

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra genetiky**

**Lokalizace telomerických elementů**  
**u *Drosophila melanogaster***

**Diplomová práce**

**Bc. Iveta Pavlechová**

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

České Budějovice 2015

Pavlechová I., 2015. Lokalizace telomerických elementů u *Drosophila melanogaster*. [Localisation of telomeric elements in *Drosophila melanogaster*. Mgr. Thesis, in Czech] - 33 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Annotation**

Telomeres are nucleoprotein structures at the ends of eukaryotic chromosomes, performing several vital functions. One of the functions is the compensation of telomeric loss resulting from incomplete replication. *Drosophila* telomeres consist of an array of telomeric retroelements *HeT-A*, *TART* and *TAHRE*, that compensate for the telomeric losses by their transposition, targeted to chromosome ends. This study shows that targeting of each of the elements is not strictly specific to any of the telomeres as each telomeric element was observed in all telomeres. Using *Drosophila* lines possessing a different telomere length it has been shown that long telomere length results in more efficient telomere clustering.

Prohlašuji, že svoji magisterskou 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 magisterské 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 10. 11. 2015

.....

Iveta Pavlechová

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své školitelce RNDr. Radmile Čapkové Frydrychové, Ph.D. za pomoc a odborné vedení při psaní diplomové práce, mým kolegům, Tomáši Krůčkovi a hlavně Míše Korandové, za její přátelství a pomoc v každém ohledu. Všem členům laboratoře Franty Marece, především Martině Dalíkové a Petru Nguyenovi, za jejich neskonalou pomoc a poskytnutý materiál. Děkuji přátelům, Martinovi, Irče, Aniče, za to, že mi dodávali sílu a mohla jsem se o ně kdykoliv opřít. Děkuji Matějovi, že mi byl vždy inspirací a stále ve mě věřil. Největší dík patří mé rodině za jejich neutuchající podporu.

# Obsah

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | Úvod.....  | 1  |
| 1.1   | Telomery.....  | 1  |
| 1.2   | Struktura telomer .....  | 1  |
| 1.3   | Kompenzace telomerických ztrát .....                                   | 2  |
| 1.4   | Retrotranspozice .....   | 4  |
| 1.5   | Telomerické elementy .....   | 5  |
| 1.5.1 | Aktivita telomerických elementů .....                                  | 6  |
| 2     | Cíle práce .....   | 8  |
| 3     | Materiál a metody .....  | 9  |
| 3.1   | Použité linie drozofily a jejich chov .....                            | 9  |
| 3.2   | Vyhodnocování počtu kopií elementů pomocí Real-time PCR .....          | 10 |
| 3.3   | Příprava preparátů polytenních chromosomů ze slinných žláz .....       | 11 |
| 3.4   | Příprava hybridizačních sond .....                                     | 11 |
| 3.5   | Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH).....                   | 12 |
| 3.6   | Mikroskopie.....   | 13 |
| 4     | Výsledky .....   | 14 |
| 4.1   | Rozdílné zastoupení elementů v genomu u jednotlivých linií .....       | 14 |
| 4.2   | Vyhodnocení hybridizačních signálů jednotlivých elementů po FISH ..... | 16 |
| 4.2.1 | Element <i>HeT-A</i> .....   | 16 |
| 4.2.2 | Element <i>TART</i> .....  | 16 |
| 4.2.3 | Element <i>TAHRE</i> .....   | 17 |
| 4.3   | Analýza intenzity fluorescenčních signálů.....                         | 20 |
| 4.4   | Telomerické fúze .....   | 22 |
| 5     | Diskuze.....   | 24 |
| 6     | Závěr .....  | 27 |
| 7     | Literatura.....  | 28 |

# 1 Úvod

## 1.1 Telomery

Na všech koncích eukaryotních chromosomů se nachází nukleoproteinové struktury zvané telomery, které mají svou specifickou sekvenci a jsou opatřeny určitými proteiny, nezbytnými pro správné fungování. Celý tento komplex je nepostradatelný pro samotný život buňky, jelikož telomery mají esenciální roli v mnoha buněčných procesech (Chan and Blackburn 2002; von Zglinicki 2002; Cenci et al. 2005) a jsou důležité pro prostorové uspořádání uvnitř jádra (Greider 1996). Přirozené konce chromosomů jsou za pomoci telomerických struktur rozpoznávány od dvouřetězcových zlomů, brání exonukleázovým degradacím a jsou chráněny před chromosomálními fúzemi (McClintock, 1942). Během dělení buňky může vlivem těchto nestabilních fúzovaných chromosomů docházet ke špatnému rozchodu do dceřiných buněk, tím pádem k úbytku genetické informace (Greider and Blackburn 1996). Nezbytné jsou i při procesu kompenzace koncových ztrát DNA v důsledku oxidativního stresu a neschopnosti DNA polymerázy dosyntetizovat dceřiné vlákno na 5' konci (Watson, 1972; Olovnikov, 1973). V buňce se tedy s každým dělením telomery zkracují, neboť dochází ke ztrátám části sekvence na 5' konci. V případě, že v buňce dojde ke zkrácení na určitou kritickou mez (tzv. Hayflickův limit), buňka ztrácí schopnost dělení (Hayflick and Moorhead, 1961; Harley et al. 1990). Tento jev je signálem pro buněčnou senescenci či buněčnou smrt. Různá poškození či změny v telomerách a v kompenzaci jejich ztrát souvisí se vznikem civilizačních onemocnění a významnou měrou se podílí na stárnutí organismu (Ferrón et al. 2009; Lin et al. 2012).

## 1.2 Struktura telomer

Nejčastější formou vyskytující se v eukaryotních chromosomech je telomerická DNA složená z tandemových repetice  $5'-T_{1-4}A_{0-1}G_{1-8}-3'$ , která je ve své podstatě sekvencí nekódující. U eukaryotních organismů se tato sekvence opakuje, vysoké zastoupení guaninu na 3' konci či cytosinu na 5' konci je proměnlivé v závislosti na dané skupině organismů, avšak v rámci taxonomické skupiny je sekvence vysoce konzervovaná (Mason et al. 2008). Na konci 5'-3'řetězce se vytvářejí krátké repetice bohaté na guanin, vznikají zde charakteristické G-kvartery či G:G páry (Williamson et al. 1989). Obratlovčí telomery jsou složeny z hexamerické opakující se sekvence  $(TTAGGG)_n$  (Meyne et al. 1989; Frydrychova

and Marec 2002). Vyšší rostliny pak ve většině případů zachovávají sekvenci (TTTAGGG)<sub>n</sub> (Pich et al. 1996). Telomerická sekvence u hmyzu je mnohdy tvořena repeticí (TTAGG)<sub>n</sub> (Okazaki et al. 1993). V hmyzí říši můžeme nalézt několik odlišností od klasické pentamerické sekvence, a to například u komára *Anopheles gambiae* či pakomára rodu *Chironomus*, jejichž telomery jsou opatřeny dlouhými satelitními sekvencemi (Nielsen and Edstrom 1993). Dalším organismem s odlišným typem telomer je *Drosophila melanogaster*, u které se nacházejí tři retrotransposibilní elementy, tvořící HTT oblast, které se řadí mezi non-LTR retrotransposony (Frydrychova et al. 2008). HTT oblast je napojena na subtelomerickou oblast TAS (telomere associated sequences) (Mason et al. 2008).

Pro celkovou stabilitu telomer, potažmo celého genomu, se na jejím samotném konci nachází tzv. telomerická čepička. Ta je u člověka tvořena shelterinovým komplexem, nazývaným také telosom, který se skládá ze šesti proteinových podjednotek TRF1, TRF2, TIN2, TPP1, POT1 a Rap1 (Diotti and Loayza 2011), a dalších proteinů. Celý komplex má specifickou vazbu právě na telomerickou sekvenci s dostatečnou délkou. U drozofily se nachází obdobný proteinový komplex terminin, jehož složky se však od shelterinu liší (Frydrychova and Mason 2013). Avšak některé ostatní proteiny telomerické čepičky u člověka a drozofily vykazují homologii, například ATM kináza či proteiny účastníci se oprav dvouřetězcových zlomů (Cenci et al. 2003). Nepostradatelnou roli má telomerická čepička při rozpoznávání chromosomálních zlomů od přirozených konců chromosomů, neboť po jejím narušení či výrazném zkrácení telomerické délky dochází vlivem reparačních mechanismů k fúzi těchto konců, při drastickém poškození či zkrácení až k buněčné smrti (Mason et al. 2008; Frydrychova and Mason 2013). V případě drozofily je tomu jinak. Po ztrátě telomery může buňka vykazovat životaschopnost i po mnoho generací. Proteinový komplex terminin se na rozdíl od shelterinového může formovat na jakémkoliv chromosomálním konci. V případě ztráty telomerické sekvence je tak možnost navázání termininu i na konec netelomerický, proto k apoptóze nemusí docházet. Ztráta HTT oblasti byla identifikována u přírodních i laboratorních populací s přežíváním do dalších generací (Mason et al. 1984).

### **1.3 Kompenzace telomerických ztrát**

DNA polymeráza je enzym, který je esenciální při replikaci DNA. Hlavním problémem je její neschopnost plně syntetizovat konce chromosomů, neboť je toho zcela

schopna pouze ve směru 5'-3'. Pro nastartování syntézy je nezbytná přítomnost RNA primeru, který přisedne k templátovému řetězci a právě po jeho zapojení započne syntéza DNA. RNA primery jsou poté degradovány, vznikne tak volné místo v novém řetězci, které nemůže být zpětně dosyntetizováno, nedochází k polymeraci deoxyribonukleotidů, neboť volný G-konec neposkytuje volnou 3'-OH skupinu (Olovnikov, 1973; Levy et al. 1992). V důsledku toho jsou koncové úseky chromosomů zkracovány.

Kompenzace těchto ztrát je řešena několika způsoby, tím nejběžnějším je aktivita enzymu telomerázy, fungující jako reverzní transkriptáza, která se váže na 3' konce, u kterých neproběhla replikace, a doplňuje je. Telomeráza byla poprvé identifikována u nálevníka *Tetrahymena thermophila* (Blackburn and Gall, 1978; Greider and Blackburn, 1985). Tento velký komplex skládající se z RNA a bílkovin obsahuje dvě hlavní podjednotky: TR (Telomerase RNA), nesoucí molekulu RNA, která slouží jako templát (Blasco et al. 1997; Lee et al. 1998; Lee et al. 2008) a TERT (TELomerase Reverse Transcriptase), hlavní činitel reverzní transkripce (Autexier and Lue 2006). Telomeráza není aktivní pouze u telomerické sekvence, ale může svou činností prodloužit i konce netelomerické, a to v průběhu vývojově řízeného chromosomálního léčení nebo po náhodném či uměle vytvořeném chromosomálním poškození (Melek et al. 1996), kdy jsou chromosomy znovu stabilizovány formací nové telomery (McClintock, 1941; Magnenat et al. 1999).

