elementů u *Drosophila melanogaster*. [Effect of oxidative stress on telomeric element activity in *Drosophila melanogaster*. Bc. Thesis, in Czech.] – 23 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

HeTom transgene expression was studied in order to determine the effect of chronic oxidative stress, using paraquat, on transcriptional activity of the promoter of *Het-A* telomeric element. After exposure to low paraquat concentrations, I found increased transcript levels of telomeric *HeT-A* as well as *HeTom*, the non-telomeric insertion of *HeT-A* promoter in combination with the gene for fluorescent protein Tomato.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou 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 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 12. prosince 2016

.....

Veronika Hejdová

Poděkování

Chtěla bych velmi poděkovat své školitelce RNDr. Radmile Čapkové Frydrychové, Ph.D., za odborné vedení této práce, cenné rady a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Michale Korandové za podporu a všem členům laboratoře za dobrou atmosféru. Také bych chtěla poděkovat celé své rodině za podporu po celou dobu studia.

Obsah

1. Úvod.....	1
1.1 Struktura a funkce telomer	1
1.1.1 Kompenzační mechanismy telomer	2
1.1.2 Telomerické elementy drozofily	3
1.2 Oxidační stres a jeho vliv na telomerického zkracování	4
1.3 Vliv oxidačního stresu na telomery drozofily	6
2. Cíle práce.....	8
3. Materiál a metody.....	9
Kmen drozofily.....	9
3.1 Vyvolání oxidačního stresu	9
3.2 Izolace celkové RNA a syntéza cDNA.....	9
3.3 Real time PCR	10
3.4 Statistická analýza	11
4. Výsledky.....	12
4.1 Transkripce transgenního konstruktu <i>HeTom</i> a telomerického elementu <i>HeT-A</i> v závislosti na nízkých koncentracích parakvatu	12
4.2 Analýza in vivo exprese konstruktů <i>HeTom</i>	12
5. Diskuze.....	15
6. Závěr.....	17
7. Použitá literatura	18
8. Příloha	22
8.1 Izolace RNA	22
8.2 Smart MMLV Reverzní Transkriptáza.....	22

1. Úvod

1.1 Struktura a funkce telomer

Telomery jsou specializované DNA-proteinové struktury na koncích lineárních eukaryotních chromosomů, skládající se z tandemově opakovaných jednoduchých sekvencí DNA (Blackburn 1990; Blackburn 1991). Plní řadu funkcí a pro životaschopnost buněk jsou zcela zásadní. Svou proteinovou strukturou odlišují přirozené konce chromosomů od dvouřetězcových zlomů. Ztráta telomer vede k chromosomálním fúzím, které vznikají jako následek reparačních procesů při dvouřetězcových zlomech, s tím, že chromosomální fúze vedou následně ke genomové nestabilitě (Mason et al. 2008; Denchi 2009; Blackburn 1990). Díky neschopnosti DNA polymerázy plně replikovat koncové úseky lineární DNA, tím, že běžná DNA polymeráza není schopna nahradit prázdný úsek vzniklý po degradaci RNA primeru, se délka telomer zkracuje s každým buněčným cyklem, což je důvodem toho, že obecně se telomery zkracují v průběhu stárnutí (Deng et al. 2004). Krom nekompletní replikace je telomerická délka zkracována také působením oxidačního stresu, který je považován za hlavní zdroj telomerických ztrát (von Zglinicki 2002).

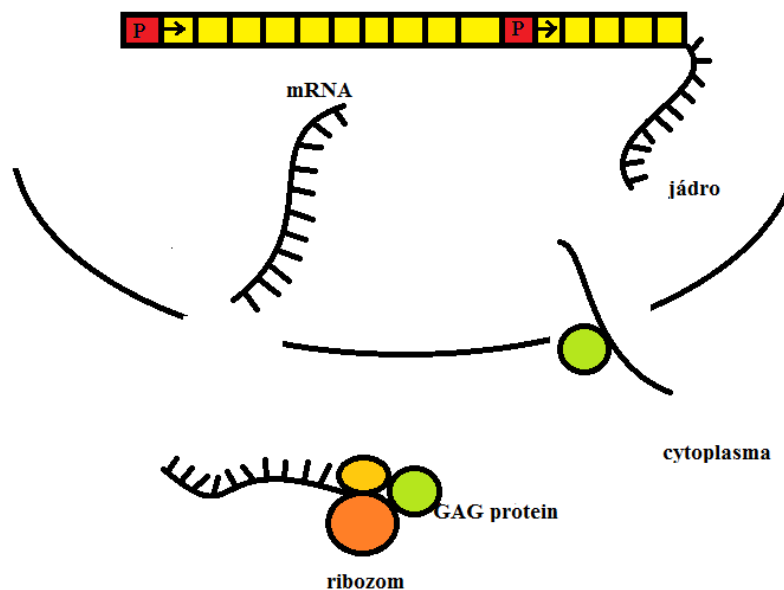
Jestliže je telomera zkrácena na nejkratší možnou délku, dochází k tzv. Hayflickovu limitu, při kterém buňka ztrácí schopnost dělení a podléhá buněčné senescenci (Hayflick & Moorhead 1961). Nicméně, prodloužením telomerické délky lze stav Hayflickova limitu odvrátit a prodloužit tak proliferační schopnost dané buňky. Dosud byly popsány tři mechanismy kompenzace telomerických ztrát – aktivita telomerázy, genová konverze a retrotranspozice telomerických elementů.

Nejčastěji jsou telomery tvořeny dlouhými úseky repetitivní DNA, které se skládají z jednoduchých opakovaných sekvencí s obecnou strukturou $(T_xA_yG_z)_n$. Např., v obratlovcích buňkách telomery obsahují tisíce párů bází telomerických TTAGGG repetice, rostliny mají sekvenci TTTAGGG (Meyne et al. 1989; Chan & Blackburn 2002). Telomerická sekvence hmyzu je obecně tvořena repeticí TTAGG, výjimku ale tvoří například *Drosophila melanogaster* (Korandová et al. 2014), u níž jsou telomery tvořeny sérií tří různě se opakujících retrotranspozónů *HeT-A*, *TART* a *TAHRE*.

