

Škola doktorských studií v biologických vědách

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Alternativní telomerické kompenzační mechanismy jako způsob adaptace
telomer vůči stresovým podmínkám v průběhu evoluce hmyzu**

Disertační práce

Mgr. Tomáš Krůček

Školitel: RNDr. Radmila Čapková Frydrychová, Ph.D.

Entomologický ústav, Biologické centrum Akademie věd ČR v.v.i.
Přírodovědecká Fakulta, Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích

Školitel specialista: prof. RNDr. Dalibor Kodrík, CSc.

Entomologický ústav, Biologické centrum Akademie věd ČR v.v.i.

České Budějovice 2017

Tato práce by měla být citována jako:

Krůček T. (2017): Alternativní telomerické kompenzační mechanismy jako způsob adaptace telomere vůči stresovým podmínkám v průběhu evoluce hmyzu [Alternative telomeric compensatory mechanisms as a way of adapting telomeres to stress conditions during insect evolution. Ph.D. thesis, in Czech.] Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, Škola doktorských studií v biologických vědách, České Budějovice, Česká republika, 113 stran.

Anotace

Telomeres are special nucleoprotein structures at the ends of eukaryotic chromosomes. Because of incomplete DNA replication telomere length becomes shorter with each cell cycle. Several mechanisms of telomere maintenance have been identified. Although the most common mechanism is the activity of telomerase that synthesizes short telomeric sequences onto chromosome ends, telomere length might be elongated by alternative ways such as the retrotransposition of special telomeric mobile elements targeted to chromosome ends, found in *Drosophila*, and homologous recombination. Homologous recombination extends satellite sequences in some dipteran species and also serves in vertebrates as the alternative mechanism to telomerase. The (TTAGG)_n sequence was designated as the insect telomeric sequence. Although the (TTAGG)_n sequence was found at telomeres of most of the tested insect orders in previous studies, there are numerous insect species showing the (TTAGG)_n absence. Diptera is the large insect order, which shows the lost of the (TTAGG)_n sequence together with telomerase system and its replacement by the transposition of telomeric elements in *Drosophila* or homologous recombination in mosquitoes or midges. The (TTAGG)_n sequence was reported as telomeric sequence in most insect orders, however, the (TTAGG) specific telomerase activity was not tested in these orders. Therefore, I first speculated that non-telomerase systems in insects may not be limited only to Diptera and the presence of non-telomerase systems in insect might be underestimated. When I tested a distribution of the TTAGG-specific telomerase activity I confirmed that the telomerase system is the most common telomere length compensation mechanism in insect, however, it is not present in Zygentoma, Orthoptera and Phasmida, which are insect orders with a previously reported presence of the (TTAGG)_n telomeric motif. Data of the thesis showed that the activity of telomeric retroelements at *Drosophila* is up-regulated by mild-levels of

free radical species, enhancing telomere extension. The role of non-telomerase mechanisms to overcome stress conditions during evolution of insect telomeres is hypothesized.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji disertační práci jsem vypracoval 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 disertační práce, a to v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou 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.

České Budějovice, 30. 10. 2017

.....

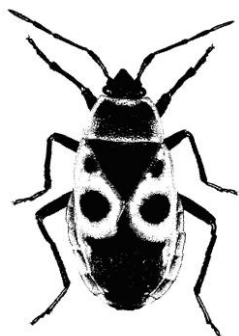
Tomáš Krůček

Tato práce vznikla z partnerství Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity a Entomologického ústavu Biologického centra Akademie věd ČR, podporujícího postgraduální studium ve studijním oboru Biologie ekosystémů.



Přírodovědecká
fakulta
Faculty
of Science

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice



Entomologický ústav
Institute of Entomology



**BIOLOGICKÉ
CENTRUM**
AV ČR, v. v. i.

Finanční podpora

Tato práce byla podpořena grantem č. 14-07172S z Grantové agentury ČR, granty č. 062/2011/P, 131/2012/P, 052/2013/P, 038/2014/P z Grantové agentury Jihočeské univerzity, jinými granty z Grantové agentury Jihočeské univerzity a ze společnosti Max Planck. Také jsem si vědom využívání prostředků vědecké infrastruktury, která získala finanční prostředky ze Sedmého rámcového programu Evropské unie (FP7/2007-2013) na základě grantové dohody č. 316304.

Poděkování

Rád bych poděkoval celému spektru lidí napříč obory a místy, odkud je znám minimálně v průběhu doktorského studia a kteří mi byli všichni nápomocni, ať už v jakékoli míře a odbornosti. Bez všech těchto lidí by tato práce nemusela vzniknout a možná ani nevznikla.

Jedním z hlavních lidí, jemuž tento dík patří, je bezesporu má školitelka Radmila Čapková Frydrychová. Tento člověk mě provázel mou prací od samého počátku. Už když jsem hledal laboratoř, kam nastoupím v rámci svého studia, mi byla oporou a bez sebemenšího zdráhání se mě ujala a umožnila mi být dnes tam, kde jsem. Radka mi byla v průběhu studia nejen velice důležitou oporou v metodice, radách ve výzkumu, ale také, a to je nejdůležitější, psychickou oporou. Byly časy horší i lepší, ale pokud přišly ty horší, dokázala například v nevyhájících pokusech najít optimismus a poskytla mi novou jiskru do života. Radmila, jakožto odborník na telomery a problematiku jich se týkající byla vždy na místě s radou a pomocí, a za to jí veliké DĚKUJI. Má školitelka však nebyla zdaleka jediná. Veliké díky také patří všem členům naší laboratoře, pod vedením naší školitelky: Kláře Vötterové (roz. Szakosové), Hance Majerčákové (roz. Švellerové), Michale Korandové, Jindřišce Tomáškové a všem dalším. Zde musím vyzdvihnout především pomoc Michaly Korandové. S Míšou jsem měl možnost spolupracovat na mnoha projektech a spolehnout se na ni vždy, když bylo třeba. Míša je nejen skvělý začínající vědec, ale také skvělý přítel, který dokáže naslouchat a dávat rady. A za to jí patří také obrovské DĚKUJI. Díky tomu, že jsem doktorské studium vykonával na stejné škole, byli mi velkou oporou, jak bývalí spolupracovníci z předešlých laboratoří, jako Klára Mičulková a Tereza Koníčková (roz. Stašková), tak lidé z okolních laboratoří. S těmi jsem se měl možnost pravidelně se stýkat a diskutovat o problémech týkajících se nejen pracovních záležitostí. Naše laboratoř spadá pod laboratoř pana profesora Františka Marece. Pan Marec a tým pod jeho vedením poskytoval jak mě, tak naši laboratoř vždy otevřenou náruč. Jeho odborné znalosti nás občas nasměrovaly směrem, který by nás možná ani nenapadl. Z této laboratoře musím opět poděkovat hlavně jednomu členovi, a tím je Marie Korchová, technický pracovník této laboratoře. Maruška nám vycházela vstříc v otázkách přípravy diety pro chov drozofil a přípravy médií, jak jen to bylo v jejích silách. Druhou laboratoř, které patří velice významné „děkují“, je laboratoř pana profesora Dalibora Kodříka. Dalibor byl mým školitelem specialistou. V jeho laboratoři jsme byli jak já, tak členové naší laboratoře vždy vítáni. Dalibor mi vždy srdečně poskytl veškeré vybavení své laboratoře a cenné rady, které jsem

v nemalé míře využíval. V této laboratoři jsem se cítil vždy velice dobře, jelikož ne jenom Dalibor, ale celé složení laboratoře je nadmíru vřelé a nápomocné. Proto všem členům: Andree Bednářové, Konstantinovi Vinokurovi, Emadu Ibrahimovi, Heleně Štěrbové a všem ostatním, i bývalým členům - Miladě Zemanové, Daniele Hlávkové a dalším patří opět „děkuji“. Musím ještě zmínit laboratoře především pana profesora Michala Žurovce, kde jsem měl možnost spolupracovat, jak s ním, tak s panem Michalem Šerým, Annou Žaloudíkovou, Václavem Brožem a mnohými dalšími. Také musím zmínit ještě laboratoř pana profesora Vladimíra Košťála, kde mi on, ale také jeho tým, převážně však Jaroslava Korbelová vycházeli také mnohokrát vstříc. Těmto laboratořím také děkuji. Kromě těchto, již zmíněných, děkuji i dalším členům Entomologického ústavu, ale ne jenom jim. I would like thanks to Mr. Profesor Ronald Kühnlein and to his laboratory group from my abroad internship in Göttingen. Také pan Václav Křišťufek si zaslouží poděkování, s ním jsem měl možnost spolupracovat na pokusech se včelami. Omlouvám se, pokud, jsem na někoho zapomněl, ale lidí, jež mi pomohli je tolik, že by byl tento výčet opravdu dlouhý.

Nakonec patří mé největší DĚKUJI mé rodině. Právě ona mě podporovala nejvíce, a to jak psychicky, tak také finančně. Bez jejich pomoci bych tu nejspíše opravdu nebyl.

Seznam publikací a příspěvků autora

Disertační práce vznikla na základě následujících publikací (řazeno chronologicky)

- I. Korandová M., **Krůček T.**, Vrbová K., Čapková Frydrychová R. (2014). Distribution of TTAGG-specific telomerase activity in insects. *Chromosome research*. 22(4): 495-503. (IF = 2.385).

Tomáš Krůček se podílel na mapování TTAGG-specifické telomerázové aktivity v testovaných hmyzích řádech.

- II. **Krůček T.**, Korandová M., Šerý M., Szakosová K., Čapková Frydrychová R. (2015). Effect of low doses of herbicide paraquat on antioxidant defense in *Drosophila*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 88(4): 235-48. (IF = 1.021).

Tomáš Krůček se podílel na vyhodnocení hladin peroxidu vodíku, vyhodnocení mortality, pohybové aktivity a textovém zpracování publikace.

- III. Korandová M., **Krůček T.**, Szakosová K., Kodrík D., Kühnlein R. P., Tomášková R., Čapková Frydrychová R. Chronic low-dose pro-oxidant treatment stimulates transcription activity of telomeric retroelements and increases telomere length in *Drosophila*. Rukopis

Tomáš Krůček se podílel na stanovení hladin adipokinetického hormonu a vyhodnocení mortality.

Spoluautoři potvrzují, že se Tomáš Krůček významně podílel na sestavování publikací uvedených výše, tak jak je uvedeno v prohlášení u jednotlivých publikací.

.....
RNDr. Radmila Čapková Frydrychová Ph.D.

.....
RNDr. Michala Korandová

Obsah

1.	Úvod	1
1.1.	TELOMERY – JEJICH FUNKCE A STRUKTURA	1
1.2.	KOMPENZACE TELOMERICKÝCH ZTRÁT	2
1.3.	AKTIVITA TELOMERICKÝCH MOBILNÍCH ELEMENTŮ JAKO ZPŮSOB TELOMERICKÉ KOMPENZACE	3
1.4.	PROTEINOVÁ STRUKTURA TELOMER	5
1.5.	TELOMERY V PRŮBĚHU EVOLUCE	6
1.6.	TELOMERICKÁ AKTIVITA PŘI STRESOVÝCH PODMÍNKÁCH	8
1.7.	OXIDATIVNÍ STRES	9
1.8.	MOBILNÍ ELEMENTY JAKO MECHANISMUS ADAPTACE KE STRESOVÝM PODMÍNKÁM	10
2.	Hypotézy a cíle	13
3.	Výsledky	15
3.1.	Publikace č. I	15
3.2.	Publikace č. II	16
3.3.	Rukopis	17
4.	Diskuze	18
5.	Závěr	22
6.	Citovaná literatura	23
7.	Publikace a Rukopis	35
7.1.	Publikace I	35
7.2.	Publikace II	45
7.3.	Rukopis	60
8.	Přílohy	84
9.	Životopis	112

1. Úvod

1.1. TELOMERY – JEJICH FUNKCE A STRUKTURA

Telomery jsou nukleoproteinové struktury na koncích lineárních chromosomů eukaryot (Blackburn a Gall 1978), tvořené specifickou sekvencí DNA a specifickým proteinovým složením. Existuje několik funkcí, které telomery zastávají. Telomery jednak díky své speciální proteinové struktuře umožňují buňkám rozpoznávat přirozené konce chromosomů od chromosomálních zlomů. Telomery tak chrání chromosomy před vznikem chromosomálních fúzí, které by jinak vznikaly následkem činnosti reparačních mechanismů a jejichž přítomnost by vedla k mohutné genomové nestabilitě (Day a kol. 1993). Dále telomery hrají úlohu v prostorové organizaci chromosomů v jádře, či chrání konce chromosomů před enzymatickými degradačními procesy. Nejčastěji v literatuře zmiňovanou telomerickou funkcí je ale vyvažování ztrát DNA, které vznikají na koncových úsecích telomer, a které lze jednoduše označit jako tzv. telomerické zkracování. Ke zkracování telomer jednak dochází s každým buněčným dělením vlivem nekompletní replikace kvůli tomu, že konvenční DNA polymeráza není schopna doplnit prázdný úsek vzniklý po degradaci RNA primeru, či náhodným působením genotoxických agens, jako jsou volné kyslíkové radikály (de Lange 2002; Kim a kol. 2002; Day a kol. 1993). Mechanismy, které nahrazují tyto ztráty, a de facto telomery zpětně prodlužují, úzce souvisí s daným typem telomery.

Nejrozšířenějším typem telomery, vyskytujícím se napříč eukaryoty, je dlouhý klastr krátké repetitivní sekvence DNA, většinou dlouhé 5-8bp a s obecným vzorcem $(T_xA_yG_z)_n$. Telomery tohoto typu jsou prodlužovány speciálním enzymem telomerázou. Málo obvyklými typy telomer, popsanými zatím skutečně jen u několika druhů organismů, jsou telomery tvořené satelitními sekvencemi udržovanými homologní rekombinací, či se telomery, tak jako je tomu u drozofily, skládají z mobilních elementů, které jsou na chromosomální konce navazovány prostřednictvím retrotranspozice (Mason a kol. 2008; Biessmann a Mason 2003). Délka telomerické sekvence se činností telomerických kompenzačních mechanismů udržuje na optimální úrovni, a to vzhledem k typu buňky a

vývojovému stádiu (Chan a Blackburn 2002; Blackburn 1991). Krom toho, že telomerická délka je geneticky určena, může být do značné míry ovlivněna i faktory vnějšího prostředí. Z toho tedy vyplývá, že jak mezi různými jedinci jednoho druhu, tak i v rámci jednoho jedince, může být délka telomery značně variabilní. Takže např. u člověka je telomerická délka dlouhá v průměru 5-15 kb (Moyzis a kol. 1988), u myši až 150 kb (Hemann a Greider 2000) a u drozofily, kde jsou telomery tvořeny mobilními elementy, jsou telomery dlouhé 26-147 kb dlouhá (Abad a kol. 2004b).

1.2. KOMPENZACE TELOMERICKÝCH ZTRÁT

Díky nekompletní replikaci a zejména působením oxidačního stresu dochází v průběhu vývoje a stárnutí jedince u většiny jeho somatických buněk k postupnému zkracování telomer (Blackburn 1991; Oikawa a kol. 2001; Zglinicki a kol. 2000, 2002). Zkrácení může dosáhnout až tzv. Hayflickova limitu, který vlivem nekompletní replikace nastává u lidských buněk po přibližně 50 buněčných děleních (Hayflick a Moorhead 1961) a jeho dosažením jsou aktivovány signální dráhy vedoucí k zastavení buněčného cyklu, buněčné senescenci, případně apoptóze (Takai a kol. 2003; d'Adda a kol. 2003).

Kompenzačním mechanismem, který je spjat s telomery tvořenými kanonickou, tj. krátkou opakující se telomerickou sekvencí, je činnost enzymu telomeráza, což je ribonukleoproteinový komplex, který nasedá na konce chromosomů, kde syntetizuje nové telomerické repetice a dodává je ke stávajícímu telomerickému konci. Telomeráza je složena z RNA složky (TER – Telomerase RNA), jež funguje jako templát pro syntézu telomerické sekvence a reverzní transkriptázy (TERT – Telomerase Reverse Transcriptase), která zajišťuje vlastní syntézu nových telomerických repetitiv DNA (Cohen a kol. 2007). Obecně je aktivita telomerázy spjata s proliferačním statusem buňky. Vysoká aktivita telomerázy je typická pro raný embryonální vývoj a v průběhu vývoje a stárnutí organismu obecně její aktivita v buňkách klesá, takže během dospělosti je její hladina ve většině buněk nulová. U dospělých jedinců zůstává aktivita telomerázy na vysoké hladině v proliferačně aktivních buňkách, jako např. buňkách kmenových či zárodečných (Geserick a Blasco 2006, Saretzki a kol. 2008). Negativním aspektem telomerázy je její aktivace v nádorových buňkách, umožňující nepřiměřené telomerické prodloužení, a to jako jeden z předpokladů buněčné imortalizace (Kim a kol. 1994; Yui a kol. 1998; Liu a kol. 1999; Forsyth a kol. 2002).

U savců byl kromě telomerázového systému objeven také alternativní způsob telomerické kompenzace, a to homologní rekombinace. Jedná se o přenos genetického materiálu z „dárcovské“ sekvence na homologního „příjemce“ (Chen a kol. 2007), kdy tedy jedna telomera slouží jako templát pro syntézu a prodloužení telomery druhé (Pluta a Zakian 1989; Wang a Zakian 1990). Homologní rekombinace byla popsána i u řádu dvoukřídlých (Diptera), kde funguje jako hlavní kompenzační mechanismus u telomer tvořených satelitní sekvencí, a to u *Anopheles gambiae* či pakomárů rodu *Chironomus*, nebo funguje jako alternativní mechanismus k telomerické retrotranspozici u drozofily. Na tomto místě je třeba zdůraznit jedinečnost řádu dvoukřídlých, protože, ačkoliv se jedná o početný hmyzí taxon, existence telomerázového kompenzačního mechanismu se u něj dosud neprokázala (Mason a kol. 2016).

