

# **STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST**

**Obor č.4: Biologie**

## **Vliv kademnatých solí na aktivitu rostlinné telomerázy**

**Anna Jurtíková**

**Jihomoravský kraj**

**Brno 2020**

# STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č.4: Biologie

## Vliv kadmennatých solí na aktivitu rostlinné telomerázy

## The influence of cadmium salts on plant telomerase activity

**Autor:** Anna Jurtíková

**Škola:** Gymnázium Brno, Křenová, příspěvková organizace,  
Křenová 36, 602 00 Brno

**Kraj:** Jihomoravský

**Konzultanti:** doc. Mgr. Miloslava Fojtová, CSc., Mgr. Martin Lyčka

Brno 2020

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Brně dne .....

Podpis: .....

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat svým konzultantům doc. Mgr. Miloslavě Fojtové, CSc. a Mgr. Martinu Lyčkovi za jejich trpělivost, ochotu a vstřícnost při vedení mé práce a pomoc při vypracování praktické části.

## ANOTACE

Tato práce se zabývá vlivem dvou kadmnatých solí ( $\text{CdCl}_2$  a  $\text{CdSO}_4$ ) na aktivitu telomerázy, enzymu zodpovědného za prodlužování telomer. Telomery jsou koncové části lineárních eukaryotických chromozomů skládající se z opakujících se sekvencí nukleotidů. K výzkumu byla použita modelová rostlina *Arabidopsis thaliana*. Kadmnaté soli se do média při klíčení semen přidávaly ve dvou výsledných koncentracích: 4  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$ . Analýza aktivity telomerázy byla provedena pomocí metod TRAP (telomerase repeat amplification protocol) a qTRAP (quantitative telomerase repeat amplification protocol). Bylo zjištěno, že ve čtyřdenních klíčnicích rostlinách je aktivita telomerázy významně ovlivněna pouze přidavkem  $\text{CdSO}_4$  při koncentraci 4  $\mu\text{M}$  i 50  $\mu\text{M}$ , zatímco u sedmidenních klíčnicích rostlin došlo ke změnám aktivity telomerázy přidavkem  $\text{CdSO}_4$  i  $\text{CdCl}_2$  v obou testovaných koncentracích. Dále bylo prokázáno, že kadmnaté soli neovlivňují aktivitu rostlinné telomerázy, pokud jsou přidány *in vitro* přímo do reakční směsi. Z analýzy morfologických změn klíčnicích rostlin vyplývá, že kadmnaté soli mají vliv na délku kořene a žloutnutí listů *A. thaliana*. Výzkum probíhal v laboratořích výzkumného střediska CEITEC (Středoevropský technologický institut) Masarykovy univerzity v Brně.

**Klíčová slova:** telomery, telomeráza, TRAP, qTRAP, *Arabidopsis thaliana*, kadmnaté soli, klíčnicí rostliny

## ANNOTATION

This work deals with the influence of two cadmium salts ( $\text{CdCl}_2$  and  $\text{CdSO}_4$ ) on activity of telomerase, an enzyme responsible for the lengthening of telomeres. Telomeres are regions at the ends of linear eukaryotic chromosomes consisting from short repetitive sequences. In this research, *Arabidopsis thaliana* was used as a model plant. Cadmium salts were added into cultivation media in two final concentrations: 4  $\mu\text{M}$  and 50  $\mu\text{M}$ . Analysis of telomerase activity was performed using TRAP (telomerase repeat amplification protocol) and qTRAP (quantitative telomerase repeat amplification protocol) methods. It was discovered that activity of telomerase was significantly affected by 4  $\mu\text{M}$  i 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdSO}_4$  in 4 days old seedlings. In 7 days old seedlings, activity of telomerase was affected by  $\text{CdSO}_4$  and  $\text{CdCl}_2$  in both tested concentrations. Furthermore, it was shown that addition of cadmium salts into the TRAP reaction mixture did not affect telomerase activity. Analysis of morphological changes of seedlings showed, that cadmium salts influenced negatively the length of roots and caused yellowing of cotyledons. The research was realized in laboratories of the CEITEC (Central European Institute of Technology) Masaryk University Brno.

**Keywords:** telomeres, telomerase, TRAP, qTRAP, *Arabidopsis thaliana*, cadmium salts, seedlings

# OBSAH

1	Úvod.....	8
2	Teoretická část .....	9
2.1	Kadmium .....	9
2.1.1	Výskyt kadmia .....	9
2.1.2	Toxické účinky kadmia.....	9
2.2	Telomery.....	10
2.3	Telomeráza .....	10
3	Materiál a metody .....	12
3.1	Materiál.....	12
3.1.1	Rostlinný materiál.....	12
3.1.2	Roztoky a chemikálie.....	12
3.1.3	Primery.....	13
3.1.4	Enzymy .....	13
3.1.5	Použité přístroje .....	13
3.2	Metody.....	13
3.2.1	Výsev semen Arabidopsis thaliana .....	13
3.2.2	Kultivace a sběr klíčnicích rostlin .....	14
3.2.3	Izolace telomerázového extraktu .....	14
3.2.4	Měření koncentrace proteinů .....	15
3.2.5	TRAP .....	15
3.2.6	Kvantitativní TRAP (qTRAP) .....	17
4	Výsledky .....	19
4.1	Morfologické změny klíčnicích rostlin pěstovaných v přítomnosti solí kadmia.....	19
4.2	Analýza aktivity telomerázy pomocí metody TRAP.....	19
4.3	Analýza aktivity telomerázy pomocí metody qTRAP.....	22
5	Diskuse.....	26
6	Závěr .....	29
7	Použité zkratky.....	30
8	Seznam použité literatury.....	32
9	Seznam obrázků, tabulek a grafů .....	33
9.1	Obrázky.....	33
9.2	Tabulky .....	34
9.3	Grafy .....	34

# 1 ÚVOD

Kadmium je nebezpečným průmyslovým polutantem a jeho sloučeniny nacházíme v atmosféře, půdním systému i vodě. Kadmium ovlivňuje klíčové metabolické procesy v živočišných i rostlinných buňkách, což je způsobeno i jeho vlivem na funkci mnoha enzymů. Jedním z enzymů, na něž by mohlo mít kadmium vliv, je telomeráza, což je enzym zodpovědný za prodlužování telomer, které se nacházejí na koncích chromozomů.

Cílem této práce bylo analyzovat vliv kademnatých solí –  $\text{CdCl}_2$  a  $\text{CdSO}_4$  – na aktivitu rostlinné telomerázy. Pro výzkum byla zvolena modelová rostlina *Arabidopsis thaliana*, česky *huseniček rolní*, která se vyskytuje téměř v celé Evropě, Asii, ale i v Austrálii, Severní Americe, v Africe a v Jižní Americe. Kademnaté soli byly přidány přímo do média, na kterém byly kultivovány klíčící rostliny, v koncentraci  $4 \mu\text{M}$  a  $50 \mu\text{M}$ , nebo přímo do reakce, v níž byla stanovována aktivita telomerázy ve výsledných koncentracích  $1 \text{ pM}$ ,  $1 \text{ nM}$  a  $100 \text{ nM}$ .

V první řadě byla provedena analýza aktivity telomerázy v sedmidenních klíčících rostlinách, které byly kultivovány na kontrolním médiu, a kademnaté soli byly přidány *in vitro* do reakční směsi. Další analýzy byly zaměřeny na účinky kadmia *in vivo*. Pro tyto analýzy byly kultivovány dvě série klíčících rostlin *A. thaliana*. V první sérii byla semena klíčena na médiu s obsahem  $50 \mu\text{M}$   $\text{CdSO}_4$  a  $50 \mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ . U druhé série byla koncentrace obou kademnatých solí snížena na  $4 \mu\text{M}$ . U obou sérií byly na analýzy odebírány čtyřdenní a sedmidenní klíčící rostliny. Kromě prvního experimentu, kde byla na analýzu použita pouze metoda TRAP, se zjišťovala aktivita enzymu vždy pomocí metody TRAP i qTRAP. Dále bylo analyzováno, zda má přítomnost kademnatých solí v kultivačním médiu vliv na fenotyp klíčících rostlin.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Kadmium

Kadmium je modrobílý kov s výraznou měkkostí a snadnou tavitelností, který řadíme společně se zinkem a rtuť do 12. skupiny periodické soustavy prvků. V přírodě se vyskytuje pouze ve sloučeninách s jinými prvky. Jedná se o toxický kov znečišťující životní prostředí, který se prostřednictvím půdního systému a transportu do rostlinných pletiv může stát nebezpečným pro lidské tělo. Tento kov patří mezi nebezpečné průmyslové polutanty, protože ovlivňuje životně důležité funkce živočišných i rostlinných buněk (přehledně v Hoseini a Zargari, 2013).

#### 2.1.1 Výskyt kadmia

Kadmium se kromě zemské kůry, kde se jeho koncentrace pohybuje mezi  $0,1 - 0,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , vyskytuje také v mořské vodě ( $\sim 0,1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ), jejích sedimentech ( $\sim 1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) nebo v atmosféře ( $0,1 - 5,0 \text{ ng}\cdot\text{m}^{-3}$ ) (shrnuto v Lyčka, 2016). Nejčastěji se kadmium do ovzduší dostává skrze průmyslové znečištění. Ve vodě se s kadmiem často setkáváme v usazeninách (přehledně v Ismael a kol., 2019). Mezi významné zdroje znečištění mořské vody kadmiem patří atmosférické nánosy a průmyslové znečištění. V případě půdního systému se považuje koncentrace kadmia mezi  $0,04 - 0,32 \text{ mM}$  jako neznečištěná půda a půda obsahující kadmium nad  $0,32 \text{ mM}$  je klasifikována jako znečištěná (přehledně v Hoseini a Zargari, 2013).

V lidském těle se 50-70 % přijatého kadmia absorbuje ve dvou orgánech – ledvinách a játrech. Kadmium a jeho sloučeniny se rovněž řadí mezi karcinogenní látky. Jeho vdechování ve větším množství může vést k poškození plic. V této souvislosti je třeba zmínit vysokou kapacitu rostliny *Nicotiana tabacum* (tabák viržinský) přijímat kadmium ze znečištěné půdy. To je důvodem, proč patří kuřáci ke skupině ohrožené intoxikací tímto kovem. Hmotnost kadmia, kterou člověk přijímá během vykouření jedné cigarety, se odhaduje na  $0,2 - 1,0 \mu\text{g}$  (přehledně v Ismael a kol., 2019).

#### 2.1.2 Toxické účinky kadmia

Kadmium je považováno za genotoxický kov, který negativně ovlivňuje růst a vývoj rostlin. Do rostlin se nejčastěji dostává, stejně jako většina těžkých kovů, pomocí kořenového systému (přehledně v Hoseini a Zargari, 2013). K výrazným fyziologickým změnám v důsledku vystavení účinkům kadmia patří změny v metabolismu dusíku, fotosyntéze a v příjmu vody a biogenních prvků jako jsou Ca, Mg, Zn, Fe, Mn. Mezi často uváděné morfologické změny patří růstová retardace, nekróza a chloróza listů, hnědnutí kořenových špiček a snížení hmotnosti a počtu nodulů (shrnuto v Lyčka, 2016). Na úrovni rostlinné buňky vyvolává kadmium řadu změn včetně chromozomových aberací, snížení mitotických ukazatelů v kořenových buňkách a změny v organizaci jádra. V případě živočišné buňky zvyšuje

kadmium citlivost DNA na působení UV záření a rovněž zasahuje do procesu oprav DNA a aktivity detoxikačních enzymů (shrnuto ve Fojtová a kol., 2002).

