

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

Mapování telomerázové aktivity a telomerické sekvence u brouků

Bakalářská práce

Daniela Prušáková

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

České Budějovice 2020

Prušáková, D., 2020: Mapování telomerázové aktivity a telomerické sekvence u brouků. [Mapping of telomerase activity and telomeric sequence in beetles. Bc. Thesis, in Czech] – 37 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

(TTAGG)_n sequence is an ancestral common telomere motif in insects, yet not ubiquitous, especially in beetle lineage, where the structure of telomeres varies even between representatives of the same clade. Telomerase activity related to the ancestral sequence was examined using TRAP assay, occurrence of (TTAGG)_n and (TCAGG)_n repeats across beetles was determined using hybridization methods.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 11. dubna 2020

.....

Daniela Prušáková

Poděkování

Největší poděkování určitě patří mé školitelce RNDr. Radmile Čapkové Frydrychové PhD., především za její odborné vedení, trpělivost, ochotu a díky níž jsem měla možnost seznámit se se širokou škálou laboratorních metod. Ráda bych poděkovala i ostatním členům laboratoře za cenné rady při mé práci, zejména Míše, Tomášovi a Justině. Velké zásluhy na uskutečnění této práce mají zároveň Ing. Aleš Bezděk, Ph.D. a Mgr. Lukáš Čížek, Ph.D., kteří mi pomohli ve sběru, určení a zařazení jednotlivých brouků a dále pak prof. RNDr. František Marec, CSc., který mě naučil dokumentaci výsledků analýzy FISH.

V neposlední řadě patří velké díky mojí rodině a partnerovi za obrovskou podporu nejen při vytváření této práce, nýbrž po celou dobu mého dosavadního studia.

Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	Telomery.....	1
1.1.1	Zkracování telomer a jeho příčiny.....	1
1.2	Telomeráza a její funkce.....	2
1.3	Telomerické motivy.....	3
1.3.1	Brouci a jejich telomerická sekvence.....	6
2	Cíl práce.....	8
3	Materiál a metody.....	8
3.1	Testované druhy brouků.....	8
3.2	Zpracování vzorků.....	10
3.2.1	Fenol-chloroformová izolace genomové DNA.....	10
3.2.2	Příprava chromosomů.....	10
3.2.3	Příprava proteinových extraktů.....	11
3.3	Příprava hybridizačních sond.....	11
3.3.1	Beztemplátová PCR.....	11
3.3.2	Značení sondy digoxigeninem.....	12
3.3.3	Značení sondy biotinem.....	12
3.4	Hybridizační metody.....	13
3.4.1	Southern blot.....	13
3.4.2	Dot blot.....	14
3.4.3	Fluorescenční in-situ hybridizace (FISH).....	15
3.5	TRAP assay.....	16
4	Výsledky.....	18
4.1	Distribuce (TTAGG) _n a (TCAGG) _n sekvencí pomocí dot – blot hybridizace.....	19
4.2	Southern blot.....	21
4.3	FISH.....	23
4.4	TRAP.....	25
5	Diskuze.....	26
6	Závěr.....	29
7	Literatura.....	30
8	Příloha.....	35

1 Úvod

1.1 Telomery

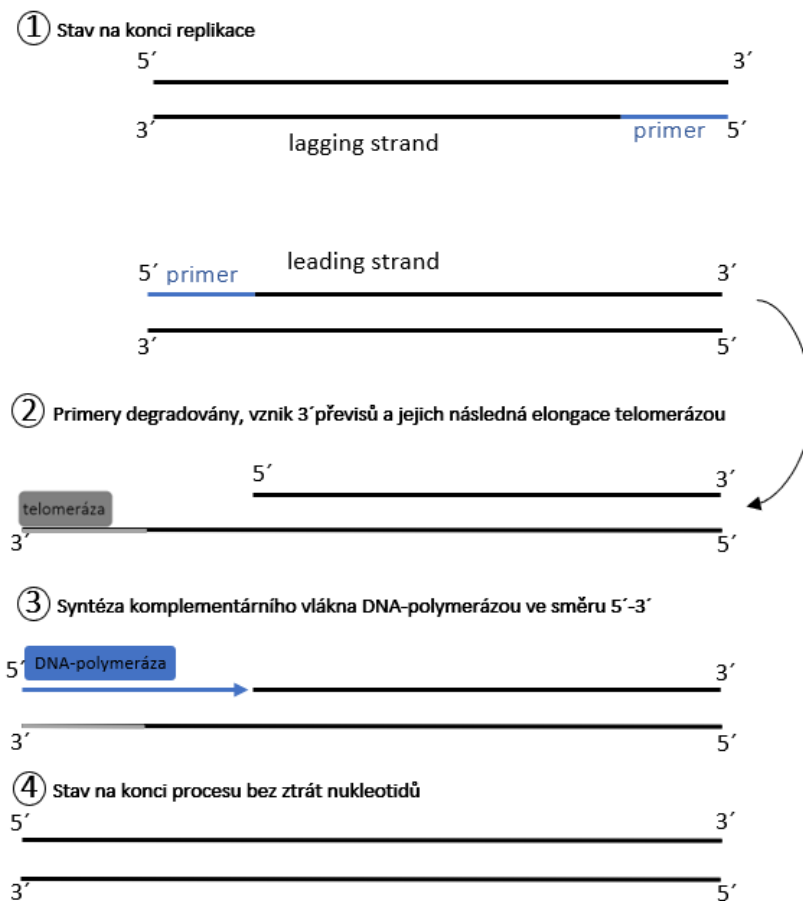
Telomery jsou nukleoproteinové struktury na konci lineárních chromozomů eukaryot. Jsou to nepostradatelné části chromozomů, poněvadž zajišťují jejich stabilitu, a to především kompenzací ztrát koncových částí chromozomů, které jsou způsobeny vlivem nekompletní DNA replikace nebo působením oxidativního stresu (Blackburn, 1991; Hackett et al., 2001). V souvislosti s tím jsou telomery označovány jako buněčné hodiny, jelikož jsou limitujícím faktorem buněčného dělení somatické linie (Allsopp et al., 1992). Jestliže telomery dosáhnou svého maximálního zkrácení, což je označováno jako tzv. *Hayflickův limit*, buňka ztrácí schopnost proliferovat, případně spouští apoptózu (Shay a Wright, 2000). Pokud ale nastane opětovné prodlužování telomer, proliferativní potenciál buňky se opět zvyšuje (Jaskelioff et al., 2011). Telomerická DNA na svém 3'konci tvoří strukturu smyčky. Tato smyčka spolu s proteinovým komplexem, tzv. telomerickou čepičkou, chrání telomery před degradací nukleázami a společně jsou klíčovými elementy pro odlišení přirozených konců chromozomů od chromozomálních zlomů. Telomery jsou tak chráněny před svou vzájemnou fúzí a tím i před genomovou labilitou (Henderson a Blackburn, 1989; Griffith et al., 1999; Linger a Price, 2009).

1.1.1 Zkracování telomer a jeho příčiny

Zkracování telomer je přirozeným důsledkem buněčné proliferace a s ní spojené replikace DNA, přesněji neúplné replikace DNA chromosomálních konců. Problém zkracování telomer neúplnou replikací (Obrázek 1) tkví zejména v tom, že pro iniciaci syntézy DNA je potřeba RNA-primer, od něhož DNA polymeráza syntetizuje nové vlákno. Primer nasedá ke 3'konci templátové sekvence a syntéza probíhá výhradně ve směru 5' → 3'. RNA-primer na 3'konci je posléze odbourán a opět nahrazen sekvencí DNA. Nicméně po odstranění RNA-primeru na samém konci chromosomu, a to na 5'konci opožděujícího se řetězce, nelze sekvenci odstraněného primeru nikterak nahradit, poněvadž za ním již sekvence nepokračuje, tudíž se zde nenachází žádný další 3'konec, od kterého by syntéza DNA mohla pokračovat. Na vedoucím vláknu tak vzniká 3'převis (Chow et al., 2012).

Významným zdrojem telomerického zkracování je oxidativní stres, přesněji genotoxické působení volných kyslíkových radikálů. Jedním z primárních cílů volných kyslíkových radikálů na DNA je guanin, jehož oxidativní modifikací vzniká 8-oxoG. Modifikované báze jsou z DNA povětšinou odstraněny pomocí bázového excizního reparačního mechanismu

(BER, base excision repair). Ovšem pravděpodobně díky specifické chromatinové struktuře telomer proces BER neprobíhá v telomerech dostatečně efektivně a jsou tak zde produkovány jednořetězcové zlomy, které jsou díky formaci telomerické vidličky při první nadcházející replikaci zdrojem ztráty významné části telomerických konců (Rhee et al., 2011).



Obr. 1: Schématické znázornění problému nekompletní replikace DNA a jeho řešení za využití telomerázy.

1.2 Telomeráza a její funkce

Délka telomer je nejčastěji udržována RNA-dependentní DNA-polymerázou zvanou telomeráza, která nasedá na 3' konce chromozomů, k nimž opakovaně připojuje krátké nekódující tandemové sekvence o délce většinou 5-8 bp (Zakian 1995; Greider a Blackburn, 1996). Pro tuto funkci telomerázy jsou klíčové zejména dvě její podjednotky. Jedna z těchto podjednotek, označovaná jako TR, TER nebo TERC, nese molekulu RNA fungující jako templát a druhá podjednotka, označovaná jako TERT (telomerase reverse transcriptase), tento templát pomocí reverzní transkripce přepisuje do DNA (Greider a Blackburn, 1989; Yu et al., 1990).

Regulace aktivity telomerázy je uplatňována prostřednictvím genetických, epigenetických a environmentálních faktorů. Závisí na transkripci podjednotek TR a TERT, jejich posttranskripčních a posttranslačních modifikacích a na účasti přidružených proteinů (Cong et al., 2002; Cairney a Keith, 2008; Webb a Zakian, 2015). Na příklad u kvasinek je aktivita telomerázy ovlivněna expresí klíčového proteinu Est1 (telomere elongation protein), se kterým telomeráza vytváří komplex. Interaguje-li poté Est1 ještě s Cdc3, proteinem vázající se na telomery, dojde k aktivaci telomerázy a následné elongaci telomer (Lin a Zakian, 2016). Poruchy v regulaci aktivity telomerázy jsou obecně spjaty se vznikem řady patologických procesů, jako je nádorový proces, některá neurodegenerativní onemocnění či některá onemocnění spjata s procesem stárnutí (Armanios et al., 2007; Calado a Young, 2009).

Aktivita telomerázy je obecně spjata s proliferujícími buňkami. Aktivní telomeráza je tak fyziologicky přítomná v buňkách epitelů, kostní dřeni, zárodečné linie či patologicky v buňkách rakovinných (Kim et al., 1994; Greider, 1998; Krupp et al., 2000). U rostlin je tomu obdobně třeba u klíčících semen nebo buňkách ve špičce kořene (Říha et al., 1998). Aktivita telomerázy je naopak utlumena v buňkách již diferenciovaných (Flores et al., 2006), a to vlivem působení tumor-supresorových drah potlačující expresi podjednotek telomerázy (Lin a Elledge, 2003).

1.3 Telomerické motivy

Nejrozšířenějším obecným vzorcem pro telomerickou sekvenci DNA je $(T_xA_yG_z)_n$ (Wellinger a Sen, 1997), kdy například hexamer $(TTAGGG)_n$ lze nalézt napříč obratlovci (Moyzis et al., 1988; Meyne et al., 1989), ale také u některých zástupců jednobuněčných, např. krásnooček (Euglenzoa) z rodu *Trypanosoma*, a dále pak u zástupce hlenek (Eumycetozoa) z rodu *Physarum* (Forney et al., 1987; Gomes et al., 2010). Naopak odlišná telomerická sekvence byla pozorována u kvasinek, kde konkrétně *Saccharomyces cerevisiae* vykazuje sekvenci $(G_{1-3}T)_n$. Neobvykle dlouhá telomerická sekvence se pak vyskytuje u *Candida albicans*, u níž je rozsah jedné repetice 23 bp a vypadá takto $(ACG_2ATGTCTA_2CT_2CT_2G_2T)_n$ (McEachern a Hicks, 1993). Srovnání telomerické sekvence u těchto zástupců ukazuje, že struktura telomerické sekvence nemusí vždy souviset s vývojovým stupněm organismu.