1.3. AKTIVITA TELOMERICKÝCH MOBILNÍCH ELEMENTŮ JAKO ZPŮSOB TELOMERICKÉ KOMPENZACE

Mobilní elementy jsou významnou součástí genomu. Jedná se o repetitivní sekvence, často označované jako parazitické, které jsou rozptýlené po „hostitelském“ genomu a mající schopnost vlastní mobilizace. Mobilní elementy se totiž v rámci genomu přesouvají z místa na místo, a to buď tak, že se z původního místa vyštěpí a přesunou se na místo jiné, nebo se nejprve zkopírují a na nové místo je integrovaná nově vytvořená kopie (McClintock 1984; Kazazian 2004). Až na několik výjimek, jsou mobilní elementy přítomné ve většině eukaryotních, tak prokaryotních organismů (Arkhipova a Meselson 2000; Gardner a kol. 2002), u nichž tvoří podstatnou část genomu. Například u člověka mobilní elementy a jejich zbytky tvoří něco mezi polovinou až dvěma třetinami genomu, u genomu kukuřice je to až 90 % (Lander a kol. 2001; de Koning a kol. 2011; SanMiguel a kol. 1996).

Mobilní elementy jsou klasifikovány podle způsobu transpozice a tedy přítomnosti či nepřítomnosti RNA jako mezičlánku v procesu transpozice na skupinu DNA transposonů a retrotransposonů. DNA transposony jsou ty elementy, které se jednoduše přesouvají z místa na místo, a které si za tímto účelem kódují vlastní enzym transposázu, zajišťující vyštěpnutí transposonu na jednom místě v genomu a jeho začlenění na místo jiné. Tedy, DNA transposony se přesunují z jednoho místa genomu na jiné bez vlastní replikace, tj. procesem zvaným „cut and paste“ (Muñoz-López a García-Pérez 2010). Retrotransposony naopak pro svou transpozici potřebují RNA intermediát, pro jehož produkci využívají retrotransposony

hostitelských RNA polymeráz. RNA, která vzniká přepisem retroelementu, je transportována do cytoplasmy, kde je na ribozómech translatována jednak do proteinů sloužících pro transport a mobilizaci elementu a jednak do reverzní transkriptázy, která slouží k přepisu RNA intermediátu do molekuly DNA. Molekula DNA, která vzniká reverzní transkripcí, je začleněna na nové místo v genomu. Retrotransposony se tedy mobilizují mechanismem „copy and paste“ a na rozdíl od transposonů jejich aktivitou narůstá počet jejich kopií v genomu. Retrotransposony se dále dělí na LTR a non-LTR, a to podle obsahu dlouhé terminální repetice (LTR jako „long terminal repeat“) (Kazazian 2004; Beauregard 2008). LTR retrotransposony jsou ve své struktuře a životním cyklu podobné retrovirům, protože stejně jako retroviry mají geny *gag* a *pol*, s tím, že na rozdíl od retrovirů u nich nebývá přítomen funkční gen *env*. Vzhledem k tomu, že gen *env* produkuje proteiny virového obalu, které jsou u retrovirů nutné pro formaci infekčního virionu, LTR retrotransposony na rozdíl od retrovirů nejsou schopny tvořit infekční viriony, které umožňují šíření infekce z buňky do buňky, a jsou tak omezeny v pohybu pouze v rámci buňky (Finnegan 2012). Předpokládá se, že LTR retrotransposony vznikly z retrovirů ztrátou genu *env*.

Pohled na úlohu mobilních elementů v rámci hostitelského genomu se různí, a to především od vnímání elementů jako čistě parazitických sekvencí s čistě negativním efektem na hostitele, jako je mutageneze či genomová nestabilita, které nastávají pohybem elementů po genomu, až po mutualistický vztah mezi hostitelem a elementem (Muñoz-López a García-Pérez 2010). Telomerické mobilní elementy drozofily jsou nicméně dosud jediné známé mobilní elementy, které jsou zcela zásadní pro udržení životaschopnosti svého hostitelského organismu (Mason a kol. 2008) a lze tak v nich spatřovat přímo exklusivní příklad domestikace mobilních elementů svým hostitelem.

Drozofilí telomerické mobilní elementy spadají do kategorie non-LTR retrotransposonů. Dosud byly identifikovány tři typy těchto elementů, a to *HeT-A*, *TART* a *TAHRE*, které jsou souhrnně označovány jako HTT elementy (Biessmann a kol. 1990; Levis a kol. 1993; Abad a kol. 2004a; Mason a kol. 2008). HTT elementy jsou v telomerách zastoupeny v různém počtu a seskupení a svou retrotranspozicí, která je vedena specificky ke koncům chromozómů, kompenzují telomerické zkracování (Mason a kol. 2008; Čapková Frydrychová a kol. 2009). Telomerická oblast, která je složená z těchto retroelementů, se zkráceně nazývá HTT oblast, s tím, že délka HTT oblasti je odvislá od chromosomu a liší se mezi různými populacemi či individui (Abad a kol. 2004b; Golubovsky a kol. 2001; Melnikova a Georgiev 2002).

Mechanismus telomerické transpozice se uskutečňuje v několika krocích. Prvním krokem je transkripce retroelementů. Transkripty v podobě mRNA jsou směřovány ven z jádra do cytoplasmy, kde jsou translatovány do polypeptidu Gag. U elementů *TART* a *TAHRE* je také translatovaná reverzní transkriptáza. Po tomto kroku se Gag protein váže k jednotlivým transkriptům retroelementů a takto vzniklý komplex je nasměrován zpět do jádra. V jádře je RNA připojena ke konci chromosomu. Reverzní transkriptáza využívá volné hydroxylové skupiny na 3'konci chromosomu a převádí RNA na DNA v procesu reverzní transkripce (George a Pardue 2003; Biessmann a Mason 2003).

Nejprostudovanějším telomerickým elementem drozofily je element *HeT-A*. Element *HeT-A* má délku přibližně 6kbp (Pardue a kol. 2005) a jeden otevřený čtecí rámeček (ORF) kódující protein „GAG-like“. Element si tedy nekóduje vlastní reverzní transkriptázu; reverzní transkriptáza je patrně využívána z dalších dvou telomerických elementů. *HeT-A* má neobvyklou 3' nepřekládanou oblast, na jejímž 3'konci je lokalizován promotor transkribující sousední telomerický element, což znamená, že element *HeT-A* není transkribován z vlastního promotoru (Danilevskaya a kol. 1997; Pardue and DeBaryshe 2003). Element *TART*, o délce 10-12 kbp, obsahuje dva otevřené čtecí rámce ORF1 a ORF2 (geny gag a pol). ORF1 kóduje protein GAG a ORF2 má doménu jak pro endonukleázu, tak i pro reverzní transkriptázu. *TART* elementy jsou na rozdíl od *HeT-A* transkribované z obou vláken DNA, ze dvou promotorů jako „sense“ a „anti-sense“. Anti-sense“ RNA transkriptů se produkuje 10x více než „sense“ (Danilevskaya a kol. 1999), ovšem funkce těchto „anti-sense“ transkriptů je zatím neznámá (Abad a kol. 2004a). Element *TAHRE* (Telomere-Associated and *HeT-A* Related Element) kóduje reverzní transkriptázu a endonukleázu (Abad a kol. 2004a; Shpiz a kol. 2007).

1.4. PROTEINOVÁ STRUKTURA TELOMER

Proteinová struktura telomer, stejně tak mechanismus jejího fungování, byly popsány hlavně u savců. Lidská telomera je 9-15 kb dlouhá (Moyzis a kol. 1988), obsahující na 3' konci jednovláknový TTAGGG přesah, který dosahuje 200-300 nt. Tento přesah invaduje do dvouřetězcové telomerické sekvence a tvoří tak struktury zvané t-smyčka a d-smyčka, které se považují za součást ochrany chromosomů před chromosomálními fúzí (Griffith a kol. 1999, de Lange 2004). Stabilita savčích telomer je dána komplexem proteinů specifických k telomerám, nazvaného jako „shelterin complex“ (de Lange 2005), s tím, že poškozením

komplexu nastává aktivizace reparačních procesů a dochází ke vzniku chromosomálních fúzí. Hlavními součástmi shelterinového komplexu jsou proteiny TRF 1 (telomeric repeat-binding factor) a TRF 2, které se váží k dvouřetězcové telomerické DNA (Chong a kol. 1995; Broccoli a kol. 1997). Dalším proteinem komplexu je POT 1 (protein protection of telomeres), navazující se k jednořetězcovému přesahu DNA a interagující s TPP1 (tripeptidyl peptidase) (Smogorzewska a de Lange 2004; Wang a kol. 2007). Rap 1 (repressor activator protein 1) se váže k TRF2 (Li a kol. 2000). TIN2 (TRF1- interacting nuclear factor 2) je hlavní komponentou komplexu interagujícího s TRF1, TRF2 a TPP1 (Kim a kol. 1999; O'Connor 2006). Proteiny TRF1, TRF2 a POT 1 se váží přímo na TTAGGG opakování, zatímco TIN2, TPP1 a Rap1 se k telomerám váží protein-proteinovými interakcemi a slouží pro stabilizaci celého telomerického komplexu. Pomocí interakce mezi proteiny komplexu a DNA, a to především s TRF2, je DNA ohnuta do d- a t-smyčky (Stansel a kol. 2001).

Obdoba savčího shelterinu se u drozofily nazývá terminin. Zásadní rozdíl mezi shelterinem a termininem je ve vazbě komplexu k DNA, terminin se totiž k DNA, na rozdíl od shelterinu, váže sekvenčně nespecificky a může se tak formovat na jakémkoliv chromosomálním konci, tedy i na konci s netelomerickou sekvencí DNA. Díky tomuto, ztráta telomerické sekvence u drozofily, na rozdíl od savců, nemusí vést k chromosomálním fúzím a následné genomové nestabilitě (Čapková Frydrychová a Mason 2013). Terminin je složen z proteinů HOAP, HipHop, Moi a VER. Tyto proteiny jsou lokalizovány pouze v telomerické oblasti a známa je jejich role především v prevenci telomerických fúzí (Raffa a kol. 2011). Kromě proteinů shelterinového či termininového komplexu, jsou v telomerách identifikovány další proteiny. Tyto proteiny se ale na rozdíl od proteinů shelterinu a termininu vyskytují jak v telomerických, tak i netelomerických oblastech a při srovnání drozofilích a lidských telomer vykazují určité homologie. Jedná se např. o proteiny Rad 50, Mre 11, ATM kináza, Ubc D1, Ku70/80 (Cenci a kol. 2005), což jsou sice proteiny hrající roli při ochraně telomer proti vzájemným fúzím, ale jinak se také jedná o proteiny, které se obecně účastní procesů při reparaci poškozené DNA

1.5. TELOMERY V PRŮBĚHU EVOLUCE

Ačkoliv je telomerázový systém více méně konzervativní, v průběhu evoluce nesčetněkrát došlo ke změnám v původním motivu telomerické repetice. Například motiv

(TTAGGG)_n, jenž je přítomen u člověka a je nazýván také jako obratlovčí motiv, je klasickou telomerickou sekvencí společnou nejen pro obratlovce a většinu metazoí (Moyzis a kol. 1988; Meyne a kol. 1989; Traut a kol. 2007), ale také pro houby a améby (Fulnečková a kol. 2013). Mezi živočichy je sekvence (TTAGGG)_n stabilní mezi druhoústými (Gomes a kol. 2011), avšak mezi prvoústými se již poněkud mění (Mason a kol. 2011). Například u kmene Nematoda se vyskytuje motiv (TTAGGC)_n a u Onychophora, Mollusca a Annelida je motiv (TTAGGG)_n. Rozsáhlé studie byly provedené také u členovců, jejichž hlavním telomerickým motivem je sekvence (TTAGG)_n (Obr. 1). U hmyzu je sekvence (TTAGG)_n nejspíše původní, avšak nejméně 15 krát došlo v průběhu evoluce k její ztrátě. Jak se zdá, tento motiv je zachován u primitivního bezkřídlého hmyzu, jako jsou Archaeognatha a Zygentoma, a také u nižších zástupců Neoptera (Plecoptera, Phasmida, Orthoptera, Blattaria, Mantodea a Isoptera) s výjimkou u Dermaptera a Heteroptera. Překvapivě však nebyl motiv nalezen u nižších křídlatých (Palaeoptera: Ephemeroptera a Odonata). Přítomnost motivu TTAGG u skupiny Endopterygota je značně heterogenní, motiv byl zde nalezen u Hymenoptera (blanokřídlí), Lepidoptera (motýli), Trichoptera (chrostíci), Megaloptera (střečatky) a některých druhů brouků (Coleoptera) (Frydrychova a kol. 2004).

U řady hmyzích taxonů se telomerickou sekvencí dosud nepodařilo identifikovat s tím, že nepřítomnost dané sekvence může být spjata s přechodem sekvenčního motivu na jiný, nicméně se zachováním telomerázového systému. Nebo naopak mohlo dojít ke ztrátě telomerázy a její náhradě alternativním kompenzačním mechanismem. Lze předpokládat, že alternativní mechanismy se vyvinuly jako záchrana v situacích, kdy je funkce základního mechanismu porušena nebo se zcela vytratila. Pravděpodobné příklady úplné ztráty telomerázy a jejího nahrazení alternativním mechanismem v průběhu evoluce jsou patrné právě u zástupců dvoukřídlých a zvláštním případem je bourec morušový (*Bombyx mori*), který sice vykazuje telomerickou sekvenci (TTAGG)_n, jež klasicky bývá prodlužovaná telomerázou, avšak přítomnost telomerázy u bource prokázána nebyla. Můžeme tedy předpokládat, že sekvence (TTAGG)_n u bource je udržovaná jiným, alternativním mechanismem (Fujiwara a kol. 2005; Mason a kol. 2016).

Krátké telomerické repetice udržované telomerázou jsou víceméně považovány jako ancestrální telomerická struktura, či při nejmenším jsou vnímány jako téměř normativní struktura telomery. A naopak, telomerické satelity či retrotransposony, popisované u nevelkého počtu organismů, jsou shledávány jako výjimka z pravidla. Nicméně, jak uvádí Mason a kol. (2016), díky řádu dvoukřídlých si můžeme na danou problematiku dovolit i trochu jiný náhled. U dvoukřídlých nebyla telomeráza objevena u žádného z dosud

testovaných druhů, naopak byly zde, a to hned u několika vzdálených druhů, objeveny dva různé alternativní mechanismy telomerické kompenzace. Vzhledem k tomu, že dvoukřídlí zaujímají přibližně 15 % druhů z celkového počtu všech živočišných druhů, nemusíme absenci telomerázy z celkového pohledu nutně chápat jako zanedbatelnou výjimku, a nota bene, když motiv krátké telomerické sekvence nebyl nalezen ani u fylogeneticky příbuzných skupin dvoukřídlých, tj. u blech (Siphonaptera) či srpic (Mecoptera) (Mason a kol. 2016).

Existují dohady o tom, že sekvenční příbuznost reverzní transkriptázy nalezené u telomerického elementu *TART* drozofily, se sekvencí katalytické podjednotky savčí telomerázy, by mohla naznačovat společný původ telomerázového systému s telomerickými elementy (Mason et al. 2016). Porovnáním fylogenetických vztahů uvnitř hmyzu lze dospět k závěru, že ke ztrátě telomerázového systému a jeho náhradě telomerickými elementy došlo už zhruba před 260 miliony lety, a to u předků dvoukřídlých ještě před jejich oddělením od řádů blech a srpic. Nicméně bez jakýchkoliv spekulací je díky právě příkladu evolučně úspěšného řádu dvoukřídlých zřejmé, že telomeráza není pro evoluci kriticky nutná a život se obejde i bez její přítomnosti (Fujiwara a kol. 2005; Mason a kol. 2016).

1.6. TELOMERICKÁ AKTIVITA PŘI STRESOVÝCH PODMÍNKÁCH

Na základě četných studií je čím dál intenzivněji diskutováno o vzájemném propojení mezi stárnutím organismu, oxidačním stresem, funkcí telomer a vznikem řady civilizačních onemocnění (Artandi a DePinho 2009). Oxidační stres je považován za jednu z nejdůležitějších příčin stárnutí (Milton a Sweeney 2012) a vzniku rozličných lidských nemocí. Se stárnutím a vznikem různých onemocnění je taktéž spjata telomerická délka a aktivita telomerázy a nadto je znám také vliv oxidačního stresu na zkracování telomerické délky (von Zglinicki et al. 2000; von Zglinicki 2002). Lze předpokládat, že působení těchto jevů v organismu je navázáno k rozličným fyziologickým procesům, jejichž kombinace v organismu mění nastolenou homeostázi. Jako příklad lze uvést práci Romano a kol. (2013), v níž byl studován vliv působení různých agens na telomerickou délku kvasinek, a kde se zjistilo, že např. alkohol a kyselina octová telomery prodlužují, zatímco kofeín a vysoké teploty je naopak zkracují. Práce naznačuje, že telomerická délka a aktivita telomerických kompenzačních mechanismů umožňují býti modulovány v závislosti na vnějších faktorech, které v organismu mění homeostázi, s tím, že změna je závislá na koncentraci a množství působící stresové látky a může být pouze dočasná. Bylo totiž

pozorováno, že po odeznění vlivu podané látky se telomery vrací na svou původní délku, což naznačuje spíše fyziologickou než genetickou odpověď na stres (Romano a kol. 2013). Dalším příkladem vlivu vnějších stresových podmínek jsou telomery pakomára rodu *Chironomus*, které jsou tvořené satelitní sekvencí udržovanou homologní rekombinací a které po působení teplotního stresu vykazují nárůst transkripční aktivity (Martinez-Guitarte a kol. 2008). Významné působení na telomerickou délku je obecně známé u oxidativního stresu.