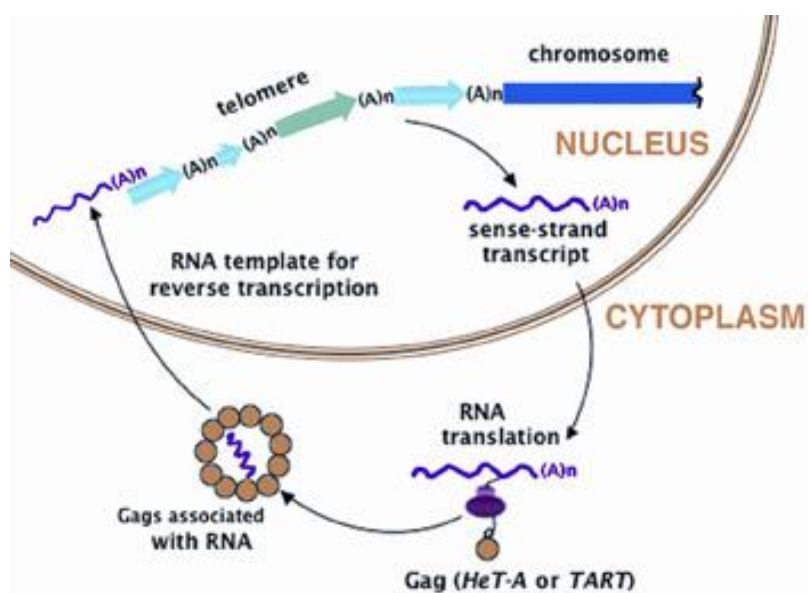
Buňky a jejich funkce mohou být úzce spjaty s mírou aktivity telomerázy. V některých vývojových stádiích somatických buněk je tato aktivita obvykle utlumena. Naopak vysoká aktivita byla zaznamenána v dělicích se zárodečných buňkách, během embryonálního vývoje, a dále pak u proliferačně aktivních či kmenových buněk (Yasumoto et al., 1996; Shay and Bacchetti, 1997). V průběhu nádorového bujení má telomeráza svou nezaměnitelnou roli, neboť i u některých těchto buněk je vysoce aktivní (Harley and Villeponteau, 1995).

Kompenzační mechanismus pomocí telomerázy je hlavním mechanismem u člověka, existují však i jiné, alternativní způsoby, jak ztráty doplnit v návaznosti na chybějící telomerázu nebo jinou skladbu telomerické sekvence. Prodlužování telomer může probíhat tzv. genovou konverzí, při které dochází k výměně úseků sesterských chromatid. Tohoto mechanismu pravděpodobně využívá např. zástupce dvoukřídlého hmyzu *Chironomus pallidivittatus*, jehož telomery jsou složeny z dlouhých repetitivních sekvencí (Rovira et al.

1993; Lopez et al. 1996) a také drozofila (Kahn et al. 2000; Walter et al. 2007), která má telomery složené z retrotransposonových elementů. Avšak genová konverze je zde jen doplňující, hlavním mechanismem kompenzace telomerických ztrát u drozofily je retrotranspozice.

## 1.4 Retrotranspozice

Telomery drozofily mají svou specifickou skladbu. Tvoří ji tři non-LTR retrotransposony (non-long-terminal-repeat retrotransposable elements) *HeT-A*, *TART* (Biessmann et al. 1992) a *TAHRE* (Abad et al. 2004b), tvořící HTT oblast. Kompenzačním mechanismem telomerických ztrát u drozofily je proces transpozice těchto telomerických elementů, a to právě účelově k telomerickým koncům mechanismem „copy and paste“, zkopírování sebe sama a vložení na nové místo.



**Obr. 1.** Proces retrotranspozice u *D. melanogaster* (Pardue and DeBaryshe 2008).

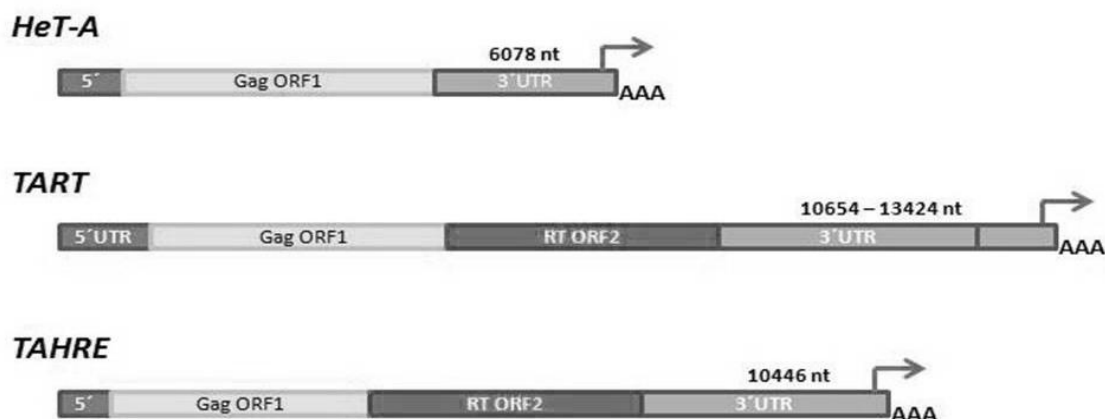
V procesu transpozice nejprve dochází k transkripci elementů v jádře a ty jsou poté odeslány do cytoplasmy přes jaderné póry. Zde za pomoci ribozomů při následné translaci vznikají proteiny. Transkripty jsou opět transportovány zpět do jádra po navázání příslušného proteinu Gag. Vzniklé komplexy se váží na chromosomální konce a za pomoci enzymu reverzní transkriptázy dochází k jejich zpětnému přepisu do DNA (Obr. 1) Pro ochranu telomerické sekvence se na takto vzniklém konci začne formovat telomerická



čepička. Směrování elementů je na chromosomálním konci sekvenčně nezávislé (Danilevskaya et al. 1999; Rashkova et al. 2003).

## 1.5 Telomerické elementy

Telomerické elementy *HeT-A*, *TART* a *TAHRE* tvoří u drozofily tzv. HTT oblast a jsou zde zastoupeny v různém počtu a pořadí, avšak v mnohanásobných kopiích (Pardue and Debaryshe 2000; Abad et al. 2004b; Mason et al. 2008). V mnoha případech jsou tyto elementy nefunkční, jelikož jsou na svém 5' konci zkráceny vlivem nekompletní replikace. Díky náhodnému uspořádání má HTT oblast proměnlivou délku, a to v rozmezí od 26 do 147 kb (Obr. 2). Velmi bohaté zastoupení mají v úsecích elementů adeninové sekvence (Rashkova et al. 2002). V procesu transpozice se cílení jednotlivých elementů jeví jako nezávislé na sekvenci v transpozičním místě (Mason et al. 2008).



Obr. 2. Strukturální uspořádání non-LTR retrotransposonů u *D. melanogaster*.

Zdaleka nejprostudovanějším elementem je *HeT-A*, který je dlouhý 6 kb a má více než 2,5 kb nekódujících sekvencí (Danilevskaya et al. 1997). *HeT-A* byl poprvé identifikován klonováním DNA fragmentu u fága  $\lambda$  XT-A (Young et al. 1983), později byly nalezeny další podskupiny. V jeho struktuře se nachází pouze jeden otevřený čtecí rámec ORF1 (Open reading frame) kódující protein Gag, jež je specificky vázán na transkript při procesu transpozice. Reverzní transkriptáza, která je u ostatních dvou elementů kódována pomocí ORF2, je díky jeho nepřítomnosti v tomto elementu získávána neznámým způsobem, předpokladem pro získání její enzymatické aktivity jsou další dva elementy,

pravděpodobně *TAHRE*, který sdílí sekvenční podobnost s *HeT-A* (Abad et al. 2004b). *HeT-A* element má velmi různorodou délku oligo(A) sekvence, díky níž je připojován na chromosomální konec. Dlouhý 3' netranslatovaný region (UTR) obsahuje promotor, který je zodpovědný za transkripci sousedního elementu, který leží ve směru 3' (Pardue and DeBaryshe 2003). V 5'UTR oblasti se nachází ještě jeden promotor, ten však nemá větších účinků v procesu transkripce a zřejmě je potřebný pro tkáňovou specifitu.

Méně četným telomerickým elementem oproti *HeT-A* je *TART* (telomere-associated retrotransposon) dlouhý 12 kb (Frydrychova et al. 2009). V rámci *D. melanogaster* byly u *TART* elementu popsány tři podskupiny *TART-A*, *TART-B*, *TART-C* (Sheen and Levis, 1994). Nukleotidové sekvence obou ORF jsou z více než 90% podobné u všech tří podskupin, rozdílná je jejich délka ve 3'UTR oblasti (Obr. 2) (Maxwell et al. 2006). Tento element, stejně jako LINE transposony, obsahuje dva čtecí rámce a oproti *HeT-A* kóduje mimo protein Gag i protein Pol, který nese endonukleázovou a RT doménu. U *TART* byly nalezeny „sense“ i „antisense“ RNA (Danilevskaya et al. 1999).

Třetím telomerickým elementem je 11 – 13 kb dlouhý *TAHRE* (Telomere-Associated and *HeT-A*-Related element). Byl nalezen jako poslední, a to *in silico* u telomer-specifických klonů  $y^1$ ;  $cn^1$   $bw^1$   $sp^1$  kmene *D. melanogaster* (Abad et al. 2004a), a jeho přítomnost byla prokázána také u *Drosophila sechellia* (Shpiz et al. 2007). Předpokládá se, že element *TART*, společně s *TAHRE*, je odvozen od společného předka, neboť oba vykazují sekvenční podobnost u ORF1 a ORF2, reverzně-transkriptázové domény, endonukleázové aktivity a kódování Gag a Pol proteinů (Abad et al. 2004a; Shpiz et al. 2007). Na základě sekvenční podobnosti *TAHRE* s *HeT-A* elementem je předpokládáno, že *HeT-A* je odvozen od *TAHRE*, a to buď delecí nebo retrotranspozicí sestřižené subgenomové RNA kódující ORF1. U druhé teorie (sekvenční podobnosti *HeT-A* s *TAHRE*) by mohl být větší předpoklad, neboť retroelementy generují sestřižené RNA kódující Gag a Env-like proteiny, které příležitostně mohou sloužit jako transpoziční meziprodukty (Katsuji et al. 1991). Nabízí se zde také již zmíněný předpoklad pro poskytnutí reverzní transkriptázy z *TAHRE* pro element *HeT-A*.

### 1.5.1 Aktivita telomerických elementů

V průběhu vývoje a v jednotlivých tkáních je aktivita elementů různá, liší se také jejich exprese při normálním vývoji a cílené stimulaci růstu. Transkripční aktivita *HeT-A* a *TART* vzájemně souvisí s buněčnou proliferací, což naznačuje spojení mezi prodlužováním

telomer a regulací buněčného cyklu u drozofily (Walter and Biessmann, 2004). Transkripce elementu *TAHRE* byla prozkoumána později, výsledky však naznačují, že jeho transkripční aktivita má podobné zacílení (Shpiz et al. 2007). Expres telomerických elementů byla potvrzena v zárodečné linii (George and Pardue 2003; Walter and Biessmann 2004; Shpiz et al. 2007). Zatímco *HeT-A* a *TAHRE* byly detekovány v rostoucím embryu v brzkých fázích vývoje, *TART* je distribuován v buňkách až v pozdní fázi oogeneze. Vysoká proliferace *HeT-A* transkriptů v zárodečných buňkách a s tím spojené prodlužování telomer v těchto buňkách se může odrážet v telomerázové aktivitě zárodečné linie u savců (Wright et al. 1996).

## 2 Cíle práce

Tato diplomová práce je zaměřena především na identifikaci a zmapování telomerických non-LTR retrotransposonů ve vztahu k jednotlivým chromosomálním ramenům *Drosophila melanogaster* a na přítomnost telomerických fúzí. Pro studii byly stanoveny tyto dílčí kroky: (1) výběr vhodných linií *D. melanogaster*, tj. linií různého původu, nesoucích rozdílné genetické pozadí či linií, u nichž je obecně předpokládána rozdílná telomerická délka, (2) pomocí kvantitativní Real-time PCR zhodnotit zastoupení jednotlivých elementů v rámci vybraných linií a otestovat jejich počet v genomu (3) navržení a vytvoření fluorescenčně značených sond k telomerickým elementům, (4) u vybraných linií pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace vyhodnotit zastoupení jednotlivých telomerických elementů v ramenech polytenních chromosomů a zjistit případné morfologické změny v oblasti telomer, jako jsou fúze či terminální delece.

