

Přírodovědecká fakulta
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích



Rigorózní práce – zkrácená verze

Telomery a fylogeneze živočichů

Magda Vítková

Školitel: František Marec

Biologické centrum AVČR, Entomologický ústav, oddělení genetiky
Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Česká republika

České Budějovice 2007

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou disertační práci vypracovala sama jen s pomocí citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb v platném znění souhlasím se zveřejněním své disertační práce, a to ve zkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.



České Budějovice, 9.12. 2007

Magda Vítková

Vítková M, 2007: Telomery a fylogeneze živočichů. Rigorózní práce, 32 stran, Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.

Annotation

Telomeres are DNA-protein structures at the ends of chromosomes of eukaryotic organisms. In most species, they are composed of short tandem repeats. To date only four telomere sequence motifs were discovered in plants and animals. Phylogenetic distribution of the presumably “insect” and “vertebrate” motifs were studied in representative sample of the animal phyla. In Vítková et al. (2005) we proved that the “insect” motif was ancestral for the whole Arthropoda; in Traut et al. (2007) the “vertebrate” motif was identified as ancestral for the superclade including all Metazoa and Choanozoa.

Anotace

Telomery jsou DNA-proteinové struktury na koncích chromosomů eukaryotních organismů. U většiny druhů jsou složeny z krátkých tandemových repetit. U rostlin a živočichů byly dosud objeveny pouze čtyři motivy těchto telomerických sekvencí. Fylogenetická distribuce původně „hmyzího“ a „obratlovčího“ motivu byla studována u vybraných zástupců živočišných kmenů. V publikaci Vítková a kol. (2005) jsme dokázali, že „hmyzí“ motiv je původní pro celou skupinu Arthropoda; v Traut a kol. (2007) pak, že „obratlovčí“ motiv je ancestrální pro supertaxon zahrnující Metazoa a Choanozoa.

Finanční podpora

Tato práce byla financována granty a výzkumnými záměry (grant 206/06/1860, grant 206/00/0750, výzkumný záměr Z50070508, Z5007907 a K5052113).

Poděkování

Děkuji svému školiteli Františku Marecovi za to, že mě přivedl k telomerám, za „vědeckou výchovu“ a velice svobodné a tvůrčí prostředí. Děkuji Janu Zrzavému za cenné připomínky k rukopisu této práce a nekonečnou trpělivost během fylogenetických konzultací. Chtěla bych poděkovat přátelům a kolegům z laboratoře za výbornou atmosféru. Nakonec bych chtěla poděkovat své rodině za lásku, podporu a důvěru.

Prohlášení o autorském podílu Magdy Vítkové na uvedených originálních publikacích

Publikace 1: The evolutionary origin of insect telomeric repeats, (TTAGG)_n

Magda Vítková, Jiří Král, Walther Traut, Jan Zrzavý, František Marec
Chromosome Research **13**: 145-56 (2005)

Prohlašuji, že Magda Vítková měla rozhodující podíl na této publikaci. Připravila chromosomální preparáty z nehmyzích zástupců skupiny Hexapoda, stonožkovců (Myriopoda) a části klepítkačů (Chelicerata). Připravila telomerické sondy a provedla fluorescenční *in situ* hybridizaci na chromosomálních preparátech i Southernovu hybridizaci na genomové DNA všech druhů, zahrnutých v této studii, včetně dokumentace výsledků. Podílela se též na přípravě manuskriptu.

Publikace 2: The telomere repeat motif of basal Metazoa

Walther Traut, Monika Szczepanowski, Magda Vítková, Christian Opitz, František Marec, Jan Zrzavý
Chromosome Research **15**: 371-82 (2007)

Prohlašuji, že se Magda Vítková významně podílela na této práci. Izolovala genomovou DNA většiny druhů zahrnutých v této studii a provedla Southernovu hybridizaci genomových DNA s telomerickými sondami, včetně dokumentace výsledků. Podílela se i na přípravě manuskriptu.