Podobnou sekvenci mají chromozomy i u většiny druhů rostlin, kde se jedná, až na několik málo výjimek, o $(TTTAGGG)_n$ (Fajkus et al., 1996). Jednou z výjimek je například

keř *Cestrum elegans*, který má telomerickou sekvenci prodlouženou na (TTTTTTAGGG)_n (Peška et al., 2015), či červená řasa *Cyanidioschyzon merolae* se zcela odlišnou repeticí (AATGGGGGG)_n (Nozaki et al., 2007).

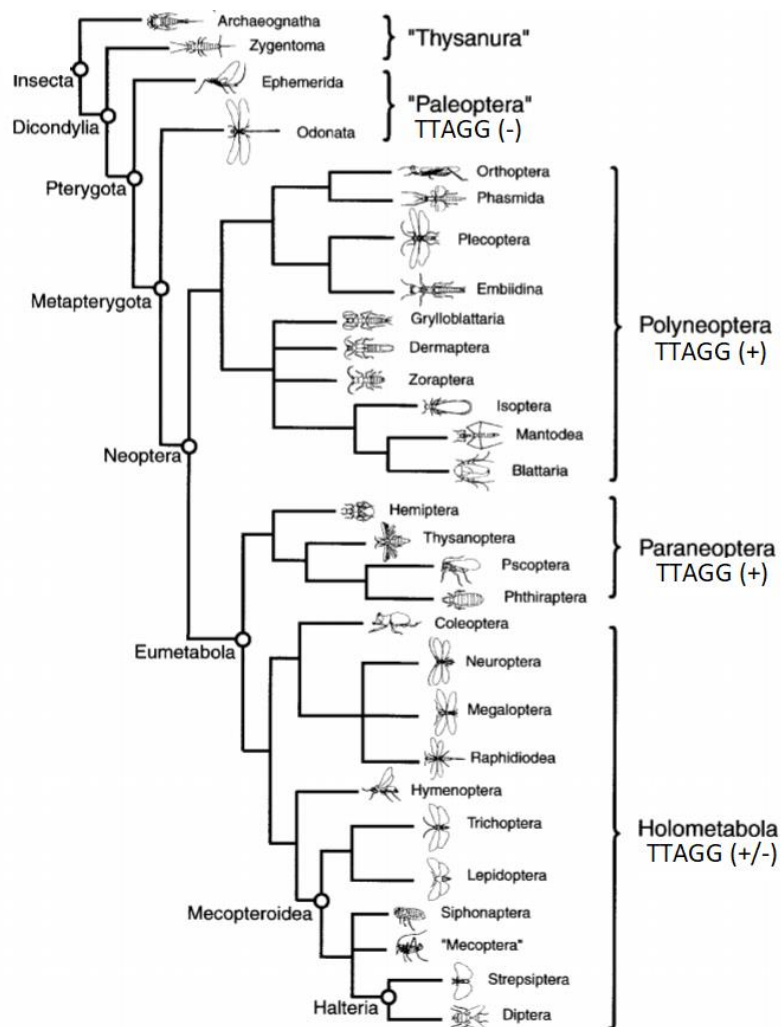
Ačkoliv se může jevit, že telomerická sekvence nese značnou míru fylogenetické konzervace, existují taxony, kde je skladba telomerické sekvence poměrně heterogenní. U členovců (Arthropoda), specifitěji u hmyzu (Insecta), coby nejpočetnější a nejrozšířenější skupiny živočichů, se ve skladbě telomerické sekvence objevuje značná heterogenita (Obrázek 2). Jako výchozí ancestrální telomerická sekvence byla u členovců stanovena sekvence (TTAGG)_n (Okazaki et al., 1993). Nicméně u hmyzu je tato sekvence poměrně často nahrazena jiným krátkým motivem či dokonce zcela jiným typem telomer. Sekvence (TTAGG)_n je vysoce konzervovaná zejména u řádů Polyptera a Paraneoptera, ale kupříkladu primitivní Paleoptera tuto sekvenci postrádají úplně a Endopterygota (=Holometabola) vykazují jak její přítomnost, tak i její absenci (Frydrychová et al., 2004; Korandová et al., 2014).

Z pohledu telomerické sekvence a způsobu kompenzace telomerických ztrát je významný hmyzí řád Diptera (dvoukřídli), protože zde došlo ke ztrátě celého telomerázového mechanismu. U octomilky *Drosophila melanogaster* a některých jejích blízkých příbuzných jsou telomery udržovány retrotranspozicí tří specifických telomerických elementů *HeT-A*, *TART* a *TAHRE* (Biessmann a Mason, 1997; Biessmann a Mason, 2003; Pardue a DeBaryshe, 2003). U rodu pakomárů (*Chironomus sp.*) či komára *Anopheles gambiae* jsou telomery udržovány dlouhými satelitními úseky pomocí genové konverze (Nielsen a Edström, 1993; Roth et al., 1997). Genová konverze jako způsob telomerické kompenzace funguje i u některých zástupců rodu *Drosophila* či *Rhynchosciara* (Gorab, 2003; Lee et al., 2007). Nepřítomnost ancestrální hmyzí sekvence zároveň vykazují dva řády fylogeneticky příbuzné řádu Diptera, kterými jsou Siphonaptera (blechy) a Mecoptera (srpice) (Frydrychová et al., 2004).

Přechodné stádium struktury telomer je naznačeno u bource morušového (*Bombyx mori*) z řádu Lepidoptera (motýli), jehož telomery se skládají z repeticí (TTAGG)_n s vloženými retrotranspozony z rodiny *SARTBm1*. Tyto retrotranspozony preferují cílovou sekvenci (TTAGG)_n. Ale zatímco retrotranspozony jsou aktivně přepisovány a vkládány zpět, aktivita telomerázy měřitelná není (Sasaki a Fujiwara, 2000; Osanai et al., 2006; Osanai-Futahashi a Fujiwara, 2011).

Předpokládá se, že to byly právě retrotranspozony, které stály na počátku evoluce telomer. Potřeba telomerických elementů souvisela s přechodem z cirkulárních genomů na

lineární chromozomy a s ním vyvstávajících problémů nekompletní replikace terminálních sekvencí a rozlišení přirozených konců chromozomů. K linearizaci došlo pravděpodobně vlivem invaze skupiny intronů II, které se po genomu šířily pomocí reverzního splicingu a reverzní transkripce. Předpokládá se, že šlo konkrétně o non-LTR-retrotranspozony, které cílily na dvoztetězcové zlomy a sloužily tak jako tzv. „proto-telomery“. Tyto elementy postupně získaly schopnost využít 3' konec lineárního chromozomu jako templát pro reverzní transkripci, což dalo za vznik TERT podjednotce telomerázy, TER podjednotka se pravděpodobně vyvinula z transkriptu retrotranspozonu a se zafixováním její sekvence pak patrně souvisí vývoj ochranné telomerické čepičky (Belfort et al., 2011; de Lange, 2015; Barcenilla a Shippen, 2019).



Obr. 2: Kladogram třídy hmyzu (Insecta). Přehled fylogenetických vztahů mezi jednotlivými řády doplněný informací o přítomnosti (+)/absenci (-) $(TTAGG)_n$ telomerické sekvence. Obrázek byl převzat z práce Wheeler (2001).

1.3.1 Brouci a jejich telomerická sekvence

Značnou různorodost v distribuci hmyzí telomerické sekvence vykazují brouci (Coleoptera). Řád brouků se dělí na čtyři podřády: Archostemata, Myxophaga, Adephaga a Polyphaga, přičemž hlavní pozornost v této práci je věnována poslednímu zmíněnému podřádu.

Archostemata (=Prvožraví) je nejmenší pořád brouků čítající zhruba 40 druhů, většina zástupců je již vyhynulá, dle fosilních nálezů starých zhruba 250 milionů let byli velmi podobní prvním broukům. Myxophaga (=Řasožraví) je druhý nejmenší podřád s celkem asi 100 druhy, v souvislosti se způsobem obživy je jejich výskyt vázán pouze na vodu a vlhké prostředí. Adephaga (=Masožraví) je podřád zahrnující přibližně 36 000 druhů uvnitř 9 čeledí vyskytujících se jak na souši, tak ve vodě, většina druhů je v dospělosti dravých. Nakonec podřád Polyphaga (=Všežraví), největší a nejdiferenzovanější podřád brouků s přibližně 335 000 popsány druhy rozdělených do 5 infrařádů, v rámci 16 různých nadčeledí, přičemž za zmínku stojí nejpočetnější Curculionoidea (~70 000 druhů) a Chrysomeloidea (~58 000 druhů). Vysokou míru diverzifikace pravděpodobně umožnil přechod z predátorského způsobu života na fytofagii, která je charakteristická hlavně pro zástupce těchto dvou nadčeledí, navíc většina zástupců se zároveň řadí mezi škůdce pěstovaných plodin, na druhou stranu někteří jsou prospěšní a využívají se dokonce k redukci invazních druhů rostlin (Crowson, 1981; Hunt et al., 2007).

Na základě dostupných dat se předpokládá, že v rámci brouků došlo ke ztrátě hmyzí telomerické sekvence pětkrát až šestkrát v průběhu evoluce. Kromě toho, heterogenita je zde v takovém měřítku, že se ve své telomerické sekvenci mezi sebou liší i zástupci jednotlivých čeledí. To signalizuje fylogeneticky relativně nedávnou a úplně nezávislou změnu ve struktuře telomer uvnitř tohoto řádu, a to ať už novým mechanismem bez potřeby telomerázy, nebo alternativní repetitivní sekvencí (Sahara et al., 1999; Frydrychová a Marec, 2002; Mason et al., 2016).

Lze vidět (Tabulka I), že u nadčeledí Bostrichoidea, Staphylinoidea, Chrysomeloidea a Elateroidea byla (TTAGG)_n sekvence zachována, nicméně někteří dosud testovaní zástupci z Cleroidea, Cucujoidea, Curculionoidea a Scarabaeoidea tuto sekvenci postrádají.

Nadčeleď Tenebrionoidea jsou jedinou skupinou brouků, kteří sice postrádají hmyzí telomerickou sekvenci, ale u níž se novou telomerickou sekvencí podařilo identifikovat. Telomerická sekvence u Tenebrionoidea vznikla z hmyzí sekvence záměnou jednoho

nukleotidu a je jí sekvence (TCAGG)_n (Mravinač et al., 2011). Navíc, u jednoho ze zástupců Tenebrionoidea byla nalezena výjimka podobná případu *B. mori*, a sice u *Tribolium castaneum*, který má v rámci své (TCAGG)_n telomerické sekvence taktéž vložené non-LTR retrotranspozony z rodiny *SARTTc1*, vykazující cílovou specifitu výhradně k sekvenci (TCAGG)_n (Osanai-Futahashi a Fujiwara, 2011).

Zároveň se v rámci brouků nachází mnoho zástupců, u kterých nebyla detekována ani jedna ze dvou výše zmíněných sekvencí či obdobné varianty telomerických sekvencí, jako jsou (CTAGG)_n, (CTGGG)_n, (TTGGG)_n, (TTAGGG)_n, (Mravinač et al., 2011). To ještě více podporuje teorii, že se brouci úspěšně vypořádávají se ztrátou telomerázy ještě jiným záložním mechanismem (Mason et al., 2016).

Tab. I: Seznam již testovaných brouků pořádku Polyphaga na telomerické sekvence. (+) značí přítomnost, (-) absenci, netest. = netestováno.