## 3 Materiál a metody

### 3.1 Použité linie drozofily a jejich chov

Linie byly chovány na standardním melaso-kukuřičném médiu (163 g kukuřičného šrotu, 33 g sušených kvasnic, 200 ml melasy, 16 g agaru, 2,6 l vody) s desinfekčním roztokem (12 g kyseliny benzoové, 2,5 g kyseliny sorbové, 240 ml denaturovaného etylalkoholu), při teplotě 25°C a nastavené fotoperiodě 16 hod / světlo a 8 hod / tma v inkubátoru s vlhkostí 65 – 70 %.

Byly použity tyto linie:

- $y^1 w^{67c23}$ ;  $Su(var)205^{04}/SM1$ : kmen nesoucí mutaci v genu  $Su(var)205$ , který kóduje heterochromatinový protein 1 (HP1). Mutace zesiluje aktivitu telomerických elementů, čímž dochází k nadměrnému prodloužení telomerické délky (Frydrychova et al. 2008). SM1 (Second Multiple 1 – balancovaný druhý chromosom, homozygotnost je zde letální). Linie byla získána z laboratoře Dr. J.Masona (NIEHS NC, USA).
- $y^1 w^{67c23}$ ; *Gaiano III*: kmen nesoucí mutaci v dosud neidentifikovaném genu a označovanou jako *Tell*. Jedná se o přirozeně vzniklou linii, objevenou v přírodní populaci v Itálii v oblasti Gaiano (Siriaco et al. 2002). Mutace *Tel* vede k nadměrnému prodlužování telomer.
- *35 HeTom*: linie vytvořená na pozadí  $y^1 w^{67c23}$  a obsahující konstrukt *HeTom*, tvořený promotorem elementu *HeT-A* a fluorescenčním proteinem Tomato. Kmen byl vytvořen v naší laboratoři Mgr. Michalou Korandovou (Korandová 2014 – diplomová práce).
- *Ral 161*: inbrední linie divokého typu z přírodní populace (označována také jako DGRP – 161). Kmen byl získán z kmenového centra v Bloomingtonu (Indiana, USA).
- *Oregon R*: divoký typ, chovaný v naší laboratoři po mnoho let.

Mutace  $y^1 w^{67c23}$  (dále v textu jen jako  $yw$ ), která se vyskytuje v některých z použitých kmenů, se týká genu *yellow* (*y*) a genu *white* (*w*).

### 3.2 Vyhodnocování počtu kopií elementů pomocí Real-time PCR

Pro tento pokus bylo využito dospělých jedinců (24 hodin po vylíhnutí zamražení v tekutém dusíku). Následně byla izolována totální RNA za pomoci kitu NucleoSpin RNA II (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, kat. číslo 740955.50). Postup byl proveden dle návodu poskytnutým výrobcem. Koncentrace získané RNA byla změřena pomocí nanodropu (NanoDrop 2000; Thermo Scientific). Využitím kitu (Super Script III First-Strand, Invitrogen, kat. číslo 18080-051) byla syntetizována cDNA. Reakce obsahovala 1 µg totální RNA, 50 µM oligo dT, 1 µl reverzní transkriptázy SmartScribe RT (100 jednotek/µl), 100 mM DTT v celkovém objemu 10 µl, 90 minut při 42 °C. Pro zastavení byla reakce zahřáta na 70 °C / 15 min.

Pro Real-time PCR byl využit qPCR 2 × SYBR MIX (Top-Bio s.r.o., kat. číslo P553) pomocí cycleru Light Cycler CFX96 BioRad Real-time PCR systém. Primery byly navrženy ke kódujícím sekvencím *HeT-A*, *TART* a *TAHRE* a jako referenční kontrola byl použit gen pro ribozomální protein *RpL 32*. Pro absolutní kvantifikaci byl použit gen *white*. Sekvence jednotlivých primerů jsou shrnuty v tabulce 1. Reakce byly provedeny v duplikátech, vždy v 25 µl / reakci s 5 µl 10krát ředěné cDNA. Finální koncentrace příslušných primerů byla 0,2 pmol / µl. Profil reakcí byl: 95 °C, 3 min – (95 °C, 30 s; 58 °C, 30 s; 72 °C, 20 s)<sub>30</sub>×. Ze získaných ct hodnot byly výsledné poměry počítány dle vztahu  $R = \text{Eff}^{\text{ct}_{\text{Ref}}} / \text{Eff}^{\text{ct}_{\text{target}}}$ , kde Eff je účinnost reakce, ct je získaná hodnota „cycle treashold“, Ref je referenční gen, target je cílový gen.

**Tab. 1:** Sekvence primerů *D. melanogaster* pro Real-time PCR.

| Název primeru           | Sekvence primeru                | Teplota nasedání | Velikost produktu |
|-------------------------|---------------------------------|------------------|-------------------|
| <i>HeT-A</i> (forward)  | 5'–ATTGCTTCTCCTCCGTCCACC–3'     | 58               | 150               |
| <i>HeT-A</i> (reverse)  | 5'–TTCTCTATGCTATTGTGCGCTGTGC–3' | 58               | 150               |
| <i>TART</i> (forward)   | 5'–TGGTGGAGGTACGGAGACAG–3'      | 57               | 120               |
| <i>TART</i> (reverse)   | 5'–ACTAGTTGGTGGAGGTACGGAGA–3'   | 57               | 120               |
| <i>TAHRE</i> (forward)  | 5'–CCCCCAATACCAAGCAGGTC–3'      | 58               | 135               |
| <i>TAHRE</i> (reverse)  | 5'–TTCACTCATTTTCGCCAACTAACC–3'  | 58               | 135               |
| <i>Rpl 32</i> (forward) | 5'–GGACAGTATCTGATGCCCAAC–3'     | 58               | 145               |
| <i>Rpl 32</i> (reverse) | 5'–ATCTCGCCGCAGTAAACGC–3'       | 58               | 145               |
| <i>WExo2</i> (forward)  | 5'–CCTCTTTATCGGCTCCCTAACG–3'    | 57               | 146               |
| <i>WExo2</i> (reverse)  | 5'–TCGTGTGCTGACATTTGCTGAG–3'    | 57               | 146               |

Pomocí statistické metody jednocestné ANOVy s Bonferroni post-testem byla vyhodnocena naměřená data pro průkaznost rozdílů v počtu kopií jednotlivých elementů u testovaných linií. Data byla zpracovávána ve statistickém programu GraphPadPrism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

### **3.3 Příprava preparátů polytenních chromosomů ze slinných žláz**

Preparáty byly provedeny klasickou roztakovou metodou. Tzn., larva byla přenesena do 45 % kyseliny octové, zde byly vypitvány slinné žlázy a přeneseny na 2-3 min do kapky roztoku kyseliny mléčné, vody a ledové kyseliny octové v poměru 1:2:3 na podložním mikroskopickém skle. Tkáň byla přikryta krycím sklem a rovnoměrným tlakem palce roztlačena. Preparáty byly využity pro fluorescenční *in situ* hybridizaci po předchozím působení etanolové řady (70 %, 80 %, 96 % etanol v kyvetách, vždy v každé 30s).

### **1.6. Příprava preparátů celých jader s glycerolovým předpůsobením**

Slinné žlázy byly vypitvány v pufru A<sup>+</sup> (10 mM Tris HCl, pH7.4, 15 mM NaCl, 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.1% Nonidet P-40, 0.25 M sacharosa, 0.15 mM spermin, 0.5 mM spermidin). Dva páry slinných žláz byly přeneseny do zkumavky se 100  $\mu$ l pufru A<sup>+</sup> (100  $\mu$ l / 2 páry slinných žláz). Takto připravený vzorek byl protažen 6x injekční jehlou 27G<sub>1/2</sub>. Z připravených vzorků byly zhotoveny preparáty celých jader pomocí centrifugace cytospinem na mikroskopické sklo (4 °C, 2200 rpm, 10 min). Do kolonky na cytospinu bylo vždy použito 100  $\mu$ l pufru s požadovanou tkání. Preparáty byly bezprostředně po centrifugaci fixovány 10 min při pokojové teplotě v čerstvě připraveném roztoku 4 % formaldehydu a následně inkubovány v 1X PBS, 0,5% Triton, a to po dobu 5min. Preparáty byly vloženy do 20 % glycerolu v 1X PBS na dobu 35 minut, poté byly dány na 5 sekund do tekutého dusíku. Působení glycerolu a tekutého dusíku bylo opakováno 5x. Takto připravené preparáty byly využity pro fluorescenční *in situ* hybridizaci.

### **3.4 Příprava hybridizačních sond**

Pro sondu k elementu *HeT-A* byl využit klon 9D4 (Genbank č. X68130) získaný od Dr. Masona. SONDY k elementu *TART* a *TAHRE* byly získány pomocí PCR s využitím

primerů k sekvenci ORF2 (Tab. 2) a následným přečištěním produktů PCR pomocí NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, kat. číslo 740609.50). Získané produkty byly standardní procedurou klonovány do vektoru pGEM (Promega, kat. číslo PRA1360) s využitím kompetentních buněk DH5 $\alpha$ . Závěrem byly sondy značeny biotinem metodou nick-translace (metoda posunu jednořetězcového zlomu) za pomoci kitu Nick Translation Kit (Abbott Molecular, Wiesbaden, Německo, kat. č. 07J00-001), a to dle instrukcí poskytnutých výrobcem.

**Tab. 2:** Sekvence použitých primerů jednotlivých telomerických elementů *D. melanogaster*.

| Element      | Název primeru                           | Velikost produktu (bp) | Sekvence primeru              | Teplota nasedání primeru (°C) |
|--------------|---|------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| <b>TART</b>  | <i>Tart567F</i> (forward)               | 1691                   | 5'-AAGAATCCCTGACAACCTCAGAA-3' | 55                            |
|              | <i>Tart2258R</i> (reverse)              | 1691                   | 5'-AACTTGTATCCGTCTTATCTGTG-3' | 51                            |
| <b>TAHRE</b> | <i>Tahre6144F</i> (forward)             | 982                    | 5'-CAGACGAATCATAAACGCCAGC-3'  | 56                            |
|              | <i>Tahre7126R</i> (reverse)             | 982                    | 5'-CGCATCACTTCGTCATGATCAG-3'  | 56                            |
| <b>HeT-A</b> | Zaklonovaný celý fragment 9D4 (4153 bp) |                        |                               |                               |

### 3.5 Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

FISH byla provedena dle Sahara et al. (1999) s využitím sond specifických k sekvencím jednotlivých telomerických elementů. Pro každý preparát bylo použito 10 ng sondy s 3 ng DNA lososích spermií. Směs byla ve zkumavce precipitována pomocí 3 M octanu sodného a 100 % etanolu, a to po dobu jedné hodiny v -80 °C a poté centrifugována při 4 °C při 13000 rpm, 30 min. Následně byl odstraněn supernatant, k peletu bylo přidáno 100  $\mu$ l 70% etanolu a směs opět centrifugována na 10 min při 4°C. Pelet získané DNA byl rozpuštěn v 10 $\mu$ l hybridizační směsi (10% dextran sulfát, 20x SSC, 50% formamid (Sigma, kat. číslo F7508), 1% Tween 20). Sonda byla denaturována při 95 °C po dobu 5 min a bezprostředně poté přenesena na led, na více než 3 minuty. Skla byla denaturována v 70% formamidu v 2x SSCT při 75°C, po dobu 10 min za mírného třepání. Rychlým okapáním a osušením hran byl preparát zbaven přebytečného roztoku a následně bylo aplikováno 10  $\mu$ l připravené sondy v hybridizační směsi. Preparát byl zakryt krycím sklem (24x32 mm), okraje byly zajištěny proti vytečení hybridizační směsi pomocí Rubber cementu (Fixo gum, Marabu GmbH & Co.) Takto přichystané preparáty byly vloženy do vlhké (2x SSCT) vaničky s víkem a poté hybridizovány při 37° C přes noc.