František Marec
školitel

Obsah

1	Úvod	1
1.1	Co jsou telomery	1
1.2	Typy sekvencí telomerické DNA.....	1
1.3	Původ a distribuce „hmyzí“ telomerické sekvence (TTAGG) _n	1
2	Originální publikace	3
2.1	Kapitola 1: The evolutionary origin of insect telomeric repeats, (TTAGG) _n - abstrakt	3
2.2	Kapitola 2: The telomere repeat motif of basal Metazoa - abstrakt.....	4
3	Výsledky a diskuse	5
3.1	Původ „hmyzí“ telomerické sekvence (TTAGG) _n	5
3.2	(TTAGGG) _n - ancestrální telomerická sekvence mnohobuněčných živočichů	5
3.3	Telomerické motivy jako fylogenetický znak.....	6
4	Literatura	7

1 Úvod

1.1 Co jsou telomery

Telomery jsou DNA-proteinové struktury na koncích lineárních chromosomů eukaryotních organismů. Pro chromosomy i celý organismus jsou nepostradatelné z mnoha důvodů. Jejich přítomnost brání spojování konců chromosomů (McClintock 1939) a umožňuje reparačním mechanismům buňky odlišit přirozené konce chromosomů od dvouřetězcových zlomů DNA (Gottschling a Zakian 1986). Telomery řeší problém replikace DNA, který vede ke zkrácení vlákna DNA během každé její syntézy (Zakian 1995). Zároveň délka telomer slouží mnohobuněčným organismům k odměřování počtu buněčných dělení, která již konkrétní buňka absolvovala (Harley 1991). Konečně telomery napomáhají během meiotické profáze I hledání a spárování homologních chromosomů (Siderakis a Tarsounas 2007).

1.2 Typy sekvencí telomerické DNA

U většiny dosud zkoumaných eukaryotních organismů je telomerická DNA tvořena tandemovými repeticemi s motivem dlouhým 5-7 nukleotidů. Délka repetice se liší nejen u různých druhů, ale může záviset i na stáří jedince, jeho pohlaví a typu tkáně (viz souhrn v Jiang a kol. 2007). Samotný motiv bývá naopak vysoce konzervativní. U rostlin a živočichů byly dosud nalezeny pouze čtyři typy telomerických motivů. Hexamer TTAGGG, objevený u člověka (Moyzis a kol. 1988), byl později nalezen u všech zkoumaných obratlovců a několika skupin bezobratlých (např. Meyne a kol. 1989; Wang a Guo 2001; Plohl a kol. 2002; Vitturi a kol. 2002a,b). Heptamer TTTAGGG byl nalezen u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) a následně u mnoha dalších rostlin (Cox a kol. 1993; Adams a kol. 2001), i když u části rostlinných druhů byla prokázána druhotná změna této sekvence na „obratlovčí“ motiv TTAGGG (Fajkus a kol. 2005). Pentamer TTAGG byl prokázán u několika druhů hmyzu a korýšů (Okazaki a kol. 1993; Klapper a kol. 1998; Sahara a kol. 1999). Hexamer TTAGGC byl potvrzen u všech dosud zkoumaných hlístic (Nematoda) (Muller a kol. 1991; Niedermaier a Moritz 2000; Ahn a Winter 2006).

1.3 Původ a distribuce „hmyzí“ telomerické sekvence (TTAGG)_n

Poté, co Okazaki a kol. (1993) publikovali objev sekvence TTAGG u bource morušového (*Bombyx mori*) (Lepidoptera), byla tato sekvence prokázána u několika dalších druhů hmyzu a korýšů (Klapper a kol. 1998; Sahara a kol. 1999). Zároveň se ukázalo, že u jiných druhů hmyzu chybí a nebyla přítomna ani u pavouka *Tegenaria ferruginea* (Araneae). Nestabilita „hmyzí“ telomerické sekvence nás vedla k zmapování jejího výskytu v rámci skupiny Insecta. V práci Frydrychová a kol. (2004) jsme