1.1.1 Kompenzační mechanismy telomer

U většiny organismů, tj. u těch, kteří mají telomery tvořené krátkou opakující se sekvencí, se kompenzace telomerických ztrát děje přidáváním nových telomerických repetit prostřednictvím enzymu telomerázy. Telomeráza je specializovaný eukaryotní ribonukleoproteinový (RNP) komplex, jehož jádro obsahuje reverzní transkriptázu TERT (telomerase reverse transcriptase) a dále molekulu RNA. Tato RNA slouží jako templát pro TERT pro syntézu nových telomerických repetit, které jsou pak připojovány k telomerickým koncům (Blackburn 2005; Hahn 2001). Aktivita telomerázy je závislá na buněčném typu a souvisí s buněčnou proliferací. Obecně je telomeráza vysoce aktivní v raném zárodečném stádiu a v dalším vývoji je její aktivita postupně utlumována, takže u dospělých jedinců bývá aktivní jen v buňkách se stálým proliferačním potenciálem, jako jsou kmenové buňky, zárodečné buňky nebo immortalizované nádorové buňky. Ve většině somatických buněčných typů není enzym aktivní. Nadměrná aktivizace telomerázy v somatických buňkách může být příčinou nekontrolovatelného nádorového bujení (Sharma et al. 1995; Wright et al. 1996; Blackburn 2005; Hahn 2001).

Hlavním mechanismem terminální elongace u drozofily je retrotranspozice (Obr. 1), při níž se k chromosomálním koncům připojují nově utvořené kopie telomerických elementů. Prvním krokem mechanismu je transkripce telomerických elementů. Transkripty opouští jádro a prochází do cytoplazmy, kde dochází k produkci transportního proteinu Gag a u elementů *TART* a *TAHRE* ještě dochází k translaci reverzní transkriptázy, která je potřebná pro závěrečný krok elongace. Protein Gag se váže na transkript elementu a pomáhá jej transportovat zpět do jádra, kde je transkript připojen k chromosomálnímu konci. Na závěr je transkript pomocí reverzní transkriptázy přepsán do molekuly DNA, čím se telomerický konec prodlužuje (Biessmann & Mason 2003; Capkova Frydrychova et al. 2009; George & Pardue 2003; Mason et al. 2008).



Obr. 1: Schéma retrotranspozice. Mechanismus retrotranspozice drozofilích telomerických elementů se skládá z několika po sobě jdoucích kroků. Prvním krokem je transkripce telomerických elementů. Vzniklé transkripty jsou transportovány do cytoplasmy, kde jsou translatovány na Gag protein a reverzní transkriptázu. Gag protein se váže na transkript retroelementů a celý tento komplex je transportován zpět do jádra, kde molekula RNA najde konec chromosomu a váže se na něj. Reverzní transkriptáza převádí RNA do řetězce DNA, a tím se telomerický konec prodlužuje.

1.1.2 Telomerické elementy drozofily

Telomery drozofily jsou tedy tvořeny sérií tří retroelementů *HeT-A*, *TART* a *TAHRE*, které jsou v telomeře zastoupeny v různém počtu a pořadí. Oblast tvořená telomerickými elementy, je označována jako HTT. Z proximálního konce na oblast HTT navazuje subtelomerická oblast TAS (telomere associated sequences), tvořená satelitními sekvencemi DNA, na distální část nasedá speciální multi-proteinový komplex označovaný jako telomerická čepička, což je právě ta komponenta, kterou telomery prokazují svou identitu (Pardue & DeBaryshe 2008; Mason et al. 2008; Capkova Frydrychova et al. 2009).

Nejvíce prostudovaný telomerický element je element *HeT-A*. *HeT-A*, který je vlastnostmi i strukturou mezi LTR a non-LTR retrotranspozónem (Danilevskaya et al. 1997; Biessmann & Mason 2003), je dlouhý asi 6 kb (Pardue et al. 2005) a má jen jeden otevřený čtecí rámec (Capkova Frydrychova et al. 2009), kódující protein GAG. Element *HeT-A* má dlouhou 3'UTR nepravidelnou oligo(A) sekvenci, která element připojuje k chromosomálnímu konci (Danilevskaya et al. 1997). V 3'UTR (tj. 3'netranslatované oblasti) leží promotor elementu *HeT-A*, který řídí transkripci sousedního elementu. Elementy *HeT-A* nejsou tedy transkribovány z vlastních promotorů, ale promotorů sousedních

elementů. *HeT-A* nekóduje vlastní reverzní transkriptázu. Pro reverzní transkripci elementy *HeT-A* využívají reverzní transkriptázu kódovanou z dalších dvou elementů (Abad et al. 2004; Biessmann & Mason 2003; Danilevskaya et al. 1997). Druhým telomerickým retroelementem je retrotranspozón *TART*, který je dlouhý asi 10 kb a má dva otevřené čtecí rámce, kódující reverzní transkriptázu a protein Gag (Pardue et al. 2005; Capkova Frydrychova et al. 2009). Třetím telomerickým retroelementem je *TAHRE* (Telomere-Associated and *HeT-A*-Related Element) (Abad et al. 2004), který stejně jako *TART* kóduje proteiny Gag a Pol (Abad et al. 2004; Capkova Frydrychova et al. 2009).

Transkripční aktivita telomerických elementů, která byla studovaná především u elementu *HeT-A*, je spjata s buněčnou proliferací (Walter & Biessmann 2004; George & Pardue 2003). Je tedy patrná zejména v embryonálním stádiu, v imaginálních discích larev, gonádách larev a stejně tak gonádách dospělců. Transkripční aktivita promotoru *HeT-A* byla rovněž studovaná pomocí transgenního konstruktů *HeTom*, který nese gen pro fluorescenční protein Tomato pod kontrolou promotoru *HeT-A* a je integrován v netelomerické pozici chromosomu 3. Exprese konstruktů, na základě fluorescence exprimovaného proteinu Tomato, vykazala do jisté míry obdobný charakter aktivity, jako ten, který je nalézán u promotoru endogenních elementů *HeT-A*. Exprese Tomato byla znatelná, i když na rozdíl od endogenních *HeT-A* jen s nízkou intenzitou, v některých imaginálních discích, dále byla velmi výrazná v larválních a adultních testes. Významná exprese byla zaznamenávána v průběhu vývoje kukly (Korandová 2014).

1.2 Oxidační stres a jeho vliv na telomerického zkracování

Ačkoliv jsou telomery zkracovány každým dalším buněčným cyklem, a to zcela přirozeně z podstaty samotné replikace, usuzuje se, že mnohem významnější vliv na délku telomer má oxidační stres, tedy především aktivita volných kyslíkových radikálů.

