

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

Katedra genetiky

**Analýza promotorových sekvencí telomerického  
elementu *HeT-A* u *Drosophila melanogaster***

Diplomová práce

**Bc. Hana Švellerová**

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

České Budějovice 2016

Švellerová H., 2016. Analýza promotorových sekvencí telomerického elementu *HeT-A* u *Drosophila melanogaster*. [Analysis of the promotor sequences of the telomeric element *HeT-A* in *Drosophila melanogaster*. Mgr. Thesis, in Czech] – 34 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:**

*Drosophila melanogaster* extends its telomeres by transposition of special telomeric retroelements (*HeT-A*, *TART* and *TAHRE*) targeted specifically to chromosome ends. Retroelement *HeT-A* is the most studied of telomeric elements and recent studies revealed significant sequence variability of the *HeT-A* element, not only along its length but also in areas with regulatory activity. This thesis is focused on the activity of different *HeT-A* promoters during the whole *Drosophila* development and comparison of transgenic lines with *HeT-A* promotor and reporter *Tomato* transgen and it was confirmed the sequence variability of the *HeT-A* promotor and tissue and organ specificity of its activity.

Prohlašuji, že svoji diplomovou 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 diplomové 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

.....

Bc. Hana Švellerová

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala své školitelce RNDr. Radmile Čapkové Frydrychové, Ph.D., za ochotu, trpělivost, cenné rady a celkové odborné vedení této práce. Dále bych ráda vyjádřila poděkování celému kolektivu laboratoře, především Mgr. Michale Korandové za neustálou pomoc a přátelství. V neposlední řadě bych poděkovala celé své rodině za jejich podporu během mého studia.

# Obsah

<b>1. Úvod.....</b>	<b>1</b>
1.1. Telomery .....	1
1.2. Telomeráza.....	2
1.3. Telomery u drozofily .....	2
1.4. Telomerické elementy.....	3
1.5. Retrotranspozice .....	4
1.6. Aktivita telomerických elementů.....	6
<b>2. Cíle práce .....</b>	<b>8</b>
<b>3. Materiál a metody .....</b>	<b>9</b>
3.1. Kmeny <i>Drosophila melanogaster</i> .....	9
3.2. Příprava transgenních konstruktů .....	9
3.3. Izolace DNA .....	10
3.4. PCR a použité primery.....	10
3.5. Vyhodnocování fluorescenčního signálu.....	11
<b>4. Výsledky .....</b>	<b>12</b>
4.1. Exprese konstruktů v larvách.....	14
4.2. Exprese konstruktů v kuklách.....	16
4.3. Exprese konstruktů v dospělých a embryích .....	18
<b>5. Diskuze .....</b>	<b>23</b>
<b>6. Závěr.....</b>	<b>26</b>
<b>7. Literatura.....</b>	<b>27</b>
<b>8. Příloha .....</b>	<b>32</b>

# 1. Úvod

S vývojem nových léků, technologií a nepředstavitelným pokrokem dnešní medicíny se nemoci, kterých se lidé dlouhé roky obávali, stávají lépe porazitelnými, či dokonce vyléčitelnými. Naproti tomu lidé podléhají civilizačním chorobám, jako jsou kardiovaskulární a nádorová onemocnění, neurodegenerativní poruchy, diabetes mellitus nebo obezita. Se zvyšující se dobou života se také zraky lékařů upínají k problematice stárnutí. Mnoho studií na světě se zaměřují na procesy, které mají za následek stárnutí a jedním z nich je i výzkum telomer.

## 1.1. Telomery

Telomery jsou nukleoproteinové struktury na koncích eukaryotních chromozomů. Mezi jejich hlavní funkce patří zachování celistvosti a stability při nekompletní replikaci terminální části chromozomů (Olovnikov 1996), obrana proti fúzím s dvouřetězcovými zlomy a ochrana konců chromozomů před nukleázami (Capkova Frydrychova 2009; Cenci et al. 2005). Při každé replikaci DNA dochází ke ztrátě části chromozomu, a to z důvodu nedokonalé replikace na opožďujícím se řetězci DNA. Problém je ve schopnosti syntetizovat vlákno DNA pouze ve směru 5'–3' a pro iniciaci syntézy je navíc vyžadována přítomnost krátkých sekvencí RNA, tzv. RNA primerů, které přisedají k templátovému řetězci a od kterých začíná syntéza DNA. Následně jsou primery degradovány, ale degradací uvolněné místo nemůže být již dodatečně dosyntetizováno a takto jsou koncové úseky chromozomů zkráceny (Olovnikov 1973; Snustad & Simmons 2010). Po určitém počtu dělení dojde ke zkrácení na určitou kritickou mez, tzv. Hayflickův limit, a buňka poté ztrácí schopnost dělení a nastává stárnutí (tzv. buněčná senescence), případně smrt buňky (Hayflick & Moorhead 1961). U většiny somatických buněk je tento proces nezvratný, nicméně v buňkách, které jsou charakterizovány vysokou či stálou proliferací, jako jsou například buňky zárodečné, embryonální nebo kmenové, existuje enzym telomeráza, který proces buněčné senescence dokáže zvrátit, a to tím, že k telomerám nasedá a prodlužuje je (Zhu et al. 2011).

## 1.2. Telomeráza

Telomeráza je ribonukleoprotein s RNA-dependentní DNA-polymerázovou aktivitou. Poprvé byla objevena u nálevníka *Tetrahymena thermophila* (Greider & Blackburn 1989) a obsahuje dvě hlavní podjednotky, telomerázovou RNA, která slouží jako templát (Blasco et al. 1997; Lee et al. 1998) a telomerázově specifický protein TERT (telomerase reverse transcriptase), který je zodpovědný za reverzní transkripci (Collins & Mitchell 2002; Lee et al. 2008). Telomeráza dosedá na 3' konec substrátové DNA, ke kterému doplňuje úseky DNA syntetizované podle templátové molekuly RNA. Sekvence komplementárního řetězce je doplněna za pomoci DNA polymerázy. Enzym tak připojuje ke koncům chromozómů krátké, opakující se sekvence, kterými tak telomery prodlužuje (Wyatt et al. 2010).

Nefunkčnost telomerázy má za následek přirozené stárnutí buňky a její smrt (Blasco 2007), na druhou stranu její opětovné aktivace využívají nádorové buňky (Blagoev 2009; Harley 1995). Sekvence, která je telomerázou k telomerám připojována je obvykle vysoce konzervována pro celé taxony, takže např. u obratlovců to je sekvence (TTAGGG)<sub>n</sub>, u většiny hmyzu (TTAGG)<sub>n</sub> (Maeshima et al. 2001; Chan & Blackburn 2004; McKnight & Shippen 2004).

## 1.3. Telomery u drozofily

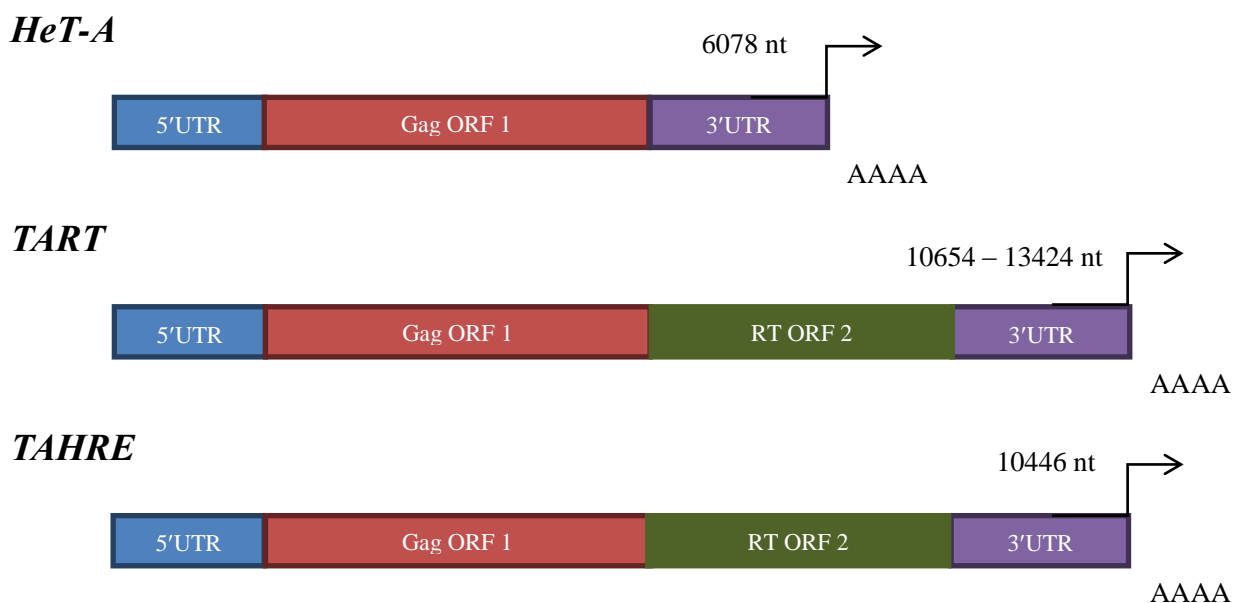
Co se týče skladby telomer a mechanismu kompenzace telomerických ztrát, jsou telomery drozofily výjimečné. Telomery drozofily totiž nejsou ani tvořeny krátkými telomerickými repeticemi a ani zde nefunguje telomeráza. Namísto toho se její telomery skládají z většího množství kopií třech telomericky specifických non-LTR retroelementů *HeT-A*, *TART* a *TAHRE*, které tvoří tzv. HTT oblast, a které jsou množeny prostřednictvím mechanismu retrotranspozice. Telomerické elementy jsou v telomeře zastoupeny v různém počtu opakování i v různém sledu (Biessmann & Mason 2003; Mason et al. 2008), a proto může mít HTT oblast proměnlivou délku od 26 do 147 kb. Tyto elementy kompenzují telomerické ztráty pomocí své retrotranspozice vedené specificky ke koncům chromozómů (Mason et al. 2008; Capkova Frydrychova 2009).