testovali 22 druhů z 20 řádů. K tomuto účelu jsme použili tři nezávislé metody: Southernovu hybridizaci celogenomové DNA s telomerickou sondou, fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH) telomerické sondy na chromosomy zkoumaných druhů a konečně amplifikaci telomerické DNA z celogenomové DNA pomocí polymerázové řetězové reakce s jedním primerem (single-primer PCR). Ukázalo se, že motiv TTAGG je přítomen u 15 druhů, u zbývajících 7 chybí. Druhy s telomerickou sekvencí (TTAGG)_n i druhy, u kterých tato sekvence přítomna nebyla, byly distribuovány napříč skupinou Insecta, což svědčilo o její pravděpodobné druhotné ztrátě u některých řádů. Extrémem byl řád brouci (Coleoptera), kde se druhy v přítomnosti či absenci motivu lišily i v rámci čeledi (Frydrychová a Marec 2002). Protože sekvence (TTAGG)_n byla přítomna u obou zkoumaných zástupců primitivního bezkřídlého hmyzu a už dříve byla prokázána u dvou korýšů, usoudili jsme, že jde o původní telomerickou sekvenci minimálně pro hmyz. Pátrání po evolučním původu této sekvence bylo předmětem práce Vítková a kol. (2005), která je uvedena v kapitole 1. Hledání ancestrální telomerické sekvence mnohobuněčných živočichů (Metazoa) pak bylo náplní práce Traut a kol. (2007) v kapitole 2.

2 Originální publikace

2.1 Kapitola 1

The evolutionary origin of insect telomeric repeats, (TTAGG)_n

Magda Vítková, Jiří Král, Walther Traut, Jan Zrzavý, František Marec

Chromosome Research **13**: 145-56 (2005)

Publikace obsažená v této kapitole je předmětem autorského práva časopisu *Chromosome Research*, proto zde uvádím pouze veřejně přístupný abstrakt práce. Plné znění publikace je k dispozici v tištěné verzi této rigorózní práce, která je umístěna ve Společné knihovně Biologického centra AV ČR a Přírodovědecké fakulty JU, Branišovská 31, České Budějovice, 370 05.

Abstrakt

The (TTAGG)_n sequence is supposed to be an ancestral DNA motif of telomeres in insects. Here we examined the occurrence of TTAGG telomeric repeats in other arthropods and their close relatives by Southern hybridization of genomic DNAs and fluorescence in-situ hybridization (FISH) of chromosomes with (TTAGG)_n probes or, alternatively, with the 'vertebrate' telomeric probe, (TTAGGG)_n. Our results show that the (TTAGG)_n motif is conserved in entognathous hexapods (Diplura and Collembola), crustaceans (Malacostraca, Branchiura, Pentastomida, and Branchiopoda), myriapods (Diplopoda and Chilopoda), pycnogonids, and most chelicerates (Palpigradi, Amblypygi, Acari, Opiliones, Scorpiones, Pseudoscorpiones, and Solifugae) but not in spiders (Araneae). The presence of TTAGG repeats in these groups suggests that the sequence is an ancestral motif of telomeres not only in insects but in Arthropoda. We failed, however, to detect the TTAGG repeats in close relatives of the arthropods, Tardigrada and Onychophora. But while Onychophora had the 'vertebrate' (TTAGGG)_n motif instead, the Tardigrada did not. The (TTAGG)_n motif probably evolved from the (TTAGGG)_n motif. Based on our and compiled data, we presume that the 'vertebrate' motif (TTAGGG)_n is an ancestral motif of telomeres in bilaterian animals and possibly also in the superclade including animals, fungi and amoebozoans.

Kapitola 2

The telomere repeat motif of basal Metazoa

Walther Traut, Monika Szczepanowski, Magda Vítková, Christian Opitz, František Marec, Jan Zrzavý

Chromosome Research **15**: 371-82 (2007)

Publikace obsažená v této kapitole je předmětem autorského práva časopisu *Chromosome Research*, proto zde uvádím pouze veřejně přístupný abstrakt práce. Plné znění publikace je k dispozici v tištěné verzi této rigorózní práce, která je umístěna ve Společné knihovně Biologického centra AV ČR a Přírodovědecké fakulty JU, Branišovská 31, České Budějovice, 370 05.