Oxidační stres je charakterizován jako posun buněčného redoxního stavu na více oxidovaný stav (Abdollahi et al. 2004; Ermak & Davies 2002). Je způsoben přetížením přirozené antioxidační obrany nadměrným množstvím reaktivních forem kyslíku (ROS – Reactive Oxygen Species) nebo dusíku (RNS – Reactive Nitrogen Species) (Wiseman & Halliwell 1996; Ermak & Davies 2002). Volné radikály i ROS jsou odvozené ze základního metabolismu kyslíku a dusíku nebo z jiných extracelulárních zdrojů (Wiseman & Halliwell 1996; Abdollahi et al. 2004) a jsou definovány jako atomy nebo molekuly s jedním nebo více nepárových elektronů, proto jsou nestabilní a vysoce reaktivní (Jones 2008; Abdollahi

et al. 2004). Chemická reaktivita volných radikálů může narušovat všechny buněčné makromolekuly, včetně bílkovin, uhlohydrátů, lipidů a nukleových kyselin, a ovlivňovat tak normální fyziologické dráhy či dokonce způsobit buněčnou smrt (Droge 2002; Abdollahi et al. 2004).

Živá buňka je neustále vystavena potenciálně škodlivým radikálům, jejichž původ může být intracelulární nebo extracelulární. Extracelulární jsou oxidanty např. ve formě ionizujícího či UV záření nebo znečištěného životního prostředí. Intracelulární zdroje vyplývají z normálního buněčného metabolismu (Evans et al. 2004; Abdollahi et al. 2004; Ermak & Davies 2002), jako je dýchací řetězec mitochondrií, který je za normálních podmínek považován za vůbec největší zdroj oxidačního stresu, nebo to jsou imunitní reakce k patogenům či detoxikace xenobiotik (Turrens 2003).

ROS můžeme rozdělit do dvou skupin, na radikálové povahy a neradikálové povahy. Reaktivní formy kyslíku (ROS) zahrnují vysoce reaktivní hydroxylové radikály (\bullet OH), superoxidové radikály ($O_2 \bullet^-$), peroxylové ($RO_2\bullet$), alkoxylové ($RO\bullet$) a ne-radikály peroxidu vodíku (H_2O_2), kyselina chlorná (HClO), ozón (O_3), peroxyinitrit ($ONOO^-$), singletový kyslík (O_2). RNS je na tom podobně, zahrnuje radikál oxidu dusnatého ($NO\bullet$), $ONOO^-$, radikál oxidu dusičitého ($NO_2\bullet$) a další oxidy dusíku (Evans et al. 2004; Wiseman & Halliwell 1996).

Existuje řada antioxidačních mechanismů, které v buňkách snižují hladinu volných radikálů. Jednotlivé antioxidanty či antioxidační mechanismy mají specifické aktivity a často pracují synergicky pro zvýšení celkové antioxidační schopnosti organismu. Nejjednodušší antioxidační obrana je formou sloučenin s nízkou molekulovou hmotností, jako jsou např. antioxidanty vitamin C a vitamin E. Vitamíny volné radikály zachycují a poskytnutím elektronu je inaktivují. Procesem sice vznikají radikály vitamínů, nicméně jejich reaktivita je poměrně nízká. Hlavní antioxidační obrana organismu je ovšem založena na činnosti silných antioxidačních enzymů, k nimž především patří Mn a CuZn superoxidáza dismutázy, které mění superoxidový radikál na peroxid vodíku, a kataláza, která rozkládá peroxid vodíku na vodu (Sies 1997; Levy et al. 1999; Abdollahi et al. 2004; Evans et al. 2004).

Ačkoliv je zřejmé, že oxidační stres ovlivňuje celou řadu fyziologických procesů, jeho vliv na genetickou informaci je vnímán jako zcela zásadní. Oxidačním stresem se DNA poškozuje jak ve formě vznikajících jednořetězcových zlomů, a to zejména působením hydroxylového radikálu, tak zejména poškozením bází (Krokan et al. 1997; Sies 1997),

s tím, že každý radikál má na různé báze různou intenzitu účinku. Nejčastěji modifikovanou bází je guanin, jeho nejznámější modifikací je 8-oxo-7,8dihydro2'-deoxyguanosin (8-oxodG), který mimochodem je také nejvíce mutagenní modifikací, způsobující GT transverze a nacházející se často v nádorových buňkách (Loft & Poulsen 1997).

Uvádí se, že oxidační stres je hlavním důvodem telomerického zkracování (Epel et al. 2004; von Zglinicki 2002). Telomery jsou působením volných radikálů zkracovány především díky vznikajícím jednořetězcovým zlomům, jejichž opravy jsou v telomerách prováděny jen s velmi nízkou efektivitou. Jednořetězcové zlomy se v telomerách objevují jak přímým působením volných radikálů, ale také jako intermediáty při reparačních procesech oxidačně modifikovaných bází. A je to především v telomerách bohatě se vyskytujícím guaninem, a tím také jeho modifikací 8-oxodG. 8-oxodG je sice rozpoznán opravným enzymem DNA glykosylázou, která modifikovanou bázi odstraní a vytvoří tím abazické místo, ale nastávající rozštěpení tohoto místa příslušnou endonukleázou vede právě ke vzniku kritického jednořetězcového zlomu. Při následné replikaci DNA, kdy dochází k separaci dvouřetězců DNA na jednořetězcové molekuly, dochází totiž vlivem přítomného zlomu ke ztrátě celého distálního úseku dané molekuly (Houben et al. 2008).

Nadprodukce volných radikálů v organismu má významné patologické důsledky. Především je to urychlené stárnutí, mutageneze, karcinogeneze a s tím přímo či nepřímo související vznik řady civilizačních onemocnění, jako je Alzheimerova choroba, Parkinsonova nemoc, šedý zákal, ateroskleróza, nádorová onemocnění, diabetes, chronické zánětlivé choroby z gastrointestinálního traktu, astma, a mnoho dalších (Abdollahi et al. 2004). Stejně tak se usuzuje, že s urychleným stárnutím a vznikem civilizačních chorob souvisí nastolení předčasné senescence vlivem nedostatečné telomerické délky (Slijepčević 2007; von Zglinicki 2002).