Druhý den byly preparáty promyty v 50 % formamidu / 2x SSCT při 45 °C, a to 4x5 minut za mírného třepání. Další promytí bylo 4x2 min ve 2x SSCT pufru při 37 °C a 5 minut v promývacím pufru 4x SSCT při RT. Po promytí byla reakce blokována pomocí 200 µl 2,5% BSA (Sigma, kat. číslo A9418) ve 4x SSC po dobu 10-ti minut. Dále byly preparáty inkubovány 45 minut při pokojové teplotě se 100 µl roztoku streptavidinu konjugovaného s fluorochromem cyanomycinem 3 (Cy3; Jackson Research Laboratories, kat. č. 016-160-084) v 2,5% BSA (1:1000). Poté byly preparáty promývány, a to 3x 5min ve 4x SSCT při 37 °C. Preparáty byly následně opět blokovány ve 2,5% BSA v 4x SSC po dobu 10 min a poté inkubovány 60 min při 37 °C s 50 µl roztoku biotinylovaného anti-streptavidinu (Vector, kat. číslo BA-0500) v 2,5% BSA (1:25). Preparáty byly promyty 3x5min ve 4xSSCT za mírného třepání při 37 °C a po opětovném blokování v 2,5% BSA inkubovány s antistreptavidinem konjugovaným s Cy3, v tomto případě po dobu 30-ti minut. Finální promývání bylo také provedeno v pufru 4x SSCT, 3x5min při 37°C. Jádra polytenních chromosomů byla barvena pomocí DAPI (3 ng / µl), (Sigma-Aldrich) v 60 µl roztoku Antifade / preparát. Zásobní roztok Antifade obsahuje 0,23 g DABCO (Sigma), 800 µl vody, 200 µl 1M Tris-HCl pH8, 9 ml glycerolu. Preparát byl přikryt krycím sklem (24x32 mm), jeho okraje byly překryty lakem na nehty pro fixaci preparátu.

### **3.6 Mikroskopie**

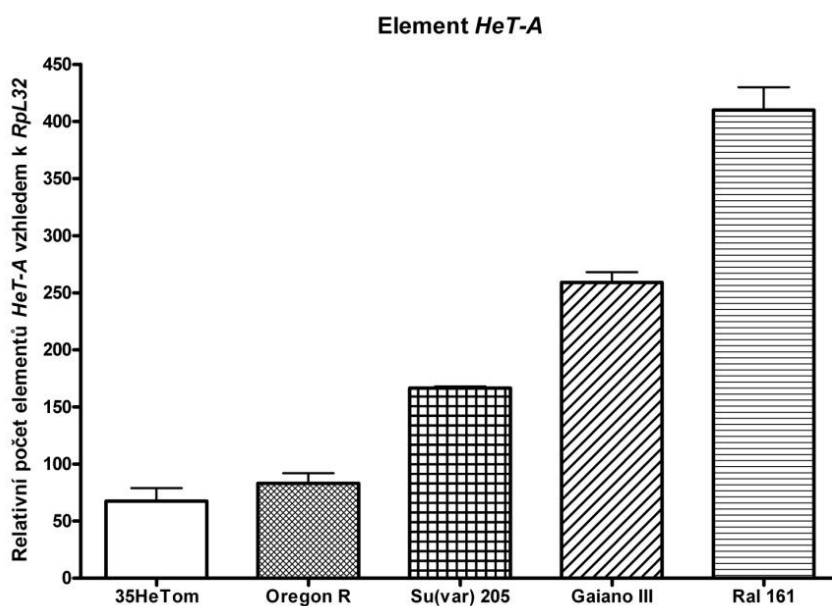
Roztlakové preparáty polytenních chromosomů po FISH byly pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem Zeiss Axioplan 2 a nasnímány digitální, černobílou CCD kamerou OLYMPUS XM10 za pomoci programu AnalySIS Software 3.2. Vyhodnocení, sestavování a úprava obrázků probíhala pomocí programu Adobe Photoshop CS4.

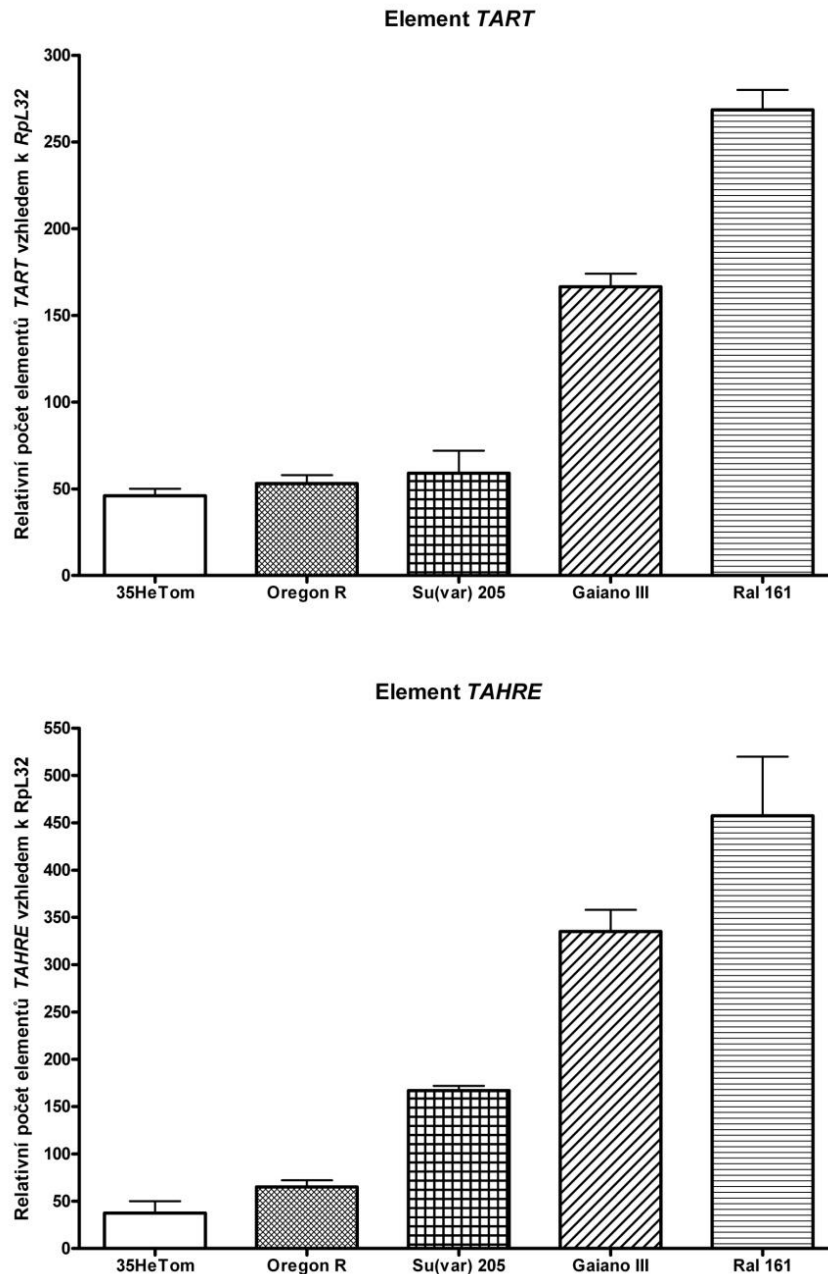
Pro naskenování a složení vrstev celých jader z preparátů ze slinných žláz byl využit konfokální mikroskop OLYMPUS FluoView FV1000 Laser scanning microscope. Analýza obrázků byla provedena v programu Imaris 8 (Bitplane).

## 4 Výsledky

### 4.1 Rozdílné zastoupení elementů v genomu u jednotlivých linií

Zastoupení jednotlivých telomerických elementů v genomu vybraných linií Oregon R, 35HeTom, *Su(var)205*<sup>04</sup>, Gaiano III a Ral 161 bylo analyzováno kvantitativní Real-time PCR a vyhodnocením intenzity hybridizačních signálů v testovaných jádrech. Lokalizace elementů na jednotlivých chromosomálních koncích byla vyhodnocena pomocí FISH na polytenních chromosomech, a to na obou ramenech chromosomu 2 (levé a pravé rameno 2L a 2R) a chromosomu 3 (levé a pravé rameno 3L a 3R), a na volných ramenech (to jest ramenech nelokalizovaných v chromocentru) telocentrických chromosomů 4 a X. Pomocí kvantitativní Real-time PCR jsem prokázala, že v zastoupení jednotlivých elementů *HeT-A* a *TAHRE* v rámci jednotlivých linií není statisticky signifikantní rozdíl, nicméně výskyt elementu *TART* je zhruba 1,5-krát nižší ( $P < 0,0001$ ) (Obr. 3). Statisticky průkazné rozdíly v počtu elementů jsem našla srovnáním testovaných linií, kdy se počet elementů zvyšoval u linií v tomto pořadí 35Hetom - Oregon R - *Su(var)205*<sup>04</sup> - Gaiano III - Ral 161. Obdobné výsledky byly získány vyhodnocením hybridizačních signálů pomocí programu Adobe Photoshop (Obr. 4).





**Obr. 3.** Vyhodnocení počtu kopií elementu *HeT-A*, *TART* a *TAHRE* pomocí kvantitativní Real-time PCR v genomu testovaných linií *D. melanogaster*. Jako referenční kontrola byl použit gen *RpL 32*, pro absolutní kvantifikaci byl použit gen *white*. Statistické vyhodnocení bylo provedeno jednocestnou ANOVou s Bonferroni post-testem. U *HeT-A* elementu bylo statisticky neprůkazné pouze porovnání 35HeTom a Oregon R. Ostatní linie se v porovnání mezi sebou statisticky lišily ( $P < 0,01$ ). U elementu *TART* nebyl statisticky průkazný rozdíl mezi 35HeTom a Oregon R a mezi Gaiano III a Ral 161. Mezi ostatními liniemi byl potvrzen statistický rozdíl ( $P < 0,01$ ). U *TAHRE* byl statisticky signifikantní rozdíl nalezen mezi všemi testovanými liniemi ( $P < 0,01$ ).