Obdobně jako u dalších prostudovaných organismů i u drozofily se na koncích telomery formuje proteinový komplex označovaný jako telomerická čepička, která především slouží k rozpoznání konců chromozómů od chromosomálních zlomů a tím k celkové stabilitě

a celistvosti genomu (Mason et al. 2008; Capkova Frydrychova 2009). Ačkoliv jsou určité rozdíly v proteinové kompozici telomerické čepičky mezi drozofilí telomerou a telomerami udržovanými telomerázou, hlavním rozdílem mezi těmito telomerami je to, že u drozofily se telomerická čepička formuje nezávisle na sekvenci DNA konce chromozómu. Proto v kontrastu s telomerami kupříkladu člověka, ztráta drozofilí telomerické sekvence nemusí vést ke genomové nestabilitě (Frydrychova & Mason 2013).

## 1.4. Telomerické elementy

Všechny tři telomerické retroelementy obsahují čtecí rámec ORF1 pro protein GAG, jenž se stará o přenos RNA elementů do jádra a jeho navázání při procesu transpozice. Elementy *TART* a *TAHRE* mají navíc druhý čtecí rámec pro reverzní transkriptázu (RT) (Rashkova et al. 2002). Elementy dále obsahují dlouhý netranslatovaný úsek UTR na 3' konci, který tvoří až polovinu jejich sekvence (Abad et al. 20041; George et al. 2006) (Obr. 1).



**Obr. 1:** Telomerické retroelementy *HeT-A*, *TART* a *TAHRE*: 5' UTR – nepřekládaná oblast na 5' konci; Gag ORF1 – kódování proteinu GAG; RT ORF2 – kódování reverzní transkriptázy; 3' UTR – nepřekládaná oblast na 3' konci, AAAA – polyadeninový konec, kterým se elementy připojují k chromozomálnímu konci.

Nejprostudovanějším retroelementem je *HeT-A*. Element *HeT-A* je dlouhý 6 kb, tvoří 80 – 90 % HTT oblasti (Frydrychova & Mason 2013) a je přerušovaný duplikacemi, delecemi a více než 2,5 kb nekódujícími sekvencemi (Biessmann et al. 1992; Danilevskaya et al. 1997). Oproti zbývajícím retroelementům, *HeT-A* obsahuje pouze jeden otevřený čtecí rámec ORF1 (open reading frame) kódující protein GAG. Chybějící restriční transkriptázu získává od zbylých elementů *TART* a *TAHRE* (Danilevskaya et al. 1997; Danilevskaya et al. 1999; Pardue & DeBaryshe 2003). Transpozon *HeT-A* má variabilní délku oligo(A) konce, díky kterému je připojován na chromozomální konec. V dlouhé netranslatované oblasti 3' UTR se nachází promotor, který řídí transkripci sousedního elementu ve směru 3' (Pardue & DeBaryshe 2003). Díky tomu obsahuje nový element část sousedního ze směru 5'. V oblasti 5' UTR se také nachází další promotor, nicméně ten k celkové transkripci přispívá jen nepatrně a pravděpodobně je důležitý pro tkáňovou specifičnost (George & Pardue 2003).

Dalším, méně čtým (10 – 20 %), telomerickým elementem je *TART*. Ten již obsahuje, jako ostatní LINE transpozony, dva čtecí rámce, ORF1, kódující protein GAG stejně jako u elementu *HeT-A*, a ORF2, kódující protein Pol s endonukleázovou doménou a funkcí reverzní transkriptázy (Capkova Frydrychova 2009; Casacuberta & Pardue 2005). *TART* je 12 kb dlouhý a byly popsány tři podskupiny, *TART-A*, *TART-B* a *TART-C* (Sheen & Levis 1994). I přesto, že *TART* nese gen pro protein GAG, bez transkriptu *Gag* z elementu *HeT-A* není schopný vyhledat konce chromozomů (Rashkova 2002).

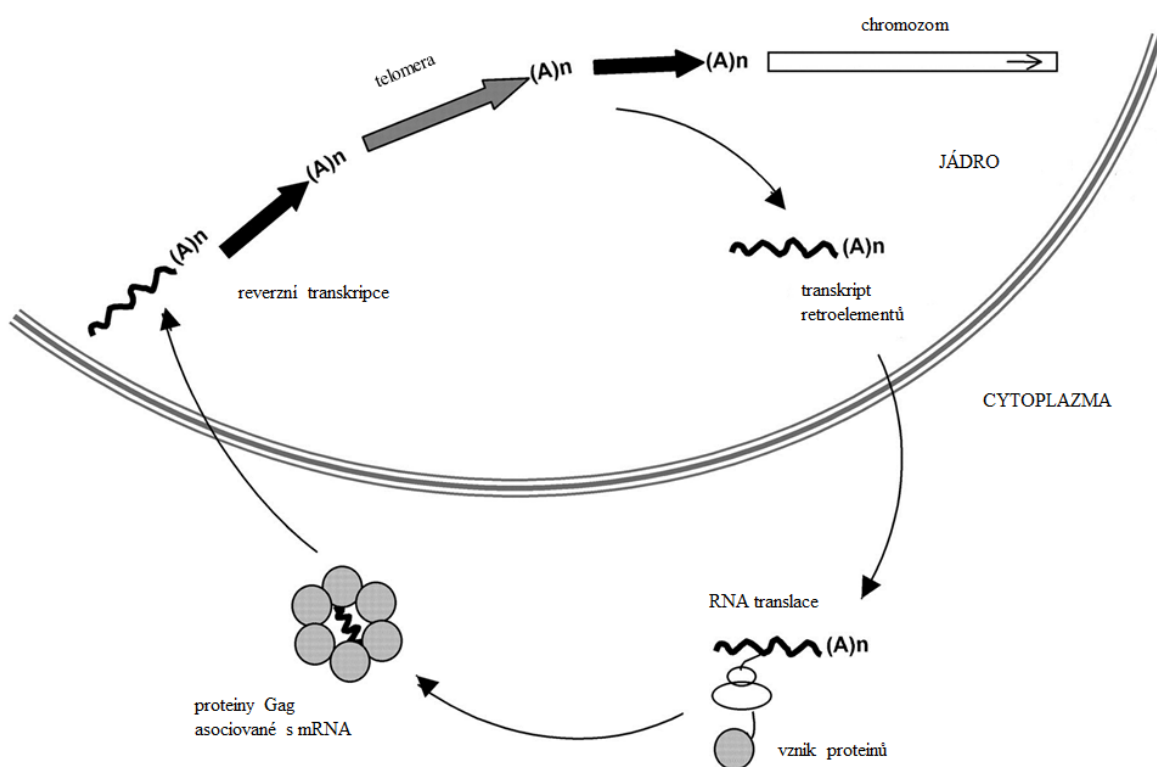
Posledním telomerickým elementem je *TAHRE* (Telomere-Associated and *HeT-A*-Related Element). Předpokládá se společný předek pro *TART* a *TAHRE* díky shodným čtecím rámcům ORF1 a ORF2, které u obou elementů kódují proteiny GAG a POL (Shpiz et al. 2007). Navíc je element *TAHRE* sekvenčně velmi podobný transpozonu *HeT-A* v oblastech 5'UTR, ORF1 a 3'UTR a předpokládá se vznik elementu *HeT-A* z elementu *TAHRE*, a to ztrátou oblasti ORF2 (Abad et al. 2004). *TAHRE* je 11 – 13 kb dlouhý a je zde domněnka, že poskytuje reverzní transkriptázu elementu *HeT-A*.

## 1.5. Retrotranspozice

U drozofily jsou pro prodlužování telomer využívány dva systémy. Prvním z nich je genová konverze, kdy v průběhu prodloužení telomer slouží jedna telomera jako templát pro syntézu druhé. Nicméně tento systém je u drozofily využíván jako alternativní (Mason et al. 2008).



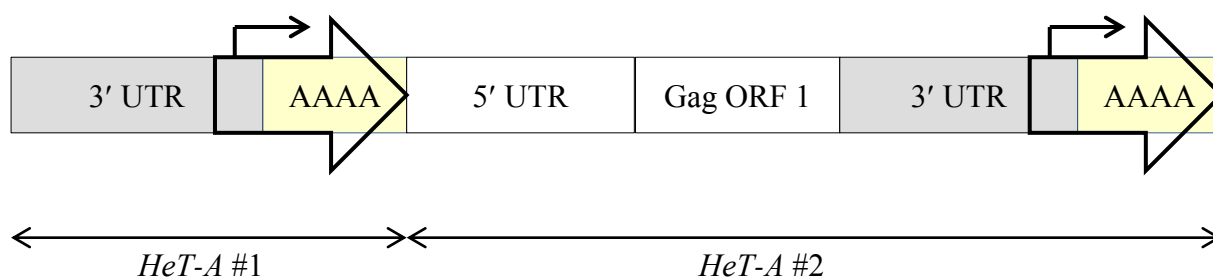
Hlavním procesem kompenzace telomerické délky je retrotranspozice telomerických elementů. Mechanismus retrotranspozice zahrnuje několik kroků (Obr. 2). Prvním krokem je transkripce telomerických elementů. Vzniklé transkripty jsou transportovány jadernými póry do cytoplazmy jako mRNA. Zde jsou translatovány na polypeptid GAG, u elementů *TART* a *TAHRE* navíc dochází k translaci reverzní transkriptázy. Poté jsou proteiny GAG navázány na transkripty retroelementů a transportovány zpět do jádra. Pomocí 3'oligo(A) konců transkriptů a interakcí proteinů dojde k navázání na chromozomální konec a pomocí reverzní transkriptázy k přepisu molekuly RNA do DNA a tedy k telomerické elongaci. Posledním krokem je vytvoření telomerické čepičky (Capkova Frydrychova 2009; Biessmann & Mason 2003).