NADČELEĎ	DRUH	SEKVENCE		ZDROJ
		(TTAGG) _n	(TCAGG) _n	
Bostrichoidea	<i>Stegobium paniceum</i>	(+)	netest.	Frydrychová et al., 2004
Staphylinoidea	<i>Silpha obscura</i>	(+)	netest.	Frydrychová et al., 2004
Chrysomeloidea	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	(+)	(-)	Frydrychová et al., 2004
	<i>Chrysolina americana</i>	(+)	netest.	Mravinač et al., 2011
	<i>Chrysolina herbacea</i>	(+)	netest.	Mravinač et al., 2011
	<i>Chrysolina polita</i>	(+)	netest.	Mravinač et al., 2011
	<i>Acanthoscelides obtectus</i>	(+)	netest.	Mravinač et al., 2011
	<i>Rhagium inquisitor</i>	(+)	netest.	Mravinač et al., 2011
	<i>Arhopalus coreanus</i>	(+)	netest.	Okazaki et al., 1993
	<i>Spondylis buprestoides</i>	(+)	netest.	Okazaki et al., 1993
Cleroidea	<i>Thanasimus formicarius</i>	(-)	netest.	Frydrychová et al., 2004
Cucujoidea	<i>Oryzaephilus surinamensis</i>	(+)	netest.	Frydrychová et al., 2004
	<i>Cryptolestes</i> sp.	(-)	(-)	Mravinač et al., 2011
	<i>Henosepilachna argus</i>	(+)	netest.	Mora et al., 2015
Curculionoidea	<i>Cionus nigratarsis</i>	(-)	(-)	Mravinač et al., 2011
	<i>Cionus ganglbaueri</i>	(-)	(-)	Mravinač et al., 2011
	<i>Ips typographus</i>	(+)	netest.	Sahara et al., 1999
	<i>Sitophilus granarius</i>	(-)	(-)	Mravinač et al., 2011
	<i>Phyllobius urticae</i>	(+)	netest.	Mravinač et al., 2011
Tenebrionoidea	<i>Mylabris</i> sp.	(-)	(+)	Mravinač et al., 2011
	<i>Typhaea stercorea</i>	(-)	(+)	Mravinač et al., 2011
	<i>Tenebrio molitor</i>	(-)	(+)	Mravinač et al., 2011
	<i>Palorus ratzeburgi</i>	(-)	(+)	Mravinač et al., 2011
	<i>Palorus subdepressus</i>	(-)	(+)	Mravinač et al., 2011
	<i>Palorus genalis</i>	(-)	(+)	Mravinač et al., 2011
	<i>Palorus ficicola</i>	(-)	(+)	Mravinač et al., 2011
	<i>Tenebrio obscurus</i>	(-)	(+)	Mravinač et al., 2011
	<i>Tribolium castaneum</i>	(-)	(+)	Mravinač et al., 2011

	<i>Tribolium freemani</i>	(-)	(+)	Mravinač et al., 2011
	<i>Tribolium confusum</i>	(-)	(+)	Mravinač et al., 2011
	<i>Tribolium madens</i>	(-)	(+)	Mravinač et al., 2011
	<i>Tribolium audax</i>	(-)	(+)	Mravinač et al., 2011
	<i>Tribolium brevicornis</i>	(-)	(+)	Mravinač et al., 2011
	<i>Tribolium anaphe</i>	(-)	(+)	Mravinač et al., 2011
	<i>Tribolium destructor</i>	(-)	(+)	Mravinač et al., 2011
	<i>Pimelia elevata</i>	(-)	(+)	Mravinač et al., 2011
	<i>Pimelia criba</i>	(-)	(+)	Mravinač et al., 2011
	<i>Pimelia monticola</i>	(-)	(+)	Mravinač et al., 2011
Buprestoidea	<i>Agrilus viridis</i>	(+)	netest.	Frydrychová et al., 2004
Elateroidea	<i>Ampedus sanguineus</i>	(+)	netest.	Frydrychová et al., 2004
	<i>Diacanthous undosus</i>	(+)	netest.	Okazaki et al., 1993
	<i>Melanotus legatus</i>	(+)	netest.	Okazaki et al., 1993
Scarabaeoidea	<i>Geotrupes stercorarius</i>	(-)	netest.	Frydrychová et al., 2004
	<i>Anomala cuprea</i>	(-)	netest.	Okazaki et al., 1993

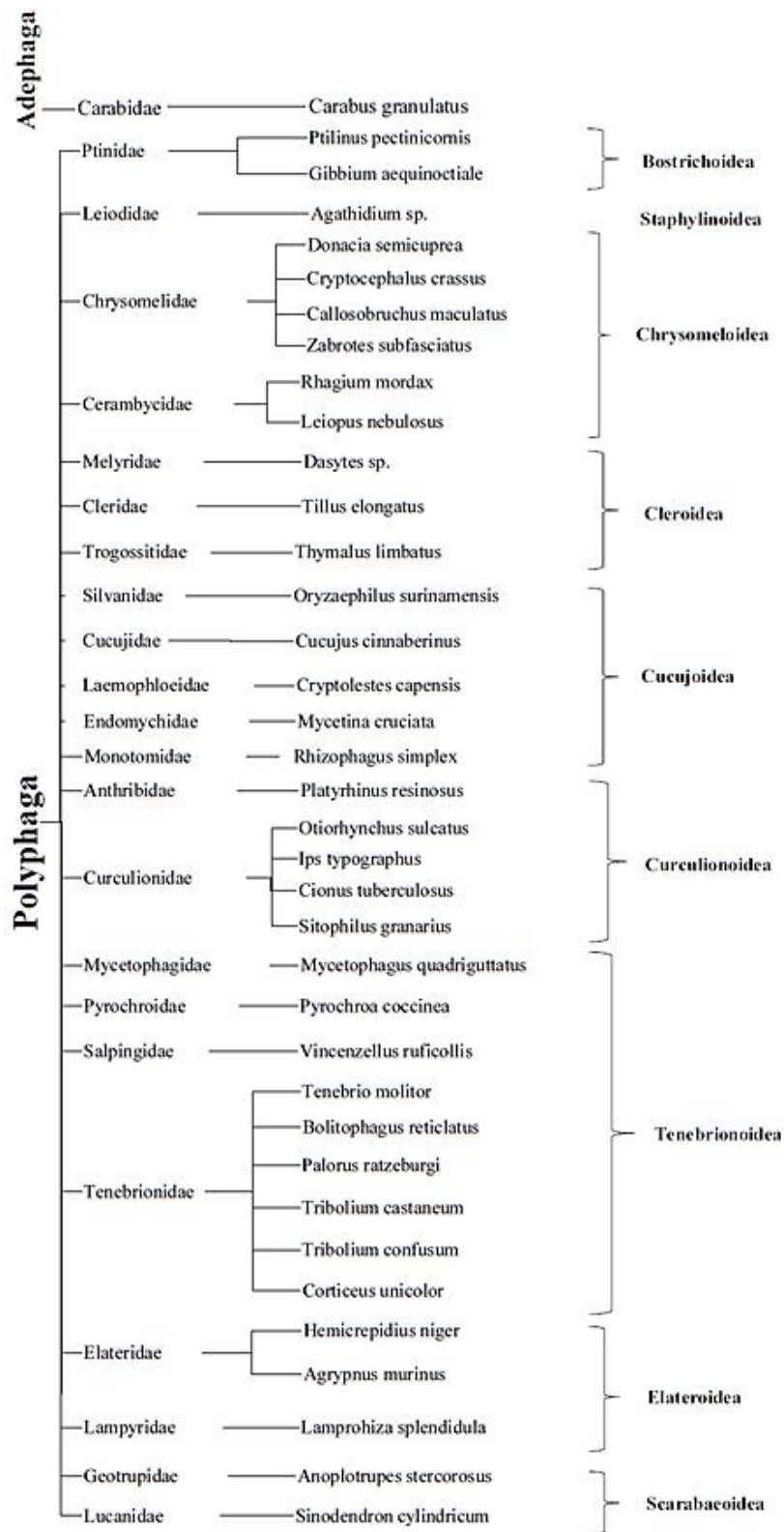
2 Cíl práce

Cílem této práce bylo v rámci řádu Coleoptera detailní mapování výskytu telomerických sekvencí (TTAGG)_n a (TCAGG)_n, a to pomocí kombinace hybridizačních metod dot-blot, Southernova blotu a in situ fluorescenční hybridizace (FISH). Dalším z cílů bylo u vybraných zástupců ověřit funkčnost telomerázového mechanismu pro danou telomerickou sekvenci.

3 Materiál a metody

3.1 Testované druhy brouků

Testované druhy brouků a jejich zařazení do jednotlivých nadčeledí a čeledí je znázorněno na Obrázku 3. Jedná se o brouky nasbírané na území České republiky, převážně v lokalitách poblíž Českých Budějovic. Pro metody hybridizace a TRAP byly nasbírané vzorky zamrazeny v tekutém dusíku a uchovávány v -80 °C pro pozdější zpracování. Pro metodu FISH byly preparáty zhotovovány ze živých vzorků.



Obr. 3: Testování jedinci v rámci řádu Coleoptera. Jde o 36 zástupců z 22 různých čeledí a 9 nadčeledí v rámci početného podřádu Polyphaga a jednoho zástupce z podřádu Adepnaga.

3.2 Zpracování vzorků

3.2.1 Fenol-chloroformová izolace genomové DNA

Genomová DNA byla izolována z celých těl brouků podle standardního protokolu fenol-chloroformové izolace. Každý vzorek byl homogenizován ve 400 µl extrakčním pufru (100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM EDTA, pH 8,0; 0,5 % SDS; 10 µg/ml Rnase A; miliQ H₂O) spolu se 2 µl proteinázy K (800 U/ml). Homogenáty byly zvolna promíchávány v horizontální poloze při 37 °C po dobu cca 12 hodin. Poté bylo ke každému vzorku přidáno 400 µl fenolu a roztoky byly promíchávány na třepačce 30 minut při pokojové teplotě. Následnou centrifugací (5 000 g po dobu 15 minut) byly odděleny tři vrstvy: vrchní vodní fáze obsahující DNA, uprostřed fáze s bílkovinami a vespod organická fáze fenolu. Vrchní fáze byla pipetou s ustríženou špičkou přenesena do nové zkumavky k dalšímu přečištění. Kroky od přidání fenolu až po přenesení vodné fáze do čisté zkumavky byly vždy ještě jednou zopakovány. Pak bylo přidáno k roztoku ve zkumavce přibližně stejné množství fenol-chloroform-izoamylalkoholu (25:24:1), vzorky se nechaly promíchávat v horizontální poloze 15 minut a poté byly centrifugovány (5 000 g, 15 minut). Horní fáze byla za použití pipety opět s ustríženou špičkou přenesena do další nové zkumavky a k ní přidán zhruba stejný objem chloroform-izoamylalkoholu (24:1). Vzorky byly stejně jako v předchozích krocích promíchávány, centrifugovány a fáze s DNA byla přenášena do čisté zkumavky. DNA byla precipitována pomocí octanu sodného, kdy ke vzorku bylo přidáno 0,1 objemu 3M octanu sodného (pH 5,2) a jemným promícháním rukou v horizontálním směru roztok homogenizován, nato byl přidán dvojnásobný objem 100 % etanolu a vzorky byly uloženy přibližně na půl hodiny do -20 °C a poté ihned centrifugovány při 3 000 g na 10 minut za pokojové teploty. Následovalo odstranění supernatantu, přidání asi 400 µl 70 % etanolu, centrifugace za stejných podmínek jako v předchozím kroku a opětovné odstranění supernatantu. Nakonec byl pelet rozpuštěn přidáním 50 µl TE pufru a lehkým protřepáním. Koncentrace a čistota vytěžené DNA byla ověřena elektroforézou a změřena na přístroji Nanodrop (Nanodrop 2000, Thermo Scientific). Takto získané vzorky byly uchovávány v lednici při 4 °C.

3.2.2 Příprava chromosomů

Preparáty chromosomů byly připraveny z gonád dospělých zástupců dle protokolu uvedeném v publikaci Frydrychová a Marec (2002). Gonády byly nejprve podrobeny hypotonickému působení v 0,9 % roztoku citronanu sodného 8-10 minut. Poté byly fixovány

v čerstvě připravené Carnoyově fixáži (96 % etanol, chloroform, kyselina octová v poměru 6:3:1) po dobu 30 minut, fixované tkáně byly rozprostřeny tenkou wolframovou jehlou v kapce 60 % kyseliny octové po ploše podložního sklíčka položeném na vyhřáté desce na 50 °C. Nakonec byly preparáty odvodněné vzestupnou etanolovou řadou (70 %, 90 %, 100 %), a to ponořením vzorku na 30 sekund do každého z etanolových roztoků. Sklíčka s takto připravenými preparáty byla uchovávána při teplotě -20 °C.

3.2.3 Příprava proteinových extraktů

Pro zhodnocení telomerázové aktivity pomocí TRAP assay byly z celých těl brouků získány proteinové extrakty dle Sasaki a Fujiwara (2000). Postup byl následovný: nejprve byl ke každému vzorku přidán desetinásobný objem extrakčního roztoku (10 mM Tris/HCl, pH 7,6; 1 mM EGTA; H₂O; 0,1 mM benzamidine; 5 mM 2-mercaptoethanol; 0,5 % (w/v) Chaps; 10 % (v/v) glycerol; 40 ml Rnase inhibitor), v němž byly poté homogenizovány a uchovávány 30 minut na ledu. Následovala centrifugace homogenátu při 12 000 g po dobu 20 minut při 4 °C. Po jejím dokončení byl odebrán supernatant, ten byl uskladňován v -80 °C pro další využití.