## 4.2 Vyhodnocení hybridizačních signálů jednotlivých elementů po FISH

### 4.2.1 Element *HeT-A*

V rámci linie Oregon R byl výskyt elementu *HeT-A* zaznamenán na koncích všech chromosomálních ramen, nicméně jádra v rámci jednotlivých testovaných jedinců vykazala hybridizační signály na různých chromosomálních koncích. V rámci některých jedinců byla pozorována variabilita v lokalizaci signálu mezi jednotlivými jádry. U všech testovaných jedinců byl element *HeT-A* pozorován vždy na 2L a 3R telomerách. U chromosomu X byl tento element zastoupen zhruba u padesáti procent jedinců, na chromosomu 4, 2R a 3L se tento element vyskytoval variabilně v rámci jednotlivých jader. Naproti tomu u linie 35HeTom byl element *HeT-A* vždy zastoupen na chromosomech X a 4. Naopak u 3R a 2R bylo jeho zastoupení okolo 70 %, u 2L to bylo 60 % a 3L 30 % (Tab. 3). U linie *Su(var)205<sup>04</sup>* byl *HeT-A* přítomen vždy na telomerách X, 2L a 4. U 60% jedinců byl element nalezen u 2R a 3R. Element byl detekován na 3L variabilně v rámci jednotlivých jader. Mimoto, u všech vyhodnocených jedinců této linie byla pozorována porucha koheze mezi homologními chromosomy, a to tak, že byla viditelná separace celých chromosomálních ramen na dva homology (Obr. 4C). U linie Gaiano III byly signály detekovány na všech chromosomálních ramenech. S výjimkou telomery 2R byly signály mnohem intenzivnější než u předcházejících linií (Obr. 4). Rovněž v mnohem větší míře byly patrné fúze jednotlivých telomer. Linie Ral 161, tj. linie, u níž jsem pomocí Real-time PCR mezi testovanými liniemi prokázala nejvyšší počet telomerických elementů, vykazala velmi výrazné signály, a to přítomné na všech vyhodnocených telomerách (Obr. 5). Kromě toho byl u této linie signál zaznamenán i v oblasti chromocentra.

### 4.2.2 Element *TART*

U linie Oregon R se element *TART* vždy vyskytoval na 3L, naproti tomu nikdy nebyl přítomen na chromosomu X. U ostatních ramen byl jeho výskyt variabilní v rámci testovaných jedinců a kromě 2R i v jednotlivých jádrech (Tab. 3). V rámci linie 35HeTom byl *TART* identifikován na všech testovaných ramenech. Vždy byl nalezen na chromosomu 4. Ve více než polovině případů se vyskytoval na chromosomu X, ovšem s variabilitou v rámci jednotlivých jedinců (Tab. 3). U linie *Su(var)205<sup>04</sup>* byl signál vždy pozorován na chromosomu X a 3L, naopak signál nebyl detekován na chromosomu 2R a 4. Zajímavým

úkazem byla separace ramen 2L a 3R na jejich homology a vzájemné párování těchto chromosomů (Obr. 4C). U linie Gaiano III (Tab. 3) se u každého testovaného jedince vyskytoval signál na 3R, naopak variabilní výskyt byl zaznamenán u dalších chromosomů, výrazně méně na X. Výskyt elementu *TART* byl více méně konstantní v rámci linie Ral 161 (Obr. 5), která nesla hybridizační signály na všech sledovaných telomerách, výjimkou byl chromosom X, ten byl zastoupen v 60 % jedinců. Četnost výskytu tohoto elementu na jednotlivých ramenech mezi vyhodnocenými jedinci je shrnuta v tabulce 3.

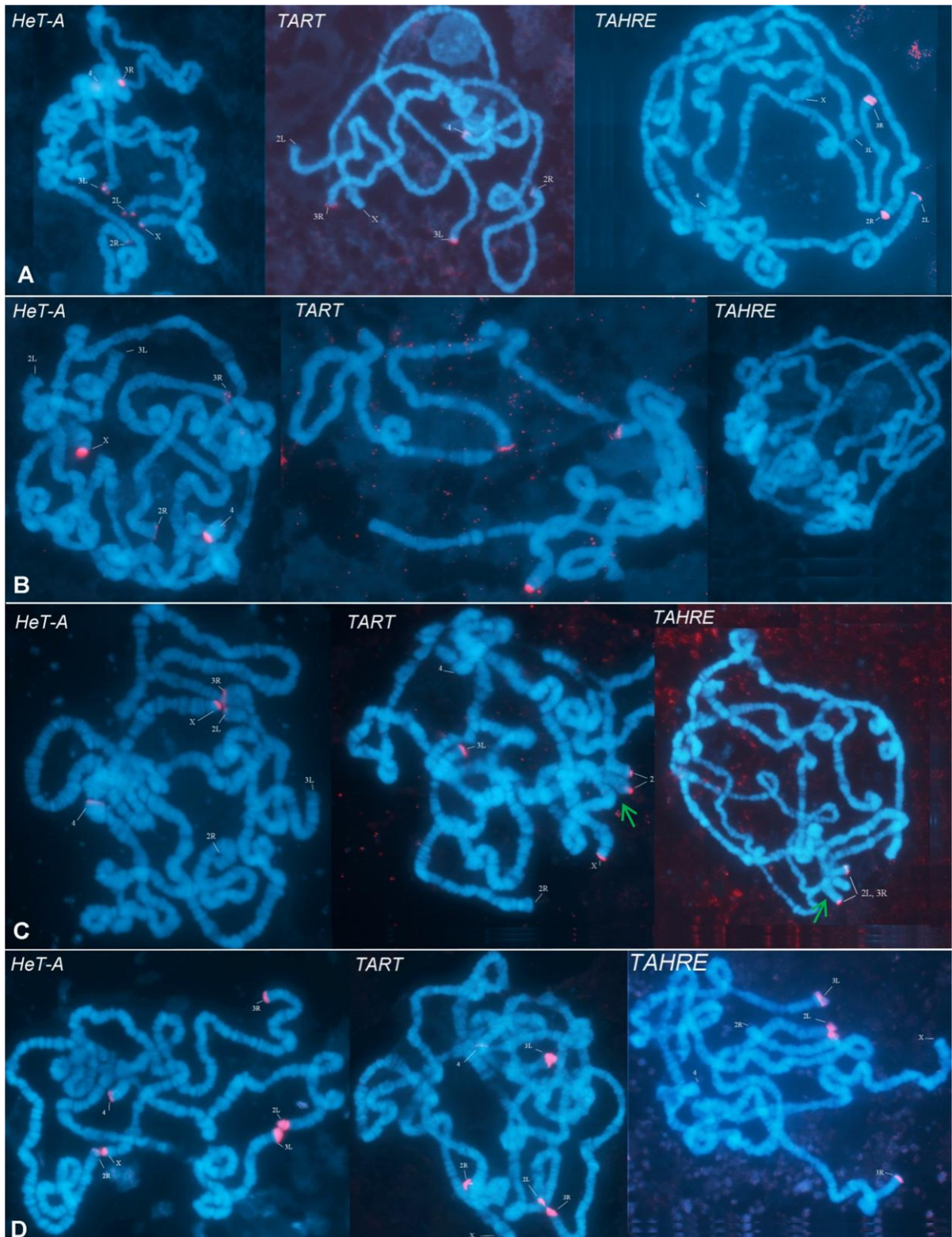
#### **4.2.3 Element *TAHRE***

U linie Oregon R nebyl tento element detekován na chromosomu X a 4. S převahou byl nalezen na 2R a 3R, u 2L a 3L byla v rámci jednotlivých jedinců opět variabilita (Obr. 4, Tab. 3). U linie 35HeTom nebyl element přítomen na žádném rameni. U linie *Su(var)205<sup>04</sup>* byly hybridizační signály zaznamenány pouze u dvou chromosomálních ramen, a to na 2L a 3R. Výjimečně u některých jader byl pozorován signál u 4 chromosomu. Linie Gaiano III vykazala signál na všech sledovaných telomerách, kromě chromosomu X, kde u poloviny vyhodnocených jedinců signál chyběl, mezi jádry byla variabilita. U linie Ral 161 (Obr. 5) byl signál přítomen na všech chromosomech, na některých jádrech se rovněž vyskytoval i signál v chromocentru.

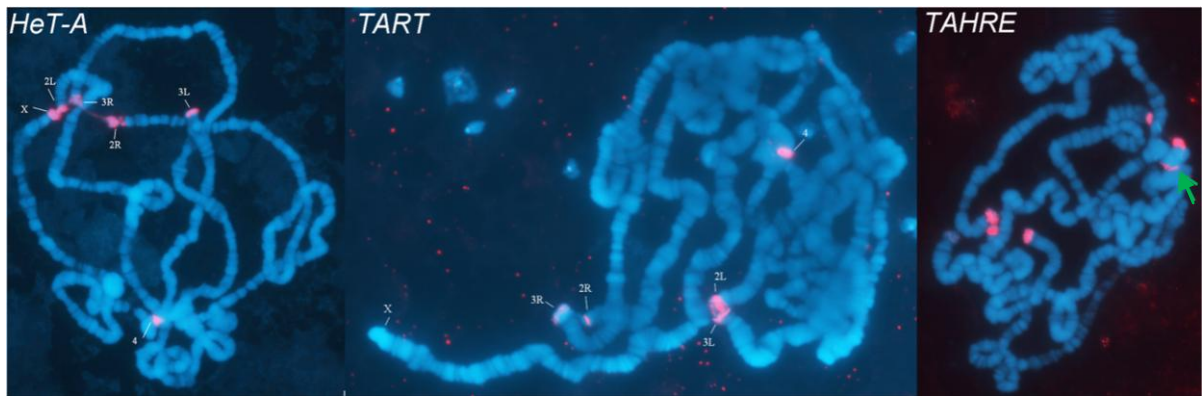
**Tab. 3:** Procentuelní zastoupení signálů v jednotlivých ramenech u linií *D. melanogaster*.

| Přítomnost hybridizačních signálů (%) |              |          |           |           |          |          |           |
|---------------------------------------|--------------|----------|-----------|-----------|----------|----------|-----------|
| Linie                                 | Element      | 2L       | 2R        | 3L        | 3R       | 4        | X         |
| <b>Oregon R</b>                       | <i>HeT-A</i> | 100      | 100J70,20 | 60J40,30  | 100      | 40J45,20 | 50        |
|                                       | <i>TART</i>  | 40J65,10 | 80J       | 100       | 60J20,20 | 50J10,20 | 0         |
|                                       | <i>TAHRE</i> | 60J20,20 | 80        | 50J20,20  | 80       | 0        | 0         |
| <b>35 HeTom</b>                       | <i>HeT-A</i> | 60       | 70        | 30        | 70       | 100      | 100       |
|                                       | <i>TART</i>  | 40       | 80        | 70        | 40       | 100      | 55J100,30 |
|                                       | <i>TAHRE</i> | 0        | 0         | 0         | 0        | 0        | 0         |
| <b>Su(var)205</b>                     | <i>HeT-A</i> | 100      | 60        | 30J100,15 | 60       | 100      | 100       |
|                                       | <i>TART</i>  | 75       | 0         | 100       | 75       | 0        | 100       |
|                                       | <i>TAHRE</i> | 100      | 0         | 0         | 100      | 0        | 0         |
| <b>Gaiano III</b>                     | <i>HeT-A</i> | 100      | 100       | 100       | 100      | 100      | 100       |
|                                       | <i>TART</i>  | 70       | 40        | 90        | 100      | 30       | 10        |
|                                       | <i>TAHRE</i> | 100      | 100       | 100       | 100      | 100      | 50J80,40  |
| <b>Ral 161</b>                        | <i>HeT-A</i> | 100      | 100       | 100       | 100      | 100      | 100       |
|                                       | <i>TART</i>  | 100      | 100       | 100       | 100      | 100      | 60        |
|                                       | <i>TAHRE</i> | 100      | 100       | 100       | 100      | 100      | 100       |

J – variabilita hybridizačního signálu na daném chromosomálním rameni mezi jádry v rámci jednotlivých jedinců (např. 50J20,30 - hybridizační signál byl pozorován u 50 % jedinců, ale u 20 % těchto jedinců alespoň 30 % vyhodnocených jader vykazovalo absenci signálu.