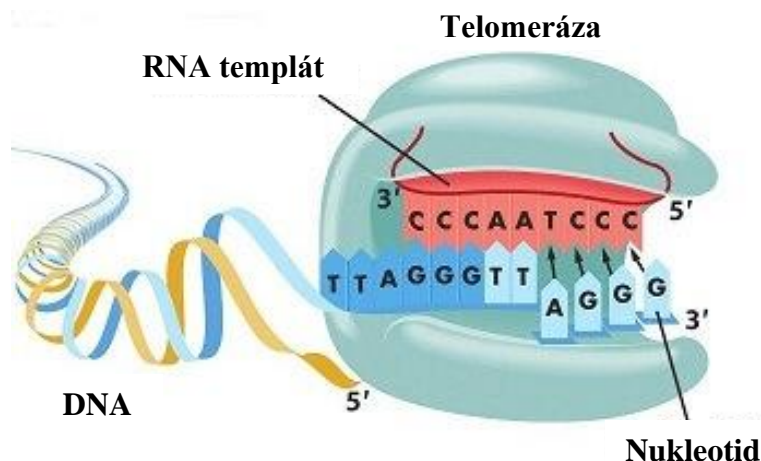
## 2.2 Telomery

Telomery jsou nukleoproteinové struktury na koncích eukaryotických chromozomů tvořené několikanásobně se opakující (repetitivní) krátkou nukleotidovou sekvencí. Tato sekvence se liší podle toho, zda se jedná o živočišné nebo rostlinné telomery. U obratlovců byla jako telomerová repetice detekována sekvence 5'-TTAGGG-3' a u většiny rostlin, včetně modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*, jsou telomery tvořeny repeticí 5'-TTTAGGG-3'. U některých rostlin, např. zástupců čeledi česnekovitých nebo řádu chřestotvarých, byly nalezeny telomery s odlišnou (alternativní) sekvencí. S variabilitou telomer se setkáváme i v případě jejich délky. Například rostlina *A. thaliana* má délku telomer v rozpětí 2-9 kb v závislosti na ekotypu, délky telomer *N. tabacum* se pohybují mezi 20-160 kb (shrnuto v Lyčka, 2016).

Telomery mají tři základní funkce. Brání deoxyribonukleázám, aby odbourávaly konce lineárních molekul DNA, zabraňují fúzi konců chromozomů a usnadňují replikaci konců chromozomů (přehledně v Snustad a kol., 2017). Při každém buněčném cyklu dochází ke zkracování telomer kvůli neschopnosti replikačního aparátu dosyntetizovat opožděující se vlákno DNA. Příčinou je fakt, že DNA polymeráza je schopna syntetizovat vlákna DNA pouze ve směru 5'→3'. Tento problém na opožděujícím se řetězci řeší Okazakiho fragmenty. Po odbourání posledního Okazakiho fragmentu však nejsou enzymy schopny DNA dosyntetizovat. Dochází tedy k tzv. replikativnímu zkracování telomer a po určitém počtu buněčných dělení se telomery zkrátí natolik, že buňka není schopna dalšího dělení a přejde do apoptózy.

## 2.3 Telomeráza

Telomeráza je specifický nukleoproteinový enzymový komplex zajišťující stabilitu telomer. Skládá se ze dvou podjednotek (Obr. 1): podjednotky TERT (telomerase reverse transcriptase), což je proteinová podjednotka s aktivitou reverzní transkriptázy katalyzující vlastní prodlužování telomer, a TER (telomerase RNA), která slouží jako templát pro TERT. Telomerázový komplex doplňují další pomocné komponenty, jež jsou potřebné pro jeho funkci *in vivo* (přehledně v Schrupfová a kol., 2019).



Obr. 1: Schéma komplexu telomerázy nasedajícího na DNA (převzato z <http://www.longlonglife.org/fr/transhumanisme-longevite/vieillessement/telomeres-et-vieillessement/linfluence-de-la-telomerase-sur-les-telomeres-et-le-vieillessement/>).

Primární funkcí telomerázy je přidávat telomerové repetice na konce lineárních chromozomů za účelem prodloužení telomer. Telomeráza však může mít i netelomerové funkce. Jedná se např. o spojování či prodlužování netelomerové DNA pomocí přidávání telomerových repetice *de novo* v procesu tzv. „chromosome healing“ (přehledně v Sýkorová a Fajkus, 2009).

Aktivita telomerázy je během vývoje živočichů i rostlin striktně regulovaná a omezená na buňky s vysokou dělicí kapacitou. U živočichů je aktivní telomeráza například v rakovinových buňkách. Bylo prokázáno, že aktivní telomeráza přispívá k neomezenému dělicímu potenciálu rakovinových buněk (přehledně v Shay, 2016). Dále nacházíme aktivní telomerázu v živočišných embryonálních buňkách. Největší aktivitu telomerázy pozorujeme v době, kdy se embryo nachází ve stádiích moruly a blastuly. Od těchto etap vývoje embrya se aktivita telomerázy snižuje. Po ukončení embryonálního období a organogeneze se aktivní telomeráza nachází pouze ve kmenových buňkách a jen výjimečně v somatických buňkách (např. T-lymfocytech) (přehledně v Schrupfová a kol., 2019).

U rostlin, stejně jako u živočichů, zodpovídá telomeráza za prodlužování telomer. Aktivní telomeráza byla detekována ve vysoce se dělicích buňkách meristematických pletiv, které se nacházejí v klíčcích rostlinách, kořenových špičkách, mladých listech, květech a pupenech. V diferencovaných rostlinných orgánech – např. kořeni nebo zralých listech – je telomerázová aktivita potlačena (přehledně v Schrupfová a kol., 2019).

## 3 MATERIÁL A METODY

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Rostlinný materiál

Byla použita modelová rostlina *Arabidopsis thaliana* ekotypu Columbia, která byla kultivována na agarových plotnách s MS médiem případně doplněném solemi kadmia. Pro analýzy aktivity telomerázy byly sbírány čtyřdenní a sedmidenní klíčící rostliny.

#### 3.1.2 Roztoky a chemikálie

- MS médium Murashige-Skoog médium, firma Duchefa Biochemie
- Rostlinný (plant) agar firma Duchefa Biochemie
- CdCl<sub>2</sub> firma Sigma-Aldrich
- CdSO<sub>4</sub> firma Sigma-Aldrich
- TWEEN 20 firma Sigma-Aldrich
- SAVO
- Pufr W 50 mM Tris-acetát, pH 7,5; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 mM glutamát draselný; 20 mM EGTA , pH 8,0; 1,5% polyvinylpyrrolidon; 10% glycerol; 2 mM dithiotreitol; 0,2 mM fenylmethansulfonyl fluorid; 1,2 mM vanadylribonukleosidový komplex; 4 µg·ml<sup>-1</sup> leupeptin; 2 µg·ml<sup>-1</sup> pepstatin A
- Bradfordové činidlo firma Sigma
- TRAP pufr 50 mM Tris-acetát, pH 8,3; 50 mM glutamát draselný ; 0,1% Triton X-100; 1 mM spermidin; 1 mM dithiotreitol; 50 µM dNTP (směs dATP, dCTP, dTTP, dGTP; výsledná koncentrace každého 50 µM); 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM EGTA, pH 8,0; 100 ng·µl<sup>-1</sup> BSA (hovězí sérový albumin)
- DMSO firma Sigma-Aldrich
- PEG 8000 Firma Sigma-Aldrich
- Nanášecí pufr 6×LB 0,1% bromofenolová modř; 0,1% xylen cyanol FF; 60% glycerol; 60 mM EDTA
- persíran amonný firma Sigma-Aldrich
- TEMED firma Sigma-Aldrich
- 40% AA (akrylamid):BIS firma Serva (metylen bisakrylaamid), 19:1
- Pufr 5×TBE 450 mM Tris-borát; 10 mM EDTA, pH 8,3
- GelStar firma Lonza

- FastStart SYBR Green Master      firma Roche

### 3.1.3 Primery

- TS21 5' – GAC AAT CCG TCG AGC AGA GTT – 3'
- TelPr 5' – CCG AAT TCA ACC CTA AAA CCC TAA ACC CTA AAC CCC – 3'

### 3.1.4 Enzymy

- DyNAzyme II DNA polymeráza, 2 U· $\mu$ l, firma Thermo Fisher Scientific

### 3.1.5 Použité přístroje

- Spektrofotometr DU 730      firma Beckman Coulter
- Centrifuga 5804 R              firma Eppendorf
- Cykler C1000                    firma Bio-rad
- Fotoaparát DMC-FZ45         firma Panasonic
- Homogenizační přístroj        firma Silamat
- Vortex                              firma IKA
- zdroj napětí                      firma Consort
- Detekční systém Fusion Fx    firma Vilber Lourmat
- Sterilní box Biohazard         firma Trigon-plus
- Skla na elektroforézu         firma Hoefler
- Vana na elektroforézu         firma Pharmacia Biotech
- Cykler na qPCR                 firma Qiagen  
RotorGene6000

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Výsev semen *Arabidopsis thaliana*

Semena byla vyseta na MS médium zředěné 1:1 destilovanou vodou s 0,8% rostlinným agarem. Do média byly případně přidány kadmnaté soli  $\text{CdCl}_2$  či  $\text{CdSO}_4$  do výsledné koncentrace 4  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$ . Médium bylo sterilizováno v Papinově hrnci po dobu 20 minut a nalito na Petriho misky o průměru 8,5 cm. Nalévání MS média a vysévání semen bylo provedeno ve sterilním prostředí boxu Biohazard, který byl před použitím vysvícen UV zářením.

Semena *A. thaliana* byla před vysetím sterilizována v 75% ethanolu po dobu 5 minut a následně 2 minuty v 96% ethanolu. Semena se poté nechala vyschnout na filtračním papíru. Po vysetí semen se Petriho misky kvůli zabránění případné kontaminace oblepily izolační páskou

Spofapor 731. Pro každý experiment (kontrolní médium, médium s CdCl<sub>2</sub>, médium s CdSO<sub>4</sub>) byly připraveny 4 misky.

### 3.2.2 Kultivace a sběr klíčnicích rostlin

Misky s vysetými semeny *A. thaliana* byly umístěny do chladové komory o teplotě 4 °C pro napodobení podmínek vernalizace. Po uplynutí dvou dnů se misky přenesly do kultivační banky (fytotronu), kde semena následně klíčila při podmínkách krátkého dne: 8 hod. světlo (intenzita osvitu 100 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>), 21 °C; 16 hod. tma, 19 °C. Odběry klíčnicích rostlin se prováděly po čtyřech a sedmi dnech od jejich přesunu do fytostronu.

Odběry klíčnicích rostlin se prováděly ve sterilním boxu do 1,5 ml mikrozkuvek se zámečkem, do kterých se před sběrem umístilo 5–10 skleněných sterilních homogenizačních kuliček. Odebíralo se přibližně 50–70 mg klíčnicích rostlin z každé misky. Odběry se prováděly pinzetou, která byla před každým odběrem sterilizována v 96% ethanolu a následně ožehuta plamenem plynového kahanu.