1.7. OXIDATIVNÍ STRES

Oxidativní stres v organismu nastává působením volných kyslíkových radikálů, a to nejčastěji superoxidového radikálu a hydroxylového radikálu. Oxidativní stres je porušením buněčné rovnováhy mezi produkcí volných kyslíkových radikálů a jejich přirozeným odbouráváním prostřednictvím antioxidačních mechanismů v organismu (Sies 1997). Zdroje volných radikálů mohou být exogenní, tedy přicházející z vnějšího prostředí, jako je ionizační záření či chemické škodliviny v podobě syntetických sloučenin kovů, pesticidů, či jiných organických chemikálií, nebo endogenní vznikající buněčným metabolismem. Celkově nejvýznamnějším zdrojem volných kyslíkových radikálů je proces oxidativní fosforylace v mitochondriích (Bandy a Davidson 1990; Halliwell and Gutteridge 1989). Volné kyslíkové radikály plní řadu důležitých fyziologických rolí v organismu, jako je například jejich účast na obraně organismu vůči patogenům či detoxikace xenobiotik pomocí cytochromu P450 (Bokoch a Knaus 2003; Halliwell a Gutteridge 1989; Ahmad a Pardini 1990; Surai 2003) nebo jsou volné kyslíkové radikály využívány jako signální molekuly, například je známa jejich role v procesu učení a paměti (Milton a Sweeney 2012). Vzhledem k negativním aspektům působení volných kyslíkových radikálů (volné radikály totiž vzhledem ke své radikálové podstatě napadají okolní molekuly a struktury) je třeba hladinu volných kyslíkových radikálů udržovat v organismu na určité optimální úrovni. Ke snižování hladiny volných kyslíkových radikálů organismus využívá četné antioxidační mechanismy, které jsou založeny jak na enzymatickém, tak neenzymatickém působení. Základními mechanismy antioxidační obrany je aktivita superoxid dismutázy, která katalyzuje dvě molekuly superoxidového radikálu na kyslík a peroxid vodíku, a katalázy, která slouží ke štěpení peroxidu vodíku na kyslík a vodu. Jako antioxidanty mohou fungovat četné

molekuly, jako je vitamín C a E či glutathion (Racek a Holeček 1999; Halliwell a Gutteridge 1999).

Negativní působení volných kyslíkových radikálů na struktury organismu je nepřehledné. Volné kyslíkové radikály narušují signální dráhy, které kontrolují buněčný růst a buněčnou apoptózu (Giorgio a kol. 2007), poškozují buňky cestou oxidativní modifikace membránových lipidů, proteinů (Seehafer a Pearce 2006; Terman a Brunk 2006; Janero 1990), DNA (Halliwell and Gutteridge 1989; Sies 1991) a rovněž byl zjištěn jejich vliv na snížení aktivity synaptických a mitochondriálních transkriptů. Oxidativní poškození se odráží na změnách morfologické struktury, jak je patrné například u dendritických buněk, u nichž působením oxidativního stresu dochází ke změně jejich počtu a hustoty (Dickstein a kol. 2007). Je známo, že za vznikem řady civilizačních onemocnění, a především těch z kategorie neurodegenerativních, stojí působení volných kyslíkových radikálů (Valko a kol. 2007).

Speciální zřetel je brán na genotoxické působení oxidativního stresu, a to především na působení volných kyslíkových radikálů v telomerické oblasti. Působením volných kyslíkových radikálů dochází k oxidativním modifikacím bází DNA, které mění párovací potenciál daných bází. Nejčastěji oxidativně modifikovanou bází je 8-oxoguanin, který vede k chybnému párování s adeninem. U člověka je 8-oxoguanin opravován pomocí DNA glykosylázy OGG1, jež vytváří jednořetězcové zlomy jako intermediáty během opravného procesu. Nicméně, specifická chromatinová struktura telomer snižuje efektivitu opravných mechanismů v telomerách, takže ve zvýšené míře zůstávají jednořetězcové zlomy, které vznikají působením OGG1, neopraveny. Během následné replikace DNA, kdy se vytváří replikační vidlička, řetězec DNA, který distálně přiléhá k jednořetězcovému zlomu, odpadá (Houben a kol. 2008; Oikawa a Kawanishi 1999; Kawanishi a Oikawa 2004). Oxidativní stres tedy významným způsobem urychluje telomerické zkracování.

1.8. MOBILNÍ ELEMENTY JAKO MECHANISMUS ADAPTACE KE STRESOVÝM PODMÍNKÁM

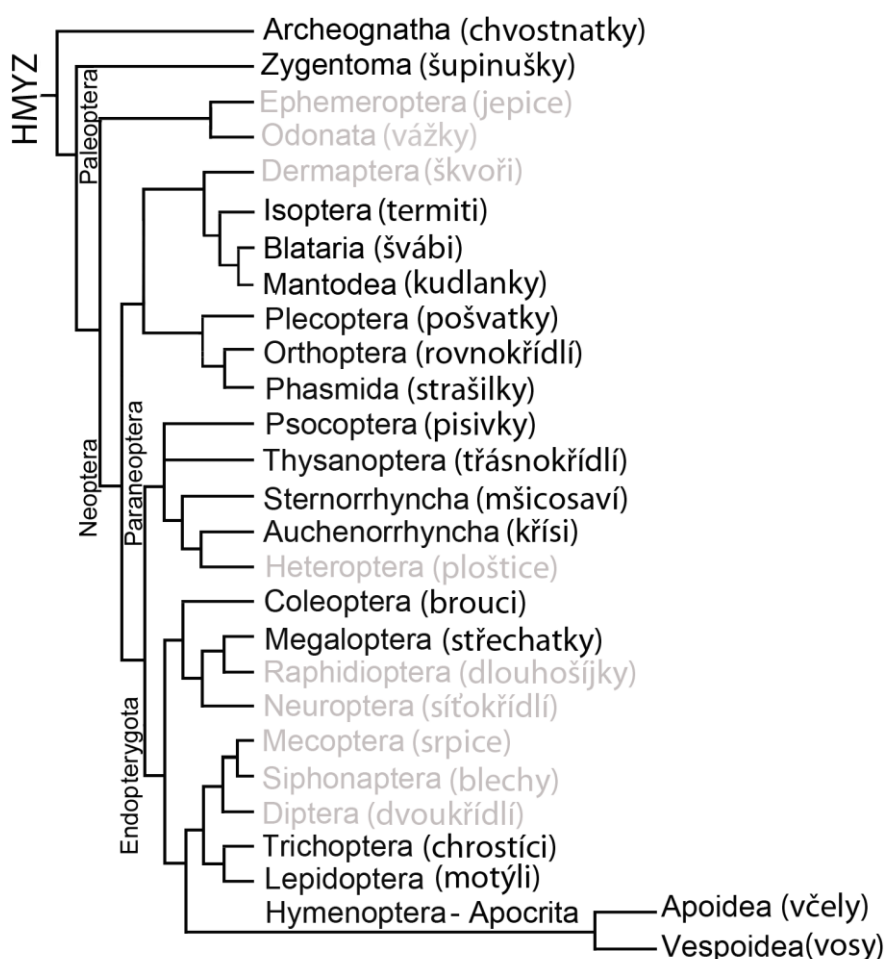
Obecně je znám genotoxický účinek mobilních elementů na jejich hostitelskou DNA. Působením mobilních elementů, resp. transpozicí mobilních elementů na nová místa genomu, dochází k rozličným genetickým změnám, které lze souhrně definovat buď jako inaktivace genové transkripce, změna úrovně genové transkripce či produkce nefunkčního

proteinu. Dále se může jednat o chromosomální přestavby vinou nerovnoměrného crossing-overu, kdy dochází k rekombinaci mezi sekvenčně podobnými elementy, ležícími ovšem na nehomologních lokusech genomu (Kidwell a Lisch 2001; Moran a kol. 1999; Sayah a kol. 2004; Prak a Kazazian 2000). Všechny uvedené změny mohou zcela zásadně snížit životaschopnost hostitele a ve svém důsledku tak i ohrozit existenci samotných mobilních elementů. Je proto logické, že, jak u hostitele, tak mobilních elementů, byly vyvinuty strategie, jak těmto dopadům předcházet či je mírnit na únosnou mez (Muñoz-López a García-Pérez 2010). Příkladem je přednostní vkládání některých typů transposonů do neesenciálních oblastí genomu, jako je heterochromatinová oblast (Kidwell 1991; Pimpinelli a kol. 1995; Dimitri a kol. 1997; Ikeda a kol. 2007). Nebo koncentrace aktivity mobilních elementů do zárodečné linie či raného embryonálního stádia, kde mohou být škodlivé mutace bez pozdějších následků odstraněny (Levitt a Emmons 1989; Calvi a Gelbart 1994; Kano a kol. 2009). Na straně hostitelských organismů je to redukce exprese mobilních elementů pomocí metylace DNA (Dennis a Brettell 1990; Barlow 1993; Yoder a kol. 1997; Bourc'his 2004), různé mechanismy založené na RNA interferenci (Obbard a kol. 2009) či reakce specifických proteinů s mobilními elementy (Engels 1996; Schumann 2007; Stetson a kol. 2008). Na druhé straně může být mezi hostitelem a elementem nastolen stav mutualismu, kdy obě strany profitují z přítomnosti druhého (Muñoz-López a García-Pérez 2010).

Již představa Barbary McClintockové (1984), která byla objevitelkou mobilních elementů, vedla k tomu, že mobilní elementy mohou vystupovat jako elementy modifikující genetickou odpověď organismu na vystavení určitým stresovým podmínkám. To ale za předpokladu schopnosti mobilních elementů umět se začlenit do konkrétního místa v genomu, resp. vytvořit specifickou genetickou modifikaci v genomu, která by byla adekvátní k nastalým podmínkám (Mourier 2014). Aktivita mobilních elementů po vystavení stresovým podmínkám je vskutku známá již nějakou dobu (Arnault a Dufournel, 1994; Capy a kol. 2000; Garcia Guerreiro 2012) a je vnímána jako přímý důsledek či reakce na konkrétní stres, a tedy ne jen jako nepřímý produkt vyvolaný buněčnou nerovnováhou (Mourier 2014). Například u komára pisklavého (*Culex pipiens*) byla popsána rezistence ke specifickému toxinu, která se vytvořila inaktivací genu pro receptor *cpm1*, a to integrací mobilního elementu (Darboux a kol. 2007). Dalším případem je zkrácení genu CG10618 pomocí mobilního elementu a následné zvýšení rezistence k organofosfátovým pesticidům u drozofily (Aminetzach a kol. 2005). Skvělým příkladem mutualismu mezi mobilním elementem a jeho hostitelským genomem je gen *LITD1*. Tento gen, jenž se nachází u

člověka, je odvozen z LINE-1 retroelementu a hraje důležitou roli v udržení pluripotence. Gen pochází původně z období evoluce myši a primátů, kdy hrál pravděpodobně roli v obraně právě proti LINE-1 elementům (McLaughlin 2014).

Lze rovněž předpokládat, že k uplatnění selekční výhody nedochází jen při přechodu z generace na generaci, ale že adaptační proces ke změně podmínek a následná selekce může probíhat i v rámci somatických buněk daného jedince. Z hlediska studia je bohužel nevýhodou to, že tyto změny jsou, až na výjimku klonálních amplifikací u nádorových buněk, dosud jen stěží technicky odhalitelné (Mournier a kol. 2014). Přesto lze z pohledu evoluce přínos mobilních elementů vnímat víc než příznivě.



Obr. 1. Distribuce telomerické sekvence TTAGG u hmyzu. Telomerická sekvence TTAGG byla potvrzena u hmyzích řádů, které jsou vyznačeny černě, naopak u hmyzích řádů znázorněných v šedé barvě sekvence nalezena nebyla.

2. Hypotézy a cíle

Telomerázový systém je chápán jako více méně konzervativní mechanismus telomerické kompenzace, s tím, že existuje bezpočet příkladů změn telomerické sekvence, které nastaly v průběhu evoluce, avšak většinou se zachováním telomerázového kompenzačního mechanismu. Příkladem relativně častých ztrát v průběhu evoluce je sekvence TTAGG. Přesto, že se tato telomerická sekvence u hmyzu jeví jako nejčastější a také i jako původní, byla v průběhu evoluce hmyzu ztracena mnohokrát (Frydrychová a Marec 2002; Frydrychová a kol. 2004). Sekvence či telomerické systémy, které nahradily ztrátu sekvence TTAGG v jednotlivých případech ovšem nebyly většinou identifikovány.

Pro mapování sekvence TTAGG v telomerách hmyzu bylo provedeno několik extensivních studií, ovšem je třeba dodat, že v některých studiích byla pro mapování telomerické sekvence využita jen Southernova hybridizace, namísto její kombinace s *in situ* hybridizací, a nelze tak vždy zcela věřit v deklarovaný pozitivní nález sekvence. Na základě metodických nedostatků nebylo také zcela přesvědčivé, že nalezené motivy jsou skutečně tou deklarovanou telomerickou sekvencí a nejedná se jen o pouhé relikty kdysi funkčních sekvencí či dokonce subtelomerické sekvence, tak jak to lze ostatně pozorovat na příkladu *B. mori* (Mason a kol. 2016; Frydrychová a kol. 2004; Takahashi a Fujiwara 1999). Rovněž je třeba zmínit často nízký počet vyhodnocených druhů, které byly vybrány k jednotlivým, často poměrně obsáhlým taxonům, jako referenční.

Cíl práce: Cílem práce bylo určit, zda sekvence TTAGG, stanovená dřívějšími studiiemi jako telomerická sekvence u zástupců hmyzích řádů, je doplněna příslušným telomerázovým systémem a takto ověřit, že TTAGG sekvence je u testovaných taxonů skutečnou a funkční telomerickou sekvencí.

Vše nasvědčuje tomu, že alternativní mechanismy telomerické kompenzace se vyvinuly jako záchrana v kritických momentech, kdy byla funkce telomerázy, jako základního mechanismu telomerické kompenzace, porušena nebo se zcela vytratila. Telomerické elementy drozofily jsou jedním z příkladů alternativních mechanismů, které převzaly funkci telomerázy, a to buď jako následek ztráty telomerázy či ztráty krátké telomerické sekvence, k níž je aktivita telomerázy vázaná (Mason a kol. 2016). Telomerické mobilní elementy drozofily jsou jediné dosud známé mobilní elementy, které svému

hostitelskému organismu poskytují zcela prospěšnou a pro život klíčovou funkci. Je známo, že mobilní elementy mohou být aktivovány stresovými podmínkami (Mourier a kol. 2014), a tudíž lze spekulovat o tom, že u drozofily mohly mobilní elementy převzít svou telomerickou funkci při své aktivaci, která byla iniciovaná působením nějakého stresového faktoru. Působení volných kyslíkových radikálů, a potažmo oxidačního stresu, který jejich vlivem vzniká, patří k významným stresovým faktorům prostředí. Je obecně známo, že ataky volných kyslíkových radikálů na telomerickou oblast vedou k významné akceleraci přirozeného telomerického zkracování (Von Zglinicki 2002). Na druhou stranu je třeba dodat, že telomerická eroze vlivem oxidačního stresu byla experimentálně ověřena jen při akutní expozici relativně vysokých dávek oxidačních agens (Kawanishi a Oikawa 2004), naopak chronické působení mírných dávek či subletálních dávek zůstává nejasné. Lze se rovněž tázat, jestli působení nízkých dávek volných radikálů může na telomery působit hormetickým efektem. Hormeze je totiž jev, kdy působením velmi nízkých dávek škodlivých chemických, fyzikálních či biologických agens dochází v organismu k prospěšnému a vitalitě stimulujícímu účinku, a to navzdory tomu, že působení vyšší koncentrace daných látek je pro organismus toxické či letální (Calabrese 2004; Mattson 2008).

Cíl práce: Dalším cílem této disertační práce bylo proto zjistit, jestli aktivita drozofilích telomerických mobilních elementů může být ovlivňována chronickým působením nízkých dávek volných radikálů a případně určit, jestli vhodně zvolené nízké dávky volných radikálů mohou u drozofily či v jejich telomerách vyvolávat hormetický efekt.

3. Výsledky

Publikované výsledky jsou prezentovány dvěma publikacemi, nepublikované výsledky jsou zpracovány ve formě rukopisu. Celé znění publikací a rukopisu je uvedeno v sekci 7. Publikace a Rukopis.

3.1. Publikace č. I

Korandová M., Krůček T., Vrbová K. a Čapková Frydrychová R. (2014). **Distribution of TTAGG-specific telomerase activity in insects.** *Chromosome research.* 22(4): 495-503.

Abstrakt. Telomery u většiny eukaryot obsahují tandemově uspořádané krátké repetitivní sekvence DNA, s tím, že u hmyzu je nejčastější telomerickou sekvencí (TTAGG)_n. Nejčastěji jsou telomery udržovány pomocí enzymu telomerázy, speciální reverzní transkriptázy, jež doplňuje telomerické repetice k telomerickým koncům. Testovali jsme telomerázovou aktivitu u 15 hmyzích druhů z 12 hmyzích řádů. Telomerázová aktivita byla odhalena u řádů Isoptera, Blattaria, Lepidoptera, Hymenoptera, Trichoptera, Coleoptera a Sternorrhyncha, naproti tomu u Orthoptera, Zygentoma a Phasmida aktivita telomerázy detekovaná nebyla. Jelikož jsme telomerázovou aktivitu potvrdili u fylogeneticky odlišných druhů napříč hmyzem, můžeme konstatovat, že telomerázová aktivita specifická k sekvenci TTAGG se jeví jako nejběžnější telomerický kompenzační mechanismus u hmyzu. Pomocí metody RTQ-TRAP jsme kvantifikovali telomerázovou aktivitu u vývojově odlišných stádií a rozdílných tkání švába (*P. americana*). Ukázali jsme, že telomerázová aktivita se s vývojem švába snižuje. U dospělců je její aktivita nejvyšší v testes a ovarích. Zdá se tedy, že telomerázová aktivita je u hemimetabolního hmyzu spojena s buněčnou proliferací a vývojem organismu.