**Obr. 2:** Znárodnění retrotranspozice telomerických elementů (Pardue a Debaryshe 2008, upraveno). Nejprve dochází k transkripci elementů. Tyto transkripty opouštějí pomocí jaderných pórů jádro a v cytoplazmě dochází na ribozomech k translaci a vzniku proteinu GAG a reverzní transkriptázy. Následně se protein GAG naváže na transkripty a spolu s reverzní transkriptázou se navracují do jádra. Pomocí 3'oligoadeninového konce a na základě interakce proteinů dochází k navázání ke konci chromozomů, reverzní transkripci, prodloužení telomery a k vytvoření telomerické čepičky.

## 1.6. Aktivita telomerických elementů

*HeT-A* promotor se jeví jako možný evoluční mezičlánek mezi typickými non-LTR elementy a retroviry a LTR transpozony. Promotor *HeT-A* elementu je složen z terminální sekvence předcházejícího elementu, ležícího na 3' konci, a řídí transkripci sousedního elementu ve směru 5' (Pardue & DeBaryshe 2003) (Obr. 3). Každý element tedy obsahuje část elementu předcházejícího.



**Obr. 3:** Obrázek znázorňující transkripci *HeT-A* elementů. Šipky zobrazují promotory ve 3' UTR, odkud začíná transkripce následujícího elementu (Pardue a DeBaryshe 2003, upraveno).

Obecně lze říci, že exprese telomerických elementů souvisí s buněčnou proliferací a regulací buněčného cyklu (Walter & Biessmann 2004; George & Pardue 2003; Shpiz et al. 2007). Transkripční aktivita byla studována v práci Danilevskaya et al. (1997), kde byly využity různě dlouhé úseky 3' UTR oblasti v konstruktu s reportérovým genem pro  $\beta$ -galaktosidázu v kulturách buněk drozofily. Konec oblasti 3' UTR, mající různou délku od nukleotidu -590 po nukleotid -1 (kdy nukleotid -1 je posledním nukleotidem *HeT-A* elementu), byly připojeny k regionu 5' UTR s délkou od nukleotidu +1, tj. prvního nukleotidu *HeT-A* elementu, po nukleotid +646. Během pokusů bylo zjištěno, že promotorová aktivita je z 90 % lokalizovaná v oblasti 3' UTR a za zbylých 10 % aktivity je zodpovědný promotor v oblasti 5' UTR. Promotor z oblasti 3' UTR je tvořen více komponenty, protože s rostoucí délkou použité oblasti 3' UTR se aktivita promotoru zesilovala. Stejné konstrukty byly použity ve studii zaměřující se na aktivitu promotoru *HeT-A* v euchromatinu (George & Pardue 2003). V této práci byly konstrukty sledovány pro tkáňově a vývojově specifickou expresi. I přesto, že byl promotor přemístěn ze svého přirozeného prostředí do euchromatinu, vykazoval svou aktivitu. Nicméně překvapivé

bylo, že kratší promotor, o sekvenci -404 až +646, vykázal aktivitu v širším spektru tkání (v mozku a imaginálních discích) než delší promotor o sekvenci -590 až +646, u něhož byla exprese pozorována pouze v křídelních discích. Tento fakt naznačuje, že rozdílné sekvence mohou vést k rozdílné aktivitě promotoru.

Magisterská práce Korandové (2014) se zabývala studiem aktivity telomerických elementů drozofily. Součástí práce bylo vytvoření transgenního konstruktů *HETom*, nesoucího gen pro tdTomato fluoresceční protein pod kontrolou promotoru *HeT-A*, a jeho integrace do euchromatinových oblastí. Transgenní jedinci sice vykázali expresi transgenu o společných rysech s dříve popsanou expresí endogenního elementu *HeT-A* (George & Pardue 2003; Walter & Biessmann 2004), tj. exprese byla detekována v tkáních s vysokou proliferační aktivitou, nicméně byly zde některé nesrovnalosti. Exprese, ačkoliv se intenzivně projevila v larválních, tak adultních testes, nebyla prokázána v ovariích, stejně tak nebyla detekována v embryích, a krom toho v imaginálních discích byla poměrně slabá. Absenci signálu ve zmíněných tkáních by mohla vysvětlit značná sekvenční variabilita elementu *HeT-A*, která byla v rámci jedinců potvrzena jak v kódujících oblastech, tak i v oblastech s regulační aktivitou elementu *HeT-A* (Pineyro et al. 2011).

## 2. Cíle práce

Cílem mé práce bylo ověření predikce, že sekvenčně různorodé oblasti 3' UTR jsou zodpovědné za orgánově specifickou aktivitu elementů, a to pomocí (1) izolace sekvenčně variabilních oblastí s předpokládanou regulační aktivitou elementu *HeT-A* a jejich využití pro vytvoření *HETom* konstruktů nesoucích jak získanou promotorovou sekvenci *HeT-A*, tak gen fluorescenčního proteinu tdTomato, (2) vytvoření transgenních linií drozofily nesoucích tyto konstrukty a (3) *in vivo* studium expresní aktivity těchto konstruktů na základě fluorescence proteinu tdTomato.

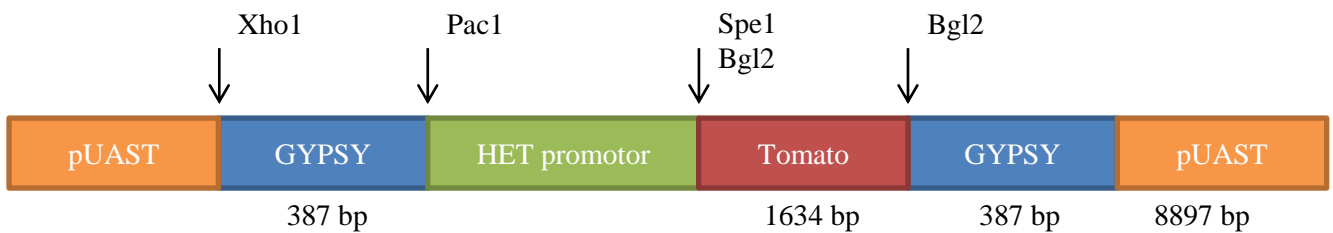
### 3. Materiál a metody

#### 3.1. Kmeny *Drosophila melanogaster*

Pro mou práci byl využit kmen  $y^1w^{67c23}$ , kmen *HETom35* s konstruktem *HETom* (Korandová 2014) a kontrolní divoký kmen Oregon R. Všechny kmeny drozofil byly chovány při stejných podmínkách, fotoperioda 16 hodin světlo + 8 hodin tma při 25°C, na standardním kukuřično-melasovém médiu (163 g kukuřičného šrotu, 16 g agaru, 33 g sušených kvasnic, 200 ml melasy, 2,6 l vody) s desinfekčním roztokem (12 g kyseliny benzoové, 2,5 g kyseliny sorbové, 240 ml denaturovaného etylalkoholu).

#### 3.2. Příprava transgenních konstruktů

Na portálu GenBank byla analyzována sekvence DNA AC010841, tj. sekvence fragmentu telomery nesoucí sérii několika elementů *HeT-A*, přičemž byly identifikovány tři *HeT-A* elementy s různou sekvencí 3' UTR. Jedna z těchto sekvencí byla pro detailní analýzu použita již v předešlé studii v konstruktu *HeTom* (Korandová 2014). Já jsem se zaměřila na další dvě sekvence, označené jako A3 a A4. Sekvence byly izolovány metodou PCR pomocí specifických primerů. Templátem pro PCR reakci byla genomová DNA z kmene Oregon R izolovaná kitem NucleoSpin® Gel. Po kontrole velikosti produktů pomocí agarózy elektroforézy byly příslušné proužky DNA z agarózy izolovány kitem PCR Clean-up (Macherey-Nagel, kat. číslo 740609.50) a DNA byla opětovně amplifikována PCR reakcí s primery nesoucími restrikční místa pro enzymy PacI a SpeI. Po přečištění byl PCR produkt ligován do vektoru pGEM (Promega). Pomocí míst PacI a SpeI byl příslušný fragment vyštěpen a napojen ke genu *Tomato* ve vektoru pUAST (Obr. 4). Připravené konstrukty byly firmou Rainbow transgenic, Inc. (USA) injikovány do vajíček drozofil kmene  $y^1w^{67c23}$ . Integrace konstruktů do genomu byla pomocí P-elementové inserce, s tím, že úseky zodpovědné pro tuto inserci jsou obsaženy v pUAST. Pro následnou selekci transformantů byla využita exprese genu *w* z vektoru pUAST, tj. oproti netransformovaným bělookým jedincům byli transformovaní jedinci červenoocí.



**Obr. 4:** Schéma konstruktů *HETom*. *Tom* je gen pro fluorescenční protein tdTomato, transkripce je řízena promotorem elementu *HeT-A*. Konstrukt je opatřen izolátory *Gypsy*, a to pro zabránění pozičního efektu po integraci konstruktů do genomu.

### Izolace DNA

Genomová DNA byla izolována pomocí E.Z.N.A. Insect DNA Kit (Omega, kat. číslo D6943-02) a pro izolaci plazmidové DNA byly využity komerční kity E.Z.N.A. Plasmid DNA Mini Kit I (Omega, kat. číslo D6943-01) a QIAGEN® Plasmid Midi Kit (Qiagen, kat. číslo 12143), přičemž jsem postupovala dle návodů doporučených výrobcem.

### 3.4. PCR a použité primery

K sekvencím A3 a A4 byly navrženy primery, ke kterým byly přidány restrikční místa Pac1 a Spe1 (restrikční místa umožnila zaklonování úseku do vektoru pUAST) (Tabulka 1). Pro kontrolu správnosti klonování byly také využity primery pro gen *tdTomato* ve vektoru pUAST. Reakční směsi byly složeny z 10×DreamTaq Buffer, 10 mM dNTP, 0,4 μM primerů, 8 U DreamTaq a doplněné vodou. Reakční profil pro primery HET byl 95°C, 3 min – (90°C, 30 s – 59°C, 30 s – 72°C, 1 min)<sub>31×</sub>, 72°C, 4 min. Reakční profil pro primery Tomato byl 95°C, 3 min – (90°C, 30 s – 61°C, 30 s – 72°C, 1 min)<sub>31×</sub>, 72°C, 4 min.