Abstrakt

In most eukaryotes the telomeres consist of short DNA tandem repeats and associated proteins. Telomeric repeats are added to the chromosome ends by telomerase, a specialized reverse transcriptase. We examined telomerase activity and telomere repeat sequences in representatives of basal metazoan groups. Our results show that the 'vertebrate' telomere motif (TTAGGG)(n) is present in all basal metazoan groups, i.e. sponges, Cnidaria, Ctenophora, and Placozoa, and also in the unicellular metazoan sister group, the Choanozoa. Thus it can be considered the ancestral telomere repeat motif of Metazoa. It has been conserved from the metazoan radiation in most animal phylogenetic lineages, and replaced by other motifs-according to our present knowledge-only in two major lineages, Arthropoda and Nematoda.

3 Výsledky a diskuse

3.1 Původ „hmyzí“ telomerické sekvence (TTAGG)_n

V práci Vítková a kol. (2005) se nám podařilo prokázat, že „hmyzí“ telomerický motiv je společný i korýšům (Crustacea), stonožkvcům (Myriapoda), klepítkačům (Chelicerata) a nohatkám (Pycnogonida). Sekvence (TTAGG)_n paradoxně chyběla pouze u pavouků, tedy jediné skupiny klepítkačů, která byla testována v předchozích pracích. Původně „hmyzí“ telomerická sekvence se ukázala být ancestrální sekvencí všech členovců (Arthropoda). To, zda její původ nesahá ještě hlouběji do dalších skupin, jsme testovali na dvou skupinách členovců blízké příbuzných: drápkovcích (Onychophora) a želvuškách (Tardigrada). Ani u jedné skupiny se nám nepodařilo nalézt tuto nyní již „členovčí“ telomerickou sekvenci (TTAGG)_n, avšak u drápkovců jsme prokázali „obratlovčí“ sekvenci (TTAGGG)_n, která ale u želvušek přítomna nebyla. „Obratlovčí“ sekvence se vyskytuje u všech testovaných druhoústých živočichů (Echinodermata, Cephalochordata, Urochordata, Vertebrata) i u většiny prvoústých (Annelida, Mollusca, Platyhelminthes, Rotifera, Onychophora). Na základě těchto výsledků je zřejmé, že se „členovčí“ telomerická sekvence (TTAGG)_n zřejmě vyvinula z „obratlovčí“ sekvence (TTAGGG)_n. Podle informací z literatury jsme vyslovili hypotézu, že motiv (TTAGGG)_n by mohl být ancestrálním telomerickým motivem mnohobuněčných živočichů (Metazoa) a zároveň i supertaxonu Unikonta zahrnujícího živočichy, houby a Amoebozoa.

Kromě důkazu původu telomerické sekvence (TTAGG)_n z této práce vyplynuly další fylogeneticky zajímavé informace. Přítomnost „členovčí“ telomerické sekvence v genomu jazyčnatků (Pentastomida) silně podpořila jejich zařazení mezi členovce (patrně dovnitř korýšů), což bylo některými paleontology zpochybňováno (Waloszek a kol. 2005). Naopak její absence u drápkovců představuje silný argument, že drápkovci nejsou modifikovaní členovci (Mayer a Harsz 2007, Strausfeld a kol. 2006b), jak v poslední době naznačují některé neuroanatomické práce (Strausfeld a kol. 2006a).

3.2 (TTAGGG)_n - ancestrální telomerická sekvence mnohobuněčných živočichů

Hledání ancestrální telomerické sekvence mnohobuněčných živočichů (Metazoa) bylo náplní práce Traut a kol. (2007), uvedené v kapitole 2. „Obratlovčí“ sekvenci (TTAGGG)_n jsme našli u všech bazálních skupin mnohobuněčných živočichů, tedy vložkvců (Placozoa), houbovců (Porifera), žahavců (Cnidaria) a žebernatků (Ctenophora). Sekvence byla přítomna i u sesterské skupiny mnohobuněčných živočichů, jednobuněčných trubének (Choanozoa). Je tedy původní minimálně pro Holozoa, společný taxon zahrnující Metazoa a Choanozoa (Lang a kol 2002). Rekonstrukce původní telomerické sekvence všech eukaryot vyžaduje další analýzy, ale bývalý „obratlovčí“ motiv je zatím nejpravděpodobnějším kandidátem.