3.2. Publikace č. II

Krůček T., Korandová M., Šerý M., Szakosová K., Čapková Frydrychová R. (2015). **Effect of low doses of herbicide paraquat on antioxidant defense in *Drosophila***. Archives of Insect Biochemistry and Physiology. 88(4): 235-48.

Abstrakt. Paraquat je navzdory velké toxicitě stále ve světě široce užívaným herbicidem. Naše studie hodnotí dopady paraquatu na antioxidantní odezvu a lokomoční aktivitu u *Drosophila melanogaster*. Zkoumali jsme jak enzymatickou, tak transkripční aktivitu superoxid dismutázy (SOD) a katalázy. Mouchy byly během pokusů vystaveny spektru koncentrací (od 0.25 μ M do 25 mM) po dobu 12 hodin. SOD, jak na transkripční, tak enzymatické aktivitě, vykazuje bifázickou a na koncentraci závislou křivku s maximálním nárůstem při koncentraci 2.5 μ M paraquatu. Podobnou křivku vykazuje i transkripční aktivita katalázy. U samců se projevuje vyšší citlivost k působení paraquatu, tedy vyšší úmrtnost, zvýšená aktivita SOD a vyšší hladina peroxidů v porovnání k samicím. U samic jsme při koncentraci paraquatu 2,5 μ M objevili také zvýšenou lokomoční aktivitu. Zvýšená citlivost k parakvatu byla pozorována u reprodukčně aktivních jedinců, což podporuje hypotézu zvýšené citlivosti vůči stresu jako fyziologické dani z reprodukce.

3.3. Rukopis

Korandová M., Krůček T., Szakosová K., Kodrík D., Kühnlein R. P., Tomášková J., Čapková Frydrychová R. **Chronic low-dose pro-oxidant treatment stimulates transcriptional activity of telomeric retroelements and increases telomere length in *Drosophila*.** (zasláno do Journal of Insect Physiology)

Abstrakt. Předpokládá se, že oxidativní stres, vyvolaný zvýšenou hladinou reaktivních forem kyslíku, vyvolává telomerickou erozi. Zatímco většina eukaryot se vyrovnává se zkracováním telomer pomocí aktivity telomerázy, telomerická ztráta u drozofily je kompenzována pomocí retrotranspozice telomerických retroelementů *HeT-A*, *TART* a *TAHRE* k chromosomálním koncům. V této studii jsme testovali efekt chronického vystavení much subletálním dávkám paraquatu, což je sloučenina s redoxním potenciálem a schopná vyvolávat oxidativní stres. Expozice much paraquatu během pěti generací vyústila ve zvýšenou transkripční aktivitu telomerických a netelomerických elementů a prodloužení telomerické délky. Předpokládáme tedy, že vystavení mírnému oxidativnímu stresu vede k prodloužení telomerické délky v rámci testované populace drozofily. Nárůst telomerické délky lze vysvětlit buď adaptací přímo vedoucí ke stimulaci telomerické extenze, nebo pozitivní selekcí, která by favorizovala jedince s delšími telomerami.

4. Diskuze

Telomery jsou struktury, které zcela zásadním způsobem zajišťují celistvost genetické informace, a tím také buňce zajišťují její existenci a funkčnost. Poškození telomer má za následek četné genomové defekty, z nichž nejlépe zdokumentované jsou chromosomální fúze, které ústí v celou škálu projevů, a to od defektní genetické informace až po buněčnou apoptózu. Telomera funguje jako složitá nukleoproteinová struktura, v níž jednotlivé komponenty mají v zajištění funkčnosti celého systému své důležité a nezastupitelné opodstatnění (Blackburn 1991). Tímto, destabilizace celého systému může být vyvolána nejenže celou ztrátou, ale i jen snížením funkčnosti jedné z mnoha telomerických komponent. To lze dobře dokumentovat na příkladu proteinu HP1, který je součástí telomerické čepičky a vliv jeho mutací, a to i v heterozygotním stavu, je dobře patrný na zvýšené četnosti chromosomálních fúzí a dalších s tím spojených letálních defektů (Cenci a kol. 2005).

Ztráta telomery má obecně pro buňku a potažmo organismus letální následky, na druhou stranu, jak bylo prokázáno na mnoha příkladech, ztráta telomerické sekvence a její náhrada sekvencí jinou, či dokonce ztráta telomerázového systému a jeho náhrada jiným telomerickým kompenzačním mechanismem, nemusí nutně vést k zániku daného organismu. To je patrné zejména na příkladu hmyzu, a to zejména brouků, u nichž evoluce telomerické sekvence byla spojená možná až s překotnými změnami. Změny v kompozici telomerické sekvence brouků se totiž v průběhu evoluce odehrály nejméně pětkrát (Frydrychova a Marec 2002; Frydrychová a kol. 2004). Je třeba si uvědomit, že ztráta telomerické sekvence v průběhu evoluce není pouhou výměnou jedné sekvence za jinou, ale že změny v telomerické sekvenci s sebou přináší změny jak ve vazebné specificitě proteinů shelterinové struktury, tak především systému telomerické kompenzace. Pokud budeme uvažovat situaci, kdy byl zachován telomerázový systém, ale došlo ke změně telomerické sekvence, pravděpodobně prvotní změnou je změna templátové sekvence telomerázové podjednotky, která je následovaná adaptací shelterinových proteinů k nové telomerické sekvenci. Jak uvažuje Mason a kol. (2016), náhrada jedné telomerické sekvence za druhou je umožněna v případech, kdy proteiny telomerické čepičky postrádají striktní vazebnou specificitu k určité DNA sekvenci. Příkladem, který toto skvěle dokládá, je drozofila, jejíž

telomery jsou tvořeny směsicí tří telomerických elementů, které jednak vykazují různou délku a v rámci daného typu rovněž i určitou sekvenční variabilitu. Komplex termininu, což je u drozofily proteinový komplex svou funkcí analogický shelterinovému proteinu obratlovců, je schopen se zformovat na jakékoliv sekvenci DNA (Cenci a kol. 2005; Mason a kol. 2008), což je důvod, proč náhlá ztráta koncových částí telomery drozofily nemusí nevyhnutelně vést, na rozdíl od savců, ke genomové nestabilitě a letálním efektům.

Přítomnost netelomerázových systémů telomerické kompenzace může být mnohem obecnějšího charakteru, než jak se běžně předpokládá. Krátké opakující se sekvence, které jsou obvykle v telomerách spjaty s telomerázovým systémem, byly prokázány v telomerách většiny testovaných druhů rostlin a živočichů (Frydrychova a Marec 2002; Frydrychová a kol. 2004; Gomes a kol. 2011). Nicméně, na příkladu *B. mori*, u něhož je telomeráza neaktivní, a to i navzdory přítomnosti krátké opakující se sekvenci v telomerách (Sasaki and Fujiwara, 2000), lze usuzovat, že pouhá přítomnost určité sekvence v telomerách může být pro celkové hodnocení daného telomerického typu při nejmenším zavádějící. Navíc, Mason a kol. (2016) na příkladu řádu Diptera, který patří k nejpočetnějším řádům živočichů a jehož zástupci nahradili telomerázový systém dvěma různými systémy, ukazuje, že přítomnost telomerázy není pro existenci života tak zásadní, jak je obvykle chápáno. Tím se otvírá prostor pro spekulaci, jak to s obecností telomerázového systému vlastně je.

Jedním z cílů disertační práce bylo ověření přítomnosti telomerázového systému specifického k hmyzí telomerické sekvenci TTAGG u vybraných jedenácti hmyzích řádů, které v dřívějších studiích prokázaly přítomnost telomerické sekvence TTAGG (Frydrychova a Marec 2002; Frydrychova a kol. 2004). Dle původního předpokladu, ne všechny testované řády vykazaly přítomnost TTAGG-telomerázového systému, protože absence tohoto systému byla zaznamenána u Zygentoma (rybenky), Orthoptera (rovnokřídlí) a Phasmida (strašilky) (Korandová a kol. 2014). To zcela jasně potvrzuje, že pouhá přítomnost telomerické sekvence nemůže být jediným ukazatelem příslušného telomerického systému. Lze předpokládat, že telomerická sekvence, která se v telomerách vyskytuje, navzdory absenci specifického typu telomerázy, může být pouhou reliktní sekvencí, zbylou po zaniklém telomerickém systému, případně se může jednat o subtelomerické sekvence, které byly mylně vyhodnoceny jako telomerické. V případě zmíněných řádů Zygentoma, Orthoptera a Phasmida, TTAGG-telomeráza tedy prokázána nebyla, nicméně zůstává otázkou, zda v těchto řádech došlo k pouhé změně v templátové sekvenci telomerázy, nebo naopak ztrátě celého telomerázového systému. Jak se zdá, tak například u Hymenoptera došlo pravděpodobně také ke ztrátě telomerického systému specifického k (TTAGG)_n

sekvenci u třinácti z doposud patnácti studovaných čeledí Menezes a kol. (2017). Tito autoři navrhují teorii ztráty telomerického motivu již u předků Apocrita, nebo dokonce již u předků Hymenoptera, s následnou obnovou u dvou čeledí Formicidae a Apidae. U Coleoptera je situace obdobná, i zde postrádá mnoho zástupců klasickou hmyzí sekvenci a také se zdá, že sekvence TTAGG byla ztracena osmkrát v průběhu evoluce tohoto řádu (Frydrychová a Marec 2002). Klasický telomerický motiv se vůbec nevyskytuje u 8 z 19 testovaných čeledí. U tří blízce příbuzných čeledí (v rámci nadčeledi Tenebrionoidea) byla hmyzí sekvence nahrazena motivem (TCAGG)_n (Mycetophagidae, Tenebrionidae a Meloidae) (Mravinac a kol. 2011; Frydrychova kol. 2002; 2004; Mason a kol. 2016).

V některých případech mohou alternativní mechanismy sekundovat hlavnímu mechanismu telomerické kompenzace, tak jak je pozorováno v případě homologní rekombinace u člověka či kvasinek jako alternativy k telomeráze, nebo jako alternativy k retrotranspozici u drozofily (Mefford a Trask 2002; Biessmann a Mason 2003; Mason a kol. 2011, 2008). Do jaké míry se alternativní mechanismy v těchto případech uplatňují na celkové telomerické kompenzaci, není zatím zcela jasné, nicméně s velkou pravděpodobností slouží tyto mechanismy nejspíše pouze jako doplněk telomeráze. Telomeráza se totiž na základě všech dat, která v současné době máme, jeví jako původním, ancestrálním mechanismem telomerické kompenzace (Frydrychova a kol. 2004; Fulnečková a kol. 2013; Gomes a kol. 2011; Traut a kol. 2007), což je ostatně podpořeno i výsledky této disertační práce (Korandová a kol. 2014). Lze předpokládat, že telomeráza je v organismech doprovázena alternativním mechanismem, který přebírá roli hlavního mechanismu za určitých stresových podmínek, což si lze dost dobře představit na příkladu drozofily a jejich telomerických elementů.

Výsledky této disertační práce jasně ukazují, že aktivita telomerických mobilních elementů a tím i telomerická délka je zvyšována působením nízké koncentrace volných kyslíkových radikálů (Korandova a kol., zasláno do časopisu), což jsou agens, která v obecném povědomí telomery spíše zkracují, než prodlužují, a která při svých vysokých koncentracích mohou vést až k chromosomálním zlomům, tedy i ztrátě telomer (Proctor a Kirkwood 2002). Aktivace mobilních elementů volnými kyslíkovými radikály podporuje teorii, že telomeráza mohla být u drozofily nahrazena mobilními elementy právě při působení oxidačního stresu. Vlivem oxidačního stresu jednak mohlo dojít ke ztrátě telomerických sekvencí, které jsou mimo jiné limitujícím faktorem pro navazování telomerázy k chromosomálním koncům a tedy telomerické elongaci (Mason a kol. 2016), a zároveň byly hyperaktivovány mobilní elementy, jejichž nové kopie, náhradou za kanonické

telomerické sekvence, zaujaly pozice na koncích chromosomálních zlomů. Vzhledem k tomu, že komplex telomerické čepičky byl hned od počátku dostatečně tolerantní vůči nové „telomerické“ DNA, došlo k postupné adaptaci z původně telomerázového systému na systém telomerické retrotranspozice.

Hormeze je jev, kdy nízké dávky chemických, fyzikálních či biologických agens mají na organismus prospěšný a vitalitu-stimulující účinek, a to navzdory vysokým koncentracím daných látek, které naopak působí na organismus škodlivě až letálně (Calabrese 2004; Mattson 2008). S ohledem na mobilizaci retroelementů působením oxidačního stresu, disertační práce poukazuje na telomerickou hormezi jako na zcela nový fenomén. Na základě práce se totiž jeví, že působení nízkých koncentrací volných kyslíkových radikálů stimuluje nejenže aktivitu antioxidačních mechanismů, ale i překvapivě aktivitu telomerických elementů. Tedy, vysoké hladiny oxidantů telomery zkracují, nízké hladiny naopak telomery prodlužují.

5. Závěr

Mobilní elementy sice vystupují jako genotoxická agens, nicméně na druhou stranu je známa jejich úloha při adaptaci organismu k četným stresovým podmínkám. Telomerické mobilní elementy drozofily jsou chápány jako jediné známé mobilní elementy, které svému hostitelskému organismu prokazují funkci, která je nejenže čistě prospěšná, ale i zcela zásadní pro existenci organismu. To, že telomerické mobilní elementy mohou být aktivovány působením volných radikálů, je zcela jistě další nástavbou pro naše vnímání mobilních elementů ve smyslu jejich užitečnosti v rámci genomu, ale taktéž přináší další náhled do pochopení úlohy, kterou hrají alternativní telomerické kompenzační mechanismy v evoluci telomer a potažmo organismů.

6. Citovaná literatura

Abad J. P., de Pablos B., Osoegawa K., De Jong P. J., Martin-Gallardo A., Villasante A. (2004a). *TAHRE*, a novel telomeric retrotransposon from *Drosophila melanogaster*, reveals the origin of *Drosophila* telomeres. *Mol Biol Evol.* 21: 1620-1624.

Abad J. P., de Pablos B., Osoegawa K., de Jong P. J., Martin-Gallardo A., Villasante, A. (2004b). Genomic analysis of *Drosophila melanogaster* telomeres: Full-length copies of *HeT-A* and *TART* elements at telomeres. *Mol Biol Evol.* 21: 1613–1619.

Ahmad S. and Pardini R. S. (1990). Mechanisms for regulating oxygen toxicity in phytophagous insects. *Free Radic Biol Med.* 8: 401-413.

Aminetzach Y. T., Macpherson J. M., Petrov D. A. (2005). Pesticide resistance via transposition-mediated adaptive gene truncation in *Drosophila*. *Science.* 309: 764–767.

Arkhipova I. and Meselson M. (2000). Transposable elements in sexual and ancient asexual taxa. *Proc Natl Acad Sci.* 97: 14473–14477.

Arnault C. and Dufournel I. (1994). Genome and stresses: reactions against aggressions, behavior of transposable elements. *Genetica.* 93: 149–160.

Artandi S. E. and DePinho R. A. (2009). Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis.* 31(1): 9-18.

Bandy B. and Davison A. J. (1990). *Free Radical Biol Med.* 8: 523-539.

Barlow D. P. (1993). Methylation and imprinting: from host defense to gene regulation? *Science.* 260(5106): 309-310.

Beauregard A., Curcio M. J., Belfort M. (2008). The take and give between retrotransposable elements and their hosts. *Annu Rev Genet.* 42: 587-617.

Biessmann H. and Mason J. M. (2003). Telomerase-independent mechanisms of telomere elongation. *Cell Mol Life Sci.* 60(11): 2325-2333.

Biessmann H., Mason J. M., Ferry K., d'Hulst M., Valgeirsdottir K., Traverse K. L., Pardue M. L. (1990). Addition of telomere-associated *HeT* DNA sequences 'heals' broken chromosome ends in *Drosophila*. *Cell*. 61: 663-673.

Blackburn E. H. (1991). Telomeres. *Trends Biochem Sci*. 16: 378–381.

Blackburn E. H. and Gall J. G. (1978) A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol*. 120: 33-53.

Bokoch G. M. and Knaus U. G. (2003). NADPH oxidases: Not just for leukocytes anymore! *Trends Biochem Sci*. 28: 502-508.

Bourc'his D. and Bestor T. H. (2004). Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature*. 431(7004): 96-99.

Broccoli D., Smogorzewska A., Chong L., de Lange T. (1997). Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat Genet*. 17: 231–235.

Calabrese E. J. (2004). Hormesis: a revolution in toxicity, risk assessment and medicine. *EMBO Rep*. 5: S37.

Calvi B. R. and Gelbart W. M. (1994). The basis for germline specificity of the hobo transposable element in *Drosophila melanogaster*. *EMBO J*. 13(7): 1636-1644.

Čapková Frydrychová R. and James M. Mason J. M. (2013). Telomeres: Their Structure and Maintenance. Book edited by Stuart D. InTech. DOI: 10.5772/51356 Chapter 17

Čapková Frydrychová R., Mason J. M., Biessmann H. (2009). Regulation of telomere length in *Drosophila*. *Cytogen and Gen Res*. 122: 356–364.

Capy P., Gasperi G., Biemont C., Bazin C. (2000). Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites? *Heredity(Edinb)*. 85(Pt 2): 101–106.

Cenci G., Ciapponi L., Gatti M. (2005). The mechanism of telomere protection: a comparison between *Drosophila* and humans. *Chromosoma*. 114: 135–145.