**Tab. 1:** Sekvence primerů pro jednotlivé konstrukty.

Primery pro:	Sekvence primeru
<u><i>HETom1</i></u>	
A7-5097PacF (forward)	5'– TTAATTAAATTACCTACCAGCTAA–3'
HET-Rev (reverse)	5'– TTAACTTTGCTGGTGGAGGTA–3'
<u><i>HETom2</i></u>	
A4-4796PacF (forward)	5'– TTAATTAAAACCTTAATGATTCTAAATC–3'
A4-5885SpeR (reverse)	5'– ACTAGTTGGTGGAGGTACGGAGA–3'
<u><i>HETom3</i></u>	
A7-5271PacF (forward)	5'– TTAATTAAGCACTGCCACAAGAAG–3'
HET-Rev (reverse)	5'– TTAACTTTGCTGGTGGAGGTA–3'
<u><i>HETom4</i></u>	
A7-4786PacF (forward)	5'– TTAATTAAAATTCGACGACTCCAAA–3'
HET-Rev (reverse)	5'– TTAACTTTGCTGGTGGAGGTA–3'
<u>Tomato</u>	
Spe1TomatoF (forward)	5'– AGACTAGTATGGTGAGCAAGGG–3'
Spe1TomatoR (reverse)	5'– GGACTAGTGCAGTGAAAAAATG–3'

### 3.5. Vyhodnocování fluorescenčního signálu

Transgenní jedinci byli fotografováni pod stereo-mikroskopem (Olympus, SZX12) s filtrem pro červené spektrum fotoaparátem Olympus E-600. Pořizovala jsem fotky celých jedinců nebo jednotlivých orgánů larev třetího instaru či dospělců různého stáří. Pitva probíhala na podložním sklíčku v kapce fyziologického roztoku.

## 4. Výsledky

Byly připraveny dva konstrukty, a to *HETom3* a *HETom4*, které nesou promotorové sekvence z koncové oblasti 3' UTR elementu *HeT-A* (Obr. 12–14) napojené ke genu *tdTomato*. Sekvence byly vzájemně porovnány v programu Mega 5.2 a rovněž byly porovnány s příslušným úsekem sekvence z dříve publikované práce Danilevskaya et al. (1997) a příslušným úsekem konstruktů *HETom35* z práce Korandové (2014). Sekvenční rozdílnost úseků je prezentována v obrázku 5. U sekvence *HETom35*, kdy bylo použito 892 bp z konce 3' UTR, je sekvence téměř totožná se sekvencí použitou v práci Danilevskaya et al. (1997), a to s výjimkou několika nukleotidů. Naproti tomu sekvence z *HETom3*, která nesla 706 bp z konce 3' UTR, a *HETom4* se sekvencí 3' UTR o délce 1147 bp se od sekvence publikované v práci Danilevskaya (1997) výrazně odlišovaly. Sekvence *HETom4* a *HETom3* se navzájem odlišují jednak svou délkou a rovněž delecí 45 bází v *HETom4* (v úseku od nukleotidu -256 po nukleotid -301 sekvence *HETom3* počítané od konce elementu), jinak jsou sekvence navzájem totožné. Komplettní sekvence použitých úseků 3' UTR jsou uvedeny v příloze (Obr. 12–14).

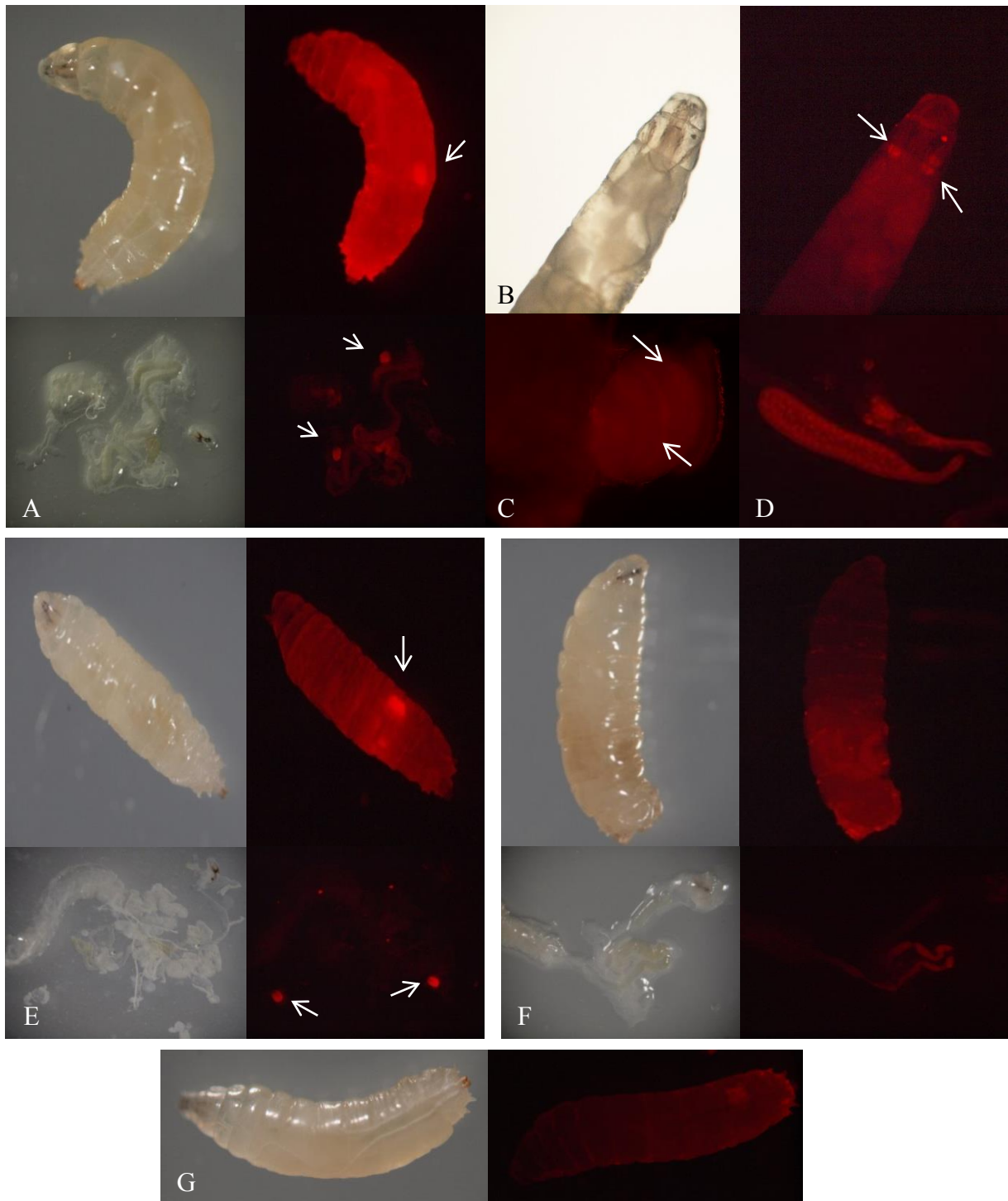
U obou konstruktů bylo po křížení transgenních jedinců s mouchami  $y^1w^{67c23}$  získáno 15 homozygotních linií, u nichž obou byly pro další analýzu vybrány čtyři linie. Mezi testovanými liniemi v rámci jednotlivých konstruktů nebyl pozorován žádný rozdíl v lokalizaci či intenzitě fluorescence. Společně s připravenými konstrukty *HETom3* a *HETom4* jsem sledovala linii *HETom35* a jako kontrolní skupinu jsem použila kmen divokého typu Oregon R. Expresce byla studována pod fluorescenčním mikroskopem během celého vývoje drozofily, od nakladených vajíček, přes všechny larvální instary, období kukly až po dospělé. Z dospělých jedinců a larev třetího instaru byly vypitvány orgány pro detailnější analýzu konstruktů. V rámci pokusu byly také pořízeny časosběrné snímky vývoje kukel.