3.3 Telomerické motivy jako fylogenetický znak

Distribuce motivů telomerických znaků ukazuje na jejich neuvěřitelnou evoluční konzervativnost. Sekvence (TTTAGGG)_n je vysoce konzervovaná v rostlinné říši (Cox a kol. 1993, Fuchs a Schubert 1996) a sekvenci (TTAGGG)_n mají jednobuněčné trubénky, primitivní mnohobuněční živočichové i obratlovci. Výjimečně byly tyto sekvence nahrazeny alternativními motivy jako u části chřestotvarých rostlin (Asparagales), u hlístic a členovců, nebo zcela odlišnými mechanismy udržování telomer, které byly objeveny u drozofily (Levis a kol. 1993), pakomárů rodu *Chironomus* (Cohn a Edström 1992), komára *Anopheles gambiae* (Roth a kol. 1997) či cibule (*Allium cepa*) (Pich a Schubert 1996). Taková homogenita silně omezuje využití telomerických motivů jako fylogenetického znaku na výjimečné případy typu jazýčnatek a drápkovců, ale o to větší mají váhu v případech, kde fylogenetickou informaci nesou.

4 Literatura

- Adams SP, Hartman TPV, Lim KY, Chase MW, Bennett MD, Leitch IJ, Leitch AR (2001) Loss and recovery of *Arabidopsis*-type telomere repeats sequences 5'-(TTAGGG)_n-3' in the evolution of a major radiation of flowering plants. *P Roy Soc Lond B Bio* **268**: 1541-1546.
- Ahn IY, Winter CE (2006) The genome of *Oscheius tipulae*: determination of size, complexity, and structure by DNA reassociation using fluorescent dye. *Genome* **49**: 1007-1015.
- Cohn M, Edström JE (1992) Telomere-associated repeats in *Chironomus* form discrete subfamilies generated by gene conversion. *J Mol Evol* **35**: 114-122.
- Cox AV, Bennett ST, Parokonny AS, Kenton A, Callimassia MA, Bennett MD (1993) Comparison of plant telomere locations using a PCR-generated synthetic probe. *Ann Bot-London* **72**: 239-247.
- Fajkus J, Sykorova E, Leitch AR (2005) Telomeres in evolution and evolution of telomeres, *Chromosome Res* **13**: 469-479.
- Frydrychová R, Grossmann P, Trubač P, Vítková M, Marec F (2004) Phylogenetic distribution of TTAGG telomeric repeats in insects. *Genome* **47**: 163-178.
- Frydrychová R, Marec F (2002) Repeated losses of TTAGG telomere repeats in evolution of beetles (Coleoptera). *Genetica* **115**: 179-187.
- Fuchs J, Schubert I (1996) Arabidopsis-type telomere sequences on chromosome termini of *Selaginella martensii* Spring (Pteridophyta). *Biologisches Zentralblatt* **115**: 260-265.
- Gottschling DE, Zakian VA (1986) Telomere proteins - specific recognition and protection of the natural termini of *Oxytricha* maxronuclear DNA. *Cell* **47**: 195-205.
- Harley CB (1991) Telomere loss - mitotic clock or genetic time bomb. *Mutat Res* **256**: 271-282.
- Jiang H, Ju Z, Rudolph KL (2007) Telomere shortening and ageing. *Z Gerontol Geriatr* **40**: 314-324.
- Klapper W, Kühne K, Singh KK, Heidorn K, Parwaresch R, Krupp G (1998) Longevity of lobsters is linked to ubiquitous telomerase expression. *FEBS Letters* **439**: 143-146.
- Lang BF, O'Kelly C, Nerad T, Gray MW, Burger G (2002) The closest unicellular relatives of animals. *Curr Biol* **12**: 1773-1778.
- Levis RW, Ganesan R, Houtchens K, Tolar LA, Sheen FM (1993) Transposomes in-place of telomeric repeats at a *Drosophila* telomere. *Cell* **75**: 1083-1093.
- Mayer G, Harzsch S (2007) Immunolocalization of serotonin in Onychophora argues against segmental ganglia being an ancestral feature of arthropods. *BMC Evol Biol* **7**: 118.
- McClintock (1939), citováno v Zakian VA (1995) Telomeres: Beginning to understand the end. *Science* **270**: 1601-1607.
- Meyne J, Ratliff RL, Moyzis RK (1989) Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *P Natl Acad Sci USA* **86**: 7049-7053.
- Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu JR (1988) A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *P Natl Acad Sci USA* **85**: 6622-6626.
- Muller F, Wicky C, Spicher A, Tobler H (1991) New telomere formation after developmentally regulated chromosomal breakage during the process of chromatin diminution in *Ascaris lumbricoides*. *Cell* **67**: 815-822.