Odebrané vzorky se ihned přenesly do tekutého dusíku a následně byly uchovávány v hlubokomrazícím boxu při teplotě -70 °C.

Pro porovnání fenotypu klíčnicích rostlin klíčnicích na kontrolním médiu a v přítomnosti kademnatých solí se sterilní semena vysévala pomocí sterilních párátek do řad. Klíčnicí rostliny se fotografovaly po 4 a 7 dnech klíčení.

### 3.2.3 Izolace telomerázového extraktu

Izolace telomerázového extraktu byla provedena dle níže uvedeného protokolu s dodržением maximální sterility, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku.

1. 50–70 mg klíčnicích rostlin bylo homogenizováno 6×7 vteřin v mikrozkuvce se sterilními skleněnými kuličkami. Mezi jednotlivými cykly homogenizace byly vzorky chlazeny v tekutém dusíku.
2. Bylo přidáno 200 μl pufru W, směs promíchána vortexem a přenesena do nové 1,5 ml mikrozkuvky, aby byly odstraněny homogenizační kuličky.
3. Vzorky byly centrifugovány ve vychlazené centrifuze při 4 °C a 20 000 g po dobu 15 minut.
4. Supernatant (tekutina nad sedimentem) byl odebrán do 1,5 ml mikrozkuvky a následně byl přidán 1 objem 20% PEG 8000.
5. Vzorky byly promíchány na vortexu a inkubovány na rotačním zařízení při teplotě 4 °C po dobu 30 minut.

6. Vzorky byly centrifugovány ve vychlazené centrifuze při 4 °C a 20 000 g po dobu 5 minut.
7. Supernatant byl odstraněn a sediment rozsuspendován pipetou ve 20 µl pufru W.
8. Vzorky byly promíchány na vortexu a inkubovány na rotačním zařízení při teplotě 4 °C po dobu 30 minut.
9. Vzorky byly centrifugovány ve vychlazené centrifuze při 4 °C a 25 000 g po dobu 2 minut.
10. Supernatant (telomerázový extrakt, TEX) byl odebrán do nové 1,5 ml mikrozkušavky a vzorky byly buď skladovány při -70 °C nebo protokol pokračoval měřením koncentrace proteinů (kapitola 3.2.4).

### 3.2.4 Měření koncentrace proteinů

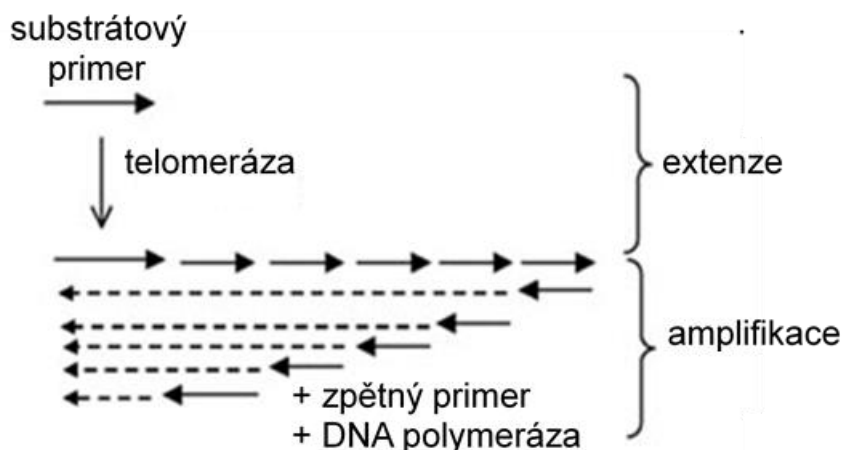
Koncentrace proteinů v TEX byla měřena spektrofotometricky v oblasti vlnové délky 595 nm pomocí metody Bradfordové.

Roztok pro měření koncentrace proteinů se skládal z 980 µl činidla Bradfordové a 20 µl vody v případě negativní kontroly, nebo 16 µl vody a 4 µl TEX pro změření koncentrace proteinů ve vzorcích. Poměr vody a TEX byl případně upraven tak, aby se koncentrace proteinů pohybovala mezi 0,1 mg·ml<sup>-1</sup> a 0,5 mg·ml<sup>-1</sup>, tj. v oblasti, kde je příslušná kalibrační křivka spolehlivě lineární. Kalibrační křivka byla konstruována s využitím sady roztoků o známých koncentracích BSA jinými členy laboratoře.

TEX byl naředěn puftrem W na koncentraci proteinů 50 ng·µl<sup>-1</sup> (T50) a přenesen do tekutého dusíku. Vzorky byly uchovávány v hlubokomrazícím boxu při teplotě -70 °C.

### 3.2.5 TRAP

Metoda TRAP (telomeric repeat amplification protocol) slouží k určení aktivity telomerázy *in vitro* a skládá se ze tří základních fází (Obr. 2). V první fázi telomeráza připojuje telomerové repetice na substrátový primer. Po denuraci telomerázy dochází k amplifikaci extendovaných substrátových primerů pomocí PCR. Při každém cyklu PCR dojde ke zdvojnásobení amplifikované oblasti. Posledním krokem protokolu je detekce produktů TRAP na polyakrylamidovém gelu.



Obr. 2: Schéma prvních dvou fází procesu TRAP.

#### Složení reakční směsi TRAP (1 reakce, 25 $\mu$ l):

- 21,9  $\mu$ l TRAP pufru
- 0,6  $\mu$ l DMSO
- 0,5  $\mu$ l substrátového primeru TS21 (koncentrace 10  $\mu$ M)
- 1  $\mu$ l T50

Reakční směs byla vložena do cykleru a při teplotě 26 °C došlo k připojování telomerových repetit na substrátový primer (míra prodloužení substrátového primeru byla úměrná aktivitě telomerázy v extraktu). Po tepelné denaturaci telomerázy (95 °C) byla do každé reakce přidána směs 0,5  $\mu$ l 10  $\mu$ M primeru TelPr (zpětný primer v PCR) a 0,5  $\mu$ l DNA polymerázy DyNAzyme II a proběhla amplifikace produktů extenze (35 cyklů PCR). Program TRAP je uveden v Tab. 1.

#### Reakční program TRAP:

Proces	Teplota	Doba
připojování telomerových repetit	26 °C	45 min
tepelná denaturace telomerázy	95 °C	5 min
přidání směsi polymerázy a reverzního primeru	80 °C	5–10 min
denaturace DNA	94 °C	30 s
nasedání primerů	65 °C	30 s
polymerace	72 °C	30 s
dosyntetizování řetězců	72 °C	5 min
zchlazení vzorku	10 °C	–

Tab. 1: Rozpis reakčního programu TRAP. Světle šedou je zvýrazněná první fáze reakce a tmavě šedou cyklus PCR, který se 35 $\times$  opakuje. Bílou barvou je označeno dokončení procesu PCR.

Po skončení reakce se do vzorků přidalo 5  $\mu$ l nanášecího pufru 6 $\times$  LB a následně se vzorky nanasly na 12,5% polyakrylamidový gel (PAGE). Připravený gel se naléval mezi dvě svísele umístěná skla firmy Hoefer, která byla upevněna ve stojanu a oddělena dvěma 1,5 mm



plastovými mezerníky. Po nalití gelu se do jeho horní části prostoru umístil hřebínek s 15 nebo 20 jamkami.

#### **Rozpis na 12,5% polyakrylamidový gel (40 ml):**

- 23,5 ml H<sub>2</sub>O
- 4 ml 5× TBE
- 12,5 ml 40% AA:BIS (19:1)
- 40 µl TEMED
- 80 µl 30% persíranu amonného

Po ztuhnutí gelu se hřebínek opatrně vytáhl a jamky se promyly destilovanou vodou. Elektroforéza byla prováděna v pufru 0,5× TBE, 15 min při napětí 180 V a asi 3 hod. při napětí 300 V; byla ukončena, když se zelená barva v nanášecím pufru (xylen cyanol FF) dostala na spodní okraj gelu.

DNA na gelu byla vizualizována fluorescenční barvou Gelstar (gel byl 20 min koupán ve 40 ml destilované vody a 4 µl fluorescenční barvy Gelstar), signály byly monitorovány detekčním systémem Fusion Fx, v kanále pro detekci SybrGREEN I.

### **3.2.6 Kvantitativní TRAP (qTRAP)**

Metoda qTRAP (quantitative telomeric repeat amplification protocol) umožňuje monitorovat aktivitu telomerázy v reálném čase díky využití principu kvantitativní PCR. V reakční směsi je přítomna fluorescenční barva SybrGREEN I, která je schopna se vázat na dvouvláknovou DNA a po této vazbě výrazně roste její fluorescence. Stejně jako u standardní TRAP dochází v první fázi qTRAP k prodloužení substrátového primeru TS21 enzymem telomerázou, který se na konci této fáze deaktivuje. Poté následuje amplifikace takto prodloužených primerů. Nárůstu množství amplikonu pak odpovídá přírůstek fluorescence, jenž se měří na konci každého cyklu PCR, přičemž se vyhodnocuje tzv. prahový cyklus (threshold cycle; C<sub>T</sub>), což je cyklus, při němž míra fluorescence vzroste nad mez detekce přístroje. Reakční program qTRAP je uveden v Tab. 2. Reakce byly provedeny v triplicátech v přístroji RotorGene6000.

#### **Složení reakční směsi qTRAP (1 reakce, 20 µl):**

- 10 µl 2× koncentrované reakční směsi FastStart SYBR Green Master
- 0,5 µl primeru TelPr (10 µM)
- 0,5 µl primeru TS21 (10 µM)
- 8 µl H<sub>2</sub>O
- 1 µl T50

## Reakční program qTRAP:

Proces	Teplota	Doba
prodloužení primeru TS21 telomerázou	26 °C	45 min
deaktivace telomerázy a aktivace DNA polymerázy	95 °C	15 min
denaturace DNA	95 °C	15 s
nasedání primerů, polymerace, detekce fluorescence na konci cyklu	60 °C	1 min
dosyntetizování řetězců	72 °C	3 min
analýza křivky tání	50–99 °C	–

Tab. 2: Rozpis reakčního programu qTRAP. Světle šedou je označena první fáze. Tmavě šedou je zvýrazněn cyklus PCR, který se 30× opakuje.

Statistické vyhodnocení výsledků analýzy aktivity telomerázy mezi bylo provedeno na základě průměrných hodnot  $C_T$  pomocí dvouvýběrového nepárového studentova t-testu. Výsledky měření se graficky znázornily jako relativní aktivita telomerázy vztažená k aktivitě telomerázy v klíčních rostlinách pěstovaných na kontrolním médiu s chybovými úsečkami; výpočty byly provedeny dle vzorců uvedených níže.