Cohen S. B., Graham M. E., Lovrecz G. O., Bache N., Robinson P. J., Reddel R. R. (2007). Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science*. 315: 1850-1853.

d'Adda di Fagnana F., Reaper P. M., Clay-Farrace L., Fiegler H., Carr P., Von Zglinicki T., Saretzki G., Carter N. P., Jackson S. P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*. 426: 194-198.

Danilevskaya O. N., Arkhipova I. R., Traverse K. L., Pardue M-L. (1997). Promoting in tandem: the promoter for telomere transposon *HeT-A* and implications for the evolution of retroviral LTRs. *Cell*. 88: 647–655.

Danilevskaya O. N., Traverse K. L., Hogan N. C., DeBaryshe P. G., Pardue M-L. (1999). The two *Drosophila* telomeric transposable elements have very different patterns of transcription. *Mol Cell Biol*. 19: 873–881.

Darboux I., Charles J. F., Pauchet Y., Warot S., Pauron D. (2007). Transposon-mediated resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-evolved population of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Cell Microbiol*. 9: 2022–2029.

Day J. P., Marder B. A. and Morgan W. F. (1993) Telomeres and their possible role in chromosomes tabilization. *Environ Mol Mutagen*. 22: 245-249.

de Koning A. P., Gu W., Castoe T. A., Batzer M. A., Pollock D. D. (2011). Repetitive elements may comprise over two-thirds of the human genome. *PLoS Genet*. 7: e1002384.

de Lange T. (2002) Protection of mammalian telomeres. *Oncogene*. 21: 532-540.

de Lange T. (2004). Opinion: t-loops and the origin of telomeres. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5: 323–329.

de Lange T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev*. 19: 2100–2110.

Dennis E. S. and Brettell R. I. (1990). DNA methylation of maize transposable elements is correlated with activity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 326(1235): 217-229.

Dickstein D. L., Kabaso D., Rocher A. B., Luebke J. I., Wearne S. L., Hof P. R. (2007). Changes in the structural complexity of the aged brain. *Aging Cell*. 6: 275-284.

Dimitri P., Arca B., Berghella L., Mei E. (1997). High genetic instability of heterochromatin after transposition of the LINE-like I factor in *Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci. 94(15): 8052-8057.

Engels W. R. (1996). P elements in *Drosophila*. Curr Top Microbiol Immunol. 204: 103-123.

Finnegan D. J. (2012) Retrotransposons. Curr Biol. 22(11): 432-437

Forsyth N. R., Wright W. E., Shay J. W. (2002). Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again. Differentiation. 69: 188-197.

Frydrychová R., Grossmann P., Trubač P., Vítková M., Marec F. (2004). Phylogenetic distribution of TTAGG telomeric repeats in insects. Genome. 47: 163-178.

Frydrychová R. and Marec F. (2002). Repeated losses of TTAGG telomere repeats in evolution of beetles (Coleoptera). Genetica. 115: 179-187.

Fujiwara H., Osanai M., Matsumoto T., Kojima K. K. (2005). Telomere-specific non-LTR retrotransposons and telomere maintenance in the silkworm, *Bombyx mori*. Chrom Res. 13(5): 455-467.

Fulnečková J., Ševčíková T., Fajkus J., Lukešová A., Lukeš M., Vlček C., Lang B. F., Kim E., Eliáš M., Sýkorová E. (2013). A broad phylogenetic survey unveils the diversity and evolution of telomeres in eukaryotes. Genome Biol Evol. 5: 468–483.

Garcia Guerreiro M. P. (2012). What makes transposable elements move in the *Drosophila* genome? Heredity(Edinb). 108: 461–468.

Gardner M. J., Hall N., Fung E., White O., Berriman M., Hyman R. W., Carlton J. M., Pain A., Nelson K. E., Bowman S., Paulsen I. T., James K., Eisen J. A., Rutherford K., Salzberg S. L., Craig A., Kyes S., Chan M. S., Nene V., Shallom S. J., Suh B., Peterson J., Angiuoli S., Pertea M., Allen J., Selengut J., Haft D., Mather M. W., Vaidya A. B., Martin D. M., Fairlamb A. H., Fraunholz M. J., Roos D. S., Ralph S. A., McFadden G. I., Cummings L. M., Subramanian G. M., Mungall C., Venter J. C., Carucci D. J., Hoffman S. L., Newbold C., Davis R. W., Fraser C. M., Barrell B. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Nature. 419: 498–511.

George J. A. and Pardue M-L. (2003). The promoter of the heterochromatic *Drosophila* telomeric retrotransposon, *HeT-A*, is active when moved into euchromatic locations. *Genetics*. 163: 625–635.

Geserick C. and Blasco M. A. (2006). Novel roles for telomerase in aging. *Mech Ageing Dev*. 127 (6): 579–583.

Giorgio M., Trillinei M., Migliaccio E., Pelicci P. G. (2007). Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator in ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Bio*. 8: 722-728.

Golubovsky M. D., Konev A. Y., Walter M. F., Biessmann H., Mason J. M. (2001) Terminal retrotransposons activate a subtelomeric white transgene at the 2L telomere in *Drosophila*. *Genetics*. 158: 1111–1123.

Gomes N. M. V., Shay J. W., Wright W. E. (2011) Telomere biology in Metazoa. *Fed Eur Biochem Soc*. 584: 3741-3751.

Griffith J. D., Comeau L., Rosenfield S., Stansel R. M., Bianchi A., Moss H., de Lange T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*. 97: 503–514.

Halliwell B. and Gutteridge J. M. C. (1989). *Free radicals in Biology and Medicine*. Oxford. Clarendon Press.

Halliwell B. and Gutteridge J. M. (1999) *Free radicals in Biology and Medicine*, 3rd edn. Oxford University Press.

Hayflick L., Moorhead P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 25: 585-621.

Hemann M. T. and Greider C. W. (2000). Wild-derived inbred mouse strains have short telomeres. *Nucleic Acids Res*. 28: 4474-4478.

Houben J. M. J., Moonen H. J. J., van Schooten F. J., Hageman G. J. (2008). Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress? *Free Radic Biol and Med*. 44(3): 235-246.

Halliwell, B. (1999). The chemistry of free radicals and related 'reactive species'; Peroxynitrite. *Free rad in biol and med*. 95-100.

Chan S. W-L. and Blackburn E. H. (2002). New ways not to make ends meet: telomerase, DNA damage proteins and heterochromatin. *Oncogene*. 21: 553-563.

Chen J-M., Cooper D. N., Chuzhanova N., Férec C., Patrinos G. P. (2007). Gene conversion: mechanisms, evolution and human disease *Nat Rev Gen*. 8: 762–775.

Chong L., van Steensel B., Broccoli D., Erdjument Bromage H., Hanish J., Tempst P., de Lange T. (1995). A human telomeric protein. *Science*. 270: 1663–1667.

Ikeda R., Kokubu C., Yusa K., Keng V. W., Horie K., Takeda J. (2007). Sleeping beauty transposase has an affinity for heterochromatin conformation. *Mol Cell Biol*. 27(5): 1665-1676.

Janero D. R. (1990). Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med*. 9: 515-540.

Kano H., Godoy I., Courtney C., Vetter M. R., Gerton G. L., Ostertag E. M., Kazazian H. H., Jr. (2009). L1 retrotransposition occurs mainly in embryogenesis and creates somatic mosaicism. *Genes Dev*. 23(11): 1303-1312.

Kawanishi S. and Oikawa S. (2004). Mechanism of telomere shortening by oxidative stress. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1019(1): 278-284.

Kazazian H. H. Jr. (2004). Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science*. 303: 1626–1632.

Kidwell M. G. and Lisch D. R. (2001). Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. *Evolution*. 55(1): 1-24.

Kidwell M. G., The Wilhelmine E. Key (1991). Invitational Lecture. (1994). The evolutionary history of the P family of transposable elements. *J Hered*. 85(5): 339-346.

Kim N. W., Piatyszek M. A., Prowse K. R., Harley C. B., West M. D., Ho P. L., Coviello G. M., Wright W. E., Weinrich S. L., Shay J. W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 266: 2011-2015.

Kim S. H., Kaminker P., Campisi J. (1999). TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat Genet*. 23: 405–412.

Kim S. H., Kaminker P., Campisi J. (2002) telomeres, aging and cancer: in search of a happy ending. *Oncogene*. 21: 503-511.

Korandová M., Krůček T., Vrbová K., Frydrychová R. (2014). Distribution of TTAGG-specific telomerase activity in insects. *Chrom Res*. 22: 495-503.

Krůček T., Korandová M., Szakosová K., Šerý M., Frydrychová R. (2015). Effect of low doses of herbicide paraquat on antioxidant defense in *Drosophila*. *Archives of Insect Biochem and Physiol*. 88: 235-248.

Lander E. S., Linton L. M., Birren B., Nusbaum C., Zody M. C., Baldwin J., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 409: 860–921.

Levis R. W., Ganesan R., Houtchens K., Tolar L. A., Sheen F. M. (1993.) Transposons in place of telomeric repeats at a *Drosophila* telomere. *Cell*. 75: 1083-1093

Levitt A. and Emmons S. W. (1989). The Tc2 transposon in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci*. 86(9): 3232-3236.

Li B., Oestreich S., de Lange T. (2000). Identification of human Rap1: implications for telomere evolution. *Cell*. 101: 471–483.

Liu K., Schoonmaker M. M., Levine B. L., June C. H., Hodes R. J., Weng N. P. (1999). Constitutive and regulated expression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci*. 96: 5147-5152.

Martínez-Guitarte J. L., Díez J. L., Morcillo G. (2008). Transcription and activation under environmental stress of the complex telomeric repeats of *Chironomus thummi*. *Chrom Res*. 16: 1085–1096.

Mason J. M., Frydrychová R. Č., Biessmann H. (2008). *Drosophila* telomeres: an exception providing new insights. *Bioessays*. 30(1): 25-37.

Mason J. M., Reddy H. M., Čapková Frydrychová R. (2011) Telomere maintenance in organisms without telomerase. *DNA Replication Curr Adv book* edited by Seligmann chapter 15 H. DOI: 10.5772/19348

Mason J. M., Randall T. A., Čapková Frydrychová R. (2016). Telomerase lost? *Chromosoma*. 125: 65–73.

Mattson M. P. (2008). Hormesis defined. *Ageing Res Rev*. 7: 1-7.

McClintock B. (1984). The significance of responses of the genome to challenge. *Science*. 226: 792–801.

McLaughlin R. J., Jr., Janet M. Young J. M., Yang L., Neme R., Wichman H. A., Malik H. S. (2014). Positive Selection and Multiple Losses of the LINE-1-Derived L1TD1 Gene in Mammals Suggest a Dual Role in Genome Defense and Pluripotency. *PLoS Genet*. 10(9): e1004531.

Mefford H. C., Trask B. J. (2002). The complex structure and dynamic evolution of human subtelomeres. *Nat Rev Genet*. 3(2): 91-102.

Melnikova L. and Georgiev P. (2002). Enhancer of terminal gene conversion, a new mutation in *Drosophila melanogaster* that induces telomere elongation by gene conversion. *Genetics*. 162: 1301–1312.

Menezes R. S., Bardella V. B. Cabral-de-Mello D. C., Lucena D. A., Almeida E. A. (2017). Are the TTAGG and TTAGGG telomeric repeats phylogenetically conserved in aculeate Hymenoptera?. *The Science of Nature*. 104(9-10): 85.

Meyne J., Ratliff R. L., Moyzis R. K. (1989). Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci*. 86: 7049–7053.

Milton V. J. and Sweeney S. T. (2012). Oxidative stress in synapse development and function. *Develop neurobiol*. 72(1): 100-110.

Moran J. V., de Berardinis R. J., Kazazian H. H., Jr. (1999). Exon shuffling by L1 retrotransposition. *Science*. 283(5407): 1530-1534.

Mourier T., Nielsen L. P., Hansen A. J., Willerslev E. (2014). Transposable elements in cancer as a by-product of stress-induced evolvability. *Front in Genet*. 5

Moyzis R. K., Buckingham J. M., Cram L. S., Dani M., Deaven L. L., Jones M. D., Meyne J., Ratliff R. L., and Wu J. R. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci*. 85: 6622-6626.

Mravinac B., Meštrović N., Cavrak V. V., Plohl M. (2011). TCAGG, an alternative telomeric sequence in insects. *Chromosoma*. 120: 367–376.

Muñoz-López M. and García-Pérez J. L. (2010). DNA Transposons: Nature and Applications in Genomics. *Current Genomics*. 11: 115-128.

Obbard D. J., Gordon K. H., Buck A. H., Jiggins F. M. (2009). The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 364(1513): 99-115.

O'Connor M. S., Safari A., Xin H., Liu D., Songyang Z. (2006). A critical role for TPP1 and TIN2 interaction in high-order telomeric complex assembly. *Proc Natl Acad Sci*. 103: 11874–11879.

Oikawa S. and Kawanishi S. (1999). Site-specific DNA damage at GGG sequence by oxidative stress may accelerate telomere shortening. *FEBS letters*. 453(3): 365-368.

Oikawa S., Tada-Oikawa S., Kawanishi S. (2001). Site-specific DNA damage at the GGG sequence by UV involves acceleration of telomere shortening. *Biochemistry*. 40 (15): 4763 – 4768.

Pardue M-L., DeBaryshe P. G. (2003). Retrotransposons provide an evolutionarily robust non-telomerase mechanism to maintain telomeres. *Annu Rev of Genet*. 37: 485–511.

Pardue M-L., Rashkova S., Casacuberta E., DeBaryshe P. G., George J. A., Traverse K. L. (2005). Two retrotransposons maintain telomeres in *Drosophila*. *Chrom Res*. 13(5): 443–453.

Pimpinelli S., Berloco M., Fanti L., Dimitri P., Bonaccorsi S., Marchetti E., Caizzi R., Caggese C., Gatti M. (1995). Transposable elements are stable structural components of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Proc Natl Acad Sci*. 92(9): 3804-3808.

Pluta A. F., Zakian V. A. (1989). Recombination occurs during telomere formation in yeast. *Nat*. 337: 429-433.

Prak E. T., Kazazian H. H., Jr. (2000). Mobile elements and the human genome. *Nat Rev Genet*. 1(2): 134-144.

Proctor C. J. and Kirkwood T. B. L. (2002). Modelling telomere shortening and the role of oxidative stress. *Mech Ageing Dev*. 123: 351–363.

Racek J. and Holeček V. (1999). Enzymy a volné radikály. *Chem. Listy* 93: 11A – 780.

Raffa G. D., Ciapponi L., Giovanni Cenci G., Gatti M. (2011). Terminin: A protein complex that mediates epigenetic maintenance of *Drosophila* telomeres. *Nucleus*. 2(5): 383-391.

Romano G. H., Harari Y., Yehuda T., Podhorzer A., Rubinstein L., Shamir R., Gottlieb A., Silberberg Y., Pe'er D., Ruppin E., Sharan R., Kupiec M. (2013). Environmental Stresses Disrupt Telomere Length Homeostasis. *PLoS Genet*. 9(9): e1003721.

SanMiguel P., Tikhonov A., Jin Y. K., Motchoulskaia N., Zakharov D., Melake-Berhan A., Springer P. S., Edwards K. J., Lee M., Avramova Z., Bennetzen J. L. (1996). Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science*. 274: 765–768.

Saretzki G., Walter, T., Atkinson S., Passos J. F., Bareth, B., Keith W. N., Stewart R., Hoare S., Stojkovic M., Armstrong L., von Zglinicki T., Lako M., (2008). Downregulation of multiple stress defence mechanisms during differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 26: 455–465.

Sasaki T. and Fujiwara H. (2000). Detection and distribution patterns of telomerase activity in insects. *Eur J Biochem*. 267: 3025-3031.

Sayah D. M., Sokolskaja E., Berthoux L., Luban J. (2004). Cyclophilin A retrotransposition into TRIM5 explains owl monkey resistance to HIV-1. *Nature*. 430(6999): 569-573.

Seehafer S. S. and Pearce D. A. (2006). You say lipofuscin, we say ceroid: Defining autofluorescent storage material. *Neurobiol Aging*. 27: 576-588.

Shpiz S., Kwon D., Uneva A., Kim M., Klenov M., Rozovsky Y., Georgiev P., Savitsky M., Kalmykova A. (2007). Characterization of *Drosophila* telomeric retroelement *TAHRE*: transcription, transpositions, and RNAi-based regulation of expression. *Mol Biol and Evol*. 24: 2535–2545.

Schumann G. G. (2007). APOBEC3 proteins: major players in intracellular defence against LINE-1-mediated retrotransposition. *Biochem Soc Trans*. 35(Pt 3): 637-642.

Sies, H. (1991). Role of reactive oxygen species in biological processes. *Journal of Molecular Medicine*, 69(21): 965-968.

- Sies H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*. 82(2): 291-295.
- Smogorzewska A., de Lange T. (2004). Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu Rev Biochem*. 73: 177–208.
- Stansel R. M., de Lange T., Griffith J. D. (2001). T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *EMBO J*. 20: 5532-5540.
- Stetson D. B., Ko J. S., Heidmann T., Medzhitov R. (2008). Tbx1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity. *Cell*. 134(4): 587-598.
- Surai P. F. (2003). Přírodní antioxidanty a jejich role ve stresových podmínkách. Sborník využitých přírodních zdrojů-Aplikace v krmivářském průmyslu. Alltech. 31-40.
- Takahashi H. and Fujiwara H. (1999). Transcription analysis of the telomeric repeat-specific retrotransposons TRAS1 and SART1 of the silkworm *Bombyx mori*. *Nucleic Acids Res*. 27: 2015–2021.
- Takai H., Smogorzewska A., de Lange T. (2003). DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol* 13: 1549-1556.
- Terman A., Brunk U. T. (2006). Oxidative stress, accumulation of biological 'garbage', and aging. *Antioxid Redox Signal*. 8: 197-204.
- Traut W., Szczepanowski M., Vítková M., Opitz C., Marec F., Zrzavý J. (2007). The telomere repeat motif of basal Metazoa. *Chromosome Res*. 15: 371–382.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T., Mazur M., Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 39(1): 44-84.
- von Zglinicki T. (2002). Oxidative stress shortens telomeres. *Trends in biochemical sciences*. 27(7): 339-344.
- von Zglinicki T., Pilger R., Sitte, N. (2000). Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. *Free Radical Biology and Medicine*. 28(1): 64-74.
- Wang F., Podell E. R., Zaug A. J., Yang Y., Baciu P., Cech T. R., Lei M. (2007). The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature*. 445: 506-510.