#### 4.1. Exprese konstruktů v larvách

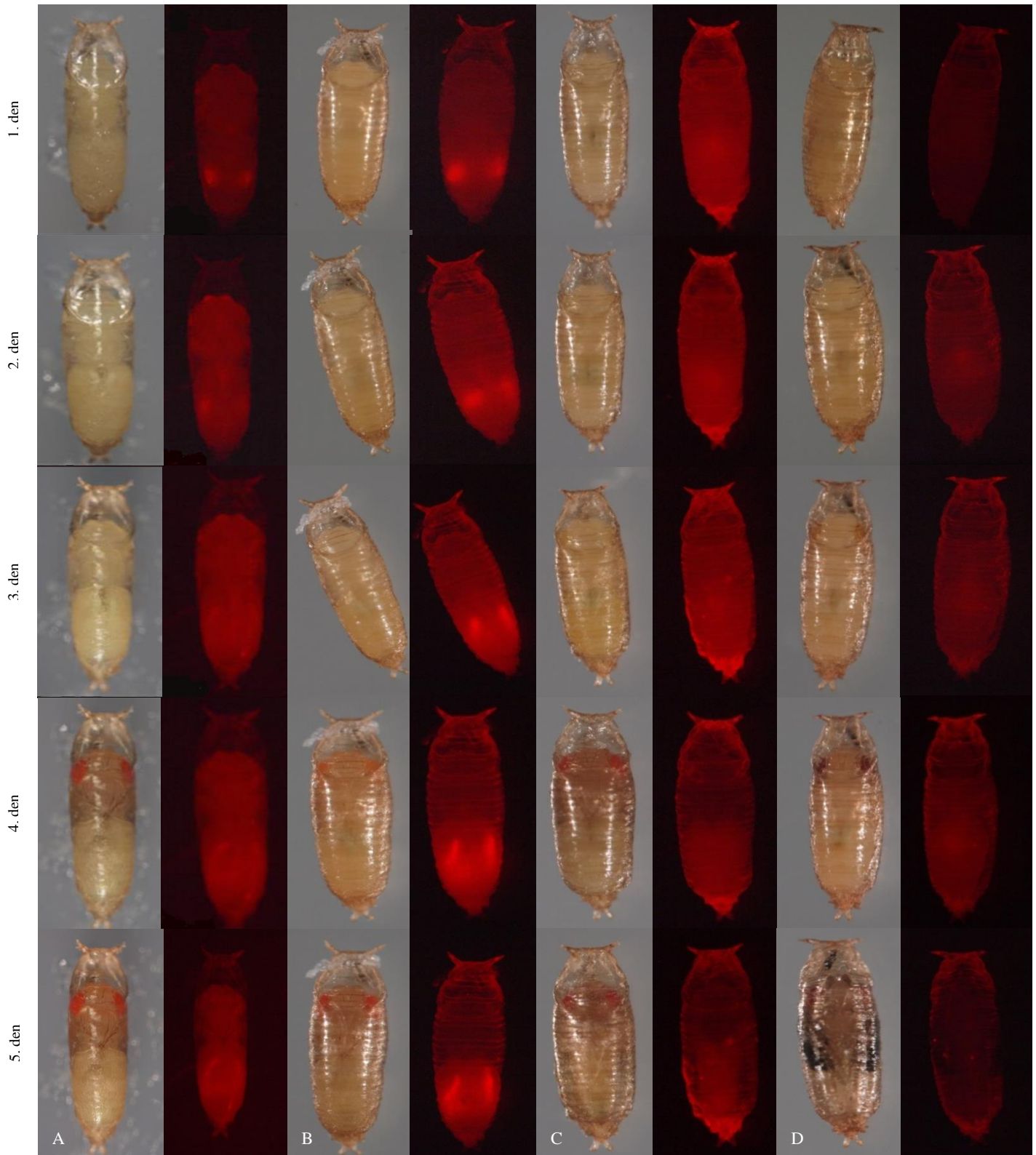
Fluorescence, tedy exprese konstruktů, byla analyzována ve všech třech instarech larválního období. Žádná významná fluorescence nebyla zaznamenána v prvním a druhém instaru, a to u žádné z linií. Fluorescence byla pozorována až u larev třetího instaru. U linie *HETom3* a *HETom35* byla pozorována mírná exprese v celém těle larvy, intenzivní fluorescence však byla sledována v testes (Obr. 6). Drozofily z linie *HETom4* vykazovaly pouze mírnou fluorescenci v celém těle (Obr. 6). U kontrolního kmenu Oregon R byla sledována mírná autofluorescence celého těla, a to znatelně nižší než byla zmíněná fluorescence těla transgenních jedinců. U larev třetího instaru byly vypitvány jednotlivé tkáně. Kromě zmíněných testes, při detailnější inspekci fluorescence byla exprese zaznamenána v některých imaginálních discích (křídelní disky, nožní disky a prothorakální disky), mozku a dokonce i v buňkách slinných žláz u jedinců *HETom35* (Obr. 6). Avšak s výjimkou prothorakálních disků a u některých jedinců také i slinných žláz, byla intenzita fluorescence relativně nevýrazná. U optických laloků mozku linie *HETom35* byla jasně patrná fluorescence v mitotických buňkách morfogenetické brázdy (Obr. 6C)



**Obr. 6:** Expresce konstruktů v larvách a jejich vypitvaných tkáních při viditelném a fluorescenčním světle. **A.** Larva linie *HETom35* (nahore) a její vypitvaná tkáň (dole). **B.** Expresce konstruktů *HETom35* v prothorakálních discích (vyznačených šipkami). **C.** Expresce konstruktů *HETom35* v mitotických buňkách morfogenetické brázdy, naznačeno šipkami, optických laloků mozku. **D.** Expresce konstruktů *HETom35* ve slinných žlázách. **E.** Larva linie *HETom3* (nahore) a její vypitvaná tkáň (dole). Šipky naznačují testes. **F.** Larva linie *HETom4* (nahore) a její vypitvaná tkáň (dole). **G.** Larva linie Oregon R.

## 4.2. Expresse konstruktů v kuklách

Pro vyhodnocení exprese v kuklách byly použity časosběrné snímky připravené snímáním jednotlivých kukel v průběhu celého jejich vývoje. Expresse konstruktů byla pozorována po celou dobu vývoje kukel, ale lišila se jak mezi jednotlivci, tak se měnila v průběhu vývoje kukly. U linie *HETom35* byla nejvyšší exprese v průběhu prvního dne zjištěna, podobně jako u larev třetího instaru, v testes, avšak již od druhého dne se místo fluorescence měnilo s postupným vývojem jednotlivých orgánů. U kmenu *HETom3* byla pozorována fluorescence celých kukel, ale především v testes. Testes u linie *HETom3* oproti linii *HETom35* vykazovala vysokou fluorescenci po celou dobu vývoje kukly. U konstruktu *HETom4* byla pozorovaná mírná exprese v celém těle kukly, a to bez výrazné fluorescence v jednotlivých částech kukly (Obr. 7). S postupným vývojem se fluorescence u linie *HETom4* snižovala. Kontrolní skupina Oregon R oproti transgenním liniím vykazovala jen lehkou autofluorescenci.

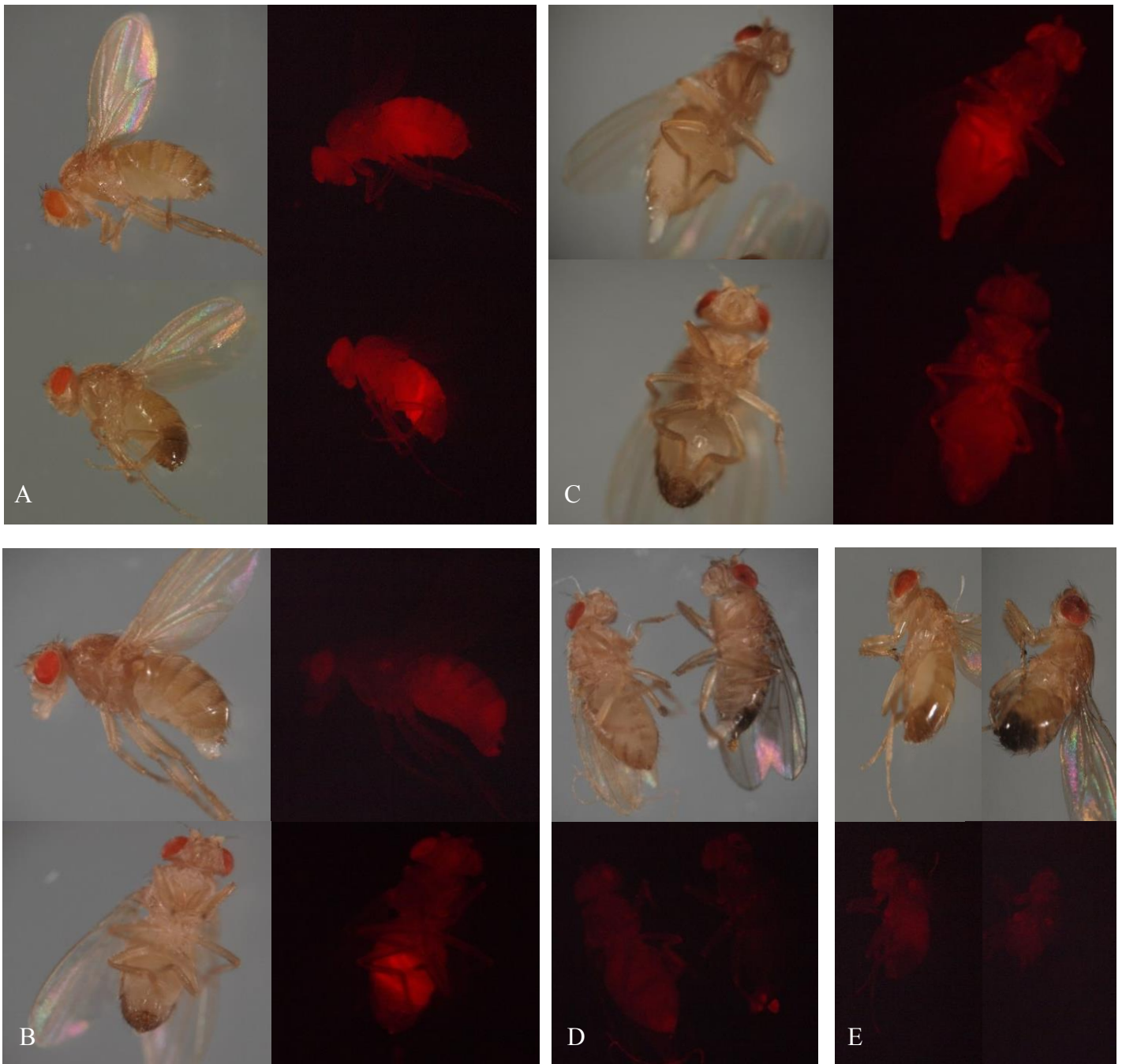


**Obr. 7:** Expresa *HETom* konstruktů v průběhu vývoje kukly. U jednotlivých kukel byly v průběhu jejich vývoje pořizovány časoběrné snímky, a to ve viditelném a fluorescenčním světle. **A.** Linie *HETom35*, **B.** Linie *HETom3*, **C.** Linie *HETom4*, **D.** Linie Oregon R.