**Obr. 4.** Polyténní chromosomy po provedení metody FISH s telomerickou sondou k telomerickým elementům, značenou biotinem (červená barva) a následným barvením DAPI (modrá barva) u linie Oregon R (A), 35Hetom (B), *Su(var)205<sup>04</sup>* (C) a Gaiano III (D). Chromosomální separace ramen na dva homology u *Su(var)205<sup>04</sup>* je naznačena zelenými šipkami.

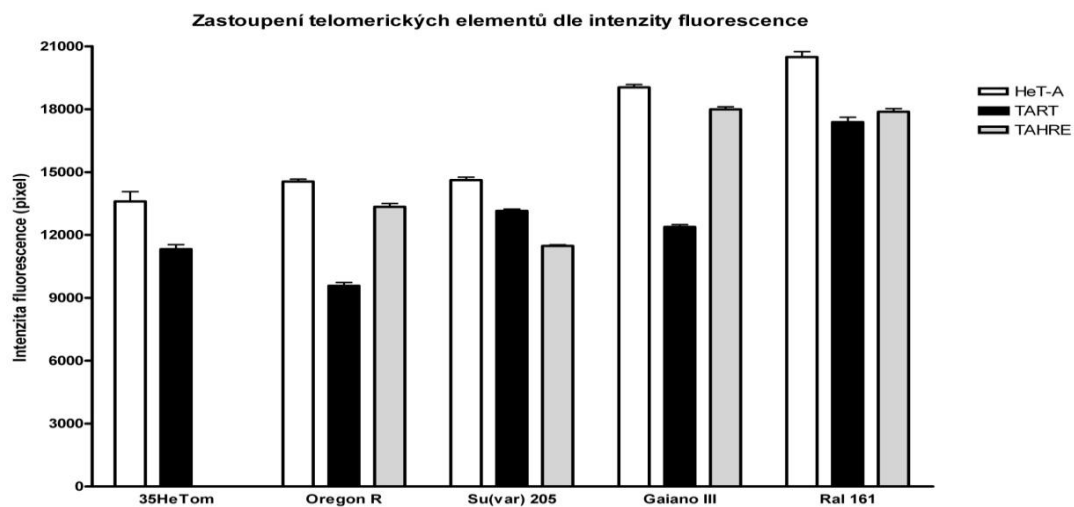


**Obr. 5.** Polyténní chromosomy po provedení metody FISH s telomerickou sondou k telomerickým elementům, značenou biotinem (červeně) a následným barvením DAPI (modrá barva) u linie Ral 161. U tohoto kmene byl patrný také signál v oblasti chromocentra (zelená šipka).

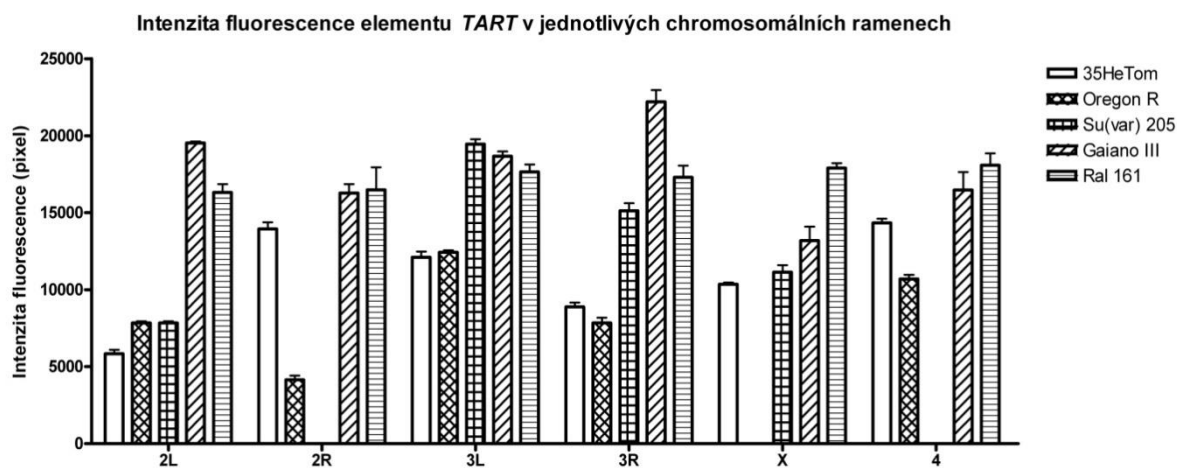
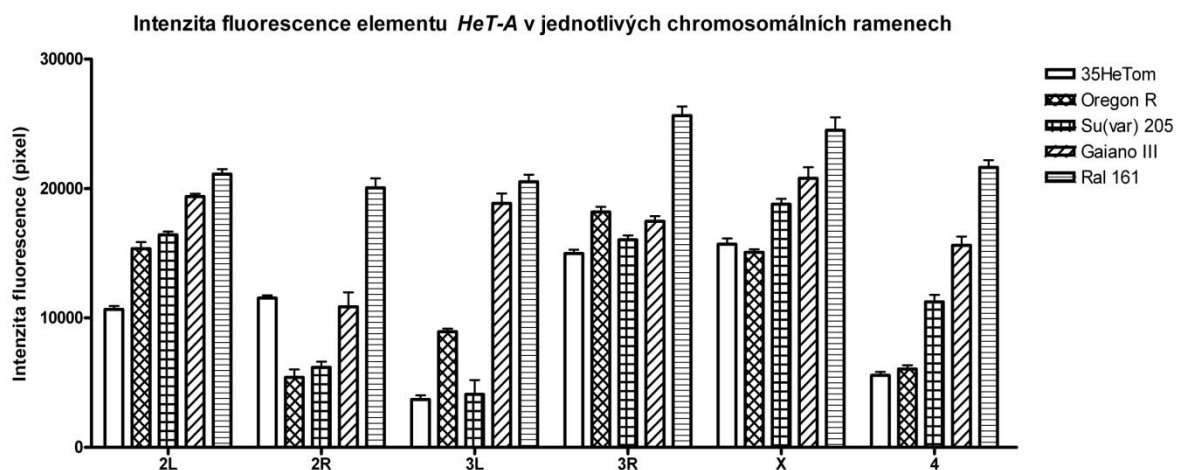
### 4.3 Analýza intenzity fluorescenčních signálů

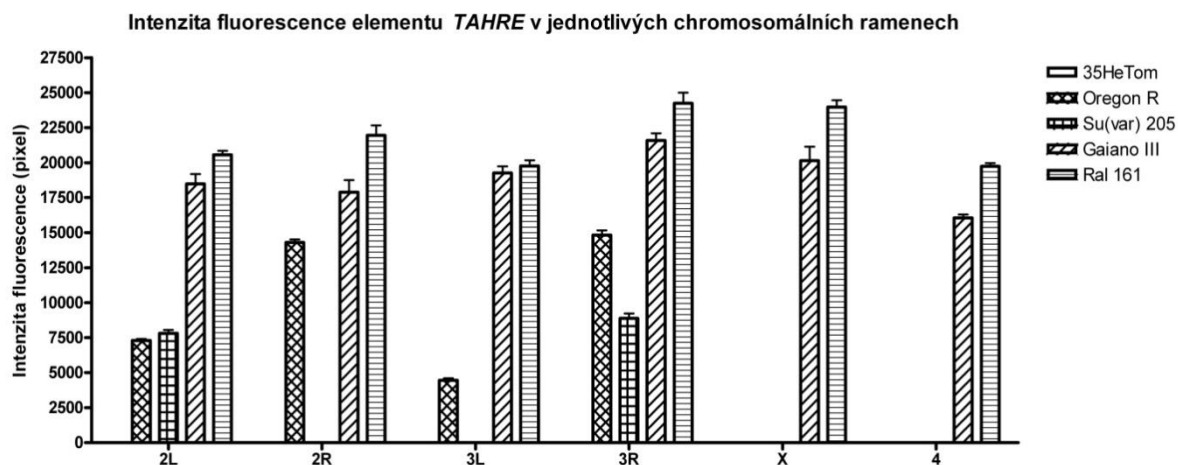
V rámci jednotlivých linií a telomerických elementů byla zaznamenána variabilita v intenzitě fluorescence. Polyténní chromosomy se signály k *HeT-A*, *TART* a *TAHRE* byly analyzovány pomocí programu AdobePhotoshop, kdy v rámci linií byly pozorovány rozdíly v intenzitě fluorescence korelující s výsledky z kvantitativní Real-time PCR. Tj., naměřené hodnoty intenzity fluorescence vykazovaly nejvyšší míru signálu u elementu *HeT-A*, poté u *TAHRE* a nejnižší intenzitu vykázal *TART* (Obr. 6). Míra fluorescence telomerických signálů byla rovněž vyhodnocena u jednotlivých chromosomů pro každý element v každé testované linii (Obr. 7). Rozdílné chromosomy vykazovaly rozdílnou míru fluorescence, což je patrné zejména u linií s kratšími telomerami, tj. OregonR, *Su(var)205<sup>04</sup>* a 35HeTom.





**Obr. 6.** Analýza intenzity hybridizačních signálů u jednotlivých elementů v rámci testovaných linií. Vyhodnocování bylo provedeno pomocí programu AdobePhotoshop na dvaceti náhodně vybraných jádrech.

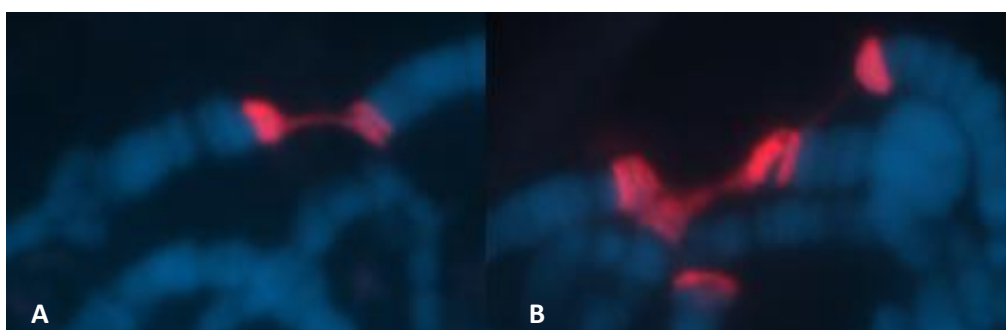




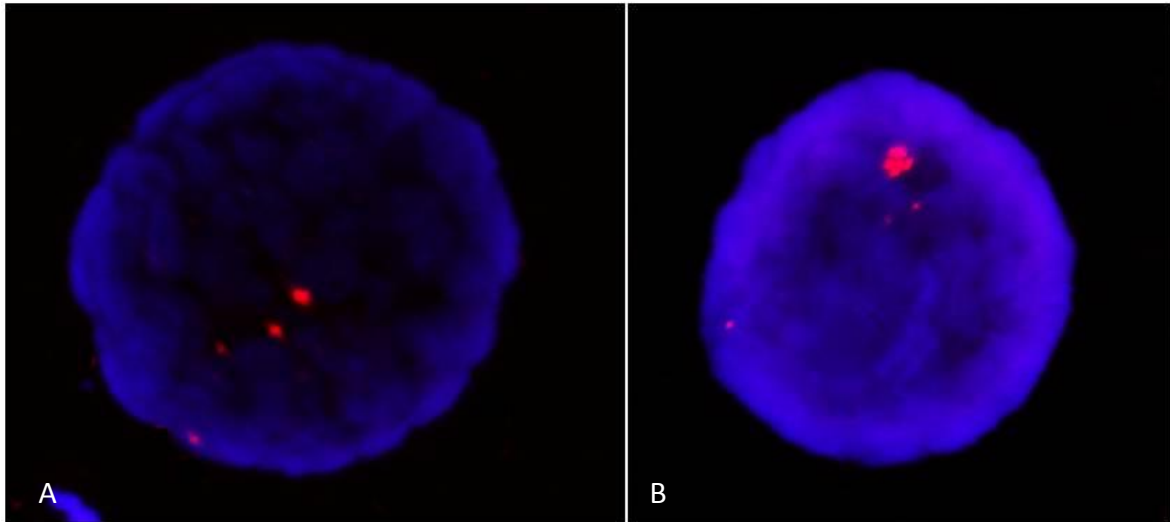
**Obr. 7.** Analýza intenzity fluorescence telomerických signálů jednotlivých chromosomálních ramen u testovaných linií pomocí AdobePhotoshop. Pro každý element a chromosomální rameno bylo vyhodnoceno deset náhodně vybraných jader u každé linie. Výsledky vykazují variabilitu mezi zacílením elementů k jednotlivým ramenům, výrazné rozdíly jsou u linií Oregon R, HeTom a *Su(var)205<sup>04</sup>*, tedy u linií bez posílení transkripční aktivity.