- Niedermaier J, Moritz KB (2000) Organization and dynamics of satellite and telomere DNAs in *Ascaris*: implications for formation and programmed breakdown of compound chromosomes. *Chromosoma* **109**: 439-452.
- Okazaki S, Tsuchida K, Maekawa H, Ischikawa H, Fujiwara H (1993) Identification of pentanucleotide telomeric sequence, (TTAGG)_n, in the silkworm *Bombyx mori* and in other insects. *Mol Cell Biol* **13**: 1424-1432.
- Pich U, Schubert I (1998) Terminal heterochromatin and alternative telomeric sequences in *Allium cepa*. *Chromosome Res* **6**: 315-321.
- Plohl M, Prats E, Martínez-Lage A, González-Tizon A, Méndez J, Cornudella L (2002) Telomeric localization of the vertebrate-type hexamer repeat (TTAGGG)_n in the wedgeshell clam *Donax trunculus* and other marine invertebrate genomes. *J Biol Chem* **277**: 19839-19846.
- Roth ChW, Kobelski F, Walter MF, Biessmann H (1997) Chromosome end elongation by recombination in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Mol Cell Biol* **17**: 5176-5183.
- Sahara K, Marec F, Traut W (1999) TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. *Chromosome Res* **7**: 449-460.
- Siderakis M, Tarsounas M (2007) Telomere regulation and function during meiosis. *Chromosome Res* **15**: 667-679.
- Strausfeld NJ, Strausfeld CM, Loesel R, Rowell D, Stowe S (2006a) Arthropod phylogeny: onychophoran brain organization suggests an archaic relationship with a chelicerate stem lineage. *P Roy Soc Lond B Bio* **273**: 1857-1866.
- Strausfeld NJ, Strausfeld CM, Stowe S, Rowell D, Loesel R (2006b) The organization and evolutionary implications of neuropils and their neurons in the brain of the onychophoran *Euperipatoides rowelli*. *Arthropod Struct Dev* **35**: 169-196.
- Vitturi R, Colomba MS, Pirrone A, Libertini A (2002a) Physical mapping of rDNA genes, (TTAGGG)_n telomeric sequence and other karyological features in two earthworms of the family Lumbricidae (Annelida : Oligochaeta). *Heredity* **85**: 203-207.
- Vitturi R, Libertini A, Armetta F, Sparacino L, Colomba MS (2002b) Chromosome analysis and FISH mapping of ribosomal DNA (rDNA), telomeric (TTAGGG)_n and (GATA)_n repeats in the leech *Haemopsis sanguisuga* (L.) (Annelida:Hirudinea). *Genetica* **115**: 189-194.
- Wang Y, Guo X (2001) Chromosomal mapping of vertebrate telomeric sequence (TTAGGG)_n in four bivalve molluscs by fluorescence *in situ* hybridization. *J Shellfish Res* **20**: 1187-1190.
- Waloszek D, Repetski JE, Maas A (2005) A new Late Cambrian pentastomid and a review of the relationships of this parasitic group. *T Roy Soc Edin – Earth* **96**: 163-176.
- Zakian VA (1995) Telomeres: Beginning to understand the end. *Science* **270**: 1601-1607.