3.3 Příprava hybridizačních sond

3.3.1 Beztemplátová PCR

Pro přípravu telomerických sond (TTAGG)_n a (TCAGG)_n byla provedena beztemplátová PCR za užití Bioer XP cycleru. Primery pro syntézu (TTAGG)_n sondy byly 5'-TAGGTTAGGTTAGGTTAGGT-3' a 5'-CTAACCTAACCTAACCTAAC-3', pro syntézu (TCAGG)_n sondy pak 5'-CAGGTCAGGTCAGGTCAGGTCAGGT-3' a 5'-CTGACCTGACCTGACCTGACCTGAC-3'. Jedna reakce o celkovém objemu 25 µl obsahovala 10 µM forward primer; 10 µM reverse primer; 10x PCR pufr; 10 mM dNTP mix; Taq polymerázu (5 U/ µl). Sled samotných reakcí byl následovný: inkubace při 94 °C na 90 sekund; poté trojice kroků denaturace (45 sekund při 94 °C), nasedání primerů (30 sekund při 52 °C) a elongace (60 sekund při 72 °C) opakována ve 29 cyklech; závěrem inkubace na 10 minut při 72 °C a poté na 1 hodinu při 4 °C. Získaný PCR produkt byl precipitován přidáním 0,1 objemu 3M octanu sodného a dvou objemů 100 % etanolu. Vzorky byly poté inkubovány po dobu 1 hodiny v -80 °C. Pak byl roztok centrifugován při 13 000 rpm na 20 minut při pokojové teplotě, supernatant odstraněn a pelet resuspendován přidáním 50 µl dH₂O.

Koncentrace produktu byla změřena pomocí přístroje Nanodrop a velikost produktu ověřena klasickou elektroforézou na agarózovém gelu. PCR produkty byly využité jak pro značení digoxigeninem, tak pro značení biotinem, v závislosti na navazující použité hybridizační metodě.

3.3.2 Značení sondy digoxigeninem

Pro chemiluminiscenční detekci u Southernovy hybridizace a hybridizace dot-blotu byly získané produkty beztemplátové PCR značeny digoxigeninem. Nejprve byly odebrány 3 µg DNA produktu a dané množství doplněno sterilní vodou na objem 15 µl, následovala denaturace roztoku v 95 °C po dobu 10 minut a okamžité zchlazení na ledu na 3 minuty. Samotná reakce DNA s digoxigeninem o konečném objemu 20 µl následně sestávala z 0,1 objemu hexanucleotide mix (Roche); 0,1 objemu DIG-dNTP mix (Roche) a Klenow enzymu (2 U/µl), roztok byl lehce promíchán a inkubován přes noc ve 37 °C. Druhý den bylo pro zastavení reakce v roztoku přidáno 0,1 celkového objemu 0,2 M EDTA (pH 8,0) a byla provedena precipitace přidáním 0,1 objemu 3 M octanu sodného, následovaná podchlazením v -80 °C na 1 hodinu a centrifugací na 15 minut při 13 000 rpm při pokojové teplotě. Byl odebrán supernatant a k peletu přidáno 50 µl předchlazeného (-20 °C) 70 % etanolu, poté opětovná centrifugace na 15 minut při 13 000 rpm a odebrání supernatantu, získaný pelet byl rozpuštěn přidáním 50 µl TE pufru. Pro kontrolu požadované délky fragmentů 200-500 bp sondy byla provedena elektroforéza. Značené sondy byly uchovávány v mrazáku při -20 °C.

3.3.3 Značení sondy biotinem

Pro fluorescenční detekci metodou FISH byly PCR produkty značené biotinem s využitím BioNick DNA Translation Mix (Roche). Reakční mix sestával z 1 µg produktu beztemplátové PCR, 4 µl BioNick Translation Mix Mixu a reakce byla doplněna vodou na celkový objem 16 µl. Vzniklý roztok byl promíchán a krátce centrifugován (15 000 g, 5 sekund) a 1 hodinu inkubován v 15 °C. Po jedné hodině byla reakce přenesena led a alikvot o objemu 3 µl byl denaturován na 3 minuty v 95 °C, okamžitě zchlazen na ledu na další 3 minuty a pak puštěn na agarózový gel. Jelikož se velikost fragmentů pohybovala v požadovaném rozmezí 200-500 bp, reakce byla zastavena přidáním 1 µl 0,5 M EDTA (pH 8) a inkubována v 65 °C po dobu 10 minut.

Přečištění vzorku od volných nukleotidů bylo provedeno etanolovou precipitací, kdy ke vzorku bylo nejprve přidáno 0,1 objemu 3M octanu sodného (pH 5,2) a dvojnásobný objem 100 % etanolu, vzorky byly pak uloženy přibližně na půl hodiny do -20 °C a poté centrifugovány při 3 000 g na 10 minut za pokojové teploty. Následovalo odstranění supernatantu, přidání asi 100 µl 70 % etanolu a centrifugace byla provedena za stejných podmínek jako v předchozím kroku. Po odstranění supernatantu byla DNA rozpuštěna v 50 µl TE pufru.

3.4 Hybridizační metody

3.4.1 Southern blot

Southernova hybridizace byla provedena v kombinaci se štěpením endonukleázami RsaI a HinfI, stejně jako v publikaci Frydrychová a Marec (2002). Použity byly vzorky genomové DNA získané fenol-chloroformovou izolací. Každá restriční reakce obsahovala 1000 ng DNA; 1x NEBuffer 2; restriční enzymy v poměru 1:1 RsaI (200 U/20µl; NEB) a Hinf I (200 U/20µl; NEB) a byla doplněna vodou na objem 20 µl, následovala inkubace na 1 hodinu při 37 °C.

Vzorky byly po restričním štěpení separovány elektroforézou na 1 % (w/v) agarosovém gelu. Po doběhnutí elektroforézy byl gel ponořen do 0,25 M HCl, poté opláchnut destilovanou vodou a přenesen na 2 x 15 minut do denaturačního roztoku (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl). Posléze byl znovu opláchnut destilovanou vodou a ponořen na 2 x 15 minut do roztoku neutralizačního (0,5 M Tris-HCl; 3 M NaCl; pH 7,5). Po uplynutí intervalu byl gel (jamky dnem vzhůru) položen na můstek tvořený navlhčeným filtračním papírem za použití 20x SSC (3 M NaCl; 0,3 M Sodium citrate; pH 6,4), okraje gelu byly obloženy parafilmem, aby se zabránilo případnému vzlínání pufru vně membrány. Na gel byla pak položena membrána Hybond N+ předvlhčená vodou (Amersham Biosciences), na ní byly položeny dva kusy filtračního papíru (předvlhčené v 20x SSC) stejného rozměru jako gel a nahoru byla umístěna 6-10 cm silná vrstva buničiny téhož rozměru. Absorbentní vrstva byla shora zatížena deskou a závažím, do misky bylo nalito 20x SSC, tak aby hladina téměř dosahovala horního okraje můstku. Takto sestavená přenosová soustava umožnila přenos DNA fragmentů z gelu na membránu během přibližně 12 hodin.

Druhý den byla soustava rozebrána, gel odstraněn z membrány a membrána volně promývaná v 6x SSC po dobu 5 minut. Osušená membrána byla fixována ve Stratagene UV

crosslinkeru (120 mJ) a pak znovu opláchnuta v 2x SSC. Prehybridizace byla provedena ponořením membrány do DIG Easy Hyb roztoku (Roche) přehřátého na 52 °C na jednu hodinu za mírného třepání právě při 52 °C. Mezitím byl připraven hybridizační roztok za použití 1,5 µl sondy (TTAGG i TCAGG) značené digoxigeninem v 50 µl vody, roztok byl denaturován v 95 °C na 5 minut, pak rychle zchlazen na ledu, a nakonec smíchán spolu s 6,5 ml čerstvého přehřátého (52°C) Dig Easy Hyb. Po uplynutí jedné hodiny byl odstraněn prehybridizační roztok a nahrazen připraveným roztokem hybridizačním, membrána v něm byla promývána po dobu 3 hodin.

Dalším krokem bylo promytí membrány na 2 x 5 minut při pokojové teplotě ve Stringent wash buffer I (2x SSC; 0,1 % SDS) za mírného třepání a hned poté v přehřátém Stringent wash buffer II (0,2x SSC; 0,1 % SDS) na 68 °C po dobu 15-20 minut. Následovalo další promytí membrány ve 100 ml čerstvě připraveného 1x Washing buffer (0,3 % Tween v 1x TBS) opět při pokojové teplotě a za mírného třepání. Pak byla membrána inkubována 30 minut ve 100 ml čerstvého blokovacího roztoku (5 % odtučněného sušeného mléka v 1x TBS) a dále v 50-100 ml pracovního roztoku Anti-DIG-AP (1 µl anti-DIG/10 ml blokovacího roztoku; Roche) také 30 minut. Navazující inkubace ve 100 ml 1x Detection buffer (1M Tris-HCl; 1 M NaCl) trvala 2-5 minut, poté byl roztok odstraněn a membrána lehce osušena filtračním papírem. Potom byla membrána uložena do hybridizačního sáčku, na ní nanášeny asi 3 ml roztoku substrátu CDP-Star (Roche) a membrána byla inkubována ve tmě přibližně jednu hodinu. Poté byly chemiluminiscenční signály zdokumentovány pomocí CCD kamery LAS-3000. Pozitivní kontrolou byl *Ips typographus*, u kterého byla detekována telomerická sekvence (TTAGG)_n (Sahara et al., 1999). Obrázky byly následně upraveny v programu PhotoFiltre 7, jelikož se jednalo o sérii několika membrán, obrázky byly spojeny v jeden.

3.4.2 Dot blot

Mimo Southernova blotu byl zároveň jako obdobná hybridizační metoda proveden dot blot. Ze vzorků genomové DNA bylo nejprve odebráno 1000 ng DNA a dané množství bylo doplněno vodou vždy na 20 µl celkového objemu. Tímto způsobem připravená DNA byla denaturována v teplotě 95 °C na 5 minut a pak okamžitě přenesena na led. Denaturovaná DNA byla pipetou nanášena na čistou membránu Hybond N+ a vzorky byly na membráně fixovány pomocí Stratagene UV crosslinkeru nastaveného na hodnotu 120 mJ. Následující kroky

prehybridizace, hybridizace a chemiluminiscenční detekce byly totožné s metodou Southernova blotu (kapitola 3.4.1).

3.4.3 Fluorescenční in-situ hybridizace (FISH)

Nejprve byl připraven hybridizační mix se sondou. Komponenty jedné reakce (pro jedno sklíčko) byly 5 μ l sondy (~250 ng/ μ l), 1 μ l lososích spermií (250 μ g/ml), 2 μ l 3 M acetátu sodného, 50 μ l 100 % etanolu, 16 μ l vody. Následovala inkubace v -80 °C na 1 hodinu. Po uplynutí jedné hodiny byla sonda centrifugována při 4 °C 21 000 rpm 30 minut. Supernatant byl pak odstraněn, k peletu přidáno 100 μ l 70 % etanolu a roztok znovu centrifugován při 13 000 rpm 10 minut. Supernatant byl opět odstraněn, pelet vysušen a poté rozpuštěn v 10 μ l hybridizačního mixu (50 % formamid, 2x SSC, 10 % dextran sulfát, 1 % Tween 20). Takto získaná sonda byla rovnou použita na samotnou FISH.

Preparáty chromozomů byly inkubovány v 2x SSCT (2x SSC, 0,1 % Tween-20) na 20 minut při 37 °C, pak následovala jejich denaturace v 70 % formamidu/ 2x SSCT (pH 7) na 10 minut při 75 °C a mezitím byla denaturována zároveň sonda (5 minut při 95 °C, 3 minuty na ledu). Po uplynutí 10 minut byla sklíčka s preparáty vyndána z denaturačního roztoku, lehce osušena a ihned na bylo každé naneseno 10 μ l připravené sondy, poté byly preparáty zakryty krycím sklíčkem, které bylo upevněno gumovým cementem. Hybridizace probíhala alespoň 12 hodin ve vlhké komůrce při 37 °C.