### Soupis použitých výpočtů:

1. Určení  $\Delta C_T$

$$\Delta C_T = C_T(\text{vzorek}) - C_T(\text{kontrola})$$

2. Určení  $\Delta SD$

$$\Delta SD = \sqrt{SD_{\text{vzorek}}^2 + SD_{\text{kontrola}}^2}$$

3. Výpočet relativní aktivity telomerázy

$$R = 2^{-\Delta C_T} \times 100 [\%]$$

4. Maximální hodnota relativní aktivity telomerázy

$$R_{\max} = 2^{-(\Delta C_T - \Delta SD)} \times 100 [\%]$$

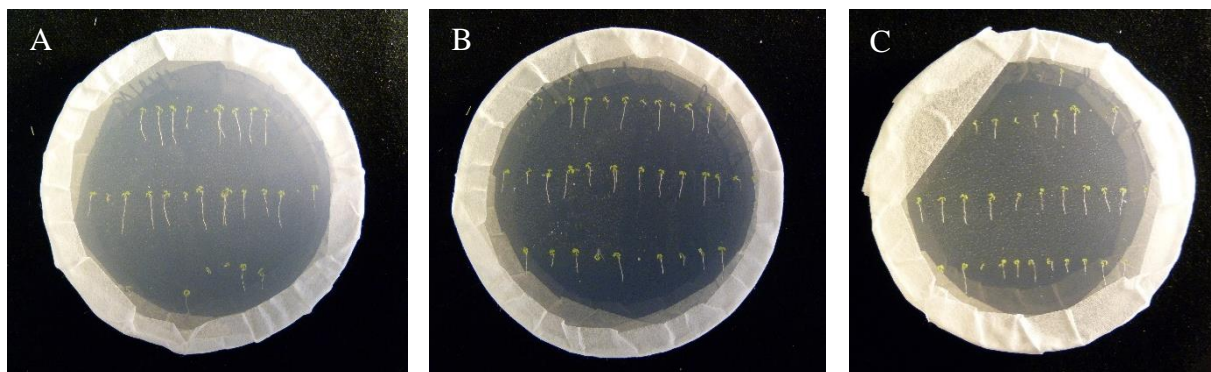
5. Minimální hodnota relativní aktivity telomerázy

$$R_{\min} = 2^{-(\Delta C_T + \Delta SD)} \times 100 [\%]$$

## 4 VÝSLEDKY

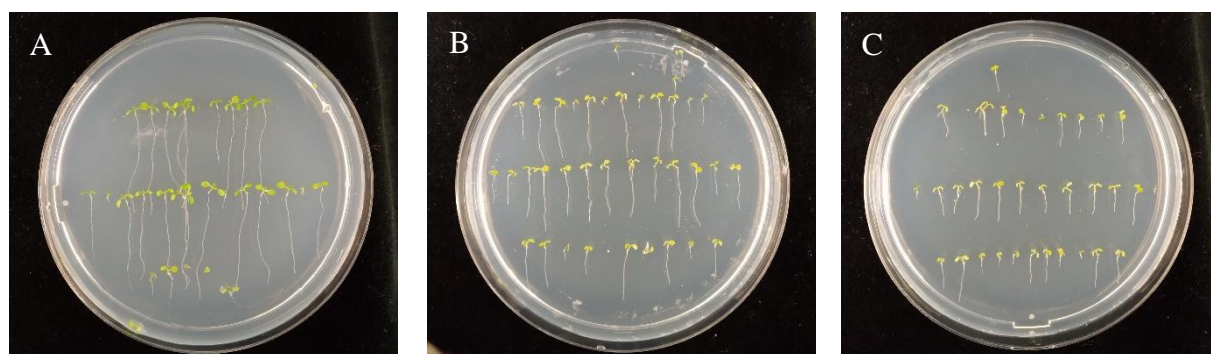
### 4.1 Morfologické změny klíčnicích rostlin pěstovaných v přítomnosti solí kadmia

U čtyřdenních klíčnicích rostlin *A. thaliana* byly kořinky klíčnicích rostlin pěstovaných v přítomnosti 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  i  $\text{CdSO}_4$  ve srovnání s kontrolními klíčnicími rostlinami mírně kratší (Obr. 3).



Obr. 3: Čtyřdenní klíčnicí rostliny *A. thaliana* pěstované na kontrolním médiu (A), médiu s přidavkem 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  (B) a médiu s přidavkem 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdSO}_4$  (C).

Rozdíly se zvýraznily u sedmidenních klíčnicích rostlin (Obr. 4), přičemž k výraznějšímu ovlivnění délky kořinek došlo u klíčnicích rostlin exponovaných 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdSO}_4$ . Jako další změnu lze pozorovat, že děložní a první pravé listy klíčnicích rostlin pěstovaných v přítomnosti kademnatých solí mají nažloutlou barvu ve srovnání s výrazně zelenými listy klíčnicích rostlin kontrolních.



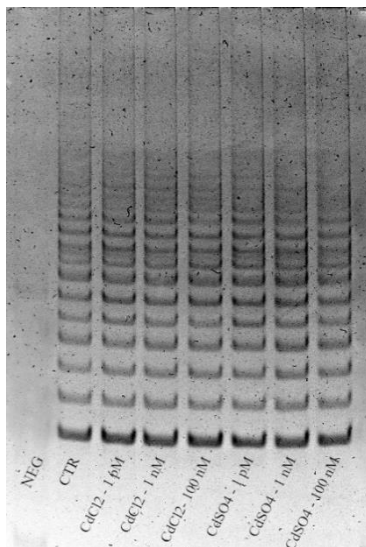
Obr. 4: Sedmidenní klíčnicí rostliny *A. thaliana* pěstované na kontrolním médiu (A), médiu s přidavkem 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  (B) a médiu s přidavkem 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdSO}_4$  (C).

Fenotyp klíčnicích rostlin *A. thaliana* exponovaných 4  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  a  $\text{CdSO}_4$  byl stejný jako fenotyp rostlin kontrolních (nedokumentováno).

### 4.2 Analýza aktivity telomerázy pomocí metody TRAP

Pro ověření, že přítomnost kademnatých iontů nemá vliv na vlastní PCR, která je součástí protokolu TRAP, byly  $\text{CdCl}_2$  i  $\text{CdSO}_4$  přidávány do reakcí, v nichž byla analyzována

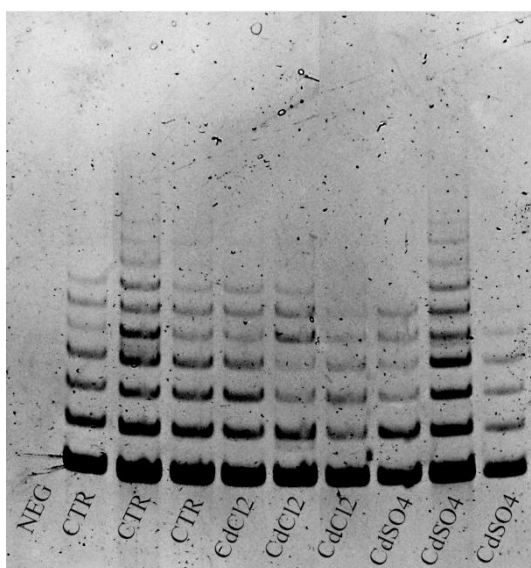
telomerázová aktivita v extraktech připravených z kontrolních sedmidenních klíčnicích rostlin *A. thaliana*, ve výsledných koncentracích 1 pM, 1 nM a 100 nM. Z Obr. 5 je zřejmé, že přítomnost kademnatých solí v reakční směsi neměla vliv na aktivitu telomerázy.



Obr. 5: Analýza aktivity telomerázy sedmidenních klíčnicích rostlin *A. thaliana* kultivovaných na kontrolním médiu. Do reakční směsi byly přidány  $\text{CdCl}_2$  a  $\text{CdSO}_4$  do výsledných koncentrací 1 pM, 1 nM a 100 nM. NEG, negativní kontrola, TRAP bez přidavku telomerázového extraktu; CTR, TRAP bez přidavku kademnatých solí.

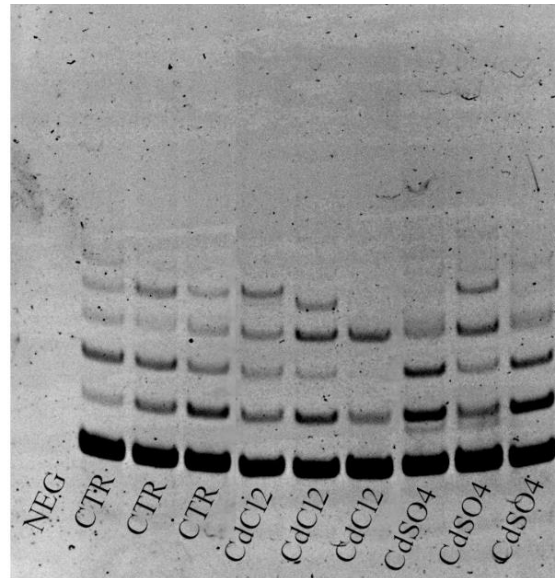
Dále byla aktivita telomerázy stanovena ve čtyřdenních a sedmidenních klíčnicích rostlinách *A. thaliana*. Reakce byly prováděny s klíčnicími rostlinami kultivovanými na médiu s koncentrací kademnatých solí 4  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$  a s klíčnicími rostlinami kultivovanými na kontrolním médiu.

U čtyřdenních klíčnicích rostlin kultivovaných na médiu s 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  i  $\text{CdSO}_4$  se zdá být aktivita rostlinné telomerázy mírně snížena v důsledku expozice  $\text{CdSO}_4$  (ve dvou ze tří analyzovaných vzorků) (Obr. 6).



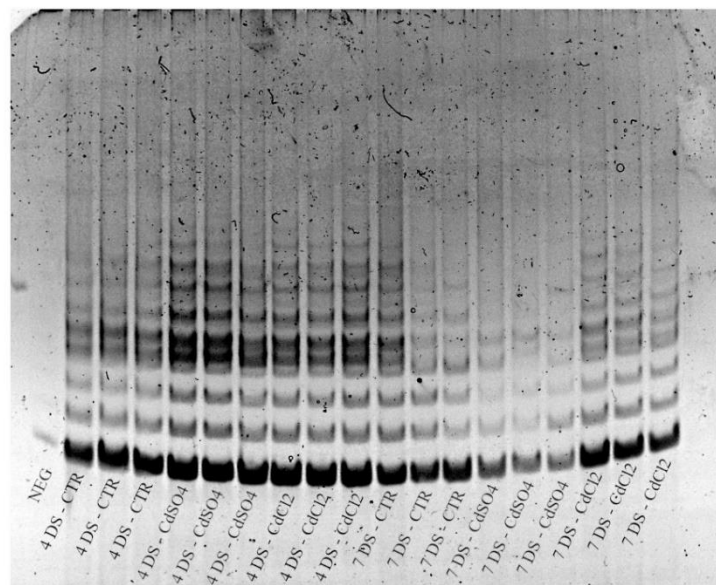
Obr. 6: Analýza aktivity telomerázy ve čtyřdenních klíčnicích rostlinách *A. thaliana* kultivovaných na kontrolním médiu (CTR) a v přítomnosti 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  a  $\text{CdSO}_4$ . NEG, negativní kontrola, TRAP bez přidavku telomerázového extraktu.

Při analýze sedmidenních klíčících rostlin kultivovaných na médiu v přítomnosti 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  i  $\text{CdSO}_4$  byla aktivita telomerázy přibližně srovnatelná ve všech vzorcích, i když v jednom vzorku klíčících rostlin ovlivněných  $\text{CdCl}_2$  se zdá být aktivita mírně snížena (Obr. 7).



Obr. 7: Analýza aktivity telomerázy v sedmidenních klíčících rostlinách *A. thaliana* kultivovaných na kontrolním médiu (CTR) a v přítomnosti 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  a  $\text{CdSO}_4$ . NEG, negativní kontrola, TRAP bez přidavku telomerázového extraktu.

