

- Sauerbrey, G.Z. 1959. - Z. Phys. **155**: 206.
 Skládal, P. 1995. - Chem. Listy **89**: 170.
 Storri S., Santoni, T., Minnuni M., Mascini M.
 1998. - Biosens. Bioelectron. **13**: 347.
 Tombelli S., Mascini M., Turner A.P.F. 2002.
 - Biosens. Bioelectron. **17**: 929.

Poděkování. Práce byla financována granty GAČR 204/02/0734, IGA MZ NC/7574 – 3 a Z 5004920.

Studium alternativních rostlinných telomer

ZUZANA KUNICKÁ

Laboratoř analýzy biologicky významných molekulových komplexů, Masarykova Univerzita v Brně, Královopolská 135, 612 65 Brno, (tel.: 541 517 151, kunicka@ibp.cz)

Úvod

Telomery jsou nukleoproteinové struktury na koncích lineárních eukaryotických chromosomů, které mimo jiné chrání chromosomy před účinky nukleas nebo před jejich vzájemnou fúzí při vzniku chromosomálních zlomů. Jsou tvořeny vysoce konzervativními repetitivními sekvencemi, které jsou specifické pro různé typy organismů a zároveň společné pro skupinu organismů (Biessmann a Mason 1994). Typickým zástupcem na poli rostlinném je *Arabidopsis thaliana*, jejíž telomery jsou složeny ze sedminukleotidové repetice (TTTAGGG)_n.

Telomerová DNA je syntetizována pomocí enzymu zvaného telomerasa, který se váže na 3'-jednořetězcový přesah chromosomového konce, k němuž přidává další telomerové repetice. Tímto mechanismem řeší eukaryotické buňky problém replikace konců lineárních chromosomů. Telomerasa je ribonukleoproteinová reverzní transkriptasa, skládající se ze dvou podjednotek - RNA podjednotky, která obsahuje templátovou oblast pro syntézu telomer, a katalytické proteinové podjednotky TERT (*telomerase reverse transcriptase*), přičemž pro její enzymatickou činnost je nutná přítomnost obou podjednotek.

Hlavním rostlinným telomerovým motivem je repetice (TTTAGGG)_n, v poslední době byly v genomech některých rostlin kromě těchto typických telomerických sekvencí popsány i jiné typy (např. lidský, *Tetrahymena*) (Sýkorová *et al.* 2003). Většina těchto poznatků byla dosud získávána pomocí Southernovy hybridizace nebo fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Tyto metody nejsou dostatečně přesné k zodpovězení otázek, jestli jde o důsledek evolučního procesu, zda je v těchto rostlinách přítomna telomerasa, syntetizující odlišné telomerové sekvence, event. zda se u těchto rostlin nevyskytuje více telomeras vedle sebe. Na tyto otázky lze odpovědět pomocí metody TRAP (*telomere repeat amplification protocol*) používané pro stanovení aktivity telomerasy v lidských buňkách (Kim *et al.* 1994). Zatímco v tomto případě jde o takřka „rutinní“ záležitost, stanovení aktivity telomerasy v rostlinách je variabilnější a stále zde „číhají“ mnohá úskalí.

Ačkoli je dnes již jasné, že mnohé rostliny s „netypickými“ telomerami pouze zaměnily *Arabidopsis*-typ telomerické sekvence za lidský typ, stále existují a objevují se i další

rostlinné druhy, u kterých se nevyskytuje rostlinný ani jiný podobný minisatelitní telomerový motiv. První objevenou výjimkou byla *Allium cepa* (Pich *et al.* 1996) a doposud není jisté, čím jsou tvořeny konce jejích chromosomů a jakým způsobem řeší konco vě-replikační problém.

Hlavním úkolem plynoucím z těchto poznatků je zjistit, jestli je v buňkách *Allium cepa* obsažena rostlinná telomerasa nebo jiný typ, který by syntetizoval odlišné telomerové sekvence.