Následovně byla sklíčka opláchnuta v roztoku 50 % formamidu/ 2x SSC (pH 7) při 45 °C na 4x5 minut. Poté promyta v roztoku 2x SSCT při 37 °C na 4 x 2 minuty, a nakonec v roztoku 4x SSCT (4x SSCT, 0,1 % Tween-20) na 5 minut při pokojové teplotě. Následovalo blokování přidáním 500 μ l 2,5 % BSA na každé sklíčko a jeho působení 10 minut při pokojové teplotě, poté detekce nanesením 100 μ l streptavidinu-Cy3 (1 μ l streptavidin-Cy3 v 1 ml 2,5 % BSA) na každé sklíčko, přiložení krycího sklíčka a inkubace na 1 hodinu. Po uplynutí jedné hodiny byla sklíčka s preparáty opláchnuta v roztoku 4x SSCT na 3 x 5 minut při pokojové teplotě. Pro zesílení signálu bylo na každé sklíčko naneseno 500 μ l 2,5 % BSA a vzorky byly inkubovány při pokojové teplotě ve tmě 10 minut. Poté byl vzorek inkubován s 50 μ l biotinem značeným anti-streptavidinem ve tmě při 37 °C po dobu jedné hodiny s přiloženým krycím sklíčkem a následně opláchnuto v 4x SSCT při pokojové teplotě 3 x 5 minut. Preparáty byly znovu blokovány 500 μ l 2,5 % BSA po dobu 10 minut při pokojové teplotě a poté na ně bylo jednotlivě naneseno 100 μ l streptavidin-Cy3 s dobou působení jedné hodiny. Nakonec byla

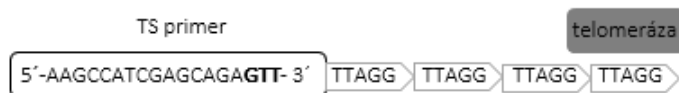
sklíčka opláchnuta 4x SSCT na 3 x 5 minut, po čemž následovalo barvení chromozomů DAPI (koncentrace 0,5 mg/ml), jako montážní médium bylo použito DABCO (1 μ l DAPI + 60 μ l DABCO na každé sklíčko). Preparáty byly přikryty krycím sklem, které bylo k podložnímu sklu fixováno průhledným lakem. Preparáty byly pozorovány fluorescenčním mikroskopem Zeiss Axioplan 2 microscope, snímky byly pořízeny CCD kamerou (F-view, Soft Imaging System GmbH, Münster, Germany) v černo-bílém rozlišení a následně obarveny v programu Adobe Photoshop CS4 (light blue pro DAPI, red pro Cy3).

3.5 TRAP assay

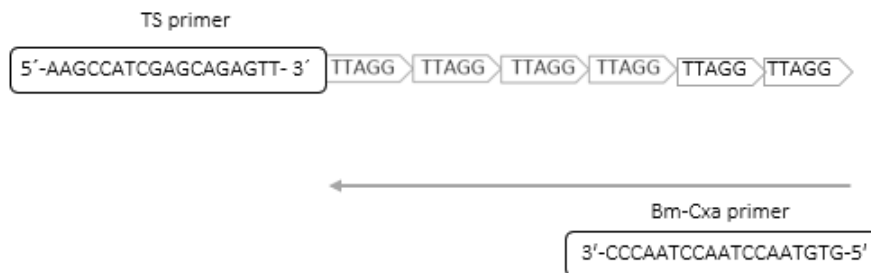
K určení aktivity telomerázy specifické k (TTAGG)_n sekvenci byla využita modifikovaná qRT-PCR zvaná TRAP (telomerase repeat amplification protocol) dle Korandová et al. (2014). Obecný princip metody je popsán v publikaci Fajkus (2006) a její schéma je znázorněno na Obrázku 4. Metoda spočívá v amplifikaci produktů telomerázy pomocí PCR. Použitý TS forward primer (5'-AAGCCATCGAGCAGAGTT-3') slouží jako substrát pro telomerázu, která tento primer prodlužuje o repetice (TTAGG)_n. Počet přidávaných repetit je kvantifikován pomocí qReal-time PCR, a to pomocí kombinace TS primeru a Bm-CXa reverse primeru (5'-GTGTAACCTAACCTAACCC-3'). Reakční roztok o celkovém objemu 25 μ l sestával z 5 μ g proteinového extraktu; 0,5 μ l (100 pmol/ μ l) TS primeru; 0,5 μ l (100 pmol/ μ l) Bm-CXa primeru; 12,5 μ l Xceed qPCR SG 2x Mix (IAB); doplněno vodou na příslušný objem. Reakce probíhají na 96-jamkových mikrotitračních destičkách v duplikátech v cycleru CFX96 BioRad Real-time PCR systém. Elongace telomerázou probíhá při inkubaci při teplotě 30 °C po dobu 60 minut. Reakční profil je 30 sekund při 95 °C, 90 sekund při 60 °C, 35 cyklů. Zaznamenávají jsou ct-hodnoty (cycle of threshold, tzn. cyklus, kdy dochází k exponenciálnímu nárůstu fluorescence nad hranici pozadí reakce). Jako negativní kontrola byl vzorek s inaktivovanou telomerázou štěpením s 1 μ g/ μ l DNase-free ribonuclease A (působení při 37 °C na 20 minut).

1. Extenze TS primeru telomerickými repeticemi pomocí telomerázy (30 °C, 60 minut inkubace)

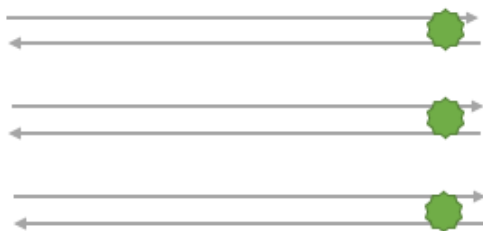
-na tučně zvýrazněnou sekvenci nasedá telomeráza



2. Syntéza komplementárního řetězce za užití Bm-CXa primeru



3. PCR amplifikace a akumulace fluorescenčního signálu



Obr. 4: Jednoduché schéma průběhu TRAP assay.

4 Výsledky

V rámci mé bakalářské práce bylo odchyceno a zpracováno celkem 37 druhů brouků (Tabulka II), nicméně vzhledem k omezenému množství některých zástupců ne všechny vybrané druhy byly podrobeny všem analýzám. Výsledky distribuce telomerických sekvencí byla sledována na podkladě fylogenetického stromu získaného z publikace Hunt et al. (2007). Celá jména zástupců jsou uvedena na Obrázku 2 (kapitola 3.1).

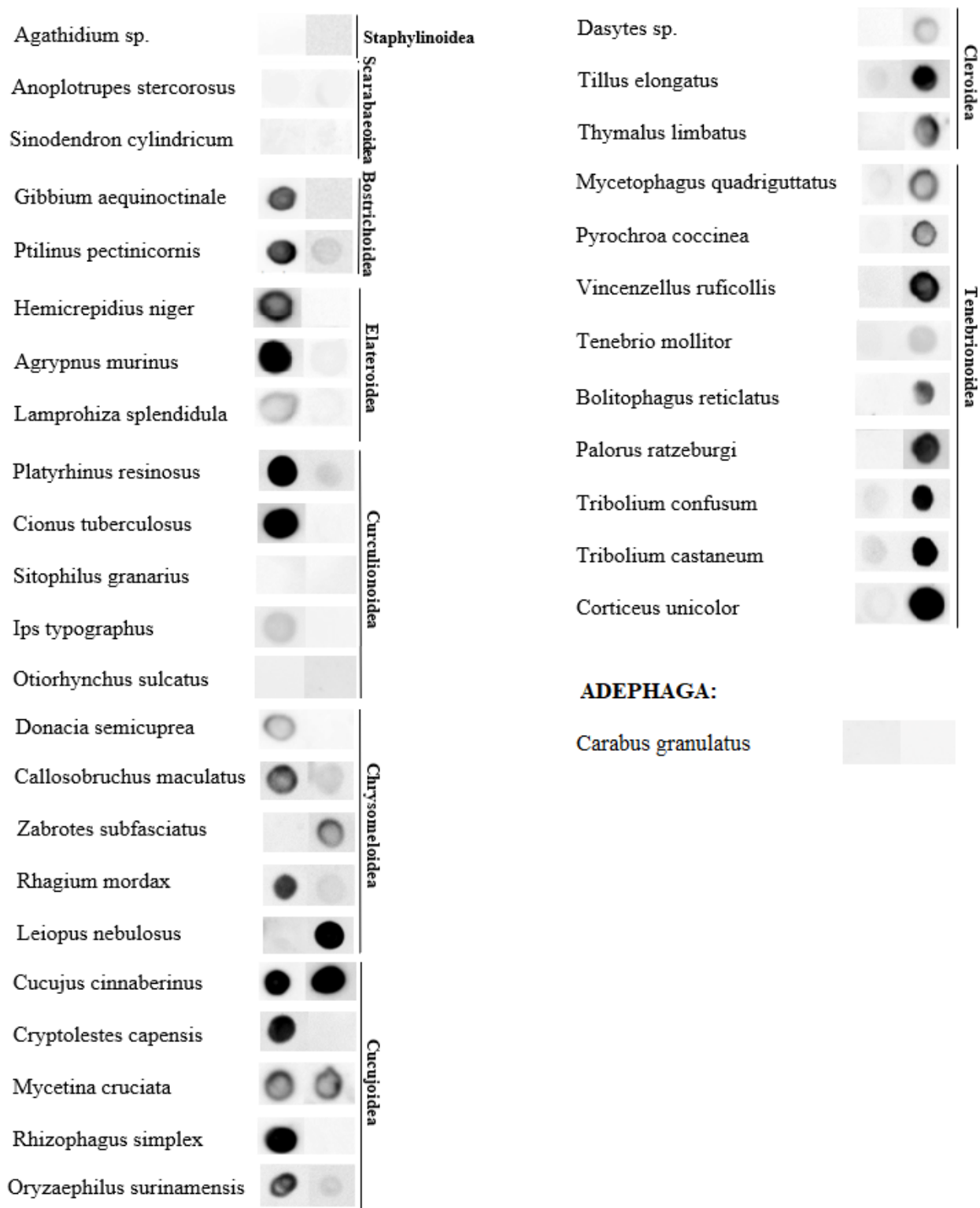
Tab. II: Seznam testovaných druhů brouků na přítomnost TTAGG/TCAGG telomerické sekvence.
Vysvětlivky: (+) značí pozitivní signál, (-) značí negativní signál, a = testováno metodou TRAP, b = testováno metodou southern blot, c = testováno metodou dot blot, d = testováno metodou FISH.

PODRÁD	NADČELEŘ	ČELEŘ	DRUH	(TTAGG) _n	(TCAGG) _n
Adephaga		Carabidae	<i>C. granulatus</i> ^{c, d}	(-)	(-)
Polyphaga	Staphylinoidea	Leiodidae	<i>Agathidium</i> sp. ^{a, b, c}	(-)	(-)
	Scarabaeoidea	Geotrupidae	<i>A. stercorosus</i> ^{a, b, c, d}	(-)	(-)
		Lucanidae	<i>S. cylindricum</i> ^{a, b, c}	(-)	(-)
	Bostrichoidea	Ptinidae	<i>P. pectinicornis</i> ^{a, b, c}	(+)	(-)
			<i>G. aequinoctinale</i> ^{b, c}	(+)	(-)
	Elateroidea	Elateridae	<i>H. niger</i> ^{a, b, c}	(+)	(-)
			<i>A. murinus</i> ^{a, b, c}	(+)	(-)
		Lampyridae	<i>L. splendidula</i> ^{a, b, c}	(+)	(-)
	Curculionoidea	Anthribidae	<i>P. resinosus</i> ^{a, b, c}	(+)	(-)
		Curculionidae	<i>C. tuberculosus</i> ^{a, c}	(+)	(-)
			<i>S. granarius</i> ^{b, c, d}	(-)	(-)
			<i>I. typographus</i> ^{a, b, c, d}	(+)	(-)
			<i>O. sulcatus</i> ^{c, d}	(-)	(-)
	Chrysomeloidea	Chrysomelidae	<i>D. semicuprea</i> ^{a, b, c}	(+)	(-)
			<i>C. crassus</i> ^{a, b}	(+)	(-)
			<i>C. maculatus</i> ^{b, c}	(+)	(-)
			<i>Z. subfasciatus</i> ^{b, c}	(-)	(+)
		Cerambycidae	<i>R. mordax</i> ^{a, c}	(+)	(-)
			<i>L. nebulosus</i> ^{a, b, c}	(-)	(+)
	Cucujoidea	Silvanidae	<i>O. surinamensis</i> ^c	(+)	(-)
		Cucujidae	<i>C. cinnaberinus</i> ^{b, c}	(+)	(+)
			<i>C. capensis</i> ^{a, b, c}	(+)	(-)
		Endomychidae	<i>M. cruciata</i> ^{a, c}	(+)	(+)