V případě klíčících rostlin kultivovaných v přítomnosti 4  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  a  $\text{CdSO}_4$  bylo pozorováno snížení aktivity telomerázy sedmidenních klíčících rostlin ovlivněných  $\text{CdSO}_4$  (Obr. 8).

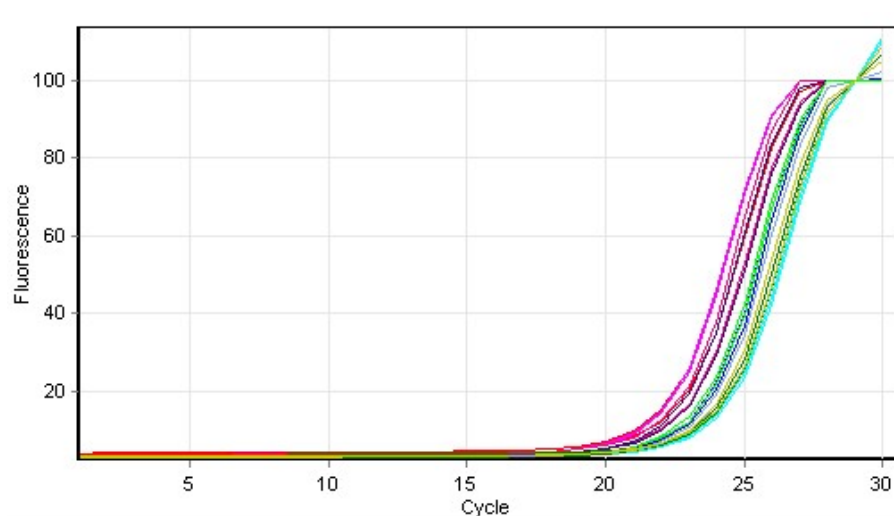


Obr. 8: Analýza aktivity telomerázy ve čtyřdenních (4DS) a sedmidenních (7DS) klíčících rostlinách *A. thaliana* kultivovaných na kontrolním médiu (CTR) a v přítomnosti 4  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  a  $\text{CdSO}_4$ . NEG, negativní kontrola, TRAP bez přidavku telomerázového extraktu.

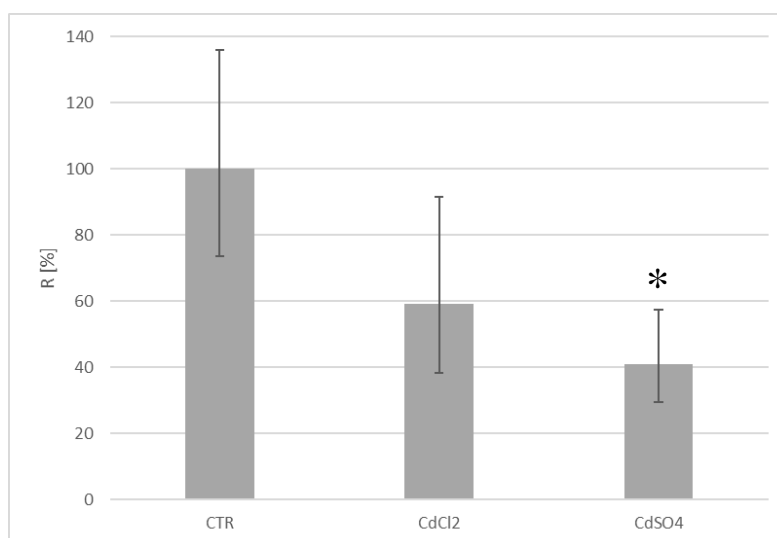
### 4.3 Analýza aktivity telomerázy pomocí metody qTRAP

Pro potvrzení a upřesnění změn aktivity telomerázy klíčnicích rostlin v důsledku jejich expozice kadmnatým solím byla použita metoda qTRAP. Byly analyzovány čtyřdenní a sedmidenní klíčnicí rostliny *A. thaliana* kultivované na kontrolním médiu a v přítomnosti kadmnatých solí o koncentraci 4  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$ .

U čtyřdenních klíčnicích rostlin kultivovaných na médiu s 50  $\mu\text{M}$  koncentrací kadmnatých solí byl prokázán významný pokles aktivity telomerázy pouze v případě přídatku  $\text{CdSO}_4$  (Obr. 9, Graf 1), což odpovídá výsledkům standardní analýzy TRAP (Obr. 6).

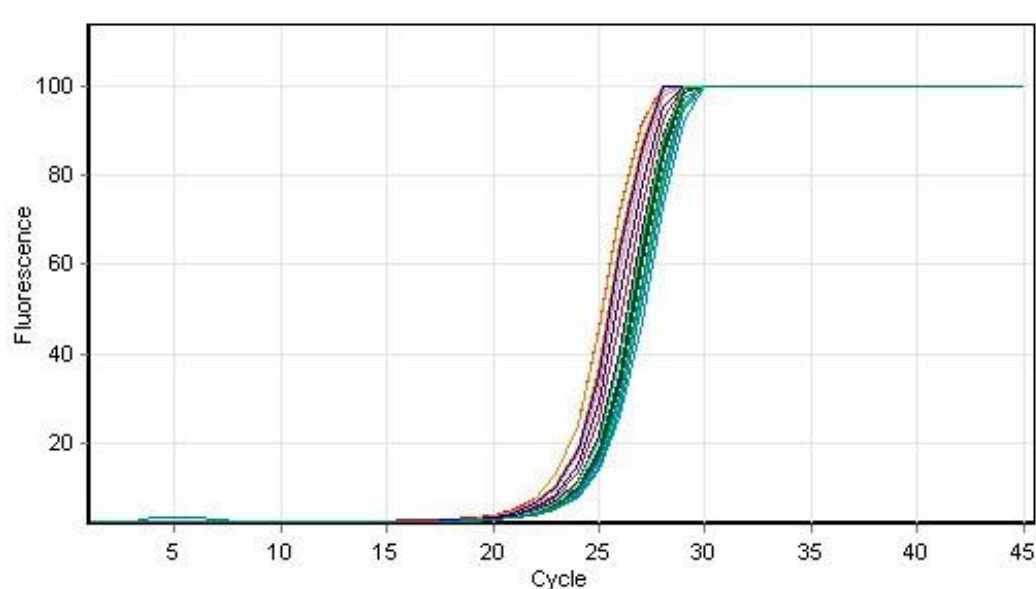


Obr. 9: Výsledné křivky kvantitativní analýzy aktivity telomerázy čtyřdenních klíčnicích rostlin. V odstínech růžové až červené jsou vyznačeny klíčnicí rostliny kultivované na kontrolním médiu, modrou barvou jsou označeny klíčnicí rostliny kultivované na médiu s přídatkem 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  a zelenou barvou jsou vyneseny klíčnicí rostliny, které byly kultivovány na médiu v přítomnosti 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdSO}_4$ .

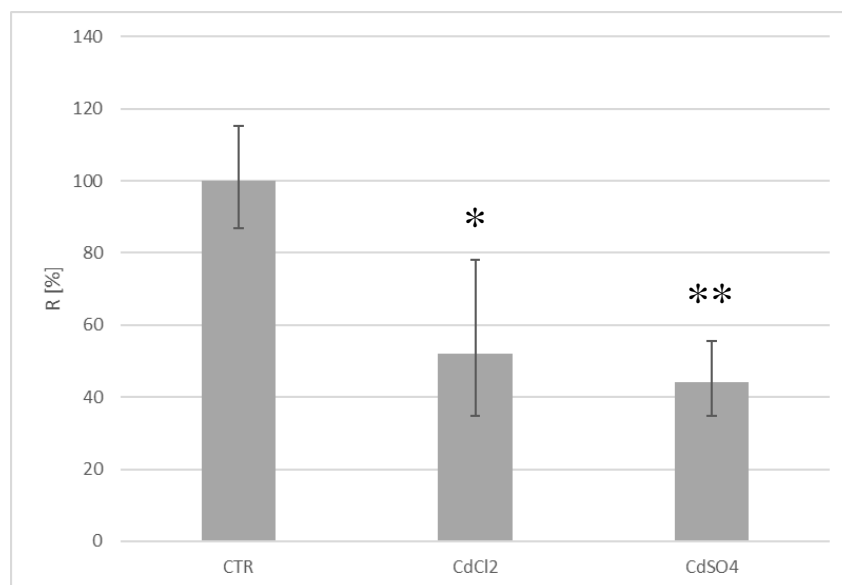


Graf 1: Kvantitativní analýza aktivity telomerázy ve čtyřdenních klíčnicích rostlinách *A. thaliana* kultivovaných na kontrolním médiu (CTR) a v přítomnosti 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  a  $\text{CdSO}_4$ : R – relativní aktivita telomerázy v % vztahovaná na rostliny kultivované na kontrolním médiu (100% aktivita enzymu). Statistické vyhodnocení viz kapitola 3.2.6.  $p < 0,05$  vůči kontrole je v grafu zaznamenán jako \*. Počet analyzovaných biologických replik  $n = 3$ .

Analýza sedmidenních klíčnicích rostlin *A. thaliana* pak prokázala významný pokles aktivity telomerázy klíčnicích rostlin kultivovaných v přítomnosti 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdSO}_4$  i  $\text{CdCl}_2$  (Obr. 10, Graf 2). Tato analýza tedy zpřesnila výsledky získané standardní TRAP, kde bylo jisté snížení aktivity telomerázy pozorováno pouze v jednom vzorku klíčnicích rostlin ovlivněných  $\text{CdCl}_2$  (Obr. 7).



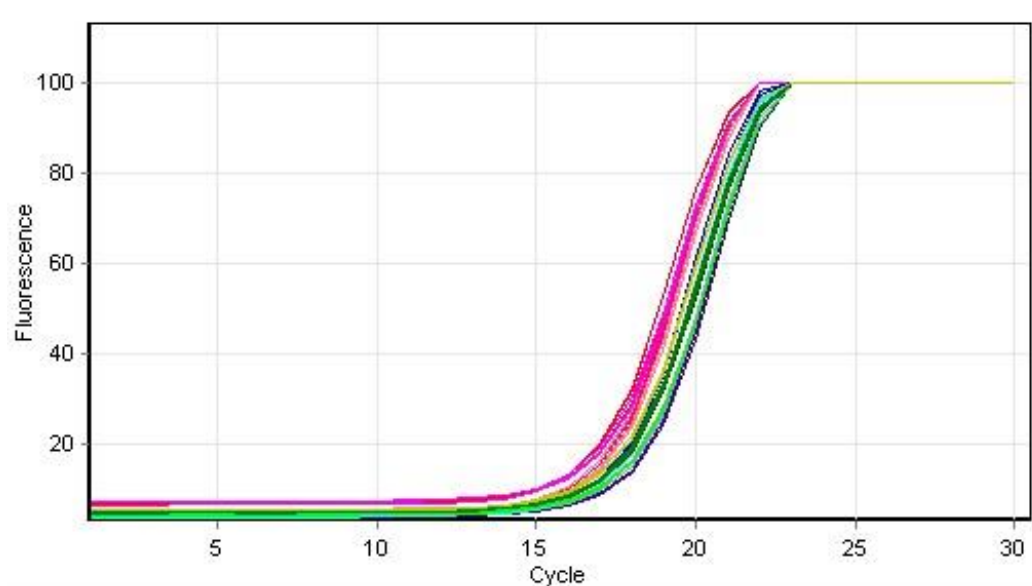
Obr. 10: Výsledné křivky kvantitativní analýzy aktivity telomerázy sedmidenních klíčnicích rostlin. V odstínech červené až oranžové jsou vyznačeny klíčnicí rostliny kultivované na kontrolním médiu, modrou barvou jsou označeny klíčnicí rostliny kultivované na médiu s přidávkou 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  a zelenou barvou jsou vyneseny klíčnicí rostliny, které byly kultivovány na médiu v přítomnosti 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdSO}_4$ .