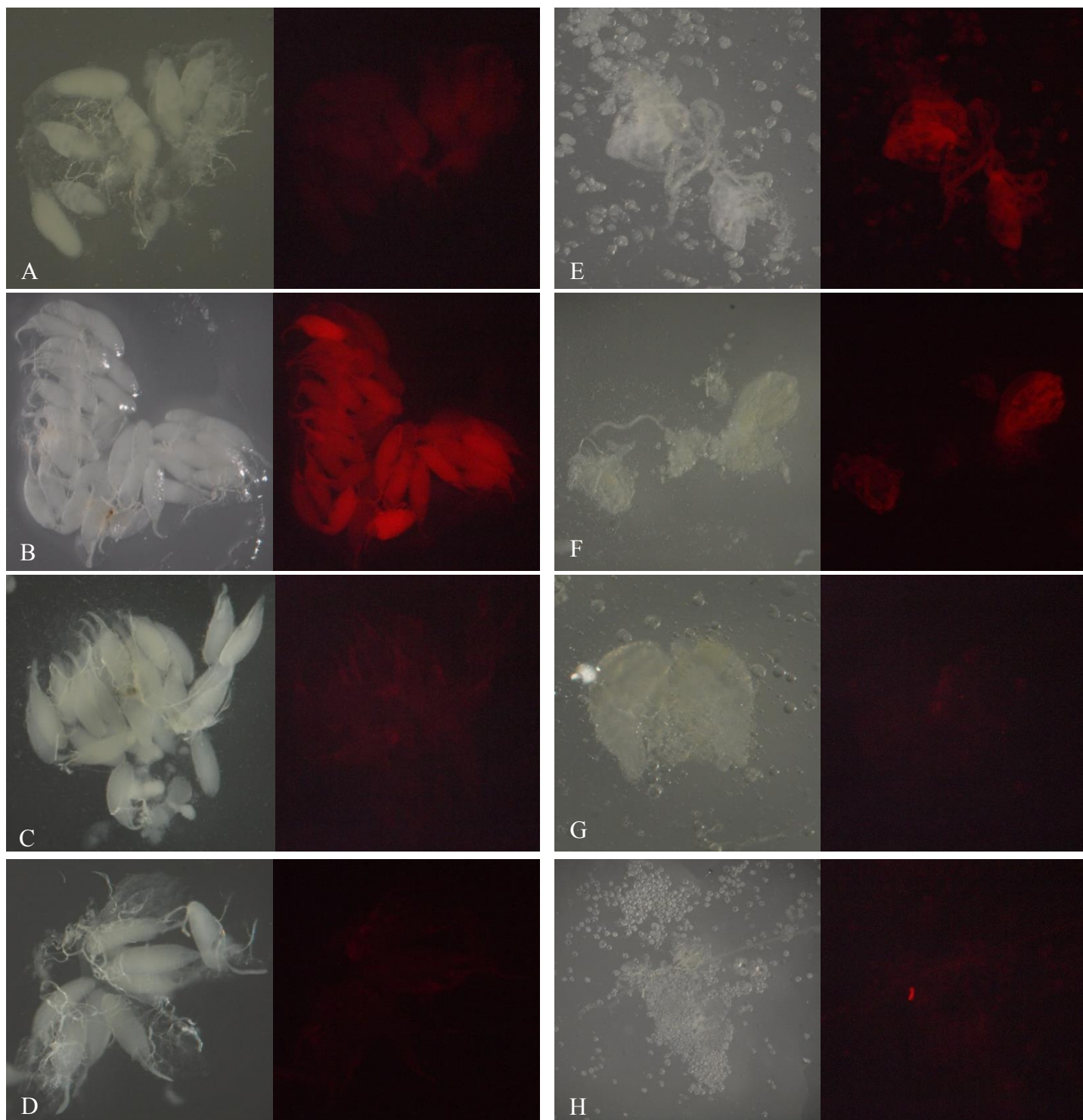
### 4.3. Expres konstruktů v dospělých a embryích

U dospělých jedinců byla u všech transgenních linií pozorována exprese v celém těle, nicméně nejintenzivnější fluorescence byla lokalizována v břišní dutině (Obr. 8). Po pitvě testovaných jedinců byla u linie *HETom35* nalezena významná exprese v testes, ale pouze mírná exprese v ovariích a vyvíjejících se oocytech. U linie *HETom3* byla výrazná fluorescence pozorována jak v testes, tak ovariích a oocytech. U linie *HETom4* byly testes, ovaria a oocyty zaznamenány pouze s mírnou fluorescencí. Jedinci a vypitvané orgány linie Oregon R vykazovaly oproti transgenním jedincům pouze lehkou autofluorescenci (Obr. 9 a 10).

Na intenzitu fluorescence byla dále vyhodnocována embrya v prvních osmi hodinách jejich vývoje. Fluorescence byla zaznamenána pouze u linie *HETom3*, s tím, že fluorescence v embryu byla homogenní bez nějakých zjevných struktur. Fluorescence u ostatních linií nepřevýšila intenzitu autofluorescence pozorovanou u linie Oregon R (Obr. 11). Při pozorování embryí mezi 15–22 hodinou jejich vývoje byly u všech transgenních linií zjištěny blíže nespecifikované útvary, které vykazovaly vyšší fluorescenci než zbytek embrya (Obr. 11).

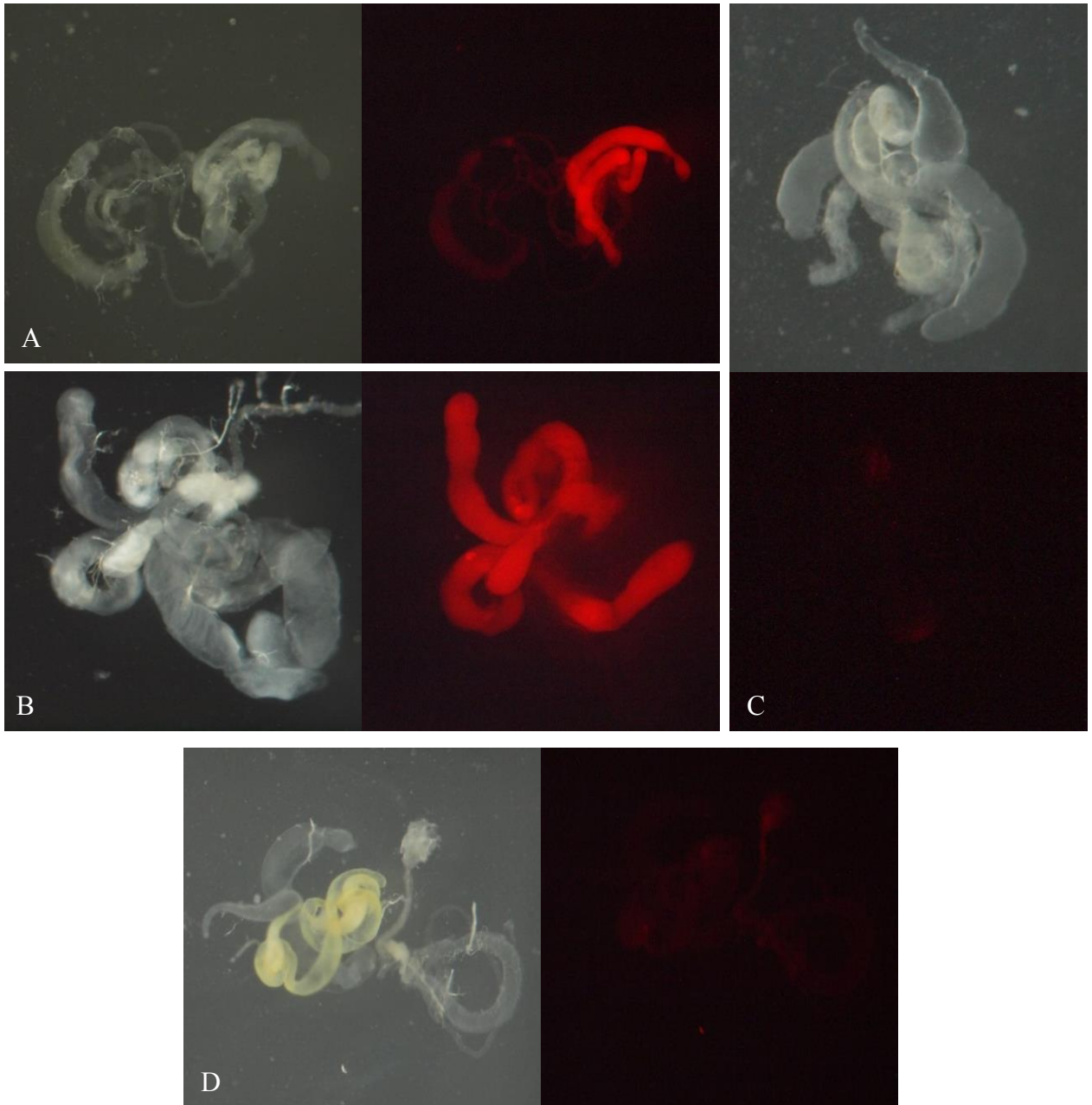


**Obr. 8:** Expres konstruktů v dospělých pozorovaná ve viditelném a fluorescenčním světle. **A.** Samice a samec linie *HETom35*. **B.** Linie *HETom3*. **C.** Linie *HETom4*. **D.** Srovnání samic kmene *HETom3* (vlevo) s Oregonem R (vpravo). **E.** Srovnání samců *HETom4* (vlevo) se samci Oregon R (vpravo).