	Monotomidae	<i>R. simplex</i> ^{a, c}	(+)	(-)
Cleroidea	Melyridae	<i>Dasytes</i> sp. ^{a, c}	(-)	(+)
	Cleridae	<i>T. elongatus</i> ^{b, c}	(-)	(+)
	Trogossitidae	<i>T. limbatus</i> ^{b, c}	(-)	(+)
Tenebrionoidea	Mycetophagidae	<i>M. quadriguttatus</i> ^{a, b, c}	(-)	(+)
	Pyrochroidae	<i>P. coccinea</i> ^{a, b, c}	(-)	(+)
	Salpingidae	<i>V. ruficollis</i> ^{b, c}	(-)	(+)
	Tenebrionidae	<i>T. castaneum</i> ^{b, c}	(-)	(+)
		<i>T. confusum</i> ^{b, c}	(-)	(+)
		<i>T. mollitor</i> ^{b, c, d}	(-)	(+)
	<i>P. ratzeburgi</i> ^{b, c}	(-)	(+)	
	<i>B. reticulatus</i> ^{b, c}	(-)	(+)	
	<i>C. unicolor</i> ^{a, b, c}	(-)	(+)	

4.1 Distribuce (TTAGG)_n a (TCAGG)_n sekvencí pomocí dot – blot hybridizace

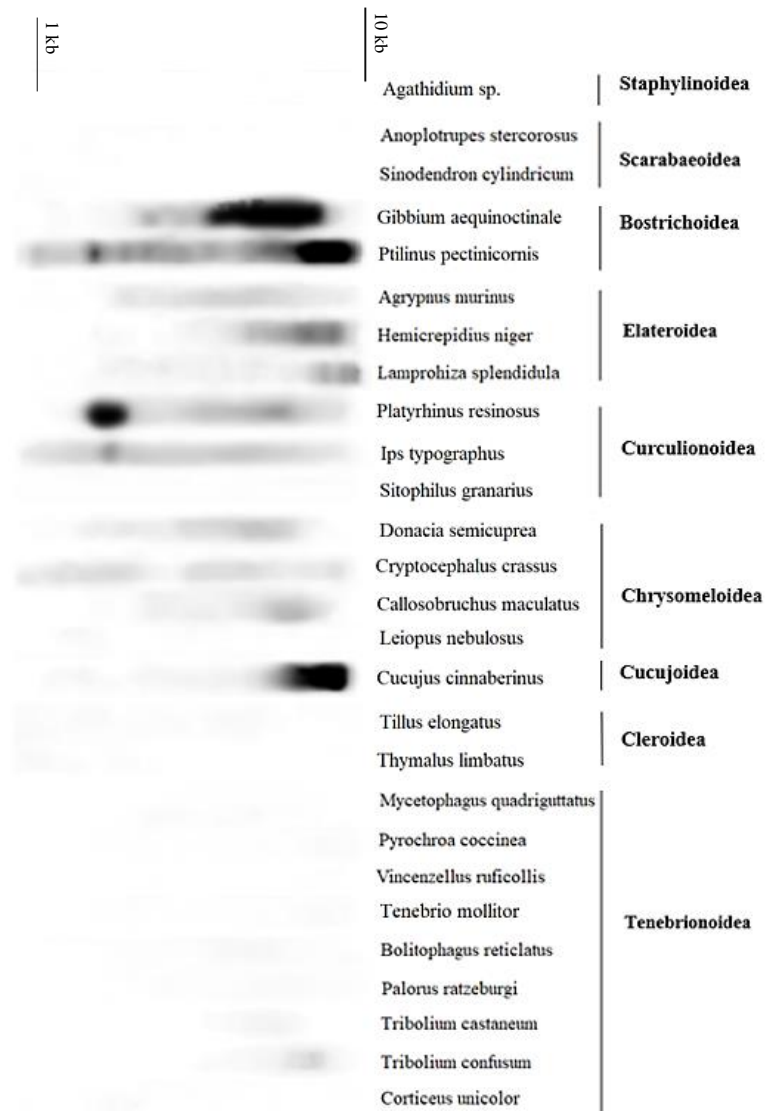
První experimenty v rámci mé bakalářské práce byly prováděny pomocí hybridizační metody dot-blot. Touto metodou bylo otestováno celkem 36 vzorků, přičemž každý ze vzorků byl podroben jak testu s (TTAGG)_n sondou, tak s (TCAGG)_n sondou (Obrázek 5). Co se týče podřádu Polyphaga, u prvních dvou nadčeledí – Staphylinoidea a Scarabaeoidea nebyla detekována ani jedna z testovaných telomerických sekvencí. Naproti tomu Bostrichoidea a Elateroidea vykazují pozitivitu pro (TTAGG)_n u všech testovaných zástupců a nepřítomnost sekvence (TCAGG)_n. U Curculionoidea nebyla sekvence (TCAGG)_n nalezena, kdežto sekvence (TTAGG)_n byla detekována u třech z pěti testovaných zástupců (*P. resinosus*, *C. tuberculosus* a *I. typographus*), u dvou zástupců (*S. granarius* a *O. sulcatus*) je tedy sekvence neznámá. U nadčeledí Chrysomeloidea a Cucujoidea byly detekovány hybridizační signály obou sekvencí, u zástupců *C. cinnaberinus* a *M. cruciata* byly oba tyto hybridizační signály o stejné intenzitě. Zástupci Cleroidea a Tenebrionoidea naopak konzistentně vykazují ztrátu sekvence (TTAGG)_n a její náhradu sekvencí (TCAGG)_n.



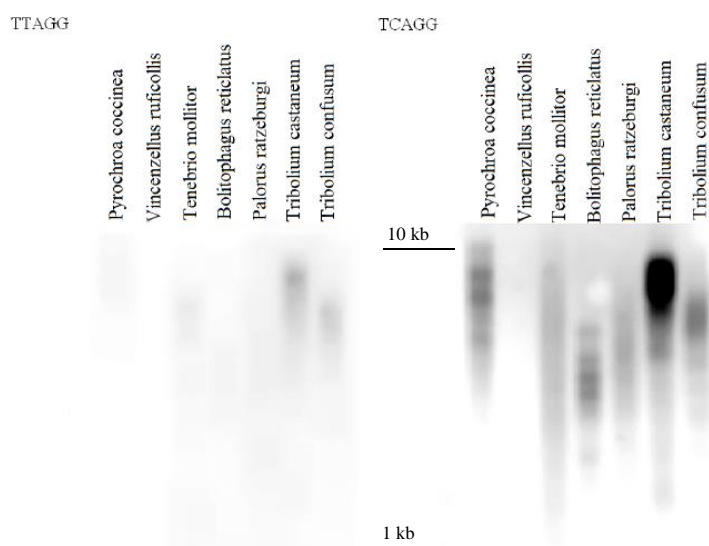
Obr. 5: Série výsledků z hybridizace dot-blot. První z dvojice hybridizačních signálů je vždy pro telomerickou sekvenci (TTAGG)_n, druhý pro (TCAGG)_n. Svislá čára označuje jednotlivé nadčeledi brouků podřádu Polyphaga, jako poslední v řadě je uveden zástupce z podřádu Adephaga *C. granulatus*.

4.2 Southern blot

Metodou navazující na dot-blot hybridizaci byl Southernův blot, který byl prováděn jednak pro potvrzení výsledků dot-blot hybridizace, ale zejména pro zjištění charakteru hybridizačních signálů. V prvním kroku byla hybridizace provedena se sondou (TTAGG)_n, a to u 27 získaných druhů brouků z 9 různých nadčeledí (Obrázek 6). Kromě některých zástupců Tenebrionoidea, odpovídala přítomnost či nepřítomnost sekvence výsledkům získaným pomocí metody dot-blot. Charakter a distribuce hybridizačních signálů má široký rozsah (od přibližně 50 kb do 1 kb) telomerických délek u většiny testovaných zástupců. Výjimku tvoří *P. resinosus*, u kterého je většina hybridizačního signálu lokalizovaná do oblasti kolem 25 kb a *C. cinnaberinus*, jehož hybridizační signály jsou naopak lokalizovány do oblasti kolem 50 kb. Někteří zástupci z nadčeledi Tenebrionoidea (*P. coccinea*, *V. ruficollis*, *T. mollitor*, *B. reticulatus*, *P. ratzeburgi*, *T. confusum*, *T. castaneum*) překvapivě vykázali (TTAGG)_n pozitivitu, a to navzdory již publikovaným výsledkům (Mravinač et al., 2011). Z toho důvodu jsem u těchto druhů Southernovu hybridizaci provedla i se sondou (TCAGG)_n, kdy hybridizace s oběma sondami byla prováděna paralelně v rámci jednoho experimentu (Obrázek 7). Porovnáním výsledků je patrné, že charakter hybridizačních signálů (tj. distribuce signálu) u obou sond je obdobný, nicméně intenzita signálu u sondy (TTAGG)_n je výrazně slabší, což patrně naznačuje nespecifické nasedání v případě sondy.



Obr. 6: Série southern blotů. Vzorky po hybridizaci s (TTAGG)_n sondou. Svislá čára označuje jednotlivé nadčeledi.

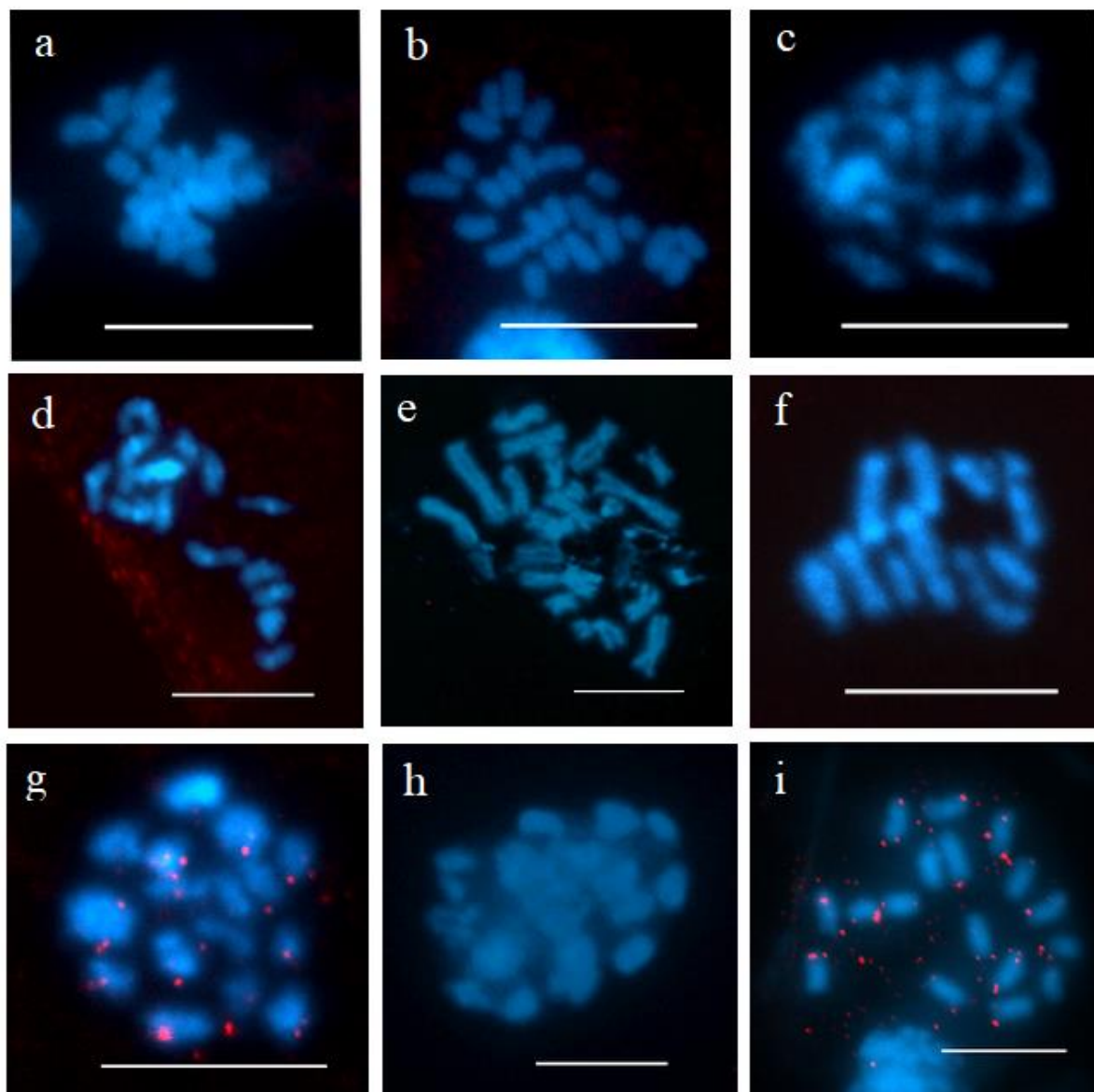


Obr. 7: Southern blot pro porovnání hybridizačních signálů. Vzorky zástupců z nadčeledi Tenebrionoidea byly hybridizovány nejprve s (TTAGG)_n sondou (vlevo) a poté s (TCAGG)_n sondou (vpravo).