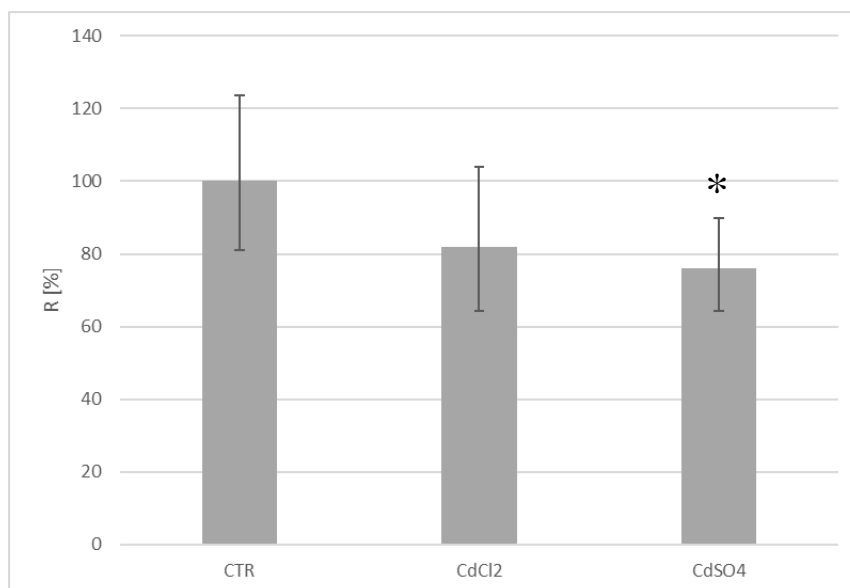
Graf 2: Kvantitativní analýza aktivity telomerázy v sedmidenních klíčnicích rostlinách *A. thaliana* kultivovaných na kontrolním médiu (CTR) a v přítomnosti 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  a  $\text{CdSO}_4$ : R – relativní aktivita telomerázy udávaná v % a vztážená na rostliny kultivované na kontrolním médiu (100% aktivita enzymu). Statistické vyhodnocení viz kapitola 3.2.6.  $p < 0,05$  vůči kontrole je v grafu zaznamenán jako \* a  $p < 0,01$  je v grafu zaznamenán jako \*\*. Počet analyzovaných biologických replik  $n = 3$ .



Analýza čtyřdenních klíčnic rostlin kultivovaných na médiu s přidavkem kademnatých solí o koncentraci 4  $\mu\text{M}$  prokázala mírný leč statisticky významný pokles aktivity telomerázy klíčnic rostlin kultivovaných na médiu s přidavkem  $\text{CdSO}_4$  (Obr. 11, Graf 3).



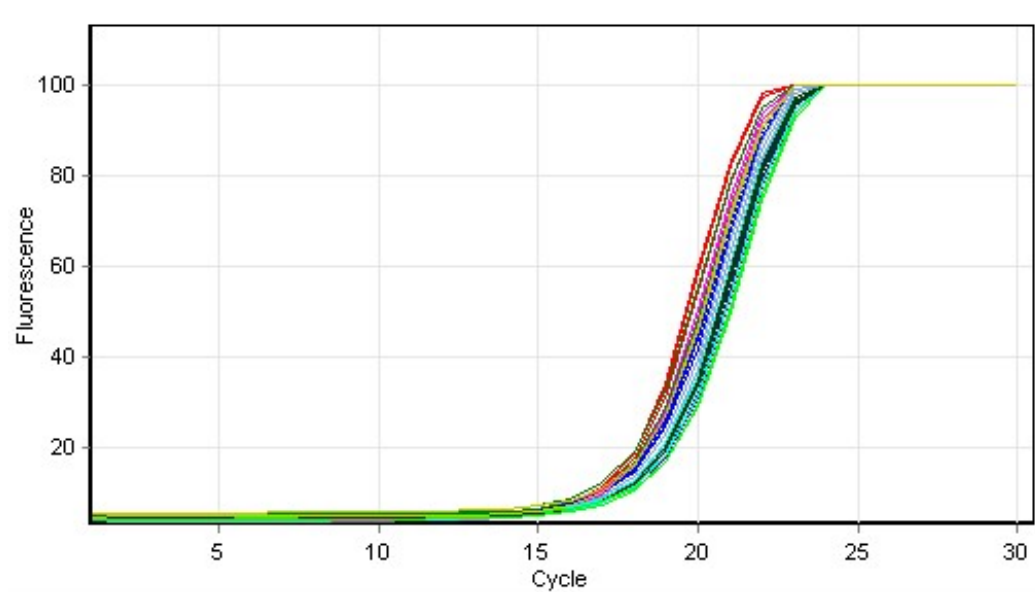
Obr. 11: Výsledné křivky kvantitativní analýzy aktivity telomerázy čtyřdenních klíčnic rostlin. V odstínech červené až růžové jsou vyznačeny klíčnic rostliny kultivované na kontrolním médiu, modrou barvou jsou označeny klíčnic rostliny kultivované na médiu s přidavkem 4  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  a zelenou barvou jsou vyneseny klíčnic rostliny, které byly kultivovány na médiu v přítomnosti 4  $\mu\text{M}$   $\text{CdSO}_4$ .



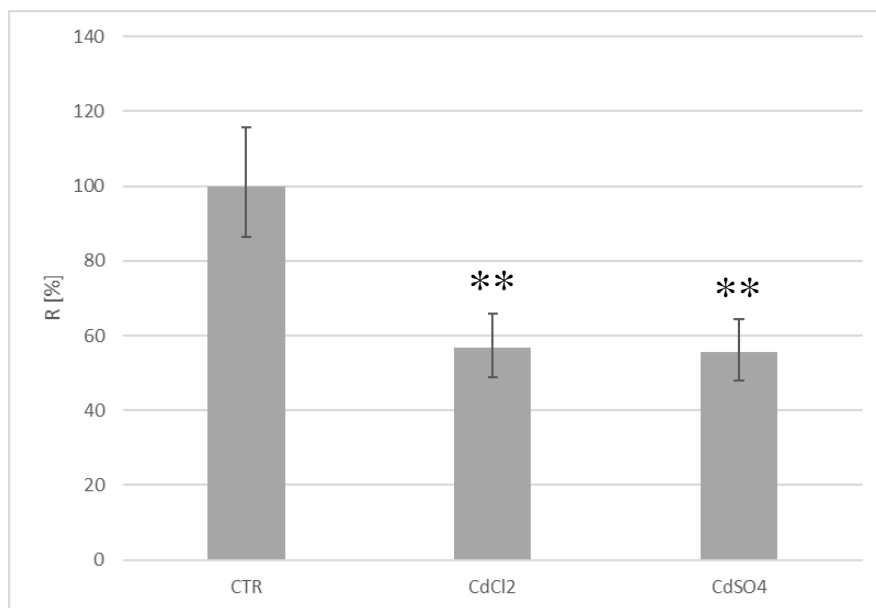
Graf 3: Kvantitativní analýza aktivity telomerázy ve čtyřdenních klíčnic rostlinách *A. thaliana* kultivovaných na kontrolním médiu (CTR) a v přítomnosti 4  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  a  $\text{CdSO}_4$ : R – relativní aktivita telomerázy udávaná v % a vztážená na rostliny kultivované na kontrolním médiu (100% aktivita enzymu). Statistické vyhodnocení viz kapitola 3.2.6.  $p < 0,05$  vůči kontrole je v grafu zaznamenán jako \*. Počet analyzovaných biologických replik  $n = 3$ .



U sedmidenních klíčnicích rostlin kultivovaných na MS médiu s kadmnatými solemi o výsledné koncentraci 4  $\mu\text{M}$  byl pozorován poměrně výrazný pokles aktivity telomerázy  $\text{CdSO}_4$  i  $\text{CdCl}_2$  (Obr. 12, Graf 4).



Obr. 12: Výsledné křivky kvantitativní analýzy aktivity telomerázy sedmidenních klíčnicích rostlin. V odstínech červené až růžové jsou vyznačeny klíčnicí rostliny kultivované na kontrolním médiu, modrou barvou jsou označeny klíčnicí rostliny kultivované na médiu s přidavkem 4  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  a zelenou barvou jsou vyneseny klíčnicí rostliny, které byly kultivovány na médiu v přítomnosti 4  $\mu\text{M}$   $\text{CdSO}_4$ .



Graf 4: Kvantitativní analýza aktivity telomerázy v sedmidenních klíčnicích rostlinách *A. thaliana* kultivovaných na kontrolním médiu (CTR) a v přítomnosti 4  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  a  $\text{CdSO}_4$ : R – relativní aktivita telomerázy udávaná v % a vztážená na rostliny kultivované na kontrolním médiu (100% aktivita enzymu). Statistické vyhodnocení viz kapitola 3.2.6.  $p < 0,01$  je v grafu zaznamenán jako \*\*. Počet analyzovaných biologických replik  $n = 3$ .

## 5 DISKUSE

Kadmium je významným polutantem životního prostředí. Jeho sloučeniny nacházíme v atmosféře, ve vodě i v půdním systému. Již dříve byly prokázány toxické účinky kadmia na důležité procesy v rostlinných i živočišných buňkách. V této práci nás zajímalo, zda sloučeniny kadmia, přesněji kademnaté soli  $\text{CdSO}_4$  a  $\text{CdCl}_2$ , mají vliv na aktivitu rostlinné telomerázy, což je enzym, jehož primární funkcí je prodlužovat telomerickou sekvenci nacházející se na koncích eukaryotických chromozomů. Tyto soli kadmia byly použity ve dvou koncentracích. V předešlých výzkumech bylo zjištěno, že v buňkách tabákové suspenzní kultury BY-2 kultivovaných v přítomnosti  $50 \mu\text{M}$   $\text{CdSO}_4$  byla indukována programovaná buněčná smrt (Fojtová a kol., 2000), přičemž v časných fázích docházelo k opravám poškozené DNA v procesu, kterého se pravděpodobně účastnila telomeráza, jejíž aktivita byla v buňkách ovlivněných kadmii zvýšená (Fojtová a kol., 2002). Nižší koncentrace kademnatých solí,  $4 \mu\text{M}$ , je odvozena z preventivního limitu pro znečištění zemědělské půdy v České republice podle vyhlášky Ministerstva zemědělství,  $0,4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  pro lehké půdy,  $0,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  pro ostatní typy půd. Z hlediska morfologických změn způsobených vlivem  $50 \mu\text{M}$   $\text{CdSO}_4$  a  $\text{CdCl}_2$  byla pozorována růstová retardace klíčnicích rostlin, což je efekt dobře zdokumentovaný v literatuře (shrnuto v Lyčka, 2016), a následné žloutnutí listů. V případě čtyřdenních klíčnicích rostlin *A. thaliana* kultivovaných v přítomnosti obou typů solí o koncentraci  $50 \mu\text{M}$  bylo pozorované mírné zkrácení kořene oproti klíčnicím rostlinám kultivovaným na kontrolním médiu (Obr. 3). U sedmidenních klíčnicích rostlin bylo kromě kratšího kořene rovněž patrné žloutnutí děložnicích a prvních pravých listů (Obr. 4), přičemž klíčnicí rostliny kultivované v přítomnosti  $\text{CdSO}_4$  mají výrazněji zkrácené kořeny než rostliny klíčící na médiu s  $\text{CdCl}_2$ , což naznačuje větší toxický účinek působení kadmia v případě, že je do kultivačního média přidáno ve formě  $\text{CdSO}_4$ . Obdobný efekt naznačující větší míru vlivu kadmia v případě jeho přídatku do kultivačního média ve formě síranu prokazují i experimenty měření aktivity telomerázy (Obr. 6, Graf 1, Graf 3).