1.3 Vliv oxidačního stresu na telomery drozofily

Vliv oxidačního stresu na telomery je studován především na savcích, kteří nesou telomery tvořené krátkou opakující se sekvencí udržovanou telomerázou, a to s tím, že jsou studovány účinky zejména vysokých dávek oxidačních činidel. V předcházející studii v naší laboratoři byl naopak studován vliv velmi nízkých, subletálních dávek oxidačního činidla na aktivitu telomer drozofily. S využitím parakvatu Szakosová (2015) zkoumala účinky dlouhodobě podávaných subletálních dávek tohoto oxidačního agens na telomery drozofily. Zjistila, že díky optimálně zvolené koncentraci parakvatu byla posilovaná transkripční

aktivita telomerických elementů a byla prodlužována telomerická délka. Efekt jevil podobnost s hormezí, neboli adaptivní odezvou, což je jev, kdy vysoké dávky škodlivých látek jsou pro organismus toxické, ale nízké dávky stresujícího stimulu aktivují adaptivní obranou reakci, zvyšující odolnost buňky či organismu a mohou vyvolat blahodárné účinky (Mattson 2008; Calabrese 2004; Calabrese & Baldwin 2002).

2. Cíle práce

Hlavní náplní práce bylo studium vlivu oxidačního stresu na aktivitu telomerických elementů u drozofily. Práce vycházela z předcházející studie Szakosové (2015), která zjistila, že působením určitých subletálních dávek oxidačního činidla parakvatu dochází ke stimulaci transkripce telomerických elementů a prodloužení telomerické délky drozofily. Mým úkolem bylo identifikovat, jestli působení parakvatu na telomerické elementy je zprostředkováno samotnými telomerami, tedy jestli je dáno ku příkladu chromatinovou strukturou telomer, či naopak je toto působení na telomerách nezávislé a může být pozorováno i v netelomerických pozicích. Plánem bylo využití linie s netelomerickou insercí konstruktů *HeTom*, který pod kontrolou promotoru *HeT-A* nese gen pro fluorescenční protein Tomato. Konkrétními úkoly bylo po působení různých koncentrací parakvatu, srovnat transkripční hladiny konstruktů *HeTom* a endogenního elementu *HeT-A* a dále zjistit, jestli působení parakvatu může ovlivnit vývojový charakter aktivity promotoru *HeT-A*.

3. Materiál a metody

Kmen drozofily

Byla použita linie $y^1w^{67c23}; HeTom$, která nese zabudovaný transgenní konstrukt *HeTom* v pozici 86E na chromosomu 3. Konstrukt *HeTom* a linie nesoucí tento konstrukt byly připraveny v předešlé studii naší laboratoře (Korandová 2014). Exprese transgenu *HeTom* v linii $y^1w^{67c23}; HeTom$ vykazuje obdobný charakter jako ten, který nese aktivita telomerického elementu *HeT-A* (Korandová 2014). Standardně byla linie $y^1w^{67c23}; HeTom$ chovaná na médiu složeného z 163 g kukuřičného šrotu, 33 g sušených kvasnic, 16 g agaru, 200 ml melasy a 2,6 l vody, s přidáním dezinfekčním roztokem (12 g kyseliny benzoové, 2,5 g kyseliny sorbové a 240 ml denaturovaného etylalkoholu). Konstrukt *HeTom* nese v sobě gen pro fluorescenční protein Tomato pod kontrolou promotoru telomerického elementu *HeT-A*. Tomato se používá pro vizualizaci aktivity elementu *HeT-A*. Pro práci byly použité larvy 3. instaru, kukly a dospělí jedinci, chováni v inkubátoru při teplotě 25 °C na instantním médiu pro drozofily (Formula 4-24; Carolina biological supply company) s destilovanou vodou a různými koncentracemi parakvatu ve skleněné vialce.

3.1 Vyvolání oxidačního stresu

Oxidační stres byl vyvoláván herbicidem parakvatem dichloridem (Sigma – Aldrich, kat. číslo 36541), který byl mouchám aplikován na instantní médium pro drozofily (Formula 4-24; Carolina biological supply company). Byly testovány koncentrace 1.6×10^{-7} mM, 1.6×10^{-6} mM, 1.6×10^{-5} mM, 1.6×10^{-4} mM, 1.6×10^{-3} mM, 1.6×10^{-2} mM a 1.6×10^{-1} mM. Parakvat byl podáván v 6 ml destilované vody a 1,35 g instantního média. Kontrolní vzorky byly připraveny bez parakvatu, tzn. v 1,35 g média v 6 ml destilované vody. Do každé vialky bylo dáno 10 samic a 10 samců.

3.2 Izolace celkové RNA a syntéza cDNA

Na izolaci celkové RNA bylo použito 20 larev 3. instaru inkubovaných na médiu s parakvatem. Izolovalo se pomocí komerčního kitu NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel, kat. číslo 740955.50). Postupovalo se přesně podle pokynů v návodu. Následně byla koncentrace RNA stanovena pomocí přístroje Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific).

Vzorky RNA byly převedeny do vzorků cDNA pomocí 1,25 µg 20 µM primeru oligo(dT) a 0,25 µg reverzní transkriptázy SMART MMLV RT (Clontech, kat. číslo 639522). Na reakci bylo použito 0,5 µg celkové RNA. Inkubace při 42°C probíhala 60 minut. Reakce byla zakončena zahřátím na 70°C po dobu 15 minut.

3.3 Real time PCR

Pomocí kvantitativní Real-time PCR jsem vyhodnocovala hladinu transkripce netelomerického konstruktu *HeTom* a telomerického elementu *HeT-A*. Jako referenční gen byl použit gen pro ribozomální protein *RpL 32*. Byly použity primery vyrobené firmou Generi Biotech. Sekvence primerů, velikosti produktů primerů a teploty nasedání primerů byly pro *RpL 32* (forward) 5' - GGACAGTATCTGATGCCCAAC - 3', 58°C, 145bp, *RpL* (reverse) 5' - TTCTCTATGCTATTGTCGCTGTGC - 3', 58 °C, 145 bp. *HeT-A* (forward) 5'- ATTGTCTTCTCCTCCGTCCACC - 3', 58 °C, 150 bp, *HeT-A* (reverse) 5'- TTCTCTATGCTATTGTCGCTGTGC - 3', 58 °C, 150 bp. *Tom 1115* (forward) 5'- GGGCGAGGGCCGCCCC - 3', 58 °C, 102 bp, *Tom1299* (reverse) 5'- CGAAGTTCATCACGCGCTC - 3', 58 °C, 102 bp. Pro kvantitativní Real-time PCR byl využit cycler Light Cycler CFX96 BioRad Real-time PCR systém (Biorad) a 2x SYBR Mix (Top-Bio kat. číslo: P553). Průběh reakcí byl 3 minuty při 95°C, 15 sekund při 94 °C, 30 sekund při 58 °C a 20 sekund při 72 °C, tento cyklus se opakoval 39x. Reakce byly prováděny v duplikátech. Získala jsem ct (cycle threshold) hodnoty, ze kterých jsem výsledné poměry vypočítala ze vztahu $R = \text{Eff}_{\text{Ref}}^{\text{ct}_{\text{Ref}}} / \text{Eff}_{\text{target}}^{\text{ct}_{\text{target}}}$. Eff je účinnost reakce, Ref je referenční gen a target je cílový gen.