4.3 FISH

Hybridizační metody byly na závěr doplněny metodou FISH, pomocí níž se dá blíže rozhodnout, zda hybridizační signály lze charakterizovat jako telomerické, případně subtelomerické, či se naopak jedná o signály mimo oblast telomer. Metoda FISH byla provedena s oběma sondami, ale z důvodu nedostupnosti materiálu jen u několika vybraných zástupců: *C. granulatus*, *A. stercorosus*, *T. mollitor*. U druhů *I. typographus*, *O. sulcatus* a *S. granarius* byla FISH provedena pouze se sondou (TTAGG)_n (Obrázek 8).

Pro obě testované telomerické sekvence byli negativní *C. granulatus* (Adephaga, Carabidae) a *A. stercorosus* (Polyphaga, Scarabaeoidea). Zástupci nadčeledi Curculionoidea *S. granarius* a *O. sulcatus* testování pouze na přítomnost (TTAGG)_n byli taktéž negativní, naproti tomu u *I. typographus* ze stejné nadčeledi byly (TTAGG)_n hybridizační signály na konci chromozomů detekovány. Zástupce *T. mollitor* (Tenebrionoidea) pak vykazoval hybridizační signály s (TCAGG)_n sondou v oblasti telomer a absence hybridizačních signálů v případě sondy (TTAGG)_n u tohoto zástupce dosvědčuje nespecifické nasedání sondy u hybridizačních metod dot-blot a Southernův blot.



Obr. 8: FISH chromozomových preparátů z gonád dospělých brouků, hybridizované s $(TTAGG)_n$ i $(TCAGG)_n$ sondami (červené hybridizační signály), chromozomy barvené DAPI (modré), měřítko 10 μm . **(a)** *Anoplotrupes stercorosus*, metafázní bivalenty bez hybridizačního signálu $(TTAGG)_n$. **(b)** *Anoplotrupes stercorosus* metafázní bivalenty ($2n=24$) bez hybridizačního signálu $(TCAGG)_n$. **(c)** *Carabus granulatus* diplotene, chromozomy bez hybridizačního signálu $(TTAGG)_n$. **(d)** *Carabus granulatus* prometafáze, chromozomy bez hybridizačního signálu $(TCAGG)_n$. **(e)** *Sitophilus granarius* metafázní chromozomy bez hybridizačního signálu $(TTAGG)_n$ sondy. **(f)** *Otiorhynchus sulcatus* prometafáze, bez hybridizačního signálu $(TTAGG)_n$ sondy. **(g)** *Ips typographus* diakineze, s hybridizačními signály $(TTAGG)_n$ sondy na konci chromozomů. **(h)** *Tenebrio mollitor* jádro ve fázi pachytene, bez hybridizačního signálu $(TTAGG)_n$ sondy. **(i)** *Tenebrio molitor* metafáze ($n=17$), s hybridizačními signály $(TCAGG)_n$ sondy na konci chromozomů.

4.4 TRAP

Posledním z cílů práce bylo ověřit funkčnost telomerázového mechanismu pro danou sekvenci. Z důvodu nedostatku materiálu byla metoda prováděna pouze se zaměřením na sekvenci (TTAGG)_n. Přítomnost či nepřítomnost aktivity telomerázy byla určena na základě přítomnosti/nepřítomnosti ct-hodnoty. Ačkoliv jedním z původních plánů bylo ověření specifčnosti reakce k dané sekvenci zaklonováním a osekvenováním produktů TRAP, z důvodu technických obtíží nebyla tato část práce finalizovaná. Nicméně výsledky, které jsem touto metodou získala (Tabulka III), plně odrážejí výsledky získané hybridizačními metodami.

Tab. III: Výsledky analýzy TRAP pro jednotlivé druhy brouků, (+) značí aktivní telomerázu k sekvenci (TTAGG)_n, (-) značí inaktivní/absentní (TTAGG)_n specifickou telomerázu.

NADČELEĎ	DRUH	(TTAGG) AKTIVITA TELOMERÁZY
Staphylinoidea	Agathidium sp.	(-)
Scarabaeoidea	Anoplotrupes stercorosus	(-)
	Sinodendron cylindricum	(-)
Bostrichoidea	Ptilinus pectinicornis	(+)
Elateroidea	Hemicrepidius niger	(+)
	Agrypnus murinus	(+)
	Lamprohiza splendidula	(+)
Curculionoidea	Platyrhinus resinosus	(+)
	Ips typographus	(+)
	Cionus tuberculosus	(+)
Chrysomeloidea	Donacia semicuprea	(+)
	Cryptocephalus crassus	(+)
	Rhagium mordax	(+)
	Leiopus nebulosus	(-)
Cucujoidea	Mycetina cruciata	(+)
	Rhizophagus simplex	(+)
Cleroidea	Dasytes sp.	(-)
Tenebrionoidea	Mycetophagus quadriguttatus	(-)
	Pyrochroa coccinea	(-)
	Corticeus unicolor	(-)

5 Diskuze

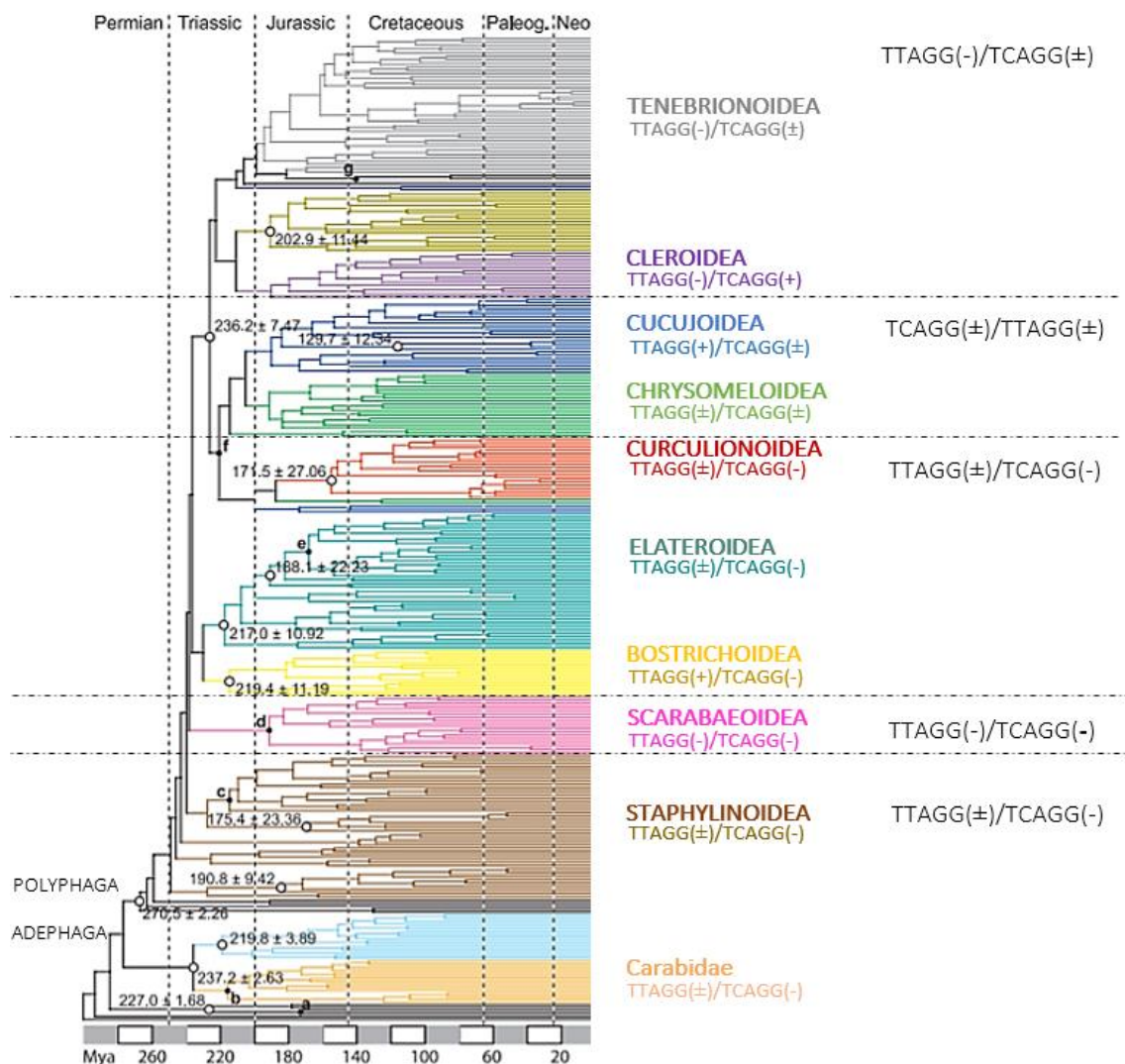
Tato práce navazuje na již několik publikovaných studií zaměřených na telomerickou sekvenci u řádu brouků (např. Okazaki et al., 1993; Sahara et al., 1999; Frydrychová a Marec, 2002; Vítková et al., 2005; Mravinač et al., 2011). První zástupci brouků se objevili zhruba před 285 miliony let a představují tak velmi starobylou a heterogenní skupinu hmyzu zahrnující přes 400 000 popsaných druhů, úspěšně obývajících různé biotopy (Hunt et al., 2007). I přes jejich obrovskou diverzitu u nich byla objevena pro hmyz společná ancestrální telomerická sekvence (TTAGG)_n (Vítková et al., 2005), nicméně jak se jeví na základě předcházejících studií a taktéž mých výsledků, tato sekvence byla v evoluci brouků mnohokrát ztracena a nahrazena buď sekvencí (TCAGG)_n nebo dosud neznámým telomerickým motivem (Frydrychová a Marec, 2002; Mravinač et al., 2011). Jak bylo prokázáno v předešlé studii (Korandova et al. 2014) a v souladu s mými výsledky z TRAP analýzy, tato sekvence je pravděpodobně součástí dosud funkčního telomerázového systému specifického k sekvenci (TTAGG)_n, a není tedy jen pouhým nefunkčním evolučním reliktem po ztraceném typu telomerázy a její telomerické sekvenci.

Pro interpretaci mých výsledků lze získaná data rozšířit o výsledky již publikované (Tabulka I) a o genomová data poskytnutá Mgr. Vratislavem Peškou, PhD. (Biofyzikální ústav AV ČR v Brně) zahrnutá v příloze (Tabulka IV). Ucelené údaje jsem pak zasadila do kladogramu brouků (Obrázek 9) z publikace Hunt et al. (2007).

Fylogeneticky nejstarší čeledí z mnou testovaných brouků je Carabidae, s tím, že na základě mých výsledků se konzistentně jeví, že tato čeleď spolu s nadčeleděmi Staphylinoidea a Scarabaeoidea (Polyphaga) postrádá obě testované telomerické sekvence (Tabulka II). Naproti tomu, většina zástupců zahrnutých v genomové databázi (Tabulka IV) ze skupin Carabidae a Staphylinoidea vykazuje přítomnost (TTAGG)_n ve svých genomech a lze diskutovat buďto o různorodosti telomerické sekvence v rámci daných skupin, případně o kvalitě genomových dat. Scarabaeoidea v souladu s mými výsledky v genomové databázi vykazují negativitu.