Metoda

Stanovení aktivity telomerasy v rostlinách se provádí pomocí modifikované verze TRAP (Fitzgerald *et al.* 1996), která byla původně vytvořena pro stanovení aktivity telomerasy v lidských buňkách. Telomerasa nemá striktní sekvenční požadavky a je schopná prodlužovat i oligonukleotidy, které nemají zjevnou homologii s telomerovými repeticemi. Této skutečnosti se využívá právě v pokusech *in vitro*, kde se jako substrát používají syntetické oligonukleotidy.

V první fázi jsou na substrátový netelomerický oligonukleotid telomerasou postupně přisyntetizovávány telomerové repetice a v druhé se pomocí klasické PCR amplifikují produkty přidáním reversního primeru s telomerickou sekvencí. Produkty PCR jsou detegovány pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy (PAGE), přičemž vzniká charakteristický žebřík produktů lišících se o sedm páru bází, tedy jednu rostlinnou telomerovou repetici.

Přístrojové vybavení

Termocyklér, stolní centrifuga, zařízení pro polyakrylamidovou gelovou elektroforézu, fluorescenční detektor, software pro analýzu dat získaných z detektoru.

Pracovní postup

Příprava telomerasového extraktu (Fitzgerald *et al.* 1996) z dělivých pletiv rostliny (kořínky, kořenové špičky..).

Stanovení koncentrace proteinů (Bradford 1976).

Samotná TRAP se skládá ze dvou kroků: první fáze - extenze, probíhá 45 minut při 26 °C.

Reakční směs obsahuje 46 µl TRAP pufru (Fitzgerald *et al.* 1996), 10 pmol denaturovaného substrátového oligonukleotidu a 5 - 500 ng celkového proteinového extraktu. Po prvním kroku se směs zahřeje 10 minut na 95 °C a po ochlazení na 80 °C se přidá do každé reakce směs obsahující 2 jednotky termostabilní DNA polymerasy (např. *Dynazyme II* DNA polymerase (Finnzymes)) a 10 pmol reversního primeru. Doba této fáze je obvykle úměrná počtu PCR reakcí - asi 5 až 10 minut. Poté jsou amplifikovány produkty reakce v 35 cyklech: 95 °C/30 s, 65 °C/30 s, 72 °C/30 s a na závěr následuje konečná extenze 10 minut při 72 °C.

Separace produktů probíhá pomocí gelové elektroforézy na 12,5 % polyakrylamidovém gelu.

Produkty jsou obarveny Sybr Greenem (Molecular Probes) a následně měřeny na STORM PhosphoFluorImager.

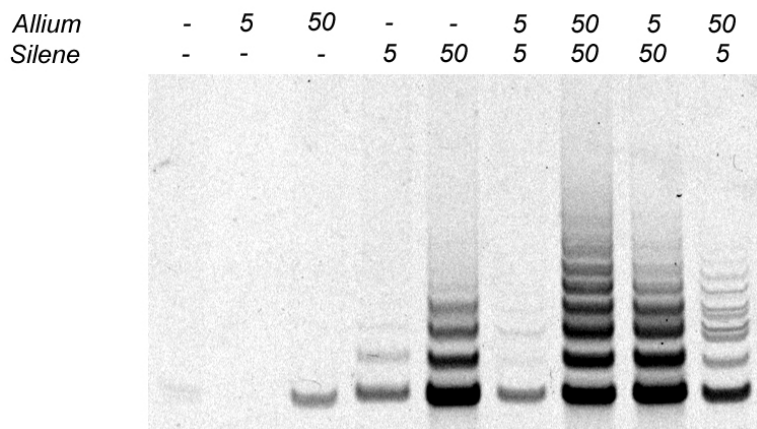
Výsledky TRAP

V první řadě byly provedeny pokusy detegovat rostlinnou telomerasu v *Allium cepa*. V klasickém uspořádání pokusu s rostlinným reversním primerem nebyl získán žádný produkt indikující přítomnost telomerasové aktivity v cibuli. Protože je známa různá preference pro substrátové primery telomerasou různých rostlin (Fitzgerald *et al.* 1996), pokus byl dále modifikován použitím několika různých substrátových primerů. Po získání dalších negativních výsledků bylo nutné zjistit, jestli cibulový extrakt neobsahuje inhibitory telomerasy. V pokusu, kdy se směšoval cibulový proteinový extrakt s telomerasa-pozitivním extraktem ze *Silene latifolia* (viz. obr. 1; čísla udávají koncentraci proteinového extraktu v reakci) bylo prokázáno, že extrakt cibule telomerasu *S. latifolia* neinhibuje, naopak, její aktivita mírně narůstá.