Vyhodnocení fluorescenčního signálu

Fluorescence byla hodnocena u larev a testes, které byly z testovaných jedinců vypitvány v kapce fyziologického roztoku Ringer. Fluorescence jednotlivých preparátů byla snímána na fluorescenčním mikroskopu (Olympus SZX12) s filtrem pro červené spektrum a se zabudovaným fotoaparátém Olympus (E600) a dále pomocí počítačového programu (QuickPHOTO CAMERA 3.0). Intenzita fluorescence byla hodnocena na získaných snímcích pomocí programu Adobe Photoshop CS4 (verze 11. 0.2). Fluorescence kukel byla focena každý den vývoje kukel, jak z ventrální, tak i z dorzální strany.

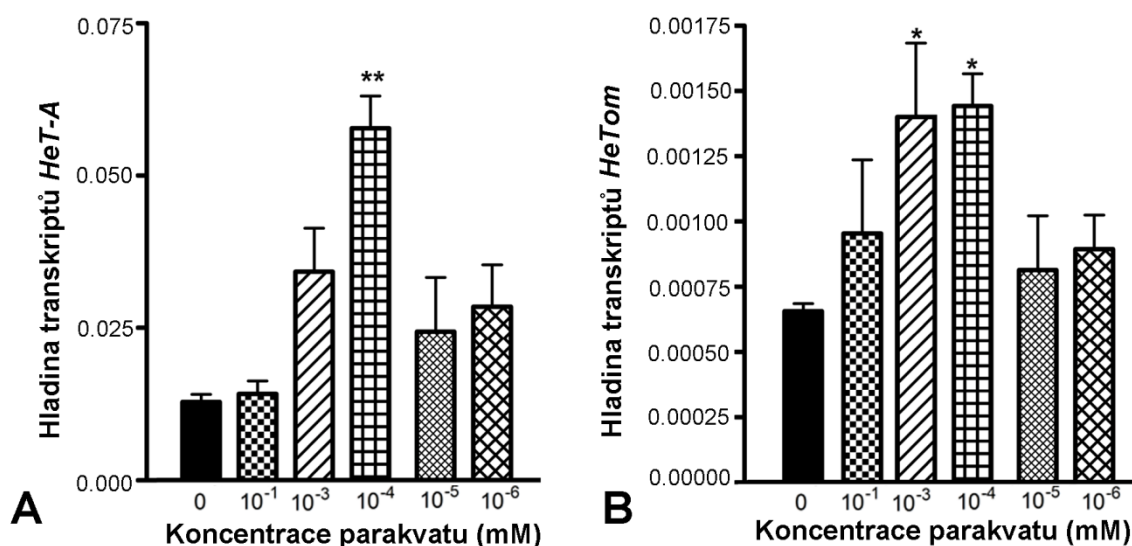
3.4 Statistická analýza

Data byla vyhodnocována metodou jednocestné ANOVY pomocí Dunnettova testu a dvoucestné ANOVY pomocí Bonferroniho testu v programu GraphPad Prism 4. Statisticky zpracované výsledky byly alespoň z deseti opakování.

4. Výsledky

4.1 Transkripce transgenního konstruktů *HeTom* a telomerického elementu *HeT-A* v závislosti na nízkých koncentracích parakvatu

Za účelem zjistit, zda nízké dávky parakvatu mají vliv na promotorovou aktivitu transgenu *HeTom* jsem pomocí kvantitativní Real-time PCR vyhodnocovala hladinu transkriptů netelomerického transgenu *HeTom* souběžně s hladinou transkriptů telomerického elementu *HeT-A*. Zjistila jsem, že po působení testovaných dávek parakvatu se hladina transkriptů oproti kontrole zvyšovala, a to jak u elementu *HeT-A*, tak i transgenu *HeTom*. V obou případech maximální nárůst byl pozorován po aplikaci parakvatu o koncentraci $1,6 \times 10^{-4}$ mM (Obr. 2). Na základě těchto výsledků lze tedy říct, že po působení nízkých dávek parakvatu dochází ke stimulaci transkripční aktivity promotoru *HeT-A* nezávisle na jeho telomerické pozici.

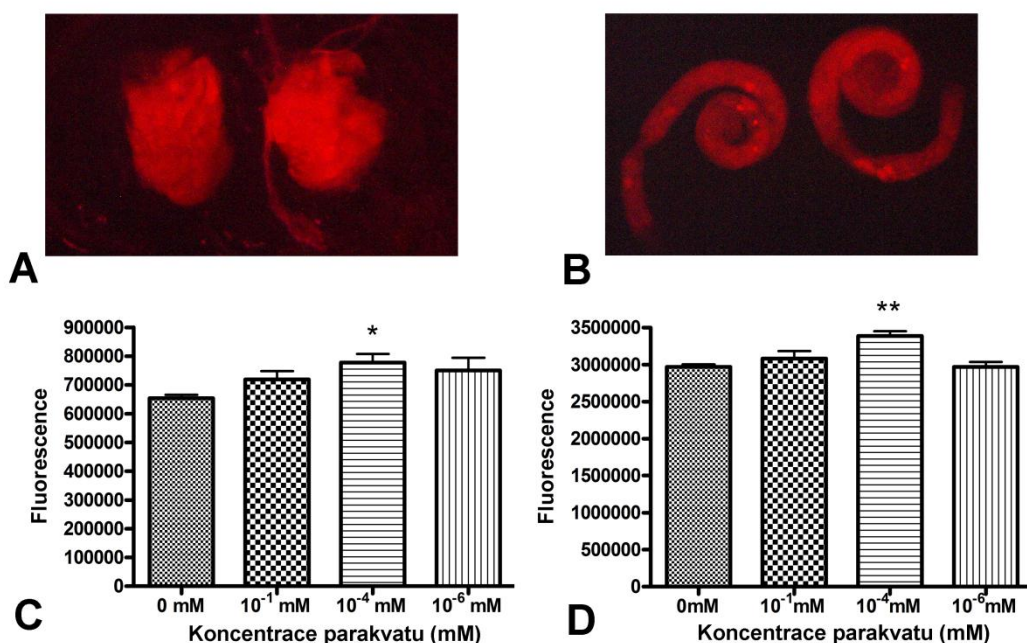


Obr. 2: Hladiny *HeTom* a *HeT-A* transkriptů. Hladina transkriptů byla vyhodnocována kvantitativní Real-time PCR. K nárůstu transkriptů docházelo ve srovnání s kontrolou v závislosti na koncentraci. Data byla zpracována jednocestnou ANOVOU s Bonferroniho posttestem ($P < 0,0001$). Chybové úsečky ukazují směrodatné odchylky. * značí $P < 0,05$, ** značí $P < 0,01$.