Wang S-S., Zakian V. A. (1990). Telomere-telomere recombination provides an express pathway for telomere elongation. *Nat.* 345: 456-458.

Yoder J. A., Walsh C. P., Bestor T. H. (1997). Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.* 13(8): 335-340.

Yui J., Chiu C. P., Lansdorp P. M. (1998). Telomerase activity in candidate stem cells from foetal liver and adult bone marrow. *Blood.* 91: 3255-3262.

7. Publikace a Rukopis

7.1. Publikace I

Korandová M., **Krůček T.**, Vrbová K., Čapková Frydrychová R. (2014). Distribution of TTAGG-specific telomerase activity in insects. *Chromosome Research*. 22: 495-503.

Abstract

In most eukaryotes, telomeres consist of tandem arrays of a short repetitive DNA sequence. Insect telomeres are generally constituted by a (TTAGG)_n repeat motif. Usually, telomeres are maintained by telomerase, a specialized reverse transcriptase that adds this sequence to chromosome ends. We examined telomerase activity in 15 species across Insecta. Telomerase activity was revealed in Isoptera, Blattaria, Lepidoptera, Hymenoptera, Trichoptera, Coleoptera, and Sternorrhyncha. In contrast, we were not able to detect telomerase activity in Orthoptera, Zygentoma, and Phasmida. Because we found telomerase activity in phylogenetically distant species, we conclude that a distribution pattern of (TTAGG)_n sequence in Insecta is generally consistent with that of telomerase activity. Thus, the TTAGG-telomerase system is functional across the Insecta. Using real-time quantitative telomeric repeat amplification protocol (RTQ-TRAP) system, we quantified telomerase activity in different developmental stages and different tissues of a cockroach, *Periplaneta americana*. We show that telomerase is upregulated in young instars and gradually declines during development. In adults, it is most active in testes and ovaries. Thus, the telomerase activity of hemimetabolous insects seems to be associated with cell proliferation and organismal development.

Následující stránky jsou chráněny autorskými právy.
Plná verze disertační práce je archivovaná v Akademické knihovně Jihočeské Univerzity.

7.2. Publikace II

Krůček T., Korandová M., Szakosová K., Čapková Frydrychová R. (2015). Effect of low doses of herbicide paraquat on antioxidant defense in *Drosophila*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 88: 235-248.

Abstract

Despite a high toxicity, paraquat is one of the most widely used herbicides in the world. Our study evaluated the effect of paraquat exposure on antioxidant response and locomotion activity in *Drosophila melanogaster*. We examined the enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase, and the transcript levels of both enzymes. Flies were exposed to a wide range of paraquat concentrations (0.25 μ M to 25 mM) for 12 h. SOD, at both transcript and enzymatic levels, revealed a biphasic dose–response curve with the peak at 2.5 μ M paraquat. A similar dose–response curve was observed at transcript levels of catalase. Males revealed higher susceptibility to paraquat exposure, displaying higher lethality, increased levels of SOD activity, and increased peroxide levels than in females. We found that the exposure of females to 2.5 μ M paraquat leads to an increase in locomotion activity. Because susceptibility to paraquat was enhanced by mating, the study supports the hypothesis of elevation of stress sensitivity as a physiological cost of reproduction .

Následující stránky jsou chráněny autorskými právy.
Plná verze disertační práce je archivovaná v Akademické knihovně Jihočeské Univerzity.

7.3. Rukopis

Korandová M., **Krůček T.**, Szakosová K., Kodrík D., Kühnlein R. P., Tomášková J., Čapková Frydrychová R. Chronic low-dose pro-oxidant treatment stimulates transcriptional activity of telomeric retroelements and increases telomere length in *Drosophila*. Rukopis (odesláno do časopisu).

Abstract

It has been proposed that oxidative stress, elicited by high levels of reactive oxygen species, accelerates telomere shortening by erosion of telomeric DNA repeats. While most eukaryotes counteract telomere shortening by telomerase-driven addition of these repeats, telomeric loss in *Drosophila* is compensated by retrotransposition of the telomeric retroelements HeT-A, TART and TAHRE to chromosome ends. In this study we tested the effect of chronic exposure of flies to non-/sub-lethal doses of paraquat, which is a redox cycling compound widely used to induce oxidative stress in various experimental paradigms including telomere length analyses. Indeed, chronic paraquat exposure for five generations resulted in elevated transcriptional activity of both telomeric and non-telomeric transposable elements, and extended telomeric length in the tested fly lines. We propose that low oxidative stress leads to increased telomere length within *Drosophila* populations. For a mechanistic understanding of the observed phenomenon we discuss two scenarios: adaption, acting through a direct stimulation of telomere extension, or positive selection favoring individuals with longer telomeres within the populati

Následující stránky jsou chráněny autorskými právy.
Plná verze disertační práce je archivovaná v Akademické knihovně Jihočeské Univerzity.

8. Přílohy

Tabulka 1. PCR primers used in this study.

Primer	Sequence (5'-3')
<i>w1F</i>	5'-TTGGAAACTCGGATCTTGG-3'
<i>w1R</i>	5'-CGTACCTCTCATGGTTCCGT-3'
<i>w2F</i>	5'-CGAGCTTCACTCAACCAACA-3'
<i>w2R</i>	5'-TGAATAATTGCGCCTCCTTC-3'
<i>HeT-A (forward)</i>	5'-ATTGTCTTCTCCTCCGTCCACC-3'
<i>HeT-A (reverse)</i>	5'-TTCTCTATGCTATTGTGCGCTGTGC-3'
<i>Tart (forward)</i>	5'-TAGAACGGACGAGGACAAAG-3'
<i>Tart (reverse)</i>	5'-CCTTCATCTAGCAGTCTCCA-3'
<i>TAHRE (forward)</i>	5'-TCAAAGGCTTCCACACCTAC-3'
<i>TAHRE (reverse)</i>	5'-AGGGGATAAGTGCGATGGGT-3'
<i>Jockey (forward)</i>	5'-ATATGACCGGGTTCGCTTTG-3'
<i>Jockey (reverse)</i>	5'-GTTGTGGAGGTTTGAGTGTG-3'
<i>RpL32 (forward)</i>	5'-GGACAGTATCTGATGCCCAAC-3'
<i>RpL32 (reverse)</i>	5'-ATCTCGCCGCAGTAAACGC-3'
<i>white (forward)</i>	5'-CCTCTTTATCGGCTCCCTAACG-3'
<i>white (reverse)</i>	5'-TCGTGTGCTGACATTTGCTGAG-3'
<i>actin 42A (forward)</i>	5'-AAGAGGTTGCAGCTTTAGTGG-3'
<i>actin 42A (reverse)</i>	5'-GCCGACATAAGAGTCCTTTG - 3'

Tabulka 2. Statistical analysis of *HeT-A* copy numbers in generation 1

	Paraquat concentration						
	0 nM	10 ⁻¹ mM	10 ⁻² mM	10 ⁻³ mM	10 ⁻⁴ mM	10 ⁻⁵ mM	10 ⁻⁶ mM
<i>HeT-A</i> copy number	92,358	98,4698	97,6041	120,6866	106,7299	106,8459	110,9534
	89,08689	90,68517	92,9121	105,62	112,1741	92,59065	95,19373
	72,39632	85,7934	76,25683	103,0924	76,78724	98,55073	63,02248
	93,8954	112,0239	76,1849	101,9417	113,6495	101,4602	89,43668
	88,47466	99,7285	116,7918	107,0985	114,3882	78,94602	64,34672
	75,64453		84,61225	103,2318	111,2867	85,1839	110,9534

One-way analysis of variance	
P value	0,0655
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
Number of groups	7
F	2,138
R squared	0,2075

Bartlett's test for equal variances	
Bartlett's statistic (corrected)	30,53
P value	P<0.0001
P value summary	***
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	5083	6	847,2
Residual (within columns)	19410	49	396,2
Total	24500	55	

Dunnett's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
0 mM vs 10⁻¹ mM	4,193	0,4213	P > 0.05	-22.30 to 30.69
0 mM vs 10⁻² mM	-5,418	0,5444	P > 0.05	-31.91 to 21.08
0 mM vs 10⁻³ mM	-21,64	2,174	P > 0.05	-48.13 to 4.857
0 mM vs 10⁻⁴ mM	-20,53	2,063	P > 0.05	-47.02 to 5.966
0 mM vs 10⁻⁵ mM	-8,620	0,8662	P > 0.05	-35.11 to 17.87
0 mM vs 10⁻⁶ mM	0,7187	0,07222	P > 0.05	-25.77 to 27.21

Tabulka 3. Statistical analysis of *HeT-A* copy numbers in generation 2

	Paraquat concentration						
	0 nM	10 ⁻¹ mM	10 ⁻² mM	10 ⁻³ mM	10 ⁻⁴ mM	10 ⁻⁵ mM	10 ⁻⁶ mM
<i>HeT-A</i> copy number	80,46874	84,02779	72,64516	90,05875	72,39382	102,3803	65,92686
	91,45894	75,20698	107,0985	91,31593	106,3587	102,0261	101,3214
	100,2454	90,05875	105,6241	104,5315	83,15866	97,86999	109,3489
	93,98306	78,21699	101,6731	137,453	150,9362	100,9708	106,3587
	84,69875	89,04475	73,15044	73,15044	101,3214	79,77112	84,02779
	91,74247	80,05175	92,27031	108,8021	99,23621	79,2201	80,88468
	82,43648	72,24599	81,44728			52,44723	49,6181

One-way analysis of variance	
P value	0,2201
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
Number of groups	7
F	1,436
R squared	0,1496

Bartlett's test for equal variances	
Bartlett's statistic (corrected)	18,68
P value	0,0047
P value summary	**
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	2911	6	485,1
Residual (within columns)	16550	49	337,8
Total	19460	55	

Dunnett's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
Column A vs 10 ⁻¹ mM	8,026	0,8734	P > 0.05	-16.44 to 32.49
Column A vs 10 ⁻² mM	-1,268	0,1380	P > 0.05	-25.73 to 23.19
Column A vs 10 ⁻³ mM	-11,59	1,262	P > 0.05	-36.06 to 12.87
Column A vs 10 ⁻⁴ mM	-12,94	1,409	P > 0.05	-37.40 to 11.52
Column A vs 10 ⁻⁵ mM	1,478	0,1609	P > 0.05	-22.98 to 25.94
Column A vs 10 ⁻⁶ mM	3,935	0,4283	P > 0.05	-20.53 to 28.40

Tabulka 4. Statistical analysis of *HeT-A* copy numbers in generation 3

	Paraquat concentration						
	0 nM	10 ⁻¹ mM	10 ⁻² mM	10 ⁻³ mM	10 ⁻⁴ mM	10 ⁻⁵ mM	10 ⁻⁶ mM
<i>HeT-A</i> copy number	84,3568	110,8753	64,57011	103,4503	112,4231	65,01923	55,63013
	85,28328	85,49657	108,2178	134,1585	117,1972	85,20078	90,37141
	105,0642	86,69006	113,5981	120,4921	144,2867	112,4231	125,6089
	90,63444	65,24496	111,2603	180,7428	110,7428	107,8434	128,2482
	88,86426	115,985	89,43668	110,8753	110,8753	55,24587	76,52158
	94,36749	111,6465	118,4221	125,1743	125,1743	83,73708	80,04807
	84,3568	110,8753	64,57011	103,4503	112,4231	65,01923	55,63013

One-way analysis of variance	
P value	0,0009
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	7
F	4,598
R squared	0,3602

Bartlett's test for equal variances	
Bartlett's statistic (corrected)	12,84
P value	0,0456
P value summary	*
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	12470	6	2078
Residual (within columns)	22150	49	451,9
Total	34610	55	

Dunnett's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
0 mM vs 10 ⁻¹ mM	-8,121	0,7640	P > 0.05	-36.42 to 20.17
0 mM vs 10 ⁻² mM	-9,489	0,8927	P > 0.05	-37.78 to 18.81
0 mM vs 10 ⁻³ mM	-37,72	3,549	P < 0.01	-66.02 to -9.425
0 mM vs 10 ⁻⁴ mM	-28,69	2,699	P < 0.05	-56.98 to -0.3924
0 mM vs 10 ⁻⁵ mM	6,517	0,6131	P > 0.05	-21.78 to 34.81
0 mM vs 10 ⁻⁶ mM	-1,310	0,1232	P > 0.05	-29.61 to 26.99

Tabulka 5. Statistical analysis of *HeT-A* copy numbers in generation 4

	Paraquat concentration						
	0 nM	10 ⁻¹ mM	10 ⁻² mM	10 ⁻³ mM	10 ⁻⁴ mM	10 ⁻⁵ mM	10 ⁻⁶ mM
<i>HeT-A</i> copy number	91,13921	122,1741	97,53139	136,5036	138,8896	123,8796	132,7709
	87,1241	110,4917	118,0124	132,7709	118,8332	124,7412	112,4231
	89,44851	98,20977	102,0261	82,87096	120,2603	105,6241	91,63296
	93,59323	106,3587	99,58073	146,8088	115,5837	110,4917	124,7412
	95,65385	112,4231	67,31213	136,0313	122,5983	65,92686	79,77112
	92,98754	95,19373	117,6041	117,1972	126,4826	104,8945	80,32597
	87,75674	67,78033	97,53139	88,81889	127,3623	66,84718	87,59609
	91,13921	122,1741		136,5036	138,8896	123,8796	132,7709

One-way analysis of variance	
P value	0,0082
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	7
F	3,310
R squared	0,2884

Bartlett's test for equal variances	
Bartlett's statistic (corrected)	26,42
P value	0,0002
P value summary	***
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	6871	6	1145
Residual (within columns)	16950	49	346,0
Total	23820	55	

Dunnett's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
0 mM vs 10 ⁻¹ mM	-10,70	1,151	P > 0.05	-35.46 to 14.05
0 mM vs 10 ⁻² mM	-9,244	0,9940	P > 0.05	-34.00 to 15.51
0 mM vs 10 ⁻³ mM	-29,04	3,123	P < 0.05	-53.80 to -4.286
0 mM vs 10 ⁻⁴ mM	-33,19	3,568	P < 0.01	-57.94 to -8.430
0 mM vs 10 ⁻⁵ mM	-9,243	0,9939	P > 0.05	-34.00 to 15.51
0 mM vs 10 ⁻⁶ mM	-10,22	1,099	P > 0.05	-34.98 to 14.53

Tabulka 6. Statistical analysis of *HeT-A* copy numbers in generation 5

	Paraquat concentration						
	0 nM	10 ⁻¹ mM	10 ⁻² mM	10 ⁻³ mM	10 ⁻⁴ mM	10 ⁻⁵ mM	10 ⁻⁶ mM
<i>HeT-A</i> copy number	90,86325	105,9908	88,5116	128,6934	173,982	125,1743	104,5315
	104,9363	145,7947	145,2903	172,1825	166,8947	155,7183	169,2245
	97,42974	105,2586	142,3003	112,4231	166,3173	135,5607	130,4899
	82,64679	108,5936	115,985	121,3302	137,9302	120,4921	60,8757
	90,65634	138,8896	122,5983	104,5315	144,2867	115,207	93,23467
	94,65333	98,20977	105,6241	141,808	157,3458	127,8929	92,9121
	89,98763	105,9908	119,6598	118,0124	158,9903	101,3972	97,86999
	90,86325		88,5116	128,6934	173,982	125,1743	104,5315

One-way analysis of variance	
P value	P<0.0001
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	7
F	7,641
R squared	0,4834

Bartlett's test for equal variances	
Bartlett's statistic (corrected)	16,25
P value	0,0125
P value summary	*
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	19510	6	3252
Residual (within columns)	20850	49	425,6
Total	40360	55	

Dunnett's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
0 mM vs 10 ⁻¹ mM	-24,10	2,336	P > 0.05	-51.56 to 3.359
0 mM vs 10 ⁻² mM	-26,97	2,615	P > 0.05	-54.43 to 0.4864
0 mM vs 10 ⁻³ mM	-35,40	3,432	P < 0.01	-62.86 to -7.944
0 mM vs 10 ⁻⁴ mM	-64,94	6,296	P < 0.01	-92.40 to -37.48
0 mM vs 10 ⁻⁵ mM	-32,90	3,189	P < 0.05	-60.35 to -5.438
0 mM vs 10 ⁻⁶ mM	-14,00	1,357	P > 0.05	-41.45 to 13.46

Tabulka 7. Statistical analysis of *TART* copy numbers in generation 1

	Paraquat concentration				
	0 nM	10 ⁻² mM	10 ⁻³ mM	10 ⁻⁴ mM	10 ⁻⁶ mM
<i>TART</i> copy number	112,49	97,99	61,98	111,68	35,21
	103,42	137,45	131,42	101,84	108,35
	81,56	75,8	89,58	80,6	100,2
	105,43	68,3302	103,42	97,89	91,59
	93,354	103,42	103,42	101,29	87,19

One-way analysis of variance	
P value	0,8170
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
Number of groups	5
F	0,3846
R squared	0,07142