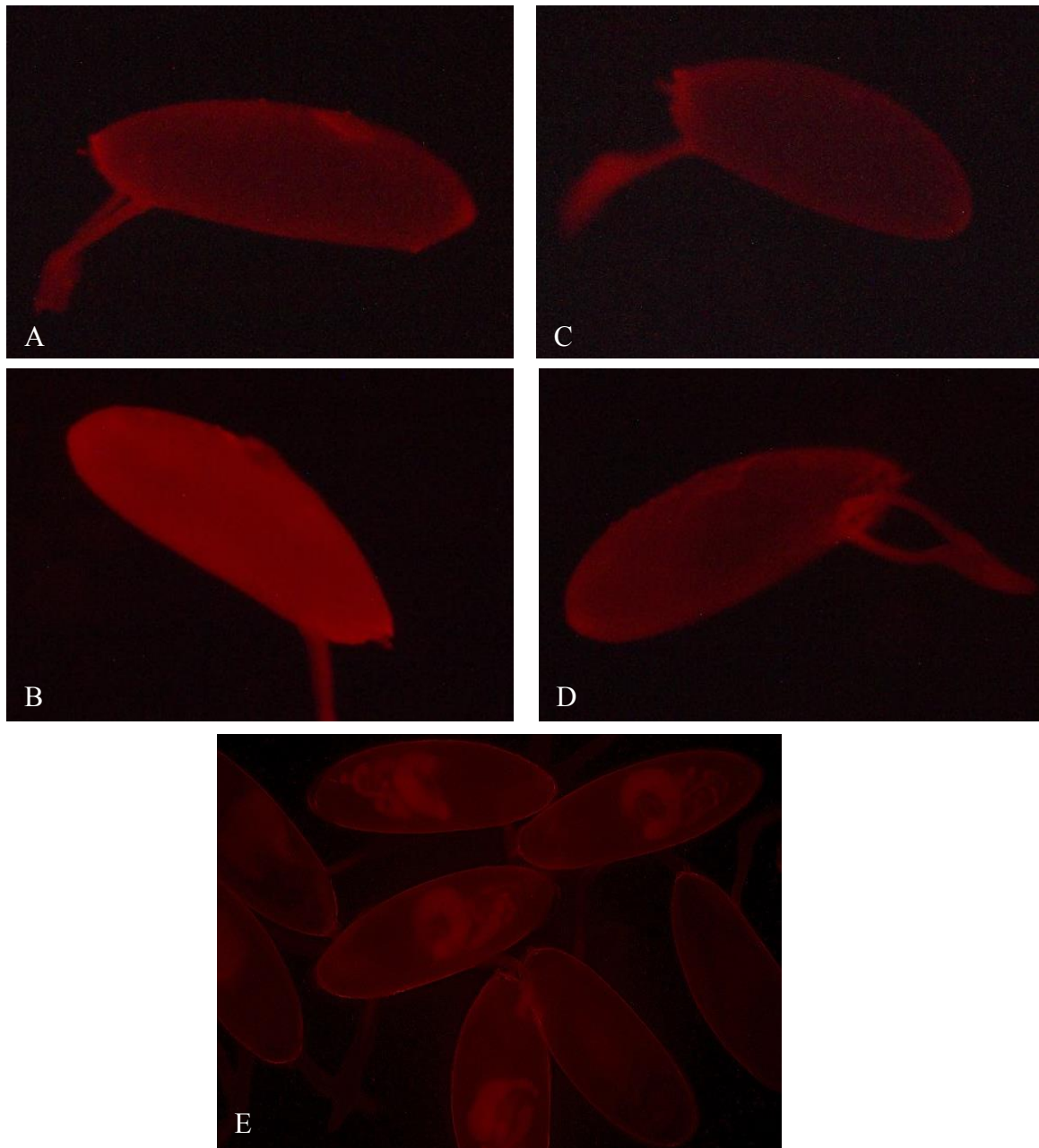


**Obr. 9:** Expresse konstruktů v oocytech a v ovariích ve viditelném a fluorescenčním světle. **A.** Oocyty linie *HETom35*. **B.** Oocyty kmene *HETom3*. **C.** Oocyty linie *HETom4*. **D.** Oocyty kontrolního kmene Oregon R. **E.** Ovaria linie *HETom35*. **F.** Ovaria linie *HETom3*. **G.** Ovaria kmene *HETom4*. **H.** Ovaria linie Oregon R.





**Obr. 10:** Expresi konstruktů v testes ve viditelném a fluorescenčním světle. **A.** Testes linie *HETom35*. **B.** Testes kmenu *HETom3*. **C.** Testes linie *HETom4*. **D.** Testes kontrolního kmene Oregon R.



**Obr. 11:** Expres konstruktu *HeTom* v embryích. **A.** Embryo linie *HETom35*. **B.** Embryo u linie *HETom3* **C.** Embryo u linie *HETom4*. **D.** Embryo u linie Oregon R. **E.** Detail embryí s viditelnými útvary vykazující vyšší fluorescenci než zbytek tkáně.

## 5. Diskuze

Transkripce telomerických elementů je klíčovým krokem telomerické elongace u drozofily, přičemž *HeT-A* element je hlavním komponentem drozofilích telomer. Tkáňově a vývojově specifický charakter transkripce telomerických elementů byl studován ve třech předcházejících studiích pomocí Northernovy hybridizace, *in situ* hybridizace či pomocí transgenních much nesoucí konstrukt s *HeT-A* promotorem řídící expresi genu pro  $\beta$ -galaktosidázu (Danilevskaya et al. 1997; Pardue & DeBaryshe 2003; Walter & Biessmann 2004). Cílem této práce bylo vytvoření transgenních konstruktů nesoucích různou promotorovou sekvenci elementu *HeT-A* a jejich aktivitu studovat *in vivo* pomocí tdTomato fluorescenčního proteinu. Danilevskaya et al. (1997) s využitím reportérových konstruktů, obsahujících *HeT-A* element řídící gen pro  $\beta$ -galaktosidázu, transientně transfekovaných do S2 (Schneider line 2), našla promotorovou aktivitu tohoto elementu na 3' konci elementu v oblasti 3' UTR. To ukázalo, že elementy *HeT-A* jsou, krom velmi slabého promotoru v 5' UTR, který je zodpovědný jen za cca 10 % aktivity elementu, transkribovány z promotoru ležícího na 3' konci sousedního elementu (sousedního elementu ve směru 5'). Ve stejné studii při bližší charakterizaci umístění promotoru, s využitím konstruktů s různě dlouhými fragmenty 3' UTR, vyšlo najevo, že promotor *HeT-A* je složen z alespoň tří částí umístěných v 3' UTR. Konstrukty obsahující 367–400 bp na 3' konci vykazaly více než 50% aktivitu nejdelšího konstruktu, tj. konstruktu s 590 bp z 3' konce, přičemž iniciace transkripce byla identifikována na pozicích 31. a 62. nukleotidu od 3' konce elementu. Pineyro et al. (2011) na základě analýzy sekvencí z 3' UTR a oblasti gag ukázal na značnou sekvenční variabilitu jednotlivých elementů *HeT-A* uvnitř jedince, přičemž na základě sekvenční příbuznosti identifikoval minimálně devět různých skupin tohoto elementu.

Korandová (2014) studovala aktivitu elementu *HeT-A* *in vivo* pomocí konstruktů tvořeného genem pro fluorescenční protein tdTomato, který byl umístěn pod kontrolou promotorové oblasti elementu *HeT-A*, s tím, že pro přípravu konstruktů bylo využito 892 bp z 3' konce 3' UTR elementu. Expres byla pozorována v testes a řadě imaginálních disků a byla tak potvrzena pozorování z prací George & Pardue (2003) a Walter & Biessmann (2004), že element *HeT-A* je transkripčně neaktivnější ve vyvíjejících se a aktivně proliferčních tkáních. Ovšem na rozdíl od obecného předpokladu, v práci překvapivě nebyla detekována exprese v ovarích. Tento rozpor, spolu s nedávnými studiemi

zabývajícími se variabilitou v sekvencích retrotranspozonu *HeT-A* (Pineyro et al. 2011), byl důvodem pro mou magisterskou práci.

Variabilita sekvence *HeT-A* může znamenat rozdílné regulační sekvence a rozdílnou tkáňovou specifičnost transkripce. Pro studium promotorové aktivity elementu *HeT-A* jsem ve své práci použila tři různé sekvence z konce 3' UTR. Sekvence promotoru linie *HETom35* (dlouhá 892 bp) byla téměř totožná se sekvencí použitou v pracích Danilevskaya et al. (1997) a George & Pardue (2003) a lišila se s ní pouze v několika nukleotidech. Oproti tomu linie *HETom3* (se sekvencí 3' UTR o délce 706 bp) a *HETom4* (se sekvencí 3' UTR o délce 1147 bp) se odlišovaly mnohem více, a to desítkami změn. Sekvence *HETom4* se od sekvence *HETom3* odlišovala pouze svou délkou a delecí 45 bází a lze spekulovat o tom, že právě tato delece je zodpovědná za odlišný charakter fluorescence pozorovaný u linie *HETom4*.

U linie *HETom4* byla fluorescence ve srovnání s dalšími dvěma transgenními liniemi nejslabší a intenzivnější fluorescence byla u této linie pozorována pouze při vývoji kukly a u dospělce. U linií *HETom35* a *HETom3* byla intenzivní fluorescence pozorována v testes, a to jak v období třetího larválního instaru, vývoje kukly, tak i v dospělém jedinci. Obě tyto linie vykazaly intenzivní fluorescenci ve vyvíjejících se tkáních kukly. Porovnáním lokalizace mezi oběma liniemi vyšly najevo i některé vzájemné odlišnosti. Zejména to byla fluorescence v ovariích, vyvíjejících se oocytech a časných embryích, nalezená pouze u linie *HETom3*, nebo naopak fluorescence v mozku a některých z imaginálních disků u *HETom35*. V práci George & Pardue (2003) byla 404 bp dlouhá sekvence z konce 3' UTR, téměř identická k sekvenci *HETom35*, použita v kombinaci se 405 bp dlouhou sekvencí ze začátku 5' UTR. Byla pozorována exprese především v křídelních discích a některých dalších imaginálních discích v průběhu třetího larválního období. Pozorování exprese v jiných orgánech než imaginálních discích či jiných vývojových stádiích nebylo reportováno. Zkrácení konstruktů o 5' UTR vedlo k expresi pozorované pouze ve stěvě, z čehož autoři usuzovali, že kombinace promotorů z obou UTR může být zodpovědná za tkáňově a vývojově specifickou regulaci aktivity *HeT-A* elementů. Nicméně, k významné ztrátě exprese, kdy exprese byla pozorována pouze v křídelních discích, překvapivě došlo i po prodloužení délky 3' UTR na 590 bp. Ztráta exprese byla o to překvapivější, že delší konstrukt vedl v předcházející studii v transfekovaných S2 buňkách k mnohem silnější expresi (Danilevskaya et al. 1997). Autoři uvedené pozorování vysvětlují možnou změnou formace chromatinu v promotoru *HeT-A* následkem přenesení „heterochromatinového“

*HeT-A* promotoru do euchromatinového (a tedy pro *HeT-A* nepřirozeného) prostředí. Ovšem je třeba zdůraznit, že pozdější studie jasně ukázaly na euchromatinový charakter telomerických elementů (Biessmann et al. 2005) a tímto uvedenou interpretaci lze považovat za mylnou. Na druhou stranu je třeba vyzdvihnout, že pozorování ztráty exprese u delšího konstruktů bylo zaznamenáno rovněž i v mé studii, a to při srovnání sekvence *HETom3* a *HETom4*. Ale jestli za změnou fenotypu stojí prodloužení sekvence či již zmíněná 45 bp delece v sekvenci *HETom4* lze těžko posoudit.