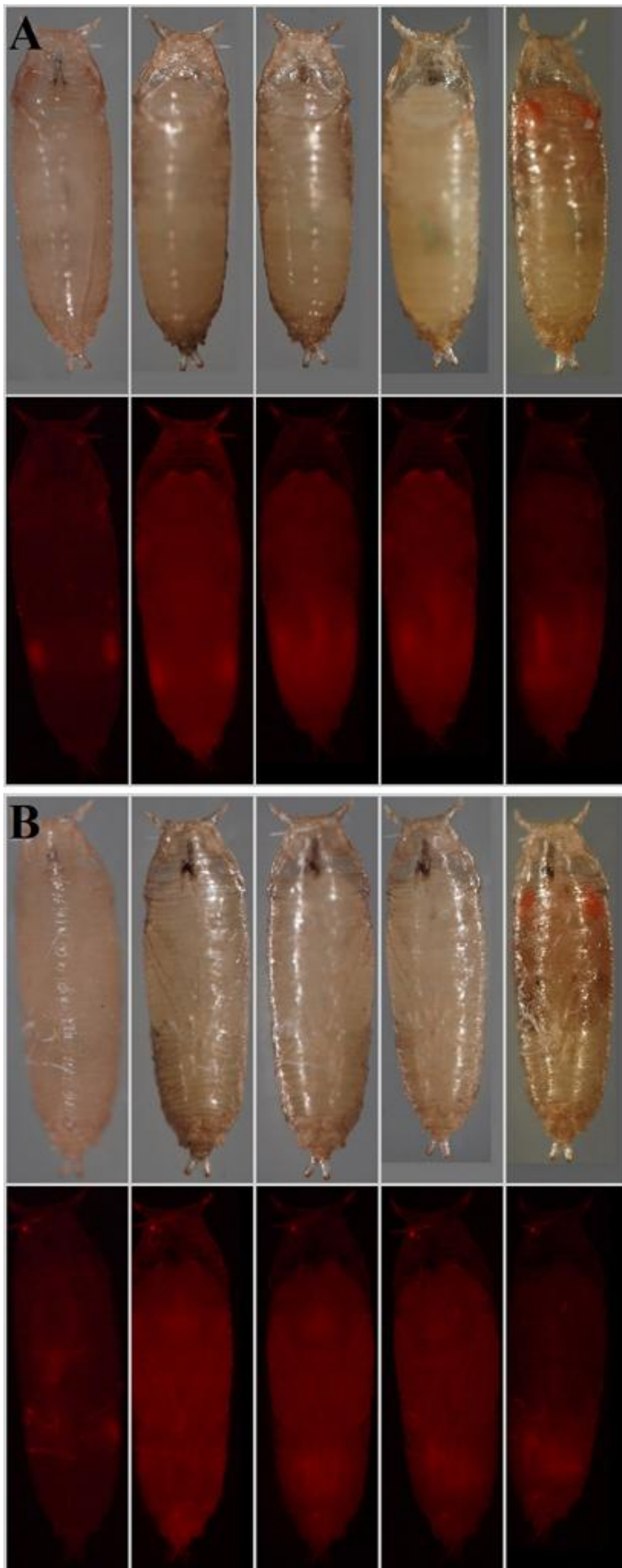
4.2 Analýza in vivo exprese konstruktů *HeTom*

V další části projektu jsem po působení parakvatem vyhodnocovala případné změny v charakteru fluorescence, tj. exprese proteinu Tomato. Vyhodnocování jsem prováděla v průběhu vývoje jedinců, a to ve 3. instaru larválního stádia, kuklách a u dospělců. Exprese byla zaznamenána v mozku a v imaginálních discích. Nicméně, zaznamenaná intenzita

fluorescence byla jen velmi nízká a mezi testovanými skupinami nebyl v intenzitě ani charakteru lokalizace viděn žádný rozdíl. Výrazná exprese byla ovšem pozorovaná u larválních a adultních testes (Obr. 3 A, B). Vyhodnocení intenzity fluorescence v těchto orgánech vykazovalo statisticky významné nárůsty po expozici $1,6 \times 10^{-4}$ mM parakvatu (Obr. 3 C, D). Dále byla vyhodnocována fluorescence v průběhu vývoje kukly (Obr. 4), ovšem porovnání jejího charakteru či intenzity fluorescence nevykázalo mezi testovanými skupinami žádné rozdíly.



Obr. 3: Intenzita fluorescence v larválních a adultních testes. Po působení parakvatu byla vyhodnocena intenzita fluorescence proteinu Tomato ve vypitvaných larválních (A) a adultních (B) testes. Průměrná intenzita fluorescence po vyhodnocení všech larválních testes (C) a adultních testes (D). Získaná data byla statisticky vyhodnocena jednocestnou ANOVOU. Chybové úsečky ukazují směrodatné odchylky. * značí $P < 0.05$, ** značí $P < 0.01$.



Obr. 4: Fluorescence v průběhu vývoje kukly. Na obrázku je příklad fluorescence u kontrolní linie snímané z dorzální strany (A) a z ventrální strany (B).

5. Diskuze

Svou práci jsem navazovala na práci Szakosová (2015), která u drozofily zkoumala vliv oxidačního stresu na délku jejich telomer. Zjistila, že působení mírných, tj. subletálních dávek parakvatu posiluje transkripční aktivitu telomerických elementů a že např. po expozici $1,6 \times 10^{-4}$ mM parakvatu po dobu pěti generací se telomerická délka prodlouží o více než o 1/3. Hlavním cílem mé bakalářské práce bylo porovnání hladiny transkriptu konstruktů *HeTom*, který je integrován v netelomerické pozici chromosomu, a promotoru elementu *HeT-A*, s tím, jestli po působení nízkých dávek parakvatu dochází u obou typů promotoru k obdobným nárůstům jejich aktivity. Výsledky ukázaly, že aktivita konstruktů *HeTom* korelovala s aktivitou promotoru *HeT-A*, a tedy lze spekulovat o tom, že to není chromatinová struktura telomery či telomera samotná, která by striktně udávala odezvu promotoru *HeT-A* k působícímu oxidačnímu stresu, ale že je to spíš samotný promotor *HeT-A*, který takto na parakvat reaguje. To je ostatně i v souladu se zjištěním Szakosové (2015), že stimulační efekt nízkých dávek parakvatu lze pozorovat i v případě netelomerických LTR a non-LTR elementů *Gypsy*, *Jockey* a *I-elementu*.