Jedním ze způsobů projevu kademnatého iontu na buněčné úrovni je jeho možné působení na aktivitu enzymů, ať už přímou nebo nepřímou cestou. Dřívější experimenty vedly k nejednoznačným závěrům o účinku kademnatých iontů na aktivitu telomerázy (Fojtová a kol., 2002; Lyčka, 2016). V první práci (Fojtová a kol., 2002) bylo pozorováno zvýšení aktivity telomerázy v důsledku expozice buněk suspenzní kultury tabáku  $50 \mu\text{M}$   $\text{CdSO}_4$ . V druhé práci (Lyčka, 2016) byla aktivita telomerázy v buňkách suspenzní kultury tabáku vystavených působení kademnatých iontů přibližně srovnatelná se vzorky kontrolními, v klíčnicích rostlinách *N. tabacum* klíčnicích na médiu s  $50 \mu\text{M}$   $\text{CdSO}_4$  a  $\text{CdCl}_2$  byla aktivita telomerázy snižena zatímco v klíčnicích rostlinách *A. thaliana* byla pozorována vyšší aktivita telomerázy ve vzorcích izolovaných z rostlin ovlivněných  $50 \mu\text{M}$   $\text{CdSO}_4$ . Nutno zdůraznit, že v práci Lyčka (2016) byly relativně velké odchylky mezi biologickými replikami a v práci Fojtová a kol. (2002) nebyla použita metoda qTRAP, protože v té době ještě nebyla v laboratoři zavedena.

Při uvažování o možných příčinách rozdílů mezi nezávislými experimenty jsme zvažovali i případný vliv kadmia v telomerázovém extraktu na TRAP. Pro vyloučení vlivu kademnatých iontů na PCR bylo v naší práci provedeno měření aktivity tohoto enzymu v extraktech izolovaných z rostlin *A. thaliana* klíčících na kontrolním médiu, přičemž se k reakční směsi přidaly kademnaté soli o třech různých koncentracích: 1 pM, 1 nM a 100 nM. Analýza aktivity telomerázy metodou TRAP neodhalila žádné změny v důsledku přidavků těchto solí do reakční směsi (Obr. 5).

V případě analýzy vlivu kademnatých iontů *in vivo* již byl efekt pozorován. Metodou TRAP byl u čtyřdenních klíčících rostlin kultivovaných na médiu s 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdSO}_4$  dokumentován mírný pokles v aktivitě telomerázy ve srovnání s rostlinami kontrolními, i když ne ve všech biologických replikách (Obr. 6). Následné měření metodou qTRAP toto potvrdilo (Graf 1). V případě sedmidenních klíčících rostlin klasická TRAP neukázala průkazný vliv kademnatých solí na aktivitu telomerázy (Obr. 7), nicméně následné měření metodou qTRAP ukázalo významný pokles v aktivitě telomerázy pro oba typy solí (Graf 2).

V případě rostlin klíčících na médiu s koncentrací kademnatých solí 4  $\mu\text{M}$ , což z environmentálního hlediska představuje reálnou situaci, nebyla dle výsledků standardní analýzy TRAP aktivita telomerázy ve čtyřdenních klíčících rostlinách ovlivněna (Obr. 8). Metoda qTRAP však prokázala významný pokles aktivity telomerázy v případě přidavku  $\text{CdSO}_4$  (Graf 3), což se shoduje se závěrem analýzy na rostlinách vystavených 12,5 $\times$  vyšší koncentraci této soli (Graf 1). Ostatně obdobný závěr jako v případě působení kademnatých solí o vyšší koncentraci (Graf 2) přinesla i analýza sedmidenních klíčících rostlin exponovaných 4  $\mu\text{M}$   $\text{CdSO}_4$  a  $\text{CdCl}_2$ , kdy se metodou TRAP ukázal negativní vliv  $\text{CdSO}_4$  (Obr. 8), ale v analýze qTRAP už byl prokázán vliv obou typů solí (Graf 4).

Tyto rozdíly mezi TRAP a qTRAP je možno vysvětlit na základě principů těchto metod. Součástí TRAP je tzv. „end point“ PCR, která ukáže případné rozdíly, až když jsou tyto velmi výrazné. qTRAP, v níž je průběh PCR monitorován v reálném čase, je z principu citlivější, a tato metoda je tedy schopná detekovat subtilnější změny. Na druhou stranu, relativně podstatnou slabinou qTRAP je absence relevantní reference. V klasických analýzách qPCR, kdy se monitoruje obsah analyzovaného úseku ve vzorku DNA nebo cDNA, se signál tohoto úseku vztahuje k signálu tzv. referenčního genu, tj. genu, jehož obsah/transkripce je totožný ve všech analyzovaných vzorcích DNA/cDNA. V případě qTRAP je jediným referenčním bodem ředění vzorků na stejnou koncentraci proteinů a s ohledem na relativně velkou chybu v tomto stanovení a extrémní citlivost qPCR mohou být výsledky qTRAP výrazným způsobem ovlivněny. Dokladem toho je i relativně velký rozptyl hodnot relativních aktivit telomerázy (Grafy 1-4). Nicméně TRAP a qTRAP jsou v současné době jedinými metodami pro analýzu aktivity telomerázy, jakožto důležitého fyziologického parametru dělících se rostlinných i živočišných buněk.

Z měření aktivity telomerázy v klíčících rostlinách *A. thaliana* lze tedy pozorovat jistý rozdíl ve vlivu  $\text{CdSO}_4$  a  $\text{CdCl}_2$  na aktivitu tohoto enzymu. Zdá se, že minimálně v raných fázích

vývoje rostliny má přítomnost CdSO<sub>4</sub> větší vliv na aktivitu telomerázy než přítomnost CdCl<sub>2</sub>. Tuto úvahu navíc podporují výsledky z pozorování morfologických změn klíčnicích rostlin, kdy v případě sedmidenních klíčnicích rostlin pěstovaných v přítomnosti 50 μM CdSO<sub>4</sub> byla pozorována zřetelnější retardace vývoje kořenového systému, než tomu bylo u rostlin klíčnicích v přítomnosti 50 μM CdCl<sub>2</sub> (Obr. 4).

Případnou odpověď na to, z jakého důvodu jsou projevy toxicity (výraznější retardace růstového systému a výraznější snížení aktivity telomerázy v raných fázích klíčení rostliny) CdSO<sub>4</sub> výraznější oproti CdCl<sub>2</sub> by mohly dát plánované experimenty v rámci širšího výzkumu zabývajícího se vlivem kadmia na aktivitu rostlinné telomerázy a další parametry, jehož součástí je i tato studie. Bude přínosné provést analýzu intracelulárního obsahu kadmia metodou ICP-MS (analytická metoda kombinující ionizaci mineralizovaného vzorku pomocí argonového plasmatu a analýzu hmotnostní spektrometrií) v rostlinách *A. thaliana* klíčnicích v přítomnosti obou typů solí pro zjištění, zda jsou kademnaté ionty v případě přídavku různého typu soli přijímány kořenovým systémem se stejnou účinností. Dále by bylo zajímavé zjistit možný vliv samotných aniontů Cl<sup>-</sup> a SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> na aktivitu telomerázy. V tomto případě by bylo příhodné pěstovat klíčnicí rostliny *A. thaliana* opět na agarových plotnách, tentokrát však s přídavkem Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> nebo NaCl. Jsou plánovány i analýzy důsledků dlouhodobého působení kademnatých solí na aktivitu telomerázy a případně i délku telomer a dalších fyziologických parametrů v rostlinách kultivovaných 5 týdnů v podmínkách hydroponie. Pilotní experimenty ukázaly výrazný vliv přítomnosti 4 μM kademnatých solí na růst rostlin i žloutnutí listů (Mikulášková, 2019).

## 6 ZÁVĚR

Cílem práce bylo stanovit, jaký vliv mají kademnaté soli  $\text{CdCl}_2$  a  $\text{CdSO}_4$  na aktivitu telomerázy v klíčnicích rostlinách *A. thaliana*.

Z hlediska morfologických změn se prokázal negativní vliv kademnatých solí o koncentraci  $50 \mu\text{M}$  na délku kořene u čtyřdenních i sedmidenních klíčnicích rostlin, přičemž působení  $\text{CdSO}_4$  mělo výraznější efekt. U sedmidenních klíčnicích rostlin bylo u rostlin exponovaných kademnatým solím rovněž pozorováno žloutnutí listů.

Analýza aktivity telomerázy metodou TRAP odhalila nižší aktivitu telomerázy v některých vzorcích klíčnicích rostlin kultivovaných na médiu v přítomnosti kademnatých solí; výraznější změny byly pozorovány v případě klíčnicích rostlin ovlivněných  $\text{CdSO}_4$ .

Analýza aktivity telomerázy metodou qTRAP odhalila signifikantní snížení aktivity telomerázy ve čtyřdenních klíčnicích rostlinách kultivovaných na médiu s  $\text{CdSO}_4$  a v sedmidenních klíčnicích rostlinách ovlivněných  $\text{CdSO}_4$  i  $\text{CdCl}_2$ .

Tato práce měla poukázat na negativní účinky kadmia nejen na rostlinnou telomerázu, ale i jeho komplexní působení, které se projevuje na úrovni fenotypu rostlin. Vzhledem k tomu, že kadmium je nebezpečným průmyslovým polutantem, který má vliv nejen na rostlinné, ale také na živočišné buňky, tj. jeho toxické účinky ovlivňují i lidskou populaci, mělo by se začít pracovat na změně průmyslových postupů vedoucích k omezení produkce kadmia na minimum. Tento problém je zvláště aktuální v rozvojových zemích, kde je problematika ochrany životního prostředí výrazně méně akcentována a důraz je kladen především na vysokou průmyslovou i zemědělskou produkci.