#### 4.4 Telomerické fúze

Při vyhodnocování hybridizačních signálů na roztlakových preparátech byla u linie Gaiano III a Ral 161 často pozorována spojení hybridizačních signálů do jednoho bodu (Obr. 8), naznačující přítomnost telomerických fúzí pravděpodobně následkem dlouhých HTT oblastí. Pro ověření tohoto pozorování jsem použila konfokální mikroskopii. Pro analýzu byl vybrán kmen Ral 161 a Oregon R, a to vzhledem k jejich rozdílným telomerickým délkám. Pro hybridizaci byla využita sonda k elementu *HeT-A*. Mezi testovanými liniemi byl v rámci jádra patrný rozdíl v rozmístění signálů (Obr. 9). Hybridizační signály v jádrech u Oregon R vždy vykazaly jednotlivé rozmístění, naopak u Ral 161 byla v 60% zaznamenána lokalizace signálů v jednom bodě.



**Obr. 8.** Pozorované telomerické fúze u linie Gaiano III (A) a Ral 161 (B) u roztlakových preparátů.



**Obr. 9.** Jádra polytenních chromosomů po FISH se sondou k elementu *HeT-A* skenována pomocí konfokálního mikroskopu a analyzována v programu Imaris 8, u linie Oregon R (A) a Ral 161 (B).

## 5 Diskuze

Hlavním cílem této diplomové práce bylo zmapování genomové lokalizace telomerických elementů u *Drosophila melanogaster*, tj. určit, jestli transpozice jednotlivých elementů je striktně či preferenčně cílena k některým z chromosomálních ramen či naopak k ní dochází nezávisle na typu chromosomu. Předcházející publikovaná data sice v tomto ohledu přinesla nějaké informace, nicméně vždy to byly informace vedlejšího charakteru, neposkytující ucelený obraz o dané problematice. Některé práce ukazují stabilní absenci některého z telomerických elementů na určitých telomerických koncích (Abad et al. 2004b, naše předcházející nepublikované výsledky) nebo dokonce nepřítomnost jakéhokoliv z telomerických elementů na některém z chromosomu (Abad et al. 2004b), naznačujících persistence terminálních deficiencí. Souhrn všech publikovaných údajů mapujících přítomnost telomerických elementů na jednotlivých chromosomálních ramenech je ukázán v tabulce 4. Na základě našich výsledků, a to zejména díky liniím Gaiano III a Ral 161 a v kombinaci s publikovanými údaji, lze konstatovat, že ani u jednoho z telomerických elementů se transpozice elementů obecně nejeví jako striktně cílená pouze k některému či některým z chromosomů, rovněž, pokud vyhodnocujeme čistě přítomnost / nepřítomnost hybridizačních signálů na jednotlivých telomerech, není patrná nějaká obecná preference elementů pro jednotlivé telomery. Nicméně z analýzy jednotlivých linií vyplývá, že jejich chromosomy mohou vykazovat dlouhodobější absenci některého z elementů, stejně tak, že v rámci jednotlivých telomer byla pozorována rozdílná četnost jednotlivých elementů, což bylo ostatně pozorováno i v předcházejících studiích (Siriaco et al. 2002, Abad et al. 2004b). To by mohlo naznačovat, že určitá regulace pro cílenou transpozici k jednotlivým chromosomálním koncům zde funguje. Je to i v souladu s tím, že u linií bez posílené transpoziční aktivity lze do jisté míry pozorovat, že element *TAHRE* je častěji, v porovnání s elementy *TART* a *HeT-A*, nepřítomen na chromosomech 4 a X. Ve všech testovaných liniích jsem oproti *HeT-A* a *TAHRE* nacházela stabilně nižší četnost elementu *TART*, což je i v souladu s předcházejícími studiemi (Siriaco et al. 2002; George et al. 2006), naznačující interdependentní závislost mezi elementy. Pro svou analýzu jsem využila polytenní chromosomy, které jsou díky své biologii a morfologii určitým specifíkem. Může být tedy otázkou, do jaké míry lze získané informace zobecnit. George et al. (2006) ve své práci popisují menší počet elementů *HeT-A* a *TART* v telomerech polytenních chromosomů v porovnání s telomery buněk izolovaných z hlav dospělých much, nicméně vzájemný

poměr mezi těmito dvěma elementy byl nalezen jako identický ve všech testovaných liniích. I když se předpokládá, že k transpozici telomerických elementů v polytenních buňkách nedochází, autoři studie se nedomnívají, že k pozorovanému úbytku telomerické DNA, vzhledem k pouze deseti replikačním cyklům v polytenních jádrech, mohlo dojít na základě nekompletní replikace. Jako možné vysvětlení autoři předkládají drastické zkrácení telomerické DNA například mechanismem, který byl pozorován u savců pomocí t-loop homologní rekombinace (George and Pardue 2003). Variabilita v přítomnosti signálů pozorovaná v mé studii v různých jádrech jednoho jedince významnou měrou podporuje tvrzení, že u drozofily, dosud nevyjasněným mechanismem, může docházet k abnormálně vysokému telomerickému zkracování.

Na základě experimentálních údajů bylo telomerické zkracování u drozofily odhadnuto na přibližně 75 bází za generaci, přičemž v rámci generace se frekvence transpozice jeví jako 1 %, a to při průměrné délce 6 kb transponovaných elementů, což je zhruba přesně tak dostačující délka, která může pokrýt vzniklé replikační ztráty (Biessmann et al. 1992; Frydrychova et al. 2009). Vzhledem ke schopnosti formace termininu na sekvenčně různorodém chromosomálním konci, nejsou u drozofily terminální delecce letální a mohou v liniích existovat po řadu generací. Někteří autoři uvádí, že persistence terminálních deficiencí u drozofily může být obecnějšího charakteru (Mason et al. 1984; Abad et al. 2004a; George et al. 2006), nicméně při mém studiu jsem linie s terminální delecí nezaznamenala. Lze však předpokládat, že za účelem studia terminálních delecí by bylo vhodnější použít multicolor FISH, která by na přítomnost terminálních deficiencí, v porovnání se standardní FISH použitou v mých experimentech, dala jednoznačnou odpověď.

Je známo, že prostorová organizace eukaryotního genomu uvnitř jádra je dynamickým procesem přispívající k regulaci procesů jako je transkripce genů, replikace DNA či opravné procesy (Schneider a Grosschedl 2007). Proto významným zjištěním, které přinesla má studie, je to, že telomerická délka drozofily ovlivňuje lokalizaci telomer uvnitř jádra, a tedy, že telomery skrze svou délku mohou mít vliv na celou vnitrojadernou architekturu, a tím na procesy fungující na celogenomové úrovni. Toto zjištění si jistě zaslouží mnohem větší pozornost v některé z budoucích studií naší laboratoře.

**Tab. 4:** Mapování přítomnosti telomerických elementů na jednotlivých chromosomálních ramenech.

| Element      | 2L          | 2R  | 3L  | 3R  | 4   | X        | Linie                   | Studie                  |
|--------------|-------------|-----|-----|-----|-----|----------|-------------------------|-------------------------|
| <i>HeT-A</i> | +           | +/- | +/- | +   | +/- | +/-      | Oregon R                | Moje studie             |
|              | +/-         | +/- | +/- | +/- | +   | +        | 35Hetom                 | Moje studie             |
|              | +           | +/- | +/- | +/- | +   | +        | <i>Su(var)205</i>       | Moje studie             |
|              | +           | +   | +   | +   | +   | +        | Gaiano III              | Moje studie             |
|              | +           | +   | +   | +   | +   | +        | Ral 161                 | Moje studie             |
|              | +           | +   | -   | +   | +   | +        | <i>y; cn bw sp</i>      | (Abad et al. 2004a)     |
|              |             |     |     |     | +   | +        | Oregon R                | (George et al. 2006)    |
|              | +           | +   | +   | +   | +   | +/-      | Oregon R                | (Siriaco et al. 2002)   |
|              | +           | +   | +   | +   | +   | +        | Gaiano III              | (Siriaco et al. 2002)   |
|              |             |     |     | +   |     |          | KG01591                 | (Biessmann et al. 2005) |
|              |             | +   |     |     |     |          | KG 10047                | (Biessmann et al. 2005) |
|              | <i>TART</i> | +/- | +/- | +   | +/- | +/-      | -                       | Oregon R                |
| +/-          |             | +/- | +/- | +/- | +   | +/-      | 35Hetom                 | Moje studie             |
| +/-          |             | -   | +   | +/- | -   | +        | <i>Su(var)205</i>       | Moje studie             |
| +/-          |             | +/- | +/- | +   | +/- | +/-      | Gaiano III              | Moje studie             |
| +            |             | +   | +   | +   | +   | +        | Ral 161                 | Moje studie             |
| +            |             | +   | -   | -   | -   | +        | <i>y; cn bw sp</i>      | (Abad et al. 2004a)     |
|              |             |     |     | +   |     |          | EY00453                 | (Biessmann et al. 2005) |
|              |             |     |     | +   |     |          | EY00802                 | (Biessmann et al. 2005) |
|              |             |     |     | +   |     | +        | EY001387                | (Biessmann et al. 2005) |
|              |             |     |     |     | +   | EY09966  | (Biessmann et al. 2005) |                         |
| <i>TAHRE</i> | +/-         | +/- | +/- | +/- | -   | -        | Oregon R                | Moje studie             |
|              | -           | -   | -   | -   | -   | -        | 35Hetom                 | Moje studie             |
|              | +           | -   | -   | +   | -   | -        | <i>Su(var)205</i>       | Moje studie             |
|              | +           | +   | +   | +   | +   | +/-      | Gaiano III              | Moje studie             |
|              | +           | +   | +   | +   | +   | +        | Ral 161                 | Moje studie             |
|              | +           | +   | -   | -   | -   | +        | <i>y; cn bw sp</i>      | (Abad 2004a)            |
| +            |             |     |     |     |     | EY008176 | (Biessmann et al. 2005) |                         |

## 6 Závěr

Na základě této diplomové práce bylo prozkoumáno zastoupení telomerických elementů *HeT-A*, *TART* a *TAHRE* v polytenních chromosomech u vybraných linií *Drosophila melanogaster*. Experimenty přinesly ucelený přehled o zastoupení elementů v genomu a jejich zacílení k jednotlivým chromosomálním ramenům. Z výsledků je patrné, že cílená transpozice určitého elementu k určitému chromosomálnímu rameni zde striktně nefunguje, ovšem preferenčně by k tomuto jevu mohlo docházet na základě absence některého z elementů, a to hlavně v rámci linií bez posílení transkripční aktivity.