Bartlett's test for equal variances	
Bartlett's statistic (corrected)	5,139
P value	0,2733
P value summary	ns
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	760,5	4	190,1
Residual (within columns)	9887	20	494,4
Total	10650	24	

Dunnett's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
0 mM vs 10-1 mM	2,653	0,1886	P > 0.05	-34.61 to 39.92
0 mM vs 10-3 mM	1,287	0,09151	P > 0.05	-35.98 to 38.55
0 mM vs 10-4 mM	0,5908	0,04201	P > 0.05	-36.67 to 37.86
0 mM vs 10-6 mM	14,74	1,048	P > 0.05	-22.52 to 52.01

Tabulka 8. Statistical analysis of *TART* copy numbers in generation 5

	Paraquat concentration				
	0 nM	10 ⁻² mM	10 ⁻³ mM	10 ⁻⁴ mM	10 ⁻⁶ mM
<i>TART</i> copy number	89,73	86,36	97,51	100,61	93,89
	106,46	104,11	121,56	119,93	97,79
	87,89	142,6	145,03	129,34	102,63
	101,1203	101,92	103,42	137,79	132,63
	75,258	103,42	103,42	138,19	101,43

One-way analysis of variance	
P value	0,0719
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
Number of groups	5
F	2,540
R squared	0,3368

Bartlett's test for equal variances	
Bartlett's statistic (corrected)	1,257
P value	0,8686
P value summary	ns
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	2936	4	733,9
Residual (within columns)	5780	20	289,0
Total	8716	24	

Dunnett's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
0 mM vs 10⁻¹ mM	-15,59	1,450	P > 0.05	-44.08 to 12.90
0 mM vs 10⁻³ mM	-22,10	2,055	P > 0.05	-50.59 to 6.396
0 mM vs 10⁻⁴ mM	-33,08	3,077	P < 0.05	-61.57 to -4.588
0 mM vs 10⁻⁶ mM	-13,58	1,263	P > 0.05	-42.07 to 14.91

Tabulka 9. Statistical analysis of *TAHRE* copy numbers in generation 1

	Paraquat concentration				
	0 nM	10 ⁻² mM	10 ⁻³ mM	10 ⁻⁴ mM	10 ⁻⁶ mM
TAHRE copy number	98,49	154,3	92,98	99,26	71,9
	112,08	88,35	95,7	81,31	102,14
	90,89	75,8	88,96	81,73	111,18
	98,02	81,35	97,7	71,41	103,34
	91,18	77,9	88,96	69,78	115,28

One-way analysis of variance	
P value	0,4149
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
Number of groups	5
F	1,032
R squared	0,1711

Bartlett's test for equal variances	
Bartlett's statistic (corrected)	14,32
P value	0,0064
P value summary	**
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	1372	4	342,9
Residual (within columns)	6643	20	332,2
Total	8015	24	

Dunnett's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
0 mM vs 10⁻¹ mM	5,392	0,4678	P > 0.05	-25.15 to 35.94
0 mM vs 10⁻³ mM	8,072	0,7003	P > 0.05	-22.47 to 38.62
0 mM vs 10⁻⁴ mM	20,23	1,755	P > 0.05	-10.31 to 50.78
0 mM vs 10⁻⁶ mM	0,1640	0,01423	P > 0.05	-30.38 to 30.71

Tabulka 10. Statistical analysis of *TAHRE* copy numbers in generation 5

	Paraquat concentration				
	0 nM	10 ⁻² mM	10 ⁻³ mM	10 ⁻⁴ mM	10 ⁻⁶ mM
TAHRE copy number	89,73	86,36	97,51	115,61	93,89
	106,46	104,11	121,56	119,93	97,79
	87,89	142,6	145,03	129,34	102,63
	101,1203	101,92	103,42	137,79	132,63
	75,258	103,42	105,58	138,19	101,43

One-way analysis of variance	
P value	0,0318
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	5
F	3,287
R squared	0,3966

Bartlett's test for equal variances	
Bartlett's statistic (corrected)	12,29
P value	0,0153
P value summary	*
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	8720	4	2180
Residual (within columns)	13270	20	663,3
Total	21990	24	

Dunnett's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
0 mM vs 10 ⁻¹ mM	-19,21	1,179	P > 0.05	-62.37 to 23.96
0 mM vs 10 ⁻³ mM	-38,94	2,390	P > 0.05	-82.10 to 4.227
0 mM vs 10 ⁻⁴ mM	-54,76	3,362	P < 0.05	-97.93 to -11.60
0 mM vs 10 ⁻⁶ mM	-20,56	1,262	P > 0.05	-63.73 to 22.60

Tabulka 11. Statistical analysis of *HeT-A* transcript in Oregon R

Generation 1:

	Paraquat concentration					
	0 nM	10 ⁻² mM	10 ⁻³ mM	10 ⁻⁴ mM	10 ⁻⁵ mM	10 ⁻⁶ mM
<i>HeT-A</i> copy number	0,003488	0,014665	0,009484	0,001925	0,024598	0,016323
	0,005671	0,00326	0,003594	0,012632	0,031864	0,015897
	0,0049	0,0198	0,012296	0,00566	0,007835	0,017385
	0,009645	0,005906	0,03117	0,0257	0,022902	0,023337
	0,003488	0,014665	0,009484	0,001925	0,024598	0,016323

One-way analysis of variance	
P value	0,1775
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
Number of groups	7
P value	1,672
P value summary	0,3232

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	0,001032	6	0,0001721
Residual (within columns)	0,0003687	21	0,00001756
Total	0,001401	27	

Dunnett's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
0 mM vs 10 ⁻¹ mM	-0,004982	0,8573	P > 0.05	-0.02119 to 0.01123
0 mM vs 10 ⁻² mM	-0,008210	1,413	P > 0.05	-0.02442 to 0.008002
0 mM vs 10 ⁻³ mM	-0,005553	0,9557	P > 0.05	-0.02177 to 0.01066
0 mM vs 10 ⁻⁴ mM	-0,01587	2,732	P > 0.05	-0.03209 to 0.0003384
0 mM vs 10 ⁻⁵ mM	-0,01231	2,118	P > 0.05	-0.02852 to 0.003903

Generati
on 5:

	Paraquat concentration					
	0 nM	10 ⁻² mM	10 ⁻³ mM	10 ⁻⁴ mM	10 ⁻⁵ mM	10 ⁻⁶ mM
<i>HeT-A</i> copy number	0,005279	0,013669	0,009344	0,019246	0,024598	0,015323
	0,005668	0,01325	0,006584	0,019632	0,021864	0,012887
	0,005919	0,009801	0,010296	0,02566	0,026825	0,016375
	0,008649	0,006906	0,021172	0,0247	0,022902	0,022338
	0,005279	0,013669	0,009344	0,019246	0,024598	0,015323

One-way analysis of variance	
P value	P<0.0001
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	7
P value	P<0.0001
P value summary	***

Bartlett's test for equal variances	
Treatment (between columns)	0,001032
Residual (within columns)	0,0003687
Total	0,001401
Treatment (between columns)	0,001032

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	0,001032	6	0,0001721
Residual (within columns)	0,0003687	21	0,00001756
Total	0,001401	27	

Dunnett's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
0 mM vs 10-1 mM	-0,004528	1,528	P > 0.05	-0.01279 to 0.003738
0 mM vs 10-2 mM	-0,005471	1,847	P > 0.05	-0.01374 to 0.002795
0 mM vs 10-3 mM	-0,01593	5,377	P < 0.01	-0.02420 to -0.007665
0 mM vs 10-4 mM	-0,01767	5,964	P < 0.01	-0.02593 to -0.009403
0 mM vs 10-5 mM	-0,01035	3,494	P < 0.05	-0.01862 to -0.002087

Tabulka 12. Statistical analysis of *HeT-A* transcript in y^lw^{67c2} ; Hetom line

	Paraquat concentration					
	0 nM	10 ⁻² mM	10 ⁻³ mM	10 ⁻⁴ mM	10 ⁻⁵ mM	10 ⁻⁶ mM
<i>HeT-A</i> copy number	0,000108	0,000228	0,000495	0,000833	0,000354	0,000349
	0,000145	0,00015	0,000323	0,000413	0,000143	0,000522
	0,000154	0,000126	0,0001	0,000512	0,00021	0,00015
	0,000254	0,00027	0,00058	0,00061	0,00028	0,000251
	0,000108	0,000228	0,000495	0,000833	0,000354	0,000349

One-way analysis of variance	
P value	0,0001
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	6
F	8,403
R squared	0,6365

Bartlett's test for equal variances	
Bartlett's statistic (corrected)	10,35
P value	0,0659
P value summary	ns
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	0,000005037	5	0,000001007
Residual (within columns)	0,000002877	24	0,0000001199
Total	0,000007914	29	

Dunnett's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
0 mM vs 10 ⁻¹ mM	-0,0003898	1,780	P > 0.05	-0.0009811 to 0.0002014
0 mM vs 10 ⁻³ mM	-0,001087	4,963	P < 0.01	-0.001678 to -0.0004956
0 mM vs 10 ⁻⁴ mM	-0,0008984	4,103	P < 0.01	-0.001490 to -0.0003072
0 mM vs 10 ⁻⁵ mM	-0,00002264	0,1034	P > 0.05	-0.0006139 to 0.0005686
0 mM vs 10 ⁻⁶ mM	-0,0003394	1,550	P > 0.05	-0.0009307 to 0.0002518

Tabulka 13. Statistical analysis of *HeTom* transcript levels in y^1w^{67c23} ; *HeTom* line

	Paraquat concentration					
	0 nM	10 ⁻² mM	10 ⁻³ mM	10 ⁻⁴ mM	10 ⁻⁵ mM	10 ⁻⁶ mM
<i>HeTom</i> transcript levels	0,000818	0,000916	0,001353	0,00151	0,000802	0,000927
	0,000596	0,000779	0,00192	0,001609	0,001114	0,001029
	0,000798	0,0015	0,0015	0,0019	0,0004	0,00153
	0,000912	0,00149	0,0027	0,0017	0,0009	0,000997
	0,000818	0,000916	0,001353	0,00151	0,000802	0,000927

One-way analysis of variance	
P value	0,0001
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	6
F	8,403
R squared	0,6365

Bartlett's test for equal variances	
Bartlett's statistic (corrected)	10,35
P value	0,0659
P value summary	ns
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	0,000005037	5	0,000001007
Residual (within columns)	0,000002877	24	0,0000001199
Total	0,000007914	29	

Dunnett's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
0 mM vs 10-1 mM	-0,0003898	1,780	P > 0.05	-0.0009811 to 0.0002014
0 mM vs 10-3 mM	-0,001087	4,963	P < 0.01	-0.001678 to -0.0004956
0 mM vs 10-4 mM	-0,0008984	4,103	P < 0.01	-0.001490 to -0.0003072
0 mM vs 10-5 mM	-0,00002264	0,1034	P > 0.05	-0.0006139 to 0.0005686
0 mM vs 10-6 mM	-0,0003394	1,550	P > 0.05	-0.0009307 to 0.0002518

Tabulka 14. Statistical analysis of HeTom fluorescence

Paraquat concentration	Fluorescence				
0 mM	272349,0	194344,0	305554,0	395996,0	478834,5
	98651,0	292818,0	254331,0	220560,0	320183,5
	527772,0	253747,0	239253,0	218124,0	242648,5
	239449,0	384985,0	442122,0	318975,0	509994,0
	366894,0	496023,0	306417,0	197918,0	462947,5
	281319,0	420105,0	535577,0	149510,0	336236,0
	235119,0	345586,0	278392,0	157612,0	386759,5
	123899,0	333483,0	348107,0	339185,0	540208,0
	301611,0	371306,0	321279,0	311215,0	540549,0
	232899,0	414545,0	666309,0	184860,0	439318,5
	143644,0	239276,0	324879,0	153140,0	337422,0
	348061,0	315396,0	457528,0	246673,0	328154,5
	207243,0	206608,0	303101,0	243585,0	174597,0
	246377,0	421125,0	271739,0	390369,0	454602,0
	277945,0	286515,0	198996,0	288927,0	347223,5
	241651,0	372507,0	145483,0	195021,0	259664,0
	288469,0	282818,0	134052,0	222853,0	197346,0
	298132,0	353541,0	262773,0	259679,0	484209,0
	287828,0	283163,0	186414,0	326956,0	432466,0
	282945,0	164260,0	165316,0	315955,0	154891,5
	138611,0	322366,0	116386,0	165546,0	383249,0
	345129,0	387617,0	299226,0	154156,0	722247,5
	232703,0	310134,0	176203,0	213491,0	420461,0
	230932,0	287132,0	223931,0	181001,5	422230,5
	122436,0	418740,0	385702,0	131209,5	630417,5
	322283,0	346032,0	216562,0	203580,5	215347,0
	167588,0	203810,0	315866,0	164928,0	379314,0
	250455,0	283903,0	165464,0	276406,0	329992,5
	320089,0	301218,0	315157,0	248558,0	590551,5
	224454,0	331592,0	335901,0	478834,5	347805,0
	663042,5	584646,5	347512,5	396187,5	398012,8
	456838,0	267735,0	394149,3	212238,0	386502,0
396187,5	289984,5	212238,0	463263,5	267692,0	

Paraquat concentration	Fluorescence				
10 ⁻⁴ mM	391183,0	345685,0	467169,0	482041,0	409025,0
	407835,0	222973,0	304265,0	409312,0	494332,0
	441661,0	206160,0	584407,0	587709,0	342764,5
	360440,0	307186,0	370172,0	376135,0	359433,0
	344377,0	551382,0	308460,0	234904,0	288435,5
	405940,0	428373,0	416389,0	314603,0	404520,0
	429839,0	267390,0	546999,0	517955,0	327090,5
	321293,0	323020,0	311044,0	538547,0	327961,5
	582919,0	287421,0	396596,0	314954,0	292270,0
	293502,0	307073,0	196725,0	170313,0	201703,5
	311696,0	392656,0	296395,0	425591,0	396244,5
	351912,0	379335,0	509366,0	410572,0	371086,5
	164160,0	214337,0	248172,0	233566,0	393666,5
	471187,0	471166,0	398741,0	591698,0	447350,0
	402147,0	408762,0	296178,0	307100,0	290389,0
	541117,0	572422,0	379242,0	243085,0	658268,0
	579978,0	400118,0	161347,0	358435,0	325216,0
	307160,0	592176,0	345064,0	378872,0	298608,0
	187858,0	545811,0	379007,0	513645,0	679499,0
	286968,0	221864,0	248159,0	513469,5	248227,0
	243763,0	284884,0	579144,0	264742,0	410395,0
	484057,0	259547,0	340857,0	421865,0	577497,0
	402554,0	250542,0	288014,0	227730,5	488048,5
	341200,0	519881,0	317531,0	207116,5	420852,0
	320755,0	307193,0	496290,0	161252,5	455708,0
	402477,0	320099,0	365928,0	245034,5	195209,0
	273965,0	284997,0	589470,0	566402,0	312530,0
	307293,0	323491,0	192030,0	544899,0	378396,5
	153391,0	269148,0	642850,0	593356,0	672430,0
	411225,0	220647,0	632045,0	409025,0	457680,5
644731,5	454560,0	411824,5	374878,5	303852,5	
462163,5	374136,5	417014,5	404088,0	546906,0	
185289,5	690063,0	424642,0	286023,5	380374,5	
302787,5	888368,0	340065,5	457589,0	190673,5	
482718,5	313972,5				

Paraquat concentration	Fluorescence				
10 ⁻⁶ mM	436224,0	335515,0	278000,0	290288,0	306610,0
	267476,0	330190,0	343766,0	291041,0	461078,0
	224840,0	621818,0	325400,0	471011,0	352196,0
	202707,0	293267,0	408046,0	459423,0	317145,0
	580423,0	377452,0	212797,0	442740,0	200317,5
	332957,0	352850,0	302526,0	283005,0	314773,5
	642903,0	363165,0	239366,0	408075,0	217646,0
	386803,0	285275,0	390263,0	238976,0	392148,5
	627715,0	244294,0	209708,0	571637,0	457278,0
	542230,0	218130,0	340320,0	263514,0	317786,5
	342562,0	341790,0	291116,0	249551,0	198955,0
	304664,0	272909,0	376502,0	159208,0	194887,0
	554257,0	233055,0	194158,0	465815,0	360492,5
	330436,0	373702,0	491273,0	246716,0	458779,5
	480558,0	306320,0	209497,0	311590,5	282175,5
	420214,0	215698,0	358390,0	434443,0	776364,5
	150075,0	194946,0	281040,0	387803,0	227176,0
	201424,0	344827,0	451665,0	441307,5	574187,5
	375397,0	301734,0	223999,0	448246,0	396813,0
	349285,0	260207,0	375277,0	436502,5	496281,0
	532351,0	150396,0	241763,0	256290,5	359505,5
	284508,0	287210,0	322451,0	478190,5	420325,5
	147826,0	341817,0	295715,0	404035,0	380406,0
	172401,0	373760,0	411612,0	266995,0	418855,5
	85194,0	291461,0	242010,0	449856,0	358224,0
	291793,0	458670,0	486699,0	136667,5	325057,5
	280374,0	227385,0	592894,0	396943,5	217268,0
	427229,0	216201,0	360997,0	419228,0	520506,5
	347457,0	333657,0	507032,0	223797,0	384539,5
	377692,0	358500,0	156882,0	334365,5	225446,0
482273,0	593228,0	298980,0	634523,5	593364,5	
317805,0	382752,0	386014,0	335170,0	655087,5	
239214,0	389998,0	373114,0	425805,0	278993,5	
252457,0	402884,5	275052,0	178021,0		