Celkově lze říci, že signál získaný z transgenních konstruktů sice do značné míry kopíruje expresi endogenního *HeT-A* elementu, tak jak je ostatně konstatováno už i v práci George & Pardue (2003), nicméně shoda je jen částečná. Rozpor s charakterem exprese endogenního *HeT-A* elementu může být zapříčiněn jednak odlišnou sekvencí jednotlivých *HeT-A* elementů, které jako soubor poskytují celé spektrum transkripce se všemi vývojovými a tkáňovými specifikami, ale také i kombinací promotorů lokalizovaných v obou UTR a jednak i faktem telomerické vs. netelomerické lokalizace, kdy příspěvek samotné lokalizace elementů v telomerách může hrát velkou roli v regulaci aktivity telomerických elementů.

## 6. Závěr

Má magisterská práce byla zaměřena na studium aktivity sekvenčně odlišných telomerických promotorů elementu *HeT-A* pomocí fluorescenčního proteinu tdTomato. S využitím konstruktů *HETom35*, *HETom3* a *HETom4*, které nesly odlišné sekvence potenciálních promotorů, jsem pozorovala tkáňově odlišnou expresní aktivitu. Ačkoliv celkově hodnotím použití proteinu tdTomato jako reportéru transkripční aktivity telomerických elementů pro nízkou intenzitu získaného signálu a jeho nízkou stabilitu jako nepřiliš vhodné, přesto má práce přispívá k potvrzení domněnky, že sekvenční variabilita promotoru elementu *HeT-A* může vést k různé tkáňové a orgánové specificitě. Na základě mých zkušeností s použitými konstrukty mohu konstatovat, že pro získání detailnějších informací o tkáňové a vývojové regulaci *HeT-A* elementu s využitím *HETom* konstruktů je třeba zvýšit citlivost signálu, a to například kombinací s imunodetekcí proteinu tdTomato, a případně připravit délkové varianty sekvencí 3' UTR či obohatit použité sekvence o oblast 5' UTR.

## 7. Literatura

- Abad, J.P. et al., 2004. Genomic analysis of *Drosophila melanogaster* telomeres: Full-length copies of HeT-A and TART elements at telomeres. *Molecular Biology and Evolution*, 21(9), pp.1613–1619.
- Abad, J.P. et al., 2004. TAHRE, a novel telomeric retrotransposon from *Drosophila melanogaster*, reveals the origin of *Drosophila* telomeres. *Molecular Biology and Evolution*, 21(9), pp.1620–1624.
- Biessmann, H. et al., 2005. Euchromatic and heterochromatic domains at *Drosophila* telomeres. *Biochemistry and Cell Biology*, 83(4), pp.477–485.
- Biessmann, H. et al., 1992. HeT-A, a transposable element specifically involved in “healing” broken chromosome ends in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology*, 12(9), pp.3910–3918.
- Biessmann, H. & Mason, J.M., 2003. Telomerase-independent mechanisms of telomere elongation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 60(11), pp.2325–33.
- Blagoev, K.B., 2009. Cell proliferation in the presence of telomerase. *PloS one*, 4(2), pp.1–6.
- Blasco, M.A. et al., 1997. Mouse models for the study of telomerase. *Ciba Foundation symposium*, 211, pp.160–166.
- Blasco, M.A., 2007. Telomere length, stem cells and aging. *Nat Chem Biol*, 3(10), pp.640–649. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.2007.38>.
- Capkova Frydrychova, R., 2009. Regulation of telomere length in *Drosophila*. *Cytogenetic and genome research*, 122, pp.356–364.

- Casacuberta, E. & Pardue, M.-L., 2005. *HeT-A* and *TART*, two *Drosophila* retrotransposons with a bona fide role in chromosome structure for more than 60 million years. *Cytogenetic and Genome Research*, 110(1-4), pp.152–159.
- Cenci, G., Ciapponi, L. & Gatti, M., 2005. The mechanism of telomere protection: A comparison between *Drosophila* and humans. *Chromosoma*, 114(3), pp.135–145.
- Collins, K. & Mitchell, J.R., 2002. Telomerase in the human organism. *Oncogene*, 21(4), pp.564–79.
- Danilevskaya, O. et al., 1997. Promoting in Tandem: The Promoter for Telomere Transposon HeT-A and Implications for the Evolution of Retroviral LTRs. *Cell*, 88(5), pp.647–655.
- Danilevskaya, O.N. et al., 1999. The two *Drosophila* telomeric transposable elements have very different patterns of transcription. *Molecular and cellular biology*, 19(1), pp.873–81.
- Frydrychova, R.C. & Mason, J.M., 2013. *Telomeres: Their Structure and Maintenance*, INTECH Open Access Publisher.
- George, J.A. et al., 2006. Genomic organization of the *Drosophila* telomere retrotransposable elements. *Genome Research*, 16(10), pp.1231–1240.
- George, J.A. & Pardue, M.L., 2003. The promoter of the heterochromatic *Drosophila* telomeric retrotransposon, HeT-A, is active when moved into euchromatic locations. *Genetics*, 163(2), pp.625–635.
- Greider, C.W. & Blackburn, E.H., 1989. A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature*, 337(6205), pp.331–7.



- Harley, C., 1995. Telomeres and telomerase in aging and cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*, 5(2), pp.249–255.
- Hayflick, L. & Moorhead, P.S., 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25(3), pp.585–621.
- Chan, S.R.W.L. & Blackburn, E.H., 2004. Telomeres and telomerase. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 359(1441), pp.109–122.
- Korandová, M., 2014. Transkripční aktivita telomerického elementu HeT-A u *Drosophila melanogaster*. , p.44.
- Lee, H.W. et al., 1998. Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature*, 392(6676), pp.569–574.
- Lee, J. et al., 2008. TERT promotes cellular and organismal survival independently of telomerase activity. *Oncogene*, 27(26), pp.3754–60.
- Maeshima, K., Janssen, S. & Laemmli, U.K., 2001. Specific targeting of insect and vertebrate telomeres with pyrrole and imidazole polyamides. *EMBO Journal*, 20(12), pp.3218–3228.
- Mason, J.M., Frydrychova, R.C. & Biessmann, H., 2008. *Drosophila* telomeres: An exception providing new insights. *BioEssays*, 30(1), pp.25–37.
- McKnight, T. & Shippen, D.E., 2004. Plant Telomere Biology. *The Plant Cell Online*, 16(April), pp.794–803.
- Olovnikov, A.M., 1973. A theory of marginotomy. *Journal of Theoretical Biology*, 41(1), pp.181–190.

- Olovnikov, A.M., 1996. Telomeres, telomerase, and aging: Origin of the theory. *Experimental Gerontology*, 31(4), pp.443–448.
- Pardue, M. Lou & Debaryshe, P.G., 2008. Drosophila telomeres: A variation on the telomerase theme. *Fly*, 2(3), pp.101–110.
- Pardue, M.-L. & DeBaryshe, P.G., 2003. Retrotransposons Provide an Evolutionarily Robust Non-Telomerase Mechanism to Maintain Telomeres. *Annual Review of Genetics*, 37(1), pp.485–511.
- Pineyro, D. et al., 2011. Transcriptional analysis of the HeT-A retrotransposon in mutant and wild type stocks reveals high sequence variability at Drosophila telomeres and other unusual features. *BMC Genomics*, 12, p.573.
- Rashkova, S., 2002. Gag proteins of the two Drosophila telomeric retrotransposons are targeted to chromosome ends. *The Journal of cell biology*, 159(3), pp.397–402.
- Rashkova, S., Karam, S.E. & Pardue, M.-L., 2002. Element-specific localization of Drosophila retrotransposon Gag proteins occurs in both nucleus and cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(6), pp.3621–6.
- Sheen, F.M. & Levis, R.W., 1994. Transposition of the LINE-like retrotransposon TART to Drosophila chromosome termini. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(26), pp.12510–12514.
- Shpiz, S. et al., 2007. Characterization of Drosophila telomeric retroelement TAHRE: transcription, transpositions, and RNAi-based regulation of expression. *Molecular Biology and Evolution*, 24(11), pp.2535–2545.
- Snustad, D. & Simmons, M.J., 2010. *Principles of genetics* 5th ed., Hoboken: Wiley.

- Walter, M.F. & Biessmann, H., 2004. Expression of the telomeric retrotransposon HeT-A in *Drosophila melanogaster* is correlated with cell proliferation. *Development genes and evolution*, 214(5), pp.211–9.
- Wyatt, H.D.M., West, S.C. & Beattie, T.L., 2010. InTERTpreting telomerase structure and function. *Nucleic Acids Research*, 38(17), pp.5609–5622.
- Zhu, H., Belcher, M. & van der Harst, P., 2011. Healthy aging and disease: role for telomere biology? *Clinical science (London, England : 1979)*, 120(10), pp.427–40.

## 8. Příloha



**Obř. 12:** Porovnání sekvence (nukleotid 1–400) fragmentu *HeT-A* elementu z práce Danilevskaya et al. (1997) a sekvencí použitých v konstruktech *HETom35*, *HETom3* a *HETom4*.



**Obr. 13:** Porovnání sekvence (nukleotid 401–850) fragmentu *HeT-A* elementu z práce Danilevskaya et al. (1997) a sekvencí použitých v konstruktech *HETom35*, *HETom3* a *HETom4*. Hvězdičky znázorňují stejné nukleotidy u všech sledovaných sekvencí.