Telomery u testovaných linií, dle předpokladů a dosavadních výsledků, vykazovaly rozdílnost ve své délce. U linií s dlouhými telomery byly patrné časté chromosomální fúze, které byly pozorovány i v rámci jaderného uspořádání polytenních chromosomů. Výsledky by mohly přinést významné poznatky o délce telomer v korelaci s vnitrojadernou architekturou. Tuto hypotézu je však nutné dále testovat, neboť výsledky jsou zatím jen předběžné.

## 7 Literatura

- Abad JP, de Pablos B, Osoegawa K, et al. (2004a) TAHRE, a Novel Telomeric Retrotransposon from *Drosophila melanogaster*, Reveals the Origin of *Drosophila* Telomeres. *Mol Biol Evol* 21(9):1620-1624.
- Abad JP, De Pablos B, Osoegawa K, et al. (2004b) Genomic analysis of *Drosophila melanogaster* telomeres: full-length copies of *HeT-A* and *TART* elements at telomeres. *Mol Biol Evol* 21:1613–9.
- Autexier C, Lue NF (2006) The structure and function of telomerase reverse transcriptase. *Annu Rev Biochem* 75: 493-517.
- Biessmann H, Valgeirsdottir K, Lofsky A, et al. (1992) *HeT-A*, a transposable element specifically involved in “healing” broken chromosome ends in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 12:3910–8.
- Biessmann H, Prasad S, Semeshin VF, et al. (2005) Two distinct domains in *Drosophila melanogaster* telomeres. *Genetics* 171(4):1767-1777.
- Blackburn EH, Gall JG (1978). A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol* 120(1): 33-53.
- Blasco MA, Lee HW, Rizen M, et al. (1997) Mouse models for the study of telomerase. *Ciba Found Symp* 211:160-70.
- Cenci G, Siriaco G, Raffa GD, et al. (2003) The *Drosophila* HOAP protein is required for telomere capping. *Nat Cell Biol* 5:82–4. doi: 10.1038/ncb902.
- Cenci G, Ciapponi L, Gatti M (2005) The mechanism of telomere protection: a comparison between *Drosophila* and humans. *Chromosoma* 114:135–45. doi: 10.1007/s00412-005-0005-9.



- Danilevskaya ON, Arkhipova IR, Traverse KL, Pardue ML (1997) Promoting in tandem: the promoter for telomere transposon *HeT-A* and implications for the evolution of retroviral LTRs. *Cell* 88:647–55.
- Danilevskaya ON, Traverse KL, Hogan NC, et al. (1999) The two *Drosophila* telomeric transposable elements have very different patterns of transcription. *Mol Cell Biol* 19:873–81.
- Diotti R, Loayza D (2011) Shelterin complex and associated factors at human telomeres. *Nucleus* 2:119–35. doi: 10.4161/nucl.2.2.15135.
- Ferrón SR, Marqués-Torrejón MA, Mira H, et al. (2009) Telomere shortening in neural stem cells disrupts neuronal differentiation and neuritogenesis. *J Neurosci* 29:14394–14407. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3836-09.2009.
- Frydrychova R, Marec F (2002) Repeated losses of TTAGG telomere repeats in evolution of beetles (*Coleoptera*). *Genetica* 115:179–87.
- Frydrychova RC, Biessmann H, Mason JM (2008) Regulation of telomere length in *Drosophila*. *Cyt and Gen Res* 122(3-4), 356-364.
- Frydrychova RC, Mason JM, Biessmann H (2009) Regulation of telomere length in *Drosophila*. *Cyt and Gen Res* 122:356–364.
- Frydrychova R, Mason JM (2013) *Telomeres: Their Structure and Maintenance*. INTECH Open Access Publisher.
- George J, Pardue ML (2003) The promoter of the heterochromatic *Drosophila* telomeric retrotransposon, *HeT-A*, is active when moved into euchromatic locations. *Genetics* 163:625–35.
- George JA, DeBaryshe PG, Traverse KL, et al. (2006) Genomic organization of the *Drosophila* telomere retrotransposable elements. *Genome Res*, 16(10):1231-1240.
- Greider CW, Blackburn EH (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43(2): 405-413.

- Greider CW (1996) Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem* 65:337–65.
- Greider CW, Blackburn EH (1996) Telomeres, telomerase and cancer. *Sci Am* 274:92–7.
- Harley CB, Futcher AB, Greider CW (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts : *Nature* 345: 458 - 460.
- Harley CB, Villeponteau B (1995) Telomeres and telomerase in aging and cancer. *C O Gen and Dev* 5(2): 249-255.
- Hayflick L, Moorhead PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *E Cell Res*, 25(3), 585-621.
- Chan SW, Blackburn EH (2002) New ways not to make ends meet : telomerase , DNA damage proteins and heterochromatin. *Oncogene* 21:553–63. doi: 10.1038/sj/onc/1205082.
- Kahn T, Savitsky M, Georgiev P (2000) Attachment of *HeT-A* sequences to chromosomal termini in *Drosophila melanogaster* may occur by different mechanisms. *Mol Cell Biol* 20:7634– 7642.
- Katsuji Y, Hiromi K, Hisaya A, et al. (1991) Identification of an unusual structure in the *Drosophila melanogaster* transposable element copia: evidence for copia transposition through an RNA intermediate. *Gene* 103(2):179-184.
- Lee HW, Blasco MA, Gottlieb GJ, et al. (1998) Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature* 392:569–574.
- Lee J, Sung YH, Cheong C, et al. (2008) TERT promotes cellular and organismal survival independently of telomerase activity. *Oncogene* 27(26):3754-3760.
- Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, et al. (1992). Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol* 225(4):951-960.
- Lin J, Epel E, Blackburn E (2012) Telomeres and lifestyle factors: roles in cellular aging. *Mutat Res* 730:85–9. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.08.003.

- López CC, Nielsen L, Edström JE (1996) Terminal long tandem repeats in chromosomes from *Chironomus pallidivittatus*. *Mol Cell Biol* 16(7):3285-90.
- Magenat L, Tobler H, Müller F (1999) Developmentally Regulated Telomerase Activity Is Correlated with Chromosomal Healing during Chromatin Diminution in *Ascaris suum*. *Mol Cell Biol* 19.5: 3457-3465.
- Mason JM, Strobel E, Green MM (1984) mu-2: mutator gene in *Drosophila* that potentiates the induction of terminal deficiencies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:6090–4.
- Mason JM, Frydrychova RC, Biessmann H (2008) *Drosophila* telomeres: an exception providing new insights. *Bioessays* 30:25–37.
- Maxwell PH, Belote JM, Levis RW (2006). Identification of multiple transcription initiation, polyadenylation, and splice sites in the *Drosophila melanogaster* TART family of telomeric retrotransposons. *Nuc Acd Res* 34(19):5498-5507.
- McClintock B (1941) The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* 26(2): 234.
- McClintock B (1942) The fusion of broken ends of chromosomes following nuclear fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 28(11): 458.
- Melek M, Shippen DE (1996) Chromosome healing: spontaneous and programmed de novo telomere formation by telomerase. *BioEssays* 18(4):301-308.
- Meyne J, Ratliff Rl, Moyzis RK (1989) Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:7049–53.
- Nielsen L, Edstrom JE (1993) Complex telomere-associated repeat units in members of the genus *Chironomus* evolve from sequences similar to simple telomeric repeats. *Mol Cell Biol* 13:1583–1589.
- Olovnikov AM (1973) A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol* 41(1):181-90.

- Okazaki S, Tsuchida K, Maekawa H, et al. (1993) Identification of a Pentanucleotide Telomeric Sequence, (TTAGG)<sub>n</sub>, in the silkworm *Bombyx mori* and in Other Insects. *Mol Cell Biol* 13:1424–32.
- Pardue ML, Debaryshe PG (2000) *Drosophila* telomere transposons: genetically active elements in heterochromatin. *Genetica* 109:45–52.
- Pardue ML, DeBaryshe PG (2003) Retrotransposons provide an evolutionarily robust non-telomerase mechanism to maintain telomeres. *Annu Rev Genet* 37:485–511. doi: 10.1146/annurev.genet.38.072902.093115.
- Pardue ML, DeBaryshe PG (2008) *Drosophila* telomeres: a variation on the telomerase theme. *Fly* 2(3):101-110.
- Pich U, Fuchs J, Schubert I (1996) How do *Alliaceae* stabilize their chromosome ends in the absence of TTTAGGG sequences? *Chromosom Res* 4:207–13.
- Rashkova S, Karam SE, Kellum R, Pardue ML (2002) Gag proteins of the two *Drosophila* telomeric retrotransposons are targeted to chromosome ends. *J Cell Biol* 159:397–402. doi: 10.1083/jcb.200205039.
- Rashkova S, Athanasiadis A, Pardue M (2003) Intracellular Targeting of Gag Proteins of the *Drosophila* Telomeric Retrotransposons. *77*:6376–6384. doi: 10.1128/JVI.77.11.6376
- Rovira C, Beermann W, Edstrom JE (1993) A Repetitive Dna-Sequence Associated with the Centromeres of *Chironomus pallidivittatus*. *Nucleic Acids Research* 25;21(8):1775-81.
- Sahara K, Marec F, Traut W (1999) TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. *Chromosome Res* 7(6):449-60.
- Schneider R, Grosschedl R (2007) Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Genes and Dev* 21:3027-3043.
- Shay JW, Bacchetti S (1997) A survey of telomerase activity in human cancer. *E J of cancer* 33(5): 787-791.

- Sheen FM, Levis RW (1994) Transposition of the LINE-like retrotransposon *TART* to *Drosophila* chromosome termini. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(26):12510-12514.
- Shpiz S, Kwon D, Uneva A, et al. (2007) Characterization of *Drosophila* telomeric retroelement *TAHRE*: transcription, transpositions, and RNAi-based regulation of expression. *Mol Biol Evol* 24:2535–45. doi: 10.1093/molbev/msm205.
- Siriaco GM, Cenci G, Haoudi A, et al (2002) Telomere elongation (Tel), a new mutation in *Drosophila melanogaster* that produces long telomeres. *Genetics*, 160(1):235-245.
- Walter MF, Biessmann H (2004) Expression of the telomeric retrotransposon *HeT-A* in *Drosophila melanogaster* is correlated with cell proliferation. *Dev Genes Evol* 214:211–9. doi: 10.1007/s00427-004-0400-x.
- Walter MF, Biessmann MR, Benitez C, et al. (2007) Effects of telomere length in *Drosophila melanogaster* on life span, fecundity, and fertility. *Chromosoma*, 116(1): 41-51.
- Watson JD (1972) Origin of the concatameric T4 DNA. *Nature New Biol* 239:197-201.
- Williamson JR, Raghuraman MK, Cech TR (1989) Monovalent cation-induced structure of telomeric DNA: The G-quartet model. *Cell* 59(5):871-880.
- Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, et al. (1996) Telomerase Activity in Human Germline and Embryonic Tissues and Cells. *Dev Genet* 18:173–179.
- von Zglinicki T (2002) Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci* 27:339–44.
- Yasumoto S, Kunimura C, Kikuchi K, et al. (1996) Telomerase activity in normal human epithelial cells. *Oncogene* 13(2): 433-439.
- Young BS, Pession A, Traverse KL, et. al. (1983) Telomere regions in *Drosophila* share complex DNA sequences with pericentric heterochromatin. *Cell* 34(1): 85-94.