## 7 POUŽITÉ ZKRATKY

**AA:BIS** – akrylamid: N, N'-methylenbisakrylamid

**BSA** – hovězí sérový albumin/ bovine serum albumin

**CTR** – kontrola

**DMSO** – dimethylsulfoxid

**DNA** – deoxyribonukleová kyselina

**cDNA** – komplementární DNA

**dATP** – deoxyadenosin trifosfát

**dCTP** – deoxycytidin trifosfát

**dGTP** – deoxyduanosin trifosfát

**dNTP** – deoxyribonukleotid trifosfát

**dTTP** – deoxythymidin trifosfát

**DS** – days seedlings

**EDTA** – kyselina ethylendiamintetraoctová

**EGTA** – ethylenglycol-bis ( $\beta$ -aminoethyl ether) - N, N, N', N'-tetraoctová kyselina

**ICP-MS** – hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem/ inductively coupled plasma mass spectrometry

**LB** – loading buffer

**MS** – Murashige-Skoog

**NEG** – negativní kontrola

**PAGE** – elektroforéza na polyakrylamidovém gelu/ polyacrylamide gele electrophoresis

**PCR** – polymerázová řetězová reakce/ polymerase chain reaction

**qPCR** – kvantitativní polymerázová reakce/ quantitative polymerase chain reaction

**PEG** – polyethylenglykol

**RNA** – ribonukleová kyselina

**T50** – telomerázový extrakt s koncentrací proteinů 50 ng· $\mu$ l

**TBE** – Tris-borát-EDTA

**TEMED** – tetramethylethyldiamin

**TER** – telomerázová RNA/ telomeric RNA

**TERT** – telomerázová reverzní transkriptáza/ telomeric reverse transcriptase

**TEX** – telomerázový extrakt

**TRAP** – telomeric repeat amplification protocol

**qTRAP** – quantitative telomeric repeat amplification protocol

**UV záření** – ultrafialové záření

## 8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

FOJTA, Miroslav, Miloslava FOJTOVÁ, Luděk HAVRAN, Hana PIVOŇKOVÁ, Vlastimil DORČÁK a Ivana ŠESTÁKOVÁ. *Electrochemical monitoring of phytochelatin accumulation in Nicotiana tabacum cells exposed to sub-cytotoxic and cytotoxic levels of cadmium*. Analytica Chimica Acta, 2006. 558, 171-178.

FOJTOVÁ, Miloslava a Aleš KOVAŘÍK, 2000. *Genotoxic effect of cadmium is associated with apoptotic changes in tobacco cells*. Plant, Cell and Environment, 2000. 23, 531–537.

FOJTOVÁ, Miloslava, Jana FULNEČKOVÁ, Jiří FAJKUS a Aleš KOVAŘÍK. *Recovery of tobacco cells from cadmium stress is accompanied by DNA repair and increased telomerase activity*. Journal of Experimental Botany, 2002. 53, 2151-2158.

HOSEINI, Seyed MEYSAM a Fatemeh ZARGARI. *Cadmium in plants: A review*. International Journal of Farming and Allied Sciences, 2013. 2, 579-581.

ISMAEL, Marwa A., Ali Mohamed ELYAMINE, Mohamed G. MOUSSA, Miaomiao CAI, Xiaohu ZHAO a Chengxiao HU. *Cadmium in plants: Uptake, toxicity, and its interactions with selenium fertilizers*. Metallomics, 2019. 11, 255-277.

LYČKA, Martin. *Telomery a telomeráza v rostlinách vystavených genotoxickému stresu*. Brno, 2016. Diplomová práce. Masarykova univerzita.

MIKULÁŠKOVÁ, Šárka. *Role sulfátů v odpovědi rostlin na stres v důsledku přítomnosti těžkých kovů*. Brno, 2019. Bakalářská práce. Masarykova univerzita.

PROCHÁZKOVÁ SCHRUMPFVÁ, Petra, Miloslava FOJTOVÁ a Jiří FAJKUS. *Telomeres in plants and humans: Not so different, not so similar*. Cells, 2019. 8, 58.

SHAY, Jerry W. *Role of telomeres and telomerase in aging and cancer*. Cancer Discovery, 2016. 6, 584-593.

SHAY, Jerry W. a Woodring E. WRIGHT. *Telomeres and telomerase: Three decades of progress*. Nature Review Genetics, 2019. 20, 299-309.

SNUSTAD, D. Peter a Michael J. SIMMONS (RELICHOVÁ, Jiřina, editorka českého vydání). *Genetika*. Druhé, aktualizované vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2017. ISBN 978-80-210-8613-5.

SÝKOROVÁ, Eva a Jiří FAJKUS. *Structure-function relationships in telomerase genes*. Biology of the Cell, 2009. 101, 375-392.



## 9 SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ

### 9.1 Obrázky

Obr. 1: Schéma komplexu telomerázy nasedajícího na DNA.....	11
Obr. 2: Schéma prvních dvou fází procesu TRAP .....	16
Obr. 3: Čtyřdenní klíčící rostliny <i>A. thaliana</i> pěstované na kontrolním médiu (A), médiu s přídatkem 50 $\mu\text{M}$ $\text{CdCl}_2$ (B) a médiu s přídatkem 50 $\mu\text{M}$ $\text{CdSO}_4$ (C). .....	19
Obr. 4: Sedmidenní klíčící rostliny <i>A. thaliana</i> pěstované na kontrolním médiu (A), médiu s přídatkem 50 $\mu\text{M}$ $\text{CdCl}_2$ (B) a médiu s přídatkem 50 $\mu\text{M}$ $\text{CdSO}_4$ (C). .....	19
Obr. 5: Analýza aktivity telomerázy sedmidenních klíčících rostlin <i>A. thaliana</i> kultivovaných na kontrolním médiu. Do reakční směsi byly přidány $\text{CdCl}_2$ a $\text{CdSO}_4$ do výsledných koncentrací 1 pM, 1 nM a 100 nM. NEG, negativní kontrola, TRAP bez přídatku telomerázového extraktu; CTR, TRAP bez přídatku kadmenných solí. ....	20
Obr. 6: Analýza aktivity telomerázy ve čtyřdenních klíčících rostlinách <i>A. thaliana</i> kultivovaných na kontrolním médiu (CTR) a v přítomnosti 50 $\mu\text{M}$ $\text{CdCl}_2$ a $\text{CdSO}_4$ . NEG, negativní kontrola, TRAP bez přídatku telomerázového extraktu. ....	20
Obr. 7: Analýza aktivity telomerázy v sedmidenních klíčících rostlinách <i>A. thaliana</i> kultivovaných na kontrolním médiu (CTR) a v přítomnosti 50 $\mu\text{M}$ $\text{CdCl}_2$ a $\text{CdSO}_4$ . NEG, negativní kontrola, TRAP bez přídatku telomerázového extraktu. ....	21
Obr. 8: Analýza aktivity telomerázy ve čtyřdenních (4DS) a sedmidenních (7DS) klíčících rostlinách <i>A. thaliana</i> kultivovaných na kontrolním médiu (CTR) a v přítomnosti 4 $\mu\text{M}$ $\text{CdCl}_2$ a $\text{CdSO}_4$ . NEG, negativní kontrola, TRAP bez přídatku telomerázového extraktu. ....	21
Obr. 9: Výsledné křivky kvantitativní analýzy aktivity telomerázy čtyřdenních klíčících rostlin. V odstínech růžové až červené jsou vyznačeny klíčící rostliny kultivované na kontrolním médiu, modrou barvou jsou označeny klíčící rostliny kultivované na médiu s přídatkem 50 $\mu\text{M}$ $\text{CdCl}_2$ a zelenou barvou jsou vyneseny klíčící rostliny, které byly kultivovány na médiu v přítomnosti 50 $\mu\text{M}$ $\text{CdSO}_4$ .....	22
Obr. 10: Výsledné křivky kvantitativní analýzy aktivity telomerázy sedmidenních klíčících rostlin. V odstínech červené až oranžové jsou vyznačeny klíčící rostliny kultivované na kontrolním médiu, modrou barvou jsou označeny klíčící rostliny kultivované na médiu s přídatkem 50 $\mu\text{M}$ $\text{CdCl}_2$ a zelenou barvou jsou vyneseny klíčící rostliny, které byly kultivovány na médiu v přítomnosti 50 $\mu\text{M}$ $\text{CdSO}_4$ .....	23
Obr. 11: Výsledné křivky kvantitativní analýzy aktivity telomerázy čtyřdenních klíčících rostlin. V odstínech červené až růžové jsou vyznačeny klíčící rostliny kultivované na kontrolním médiu, modrou barvou jsou označeny klíčící rostliny kultivované na médiu s přídatkem 4 $\mu\text{M}$ $\text{CdCl}_2$ a zelenou barvou jsou vyneseny klíčící rostliny, které byly kultivovány na médiu v přítomnosti 4 $\mu\text{M}$ $\text{CdSO}_4$ .....	24
Obr. 12: Výsledné křivky kvantitativní analýzy aktivity telomerázy sedmidenních klíčících rostlin. V odstínech červené až růžové jsou vyznačeny klíčící rostliny kultivované na kontrolním médiu, modrou barvou jsou označeny klíčící rostliny kultivované na médiu s přídatkem 4 $\mu\text{M}$ $\text{CdCl}_2$ a zelenou barvou jsou vyneseny klíčící rostliny, které byly kultivovány na médiu v přítomnosti 4 $\mu\text{M}$ $\text{CdSO}_4$ .....	25

## 9.2 Tabulky

Tab. 1: Rozpis reakčního programu TRAP .....	16
Tab. 2: Rozpis reakčního programu qTRAP .....	18

## 9.3 Grafy

Graf 1: Kvantitativní analýza aktivity telomerázy ve čtyřdenních klíčcích rostlinách A. thaliana kultivovaných na kontrolním médiu a v přítomnosti 50 $\mu\text{M}$ $\text{CdCl}_2$ a $\text{CdSO}_4$ .....	22
Graf 2: Kvantitativní analýza aktivity telomerázy v sedmidenních klíčcích rostlinách A. thaliana kultivovaných na kontrolním médiu (CTR) a v přítomnosti 50 $\mu\text{M}$ $\text{CdCl}_2$ a $\text{CdSO}_4$ : R – relativní aktivita telomerázy udávaná v % a vztažená na rostliny kultivované na kontrolním médiu (100% aktivita enzymu). Statistické vyhodnocení viz kapitola 3.2.6. $p < 0,05$ vůči kontrole je v grafu zaznamenán jako * a $p < 0,01$ je v grafu zaznamenán jako **. Počet analyzovaných biologických replik $n = 3$ .....	23
Graf 3: Kvantitativní analýza aktivity telomerázy ve čtyřdenních klíčcích rostlinách A. thaliana kultivovaných na kontrolním médiu (CTR) a v přítomnosti 4 $\mu\text{M}$ $\text{CdCl}_2$ a $\text{CdSO}_4$ : R – relativní aktivita telomerázy udávaná v % a vztažená na rostliny kultivované na kontrolním médiu (100% aktivita enzymu). Statistické vyhodnocení viz kapitola 3.2.6. $p < 0,05$ vůči kontrole je v grafu zaznamenán jako *. Počet analyzovaných biologických replik $n = 3$ . .....	24
Graf 4: Kvantitativní analýza aktivity telomerázy v sedmidenních klíčcích rostlinách A. thaliana kultivovaných na kontrolním médiu (CTR) a v přítomnosti 4 $\mu\text{M}$ $\text{CdCl}_2$ a $\text{CdSO}_4$ : R – relativní aktivita telomerázy udávaná v % a vztažená na rostliny kultivované na kontrolním médiu (100% aktivita enzymu). Statistické vyhodnocení viz kapitola 3.2.6. $p < 0,01$ je v grafu zaznamenán jako **. Počet analyzovaných biologických replik $n = 3$ . ....	25