Aktivita promotoru elementu *HeT-A* v transgenu *HeTom* byla studovaná Korandovou (2014), která sledovala aktivitu tohoto promotoru po celou dobu vývoje drozofily a zjistila, že transkripce koreluje s transkripčními hladinami telomerického elementu *HeT-A*. Stejně tak, jako aktivita telomerázy, tak i aktivita elementu *HeT-A* je spjata s buněčnou proliferací a je tak nacházená především v diploidních buňkách, jako jsou buňky imaginálních disků, mozku larev a gonád dospělců (George & Pardue 2003; Korandová 2014; Walter & Biessmann 2004). Podobně jako Korandová (2014) jsem fluorescenci potvrdila v imaginálních discích a testes. Tzn., promotor *HeTom* ve své aktivitě, navzdory své netelomerické pozici, vykazuje stejnou tkáňovou specifičnost jako promotory telomerických *HeT-A* a stejně tak i odezvu na použité subletální dávky parakvatu.

Délka telomer je dána geneticky, ale stejně tak je i významně ovlivněna faktory životního prostředí. U člověka je četnými studiemi prokázáno, že působení chronických stresových podmínek, jako je oxidační stres, psychosociální stres, špatný zdravotní stav či vůbec špatný životní styl přispívají ke zkracování telomerické délky (Zhu et al. 2011; Epel et al. 2004). To, že v našich studiích pozorujeme u drozofily opačný jev, tj. že se telomery působením chronického oxidačního stresu naopak prodlužují, může být způsobeno nízkými a přitom optimálně zvolenými koncentracemi oxidačního činidla, nebo rozdílnou strukturou

telomer a telomerického kompenzačního mechanismu drozofily. Stimulace aktivity mobilních elementů působením environmentálních stresových podmínek není překvapující a byla navržena již samotnou McClintockovou, objevitelkou mobilních elementů (Mourier et al. 2014). Předpokládá se, že vlivem stresových podmínek se mobilní elementy aktivizují a především integrují do specifických úseků genomu, a to do kódujících či regulačních oblastí konkrétních genů, které díky svému potenciálu mohou hrát roli při adaptaci k dané stresové podmínce. Nejedná se tedy jen o integraci mobilních elementů do náhodných míst genomu (Mourier et al. 2014). Mobilní elementy hrají tedy významnou roli v průběhu evoluce při adaptaci k novým podmínkám, a to, že pozorujeme jejich zvýšený počet na koncích chromosomů, může být jen dalším střípkem z jejich celkového charakteru.

6. Závěr

Tato práce podporuje dřívější závěry naší laboratoře, a to, že dlouhodobé subletální dávky parakvatu zesilují transkripční aktivitu v telomerách drozofily a podporují tak růst telomerické délky. Dále přináší nové zjištění, a to že transkripční aktivita promotoru je posilovaná i v případě promotoru ležícího v netelomerické oblasti. Takže lze říci, že je to promotor elementu *HeT-A*, který takto reaguje na parakvat, nikoli struktura telomery.

7. Použitá literatura

- Abad, J.P. et al., 2004. TAHRE, a novel telomeric retrotransposon from *Drosophila melanogaster*, reveals the origin of *Drosophila* telomeres. *Molecular Biology and Evolution*, pp.1620–1624.
- Abdollahi, M. et al., 2004. Pesticides and oxidative stress: a review. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, pp.RA141–A147.
- Biessmann, H. & Mason, J.M., 2003. Telomerase-independent mechanisms of telomere elongation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, pp.2325–33.
- Blackburn, E.H., 1990. Minireview Telomeres: Structure and Synthesis. *The Journal of biological chemistry*, pp.5919–5921.
- Blackburn, E.H., 1991. Structure and function of telomeres. *Nature*, pp.569–573.
- Blackburn, E.H., 2005. Telomeres and telomerase: Their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *FEBS Letters*, pp.859–862.
- Calabrese, E.J., 2004. Hormesis: From marginalization to mainstream. A case for hormesis as the default dose-response model in risk assessment. *Toxicology and Applied Pharmacology*, pp.125–136.
- Calabrese, E.J. & Baldwin, L.A., 2002. Defining hormesis. *Human & Experimental Toxicology*, pp.91–97.
- Capkova Frydrychova, R. Biessmann, H. & Mason, J.M., 2009. Regulation of telomere length in *Drosophila*. *Cytogenetic and Genome Research*, pp.356–364.
- Danilevskaya, O.N. et al., 1997. Promoting in tandem: the promoter for telomere transposon HeT-A and implications for the evolution of retroviral LTRs. *Cell*, pp.647–55.
- Deng, W. et al., 2004. Distinct profiles of critically short telomeres are a key determinant of different chromosome aberrations in immortalized human cells: whole-genome evidence from multiple cell lines. *Oncogene*, pp.9090–9101.
- Denchi, E.L., 2009. Give me a break: how telomeres suppress the DNA damage response. *DNA repair*, pp.1118–26.
- Droge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, pp.47–95.