Paraquat concentration	Fluorescence				
10 ⁻¹ mM	263810,5	282860,0	271084,0	326669,0	542730,0
	204076,0	426811,0	159847,0	220248,0	324465,0
	592936,0	312108,0	305243,0	239727,0	680052,0
	150179,5	223630,5	278045,0	390256,0	365381,0
	489083,5	433207,0	236837,0	279561,0	422178,0
	562555,5	476003,5	289467,0	307540,0	351669,0
	393867,5	638268,5	454435,0	313089,0	483103,0
	384702,0	495084,0	269500,0	536211,0	286448,0
	474979,0	534024,0	239991,0	262343,0	299254,0
	414298,5	500453,0	355883,0	458810,0	454858,0
	207565,5	470514,5	209173,0	307959,0	316022,0
	319921,0	434128,5	224024,0	337400,0	368050,0
	303738,5	178878,0	251904,0	270242,0	400654,0
	305906,0	582553,5	181294,0	317056,0	254143,0
	382476,0	434650,0	327159,0	446442,0	135908,0
	402078,0	443805,5	290368,0	419094,0	455145,0
	319056,5	570972,0	348123,0	226283,0	186393,0
	672286,0	562767,0	256882,0	532437,0	93818,0
	440921,5	384834,0	378161,0	477926,0	119625,0
	427559,0	372241,0	160425,0	244626,0	452944,0
	440059,5	417667,5	333863,0	253961,0	228090,0
	444977,5	313455,5	284660,0	428733,0	436871,0
	322427,0	470462,5	398211,0	561702,0	250875,0
	449591,0	620540,0	263385,0	540374,0	245821,0
	641434,0	118178,0	477918,0	173802,0	161466,0
	586258,0	146991,0	307262,0	334147,0	243834,0
	463921,5	343673,0	357150,0	246376,0	126234,0
	325823,0	251998,0	441034,0	542730,0	376352,0
	237420,0	190916,0	313298,0	222829,0	346446,0
	333323,0	116735,0	378684,0	373182,0	560748,0
	380788,0	122478,0	372610,0	465338,0	384402,0
	261982,0	191516,0	352234,0	235138,0	244202,0
124700,0	271084,0	369827,0	191317,0	188882,0	
118606,0	198423,0	171718,0	235138,0	428104,0	
250279,0	401424,0	465338,0	191317,0	328759,0	
176419,0	381301,0	235138,0	235138,0	171718,0	
193406,0	410824,0	191317,0	191317,0	465338,0	

One-way analysis of variance	
P value	P<0.0001
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	4
F	10,06
R squared	0,04297

Bartlett's test for equal variances	
Bartlett's statistic (corrected)	2,131
P value	0,5456
P value summary	ns
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	470000000000	3	156700000000
Residual (within columns)	10470000000000	672	155800000000
Total	10940000000000	675	

Dunnett's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
0 mM vs 10⁻³ mM	56,77	4,856	P < 0.01	26.32 to 87.23
0 mM vs 10⁻³ mM	56,77	4,856	P < 0.01	26.32 to 87.23
0 mM vs 10⁻³ mM	56,77	4,856	P < 0.01	26.32 to 87.23

Tabulka 15. Non-telomeric retroelement *Jockey*

Transcript level of non-telomeric retroelement *Jockey* in the 1st generation

	Paraquat concentration				
	0 mM	10 ⁻¹ mM	10 ⁻³ mM	10 ⁻⁴ mM	10 ⁻⁶ mM
Transcript level	0,364755	0,329877	0,473029	0,641713	1,035077
	0,784584	0,765779	1,231144	1,235419	2,12874
	0,469761	0,38289	0,568409	1,01396	0,114036
	0,072154	0,54123	1,32121	0,98741	0,82547

One-way analysis of variance	
P value	0,2650
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
Number of groups	5
F	1,454
R squared	0,2795

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	SS	df	MS
Residual (within columns)	1,250	4	0,3124
Total	3,222	15	0,2148

Dunnett's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
0 mM vs 10 ⁻¹ mM	-0,08213	0,2506	P > 0.05	-0.9768 to 0.8126
0 mM vs 10 ⁻³ mM	-0,4756	1,451	P > 0.05	-1.370 to 0.4191
0 mM vs 10 ⁻⁴ mM	-0,5468	1,669	P > 0.05	-1.441 to 0.3479
0 mM vs 10 ⁻⁶ mM	-0,6030	1,840	P > 0.05	-1.498 to 0.2917

Transcript level of non-telomeric retroelement *Jockey* in the 5th generation

One-way analysis of variance	
P value	0,0009
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	5
F	8,356
R squared	0,6902

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	5,251	4	1,313
Residual (within columns)	2,357	15	0,1571
Total	7,608	19	

Dunnett's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
0 mM vs 10 ⁻¹ mM	-0,3693	1,317	P > 0.05	-1.134 to 0.3959
0 mM vs 10 ⁻³ mM	-1,089	3,886	P < 0.01	-1.854 to -0.3240
0 mM vs 10 ⁻⁴ mM	-0,8032	2,866	P < 0.05	-1.568 to -0.03801
0 mM vs 10 ⁻⁶ mM	-1,448	5,168	P < 0.01	-2.214 to -0.6832

	Paraquat concentration				
	0 mM	10 ⁻¹ mM	10 ⁻³ mM	10 ⁻⁴ mM	10 ⁻⁶ mM
Transcript level	0,4003266	0,9843388	1,630104	1,200621	2,065846
	0,4297998	0,478711	1,140735	0,9684713	2,198825
	0,2841138	0,8964077	2,136077	1,679995	0,953783
	0,4641981	0,6960326	1,028088	0,9419884	2,153574

Tabulka 16. Statistical analysis of transcript level of *HeT-A* element after H₂O₂ treatment

	H₂O concentration			
	0 %	10 ⁻³ %	10 ⁻⁴ %	10 ⁻⁶ %
Transcript level	0,002472	0,006968	0,004597	0,001906
	0,002677	0,004826	0,002705	0,001118
	0,003401	0,00423	0,002687	0,000914
	0,003687	0,005282	0,003187	0,001218

One-way analysis of variance	
P value	P<0.0001
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	4
F	16,05
R squared	0,7506

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	0,00003509	3	0,00001170
Residual (within columns)	0,00001166	16	0,0000007288
Total	0,00004675	19	

Dunnett's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
0 % vs 10-3 %	-0,002403	4,450	P < 0.01	-0.003801 to -0.001004
0 % vs 10-4 %	-0,0001896	0,3511	P > 0.05	-0.001588 to 0.001209
0 % vs 10-6 %	0,001281	2,372	P > 0.05	-0.0001177 to 0.002679

Tabulka 17. Statistical analysis of eclosed flies from 80 eggs

	Paraquat concentration				
	0 mM	10 ⁻¹ mM	10 ⁻³ mM	10 ⁻⁴ mM	10 ⁻⁶ mM
Number of eclosed flies	72	60	48	56	52
	68	72	40	56	58
	56	66	78	56	76
	68	62	42	42	66
	74	60	62	52	54
	46	70	70	60	40
	62	68	66	70	60
	62	64	66	64	56
	54	60	72	66	52
	54	50	64	52	42
	72	58	60	76	60
	70	44	58	68	56
	60	50	66	58	42
	68	52	56	72	42
	60	60	42	46	56
	48	54	42	56	36
	66	58	54	50	68
	54	44	48	64	48
	46	60	50	66	44
	46	48	48	68	68
	76	68	54	66	50
	60	44	44	70	48
	58	60	54	52	36
	66	42	48	50	42
	52	32	54	52	70
	68	44	60	56	60
	66	64	56	58	66
	60	48	56	58	76
	58	46	58	62	62
	60	62	48	68	66
	64	60	52	40	64
	62	52	52	48	62
	66	62	60	60	54
	62	60	70	54	62
	56	48	52	60	64
	46	64	64	60	62
	50	56	64	62	58
	66	68	58	64	54
	64	60	66	64	48
	50	56	50	52	54
42	66	66	36	58	
52	66	74	64	66	
50	48	44	54	68	
60	46	58	42	56	
48	38	58	64	52	
46	36	66	30	46	
74	48	56	46	64	
60	48	46	42	64	

One-way analysis of variance	
P value	0,3200
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
Number of groups	5
F	1,181
R squared	0,01970

Bartlett's test for equal variances	
Bartlett's statistic (corrected)	0,9358
P value	0,9194
P value summary	ns
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	428,7	4	107,2
Residual (within columns)	21330	235	90,76
Total	21760	239	

Dunnett's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
0 mM vs 10⁻¹ mM	4,083	2,100	P > 0.05	-0.7024 to 8.869
0 mM vs 10⁻³ mM	2,667	1,371	P > 0.05	-2.119 to 7.452
0 mM vs 10⁻⁴ mM	2,417	1,243	P > 0.05	-2.369 to 7.202
0 mM vs 10⁻⁶ mM	2,917	1,500	P > 0.05	-1.869 to 7.702

Tabulka 18. Statistical analysis of eclosed flies

	Paraquat concentration				
	0 mM	10 ⁻¹ mM	10 ⁻³ mM	10 ⁻⁴ mM	10 ⁻⁶ mM
Number of eclosed flies	82	20	68	66	66
	70	16	58	90	48
	60	8	40	44	56
	88	24	42	88	96

One-way analysis of variance	
P value	0,0007
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	5
F	8,778
R squared	0,7007

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	9052	4	2263
Residual (within columns)	3867	15	257,8
Total	12920	19	

Dunnett's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
0 mM vs 10⁻¹ mM	58,00	5,109	P < 0.01	27.01 to 88.99
0 mM vs 10⁻³ mM	23,00	2,026	P > 0.05	-7.995 to 53.99
0 mM vs 10⁻⁴ mM	3,000	0,2642	P > 0.05	-27.99 to 33.99
0 mM vs 10⁻⁶ mM	8,500	0,7487	P > 0.05	-22.49 to 39.49

Tabulka 19. Statistical analysis of AKH titre

	Paraquat concentration				
	0 mM	10⁻¹ mM	10⁻³ mM	10⁻⁴ mM	10⁻⁶ mM
AKH titre	0,06598354	0,09108091	0,08496276	0,09429793	0,08408722
	0,06275306	0,04130919	0,05184843	0,06344352	0,06782658
	0,0652163	0,1008678	0,1037391	0,1214853	0,1175753
	0,06517591	0,09156338	0,1097567	0,08826458	0,08192731
	0,04765059	0,09703006	0,07917637	0,07728953	0,06241874
	0,06598354	0,1464616	0,1242787	0,1167852	0,1156324
	0,06275306	0,1661083	0,1621144	0,1436342	0,1271414
	0,0652163	0,1439384	0,1121149	0,1407367	0,1193986
	0,06517591	0,1712409	0,1436972	0,1234664	0,127077
	0,04765059	0,1468097	0,1518158	0,1122758	0,1158553
	0,06598354	0,1563299	0,1660538	0,1179286	0,06031972
	0,06275306	0,1664884	0,08601976	0,1666325	0,1160578
	0,0652163	0,03860807	0,09571436	0,08751356	0,04953915
	0,06517591	0,0618934	0,03911192	0,06301014	0,03699012
	0,04765059	0,07700641	0,07615277	0,07686413	0,08433382
	0,06598354	0,0733286	0,07677335	0,08728898	0,080000
	0,06275306	0,03602763	0,05968678	0,06261169	0,05254991
	0,0652163	0,06965933	0,05793992	0,05611691	0,05867202
	0,06517591	0,05524261	0,0530327	0,06065108	0,06438559
	0,04765059	0,07667329	0,06555033	0,08560538	0,04622844
	0,06598354		0,08142252	0,07709573	0,07987537
	0,06275306		0,06904965	0,08904667	0,081163
	0,0652163		0,05459997	0,0650514	0,09277491
	0,06517591		0,05520312	0,06927618	0,054189
	0,04765059		0,1055698	0,1006622	0,05702504
	0,06598354		0,1101007	0,07788188	0,1058502
	0,06275306		0,03132804	0,0562244	0,1390015
	0,0652163		0,05652925	0,04732782	0,04810763
	0,06517591		0,139253	0,1384621	0,1229076
	0,04765059		0,09082617	0,07307043	0,08960165
	0,06598354		0,05967856	0,05451871	0,05948979
	0,06275306		0,07849982	0,07218048	0,07370824
	0,0652163		0,05499253	0,05844815	0,05770387
0,06517591		0,05077661	0,06623341	0,0646512	
0,04765059		0,05577917	0,06063453	0,05593584	
0,06598354		0,06141685	0,05516444	0,05385441	
0,06275306		0,06999504	0,07654861	0,07455686	
		0,08444759	0,08604674	0,08049764	
		0,0345323	0,0293636	0,02772787	

One-way analysis of variance	
P value	P<0.0001
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	5
F	7,294
R squared	0,1331

Bartlett's test for equal variances	
Bartlett's statistic (corrected)	94,92
P value	P<0.0001
P value summary	***
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	0,03016	4	0,007541
Residual (within columns)	0,1964	190	0,001034
Total	0,2266	194	

Dunnett's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
0 mM vs 10⁻¹ mM	-0,03886	5,338	P < 0.01	-0.05681 to -0.02092
0 mM vs 10⁻³ mM	-0,02165	2,973	P < 0.05	-0.03959 to -0.003704
0 mM vs 10⁻⁴ mM	-0,02307	3,169	P < 0.01	-0.04102 to -0.005130
0 mM vs 10⁻⁶ mM	-0,01763	2,421	P > 0.05	-0.03557 to 0.0003188

Tabulka 20. Statistical analysis of survival rate

	Paraquat concentration				
	0 mM	10⁻¹ mM	10⁻³ mM	10⁻⁴ mM	10⁻⁶ mM
Survival (%)	42,000000	70,000000	55,000000	73,000000	75,000000
	47,000000	61,000000	72,000000	64,000000	91,000000
	32,000000	57,000000	72,000000	75,000000	68,000000
	42,000000	50,000000	60,000000	51,000000	80,000000
	50,000000	54,000000	89,000000	85,000000	65,000000

One-way analysis of variance	
P value	0,0006
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	5
F	7,835
R squared	0,6104

Bartlett's test for equal variances	
Bartlett's statistic (corrected)	2,390
P value	0,6645
P value summary	ns
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	3440	4	860,1
Residual (within columns)	2196	20	109,8
Total	5636	24	

Dunnett's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
0 mM vs 10⁻¹ mM	-15,80	2,384	P > 0.05	-33.36 to 1.761
0 mM vs 10⁻³ mM	-27,00	4,074	P < 0.01	-44.56 to -9.439
0 mM vs 10⁻⁴ mM	-27,00	4,074	P < 0.01	-44.56 to -9.439
0 mM vs 10⁻⁶ mM	-33,20	5,010	P < 0.01	-50.76 to -15.64

9. Životopis

Tomáš Krůček

Datum narození: 1. 2. 1986

Místo narození: Dačice, Česká republika

Email: krucektomas9@gmail.com

Vzdělání:

2011- nyní PhD studium, Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Téma práce - **Fyziologické a genetické dopady oxidačního stresu u hmyzu.**

2009-2011 Magisterské studium, Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Téma práce - **Studium sericinu 3 u *Bombyx mori* a zaklonování sericinových genů do *Escherichia coli*.**

2005-2009 Bakalářské studium, Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Téma práce - **Studium genů homologních savčím exonukleázám na modelovém organismu *Drosophila melanogaster*.**

Zahraniční stáž 2015: Dr. Ronald P. Kühnlein, Max Planck Institute for Biophysical Chemistry Department Molecular Developmental Biology Am Fassberg 11 Göttingen, Německo

Odučené hodiny a pracovní zkušenosti

- Vedení středoškolské práce – Barbora Macková. (2014) **Oxidativní stres a jeho vliv na antioxidační aktivitu u *Drosophila melanogaster***
- Obhajoba studentských prací
- Účast na vedení cvičení v rámci předmětu Fyziologie živočichů

- Účast na vedení EKOTECH - Multidisciplinární výchova odborníků pro využití biotechnologií v ekologických oborech
- 2011-2016 Vědecký asistent, Biologické Centrum AV ČR, v.v.i.

Grantová podpora

- **Hormonální řízení antistresových reakcí u hmyzu**, Kontakt II LH14047. MŠMT, 2014-2016
- **Procesy ovlivňující homeostázu a antistresové reakce u modelových druhů hmyzu**, 04-038/2014/P. GAJU.
- **Vliv oxidativního stresu na délku telomer a jejich funkčnost u hmyzu**, 131/2012/P. GAJU.
- **Vliv stresu na metabolické a vývojové procesy u hmyzu a ryb**, 062/2011/P. GAJU.

Publikace a konference

Korandová M., Svellerova H., **Kruček T.**, Čapková Frydrychová R. (2015). The variation in promoter activity of telomeric *HeT-A* element in *Drosophila*. In: Abstracts, Twelfth International Conference on *Drosophila* Heterochromatin, 24-30 May 2015, Palermo, Italy (poster).

Kruček T., Korandová M., Čapková Frydrychová R. (2015). Effect of thermal stress on telomere length in *Drosophila*. In: Abstracts, Twelfth International Conference on *Drosophila* Heterochromatin, 24-30 May 2015, Palermo, Italy (poster).

Kruček T., Korandová M., Szakosová K., Šerý M., Čapková Frydrychová R. (2015). Effect of low doses of herbicide paraquat on antioxidant defense in *Drosophila*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 88: 235-248.

Korandová M., **Kruček T.**, Vrbová K., Čapková Frydrychová R. (2014). Distribution of TTAGG-specific telomerase activity in insects. *Chromosome Research*. 22: 495-503.

© nepublikovaných částí Tomáš Krůček

e-mailová adresa: krucektomas9@gmail.com

Alternativní telomerické kompenzační mechanismy jako způsob adaptace telomer vůči stresovým podmínkám v průběhu evoluce hmyzu. Disertační práce, 2017

Všechna práva vyhrazena

Pouze pro nekomerční použití

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Branišovská 1760

CZ-37005 České Budějovice, Česká republika

Telefon: +420 387 776 201

www.prf.jcu.cz, e-mail: sekret-fpr@prf.jcu.cz