Protože některé rostlinné genomy neobsahují pouze rostlinný telomerový motiv, bylo nutné rozšířit spektrum vyšetřovaných telomerických sekvencí. Použitím sekvenčně specifických reversních primerů pro různé typy telomerických sekvencí (lidský, *Chlamydomonas*, *Tetrahymena*) bylo zjištěno, že v cibulovém extraktu se nenachází telomerasa, která by syntetizovala telomerovou sekvenci žádného z těchto typů. Otázka mechanismu replikace konců chromosomů *Allium cepa* tedy zůstává stále nezodpovězena.

I přes to, že u *Allium cepa* nebyla detegována telomerasová aktivita, díky této „anomálii“ se podařilo vyzkoušet velké množství substrátových a reversních primerů, které mohou být následně využity při výzkumu na dalších rostlinách, především těch, které ve svém genomu obsahují několik variant telomerových sekvencí. Dalším pozitivem je optimalizace rostlinné TRAP a minimalizace chyb.

Časová náročnost metody není vysoká; jedna série stanovení trvá včetně vyhodnocení dva dny.



Obr. 1. Konečný výstup po provedení rostlinné TRAP - typický heptanukleotidový žebříček.

Úskalí metody

Je důležité brát zřetel na nebezpečí kontaminace reakce PCR produkty, které mohou tvořit falešně-pozitivní výsledky. Díky negativní kontrole (samotný extrakční pufr) zařazené do každé PCR řady, můžeme zjistit zda nedochází například k řetězení primerů.

Může docházet i k falešné negativitě v důsledku působení inhibitorů telomerasy nebo degradace proteinů, proto je nutné zařadit kromě negativní kontroly do každé série stanovení i pozitivní kontrolu (proteinový extrakt s telomerasovou aktivitou).

Je nutné používat špičky s filtrem z důvodu možných kontaminací především v kroku přidávání směsi polymerasy a reversního primeru do reakce.

Telomerasový extrakt je velmi citlivý na teplotu, zejména na opakované zmrazování a rozmrazování, po několika použitích aktivita telomerasy v extraktu klesá, proto je vhodné rozdělit zásobní roztok do více alikvotů a z nich potom naředit několik pracovních roztoků o požadované koncentraci proteinů.

Srovnání s alternativními metodami

Telomerasu lze v rostlinách detegovat také přímo (Fajkus *et al.* 1996), tato metoda má ale oproti TRAP více nevýhod, především je pro praktické účely málo citlivá a je nutná velká spotřeba isotopu. Výhodou je ovšem absence artefaktů, které mohou vzniknout při PCR kroku TRAP.

Aktivita telomerasy metodou TRAP byla také původně stanovována radioaktivně, její neradioaktivní modifikace byla poprvé použita BFÚ AV ČR (Ríha *et al.* 1998). Její velkou výhodou je snadná detekce telomerasových produktů a odpadá práce s isotopy.

Literatura

- Biessmann, H., Mason, J.M. 1994. - Chromosoma **103**: 154.
- Fajkus, J., Kovařík, A., Královics, R. 1996. - FEBS Lett. **391**: 307.
- Fitzgerald, M.S., McKnight, T.D., Shippen, D.E. 1996. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 14 422.
- Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L.C., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L., Shay, J.W. 1994. - Science **266**: 2911.
- Pich, U., Fuchs, J., Schubert, I. 1996. - Chromosome Res. **4**: 207.
- Ríha, K., Fajkus, J., Siroky, J., Vyskot, B. 1998. - Plant Cell **10**: 1691.
- Sýkorová, E., Lim, K.Y., Kunická, Z., Chase, M.W., Bennett, M.D., Fajkus, J., Leitch, A.R. 2003. - Proc. R. Soc. Lond. B. In press.

Poděkování. Tato práce byla podporována prostředky z Výzkumného záměru MŠMT (MSM143100008) a GA ČR (grant 204/02/0027).