- Epel, E.S. et al., 2004. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, pp.17312–5.
- Ermak, G. & Davies, K.J., 2002. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Mol Immunol*, pp.713–721.
- Evans, M.D. Dizdaroglu, M. & Cooke, M.S., 2004. *Oxidative DNA damage and disease: Induction, repair and significance*, pp. 1-61.
- George, J. a. & Pardue, M.L., 2003. The promoter of the heterochromatic *Drosophila* telomeric retrotransposon, HeT-A, is active when moved into euchromatic locations. *Genetics*, pp.625–635.
- Hahn, W.C., 2001. Telomerase and cancer: Where and when? *Clinical Cancer Research*, pp.2953–2954.
- Hayflick, L. & Moorhead, P., 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, pp.585–621.
- Houben, J.M.J. et al., 2008. Telomere length assessment: Biomarker of chronic oxidative stress? *Free Radical Biology and Medicine*, pp.235–246.
- Chan, S.W. & Blackburn, E.H., 2002. New ways not to make ends meet : telomerase , DNA damage proteins and heterochromatin. *Oncogene*, pp.553–63.
- Jones, D.P., 2008. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol*, pp.C849–68.
- Korandová, M., 2014. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Přírodovědecká fakulta Transkripční aktivita telomerického elementu HeT-A u *Drosophila melanogaster*.
- Korandová, M. et al., 2014. Distribution of TTAGG-specific telomerase activity in insects. *Chromosome Research*, pp.495–503.
- Krokan, H.E. Standal, R. & Slupphaug, G., 1997. DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochemical Journal*, pp.1–16.
- Levy, R.D. et al., 1999. Glutathione-linked enzymes in benign and malignant oesophageal tissue. *British journal of cancer*, pp.32–37.
- Loft, S. & Poulsen, H., 1997. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *Journal of Molecular Medicine*, pp.297–312.

- Mason, J.M. Frydrychova, R.C. & Biessmann, H., 2008. *Drosophila* telomeres: an exception providing new insights. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, pp.25–37.
- Mattson, M.P., 2008. Hormesis defined. *Ageing Research Reviews*, pp.1–7.
- Meyne, J. Ratliff, R. I & Moyzis, R.K., 1989. Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, pp.7049–53.
- Mourier, T. et al., 2014. Transposable elements in cancer as a by-product of stress-induced evolvability. *Frontiers in Genetics*, pp.1–8.
- Pardue, M.L. et al., 2005. Two retrotransposons maintain telomeres in *Drosophila*. *Chromosome Research*, pp.443–453.
- Pardue, M.L. & DeBaryshe, P.G., 2008. *Drosophila* telomeres: A variation on the telomerase theme. *Fly (Austin)*, pp.101–110.
- Sharma, H.W. et al., 1995. Differentiation of immortal cells inhibits telomerase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, pp.12343–12346.
- Sies, H., 1997. Physiological Society Symposium : Impaired Endothelial and Smooth Muscle Cell Function in Oxidative Stress Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. *Experimental Physiology*, pp. 291-295
- Slijepčević, P., 2007. Telomeres and human disease. *Acta Medica Academica*.
- Szakosová, K., 2015. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Přírodovědecká fakulta Vliv oxidativního stresu na telomerickou délku u *Drosophila melanogaster*.
- Turrens, J.F., 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology*, pp.335–44.
- Walter, M.F. & Biessmann, H., 2004. Expression of the telomeric retrotransposon HeT-A in *Drosophila melanogaster* is correlated with cell proliferation. *Development genes and evolution*, pp.211–9.
- Wiseman, H. & Halliwell, B., 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *The Biochemical journal*, pp.17–29.

- 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*, pp.173–179.
- von Zglinicki, T., 2002. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends in biochemical sciences*, pp.339–44.
- Zhu, H. Belcher, M. & van der Harst, P., 2011. Healthy aging and disease: role for telomere biology? *Clinical science (London, England : 1979)*, pp.427–40.

8. Příloha

8.1 Izolace RNA

K izolaci RNA byl použit kit NucleoSpin RNA od firmy Macherey-Nagel. Vzorek se nejdříve musel tloučkem zhomogenizovat. Ke zhomogenizovanému se přidalo 350 μ l pufru RA1 a 3,5 μ l β -merkaptoethanolu. Abychom se zbavili pevných částec a nečistot použijeme růžové mikrozkušavky s filtrem, které jsou v balení a centrifugujeme 7 minut při 11 000 otáčkách za minutu. Čistý supernatant přeneseme do 1,5 ml mikroodstředivé zkumavky, přidáme 350 μ l 100% ethanolu a roztok důkladně zvertexujeme, ale necentrifugujeme. Následně do 2 ml sběrné zkumavky vložíme hibind RNA mini kolonku a do kolonky přeneseme 700 μ l vzorku. Centrifugujeme 1 minutu při 10 000 otáčkách za minutu. Do hibind RNA mini kolonky přidáme 250 μ l RNA Wash Buffer I a centrifugujeme 1 minutu opět při 10 000 otáčkách za minutu. Filtrát vyhodíme a sběrnou zkumavky znovu použijeme. Mezitím si připravíme směs DNázy. Do sterilní mikrozkušavky napipetujeme na každou reakci 10 μ l DNázy a 70 μ l reakčního pufru RDD. Jemně promícháme převrácením mikrozkušavky. Ke každému vzorku přidáme 80 μ l této směsi tak, aby se namočil filtr a necháme 15 minut při pokojové teplotě. Následuje promývání membrány, kdy na filtr přidáme 250 μ l RNA Wash Buffer I. Necháme 2 minuty při pokojové teplotě a centrifugujeme 1 minutu při 10 000 otáčkách za minutu. Filtrát vylijeme a sběrnou zkumavku opět použijeme. Přidáme 500 μ l RNA Wash Buffer II a znovu centrifugujeme 1 minutu při stejných otáčkách. Filtrát opět vylijeme. Opět přidáme 500 μ l RNA Wash Buffer I, znovu centrifugujeme 1 minutu při stejných otáčkách a filtrát opět vylijeme. Dále centrifugujeme 2 minuty při 11 000 otáčkách za minutu pro vysušení membrány. Kolonku umístíme do nové 1,5 ml odstředivé mikrozkušavky a přidáme 40-70 μ l DEPC vody. Necháme 1 minutu při pokojové teplotě a centrifugujeme 2 minuty při 11 000 otáčkách za minutu. Vyizolovanou RNA dáme do mrazáku (-70°C).

8.2 Smart MMLV Reverzní Transkriptáza

Na syntézu cDNA byl použit kit od firmy Clontech. K 0,5 μ l vyizolované RNA přidáme 1,25 μ l 20 μ M primeru oligo dT a RNase-free vodu do celkového objemu 5,75 μ l. Směs zahříváme 3 minuty na 70°C. Poté vzorek okamžitě dáme na led. Vzorek krátce centrifugujeme a přidáme k němu 2 μ l 5x First-Strand Buffer, 1 μ l dNTP mixu a 1 μ l 100 mM DTT. Promícháme pipetou pipetováním nahoru a dolů. Přidáme 0,25 μ l SMART

MMLV RT a znovu promícháme. Inkubujeme při 42 °C po dobu 60 minut. Reakci ukončíme zahřátím na 70 °C po dobu 15 minut nebo přidáním 2 μ l 60 mM EDTA.