U dvou mladších a blízkce příbuzných větví Bostrichoidea a Elateroidea (dále jen Polyphaga) byla detekována přítomnost hmyzího (TTAGG)_n pentameru, nicméně u několika zástupců Elateroidea (*Photinus pyralis*, *Photinus sabulosus*) zanesených v genomové databázi došlo ke ztrátě této repeticity a u nadčeledi Curculionoidea tento trend volně navazuje (zde testování *S. granarius* a *O. sulcatus*; z databáze *Anthonomus grandis*, *Dendroctonus*

ponderosae postrádající tuto sekvenci). U nadčeledí Chrysomeloidea a Cucujoidea tak lze pozorovat nepravidelnou distribuci obou telomerických sekvencí, objevuje se zde totiž i novější (TCAGG)_n telomerická sekvence (u zástupců *C. cinnaberinus* a *M. cruciata* jsou pravděpodobně obě sekvence zároveň). Nepravidelnost distribuce zřejmě souvisí s vysokou mírou diverzifikace těchto skupin brouků. A nakonec dvě z nejmladších nadčeledí Cleroidea a Tenebrionoidea charakterizuje telomerická sekvence (TCAGG)_n (data této studie; Mravinač et al. 2011), nicméně lze si všimnout (Tabulka IV), že ne zcela všichni zástupci Tenebrionoidea ji vykazují (např. *Gridelliopus subsquamosus*, *Melambius mideltensis*).



Obr. 9: Kladogram převzatý z publikace Hunt et al. (2007), upravený a doplněný o testované druhy v zastoupení příslušných nadřádů, resp. čeledi v případě Carabidae, a jejich telomerické sekvence (barevně odlišené větve symbolizují umístění skupin v kladogramu). Přerušované vodorovné čáry oddělují skupiny lišící se v distribuci telomerických sekvencí (TTAGG)_n a (TCAGG)_n psané vpravo vždy černě, (-) značí absenci dané sekvence, (+) značí přítomnost dané sekvence, (±) poukazuje na obojetné signály v rámci dané skupiny. Čísla odkazují na stáří jednotlivých čeledí v milionech let.

Telomerická hmyzí sekvence (TTAGG)_n je považovaná za ancestrální telomerickou sekvenci pro členovce, nicméně, jak je doloženo příkladem brouků, míra distribuce této sekvence nemusí být v rámci hmyzu, či dokonce celých členovců, tak rozšířená, jak se dosud předpokládá. Vzhledem ke zcela zásadnímu postavení telomer v biologii buňky, lze spekulovat o tom, jakým způsobem je umožněn přechod od jednoho telomerického typu k druhému, aniž by to buňce a danému organismu přinášelo fatální následky. Jednou z možností je paralelní či občasné využívání alternativních mechanismů (Čapková Frydrychová a Mason, 2013). Příkladem může být amplifikace subtelomerických elementů vyskytující se u kvasinek (Lundblad a Blackburn, 1993) nebo genová konverze, která je jako záložní mechanismus popsána u člověka, *D. melanogaster* či rostlin rodu *Cestrum* (Dlaska et al., 2013; Čapková et al., 2009; Fajkus et al., 2005). Alternativu retrotranspozice pak reprezentuje nejen zástupce motýlů *B. mori* (Sasaki a Fujiwara, 2000), ale i zde testovaný brouk *T. castaneum* (Osanai-Futahashi a Fujiwara, 2011). Zároveň je tedy nutné na tomto místě podotknout, že detekovaná telomerická sekvence (TTAGG)_n/(TCAGG)_n hybridizačními metodami ještě nemusí nutně znamenat aktivní telomerázu (vyjma potvrzených druhů v rámci TRAP). Ve hře je nepochybně několik dosud neobjevených způsobů udržování telomer či kombinací způsobů již objevených.

Všechny tyto poznatky svádí k ideji, že by bylo nesporně zajímavé uskutečnit podrobnější studie struktur telomer a mechanismu jejich udržování zahrnující různé zástupce napříč celým řádem brouků. Především zdůraznit kontrast struktury telomer u dynamicky se vyvíjejících nadčeledí z podřádu Polyphaga (např. Curculionoidea, Chrysomeloidea či Tenebrionoidea) a u primitivnějších vzácných podřádů Archostemata a Myxophaga.

6 Závěr

Závěrem lze shrnout, že se v rámci této práce potvrdilo, jak jsou telomery u brouků z pohledu telomerické sekvence DNA nejednotné. U nejstarších skupin Carabidae, Scarabaeoidea a Staphylinoidea dochází ke ztrátě telomerické hmyzí sekvence (TTAGG)_n, alternativní sekvence nebo mechanismus udržující telomery u nich zůstává nedefinovaný. O něco mladší blízké nadčeledi Bostrichoidea a Elateroidea si (TTAGG)_n sekvenci zatím povětšinou ponechávají na rozdíl od početné skupiny zahrnující Curculionoidea, kde je tato sekvence postupně ztrácena a u Chrysomeloidea a Cucujoidea postupně nahrazována sekvencí (TCAGG)_n. U nejmladších nadčeledí Cleroidea a Tenebrionoidea je telomerická sekvence (TCAGG)_n vykazována u všech zde testovaných zástupců.

7 Literatura

- Allsopp, R. C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E. V., Futcher, A. B., Greider, C. W., Harley, C. B. (1992). Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 89(21), s. 10114-10118.
- Armanios, M. Y., Chen, J. J. L., Cogan, J. D., Alder, J. K., Ingersoll, R. G., Markin, C., Lawson, W. E., Xie, M., Vulto, I., Phillips, J. A., Lansdorp, P. M., Greider, C. W., Loyd, J. E. (2007). Telomerase Mutations in Families with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *New England Journal Of Medicine*, 356(13), s. 1317-1326.
- Barcenilla, B. B. a Shippen, D. E. (2019). Back to the future: The intimate and evolving connection between telomere-related factors and genotoxic stress. *Journal Of Biological Chemistry*, 294(40), s. 14803-14813.
- Belfort, M., Curcio, M. J., Lue, N. F. (2011). Telomerase and retrotransposons: Reverse transcriptases that shaped genomes. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 108(51), s. 20304-20310.
- Biessmann, H. a Mason, J. M. (1997). Chromosoma Focus. *Chromosoma*, 106(2), s. 63-69.
- Biessmann, H. a Mason, J. M. (2003). Telomerase-independent mechanisms of telomere elongation. *Cellular And Molecular Life Sciences (Cmls)*, 60(11), s. 2325-2333.
- Blackburn, E. H. (1991). Structure and function of telomeres. *Nature*, 350(6319), s. 569-573.
- Cairney, C. J. a Keith, W. N. (2008). Telomerase redefined: Integrated regulation of hTR and hTERT for telomere maintenance and telomerase activity. *Biochimie*, 90(1), s. 13-23.
- Calado, R. T. a Young, N. S. (2009). Telomere Diseases. *New England Journal Of Medicine*, 361(24), s. 2353-2365.
- Čapková Frydrychová, R., Biessmann, H., Mason, J. M. (2009). Regulation of telomere length in *Drosophila*. *Cytogenetic And Genome Research*, 122(3-4), s. 356-364.
- Čapková Frydrychová, R. a Mason, J. (2013). Telomeres: Their Structure and Maintenance. In D. Stuart (Ed.), *The Mechanisms of DNA Replication*, s. 423-443.
- Cong, Y. S., Wright, W. E., Shay, J. W. (2002). Human Telomerase and Its Regulation. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 66(3), s. 407-425.
- Crowson, R. A. (1981). The biology of the Coleoptera. New York: *Academic Press*, s. 1-14.
- Dlaska, M., Schöffski, P., Bechter, O. (2013). Inter-telomeric recombination is present in telomerase-positive human cells. *Cell Cycle*, 12(13), s. 2084-2099.
- Fajkus, J. (2006). Detection of telomerase activity by the TRAP assay and its variants and alternatives. *Clinica Chimica Acta*, 371(1-2), s. 25-31.

- Fajkus, J., Kovařík, A., Královics, R. (1996). Telomerase activity in plant cells. *Febs Letters*, 391(3), s. 307-309.
- Fajkus, J., Sýkorová, E., Leitch, A. R. (2005). Telomeres in evolution and evolution of telomeres. *Chromosome Research*, 13(5), s. 469-479.
- Flores, I., Benetti, R. a Blasco, M. A. (2006). Telomerase regulation and stem cell behaviour. *Current Opinion In Cell Biology*, 18(3), s. 254-260.
- Forney, J., Henderson, E. R., Blackburn, E. H. (1987). Identification of the telomeric sequence of the acellular slime molds *Didymium iridis* and *Physarum polycephalum*. *Nucleic Acids Research*, 15(22), s. 9143-9152.
- Frydrychová, R., Grossmann, P., Trubac, P., Vítková, M., Marec, F. (2004). Phylogenetic distribution of TTAGG telomeric repeats in insects. *Genome*, 47(1), s. 163-178.
- Frydrychová, R. a Marec, F. (2002). Repeated losses of TTAGG telomere repeats in evolution of beetles (Coleoptera). *Genetica*, 115(2), s. 179-187.
- Gomes, N. M. V., Shay, J. W., Wright, W. E. (2010). Telomere biology in Metazoa. *Febs Letters*, 584(17), s. 3741-3751.
- Gorab, E. (2003). Reverse transcriptase-related proteins in telomeres and in certain chromosomal loci of *Rhynchosciara* (Diptera: Sciaridae). *Chromosoma*, 111(7), s. 445-454.
- Greider, C. W. (1998). Telomerase activity, cell proliferation, and cancer. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 95(1), s. 90-92.
- Greider, C. W. a Blackburn, E. H. (1989). A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature*, 337(6205), s. 331-337.
- Greider, C. W. a Blackburn, E. H. (1996). Telomeres, Telomerase and Cancer. *Scientific American*, 274(2), s. 92-97.
- 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(4), s. 503-514.
- Hackett, J. A., Feldser, D. M., Greider, C. W. (2001). Telomere Dysfunction Increases Mutation Rate and Genomic Instability. *Cell*, 106(3), s. 275-286.
- Henderson, E. R. a Blackburn, E. H. (1989). An overhanging 3' terminus is a conserved feature of telomeres. *Molecular And Cellular Biology*, 9(1), s. 345-348.
- Hunt, T., Bergsten, J., Levkanicova, Z., Papadopoulou, A., John, O. S., Wild, R., Hammond, P. M., Ahrens, D., Balke, M., Caterino, M. S., Gomez-Zurita, J., Ribera, I., Barraclough, T. G., Bocakova, M., Bocak, L., Vogler, A. P. (2007). A Comprehensive Phylogeny of Beetles Reveals the Evolutionary Origins of a Superradiation. *Science*, 318(5858), s. 1913-1916.

- Chow, T. T., Zhao, Y., Mak, S. S., Shay, J. W., Wright, W. E. (2012). Early and late steps in telomere overhang processing in normal human cells: the position of the final RNA primer drives telomere shortening. *Genes & Development*, 26(11), s. 1167-1178.
- Jaskelioff, M., Muller, F. L., Paik, J. -H., Thomas, E., Jiang, S., Adams, A. C., Sahin, E., Kost- Alimova, M., Protopopov, A., Cadiñanos, J., Horner, J. W., Maratos-Flier, E., DePinho, R. A. (2011). Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice. *Nature*, 469(7328), s. 102-106.
- Kim, N., Piatyszek, M., Prowse, K., Harley, C., West, M., Ho, P., Coviello, G., Wright, W., Weinrich, S., Shay, J. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 266(5193), s. 2011-2015.
- Korandová, M., Krůček, T., Vrbová, K., Frydrychová Čapková, R. (2014). Distribution of TTAGG-specific telomerase activity in insects. *Chromosome Research*, 22(4), s. 495-503.
- Krupp, G., Klapper, W., Parwaresch, R. (2000). Cell proliferation, carcinogenesis and diverse mechanisms of telomerase regulation. *Cellular And Molecular Life Sciences*, 57(3), s. 464-486.
- de Lange, T. (2015). A loopy view of telomere evolution. *Frontiers in genetics*, 6, s. 321.
- Lee, Y. C. G., Leek, C., Levine, M. T. (2007). Recurrent Innovation at Genes Required for Telomere Integrity in *Drosophila*. *Molecular Biology And Evolution*, 34(2), s. 467-482.
- Linger, B. R. a Price, C. M. (2009). Conservation of telomere protein complexes: shuffling through evolution. *Critical Reviews In Biochemistry And Molecular Biology*, 44(6), s. 434-446.
- Lin, K. W. a Zakian, V. A. (2016). 21st Century Genetics: Mass Spectrometry of Yeast Telomerase. *Cold Spring Harbor Symposia On Quantitative Biology*, 80, s. 111-116.
- Lin, S. Y. a Elledge, S. J. (2003). Multiple Tumor Suppressor Pathways Negatively Regulate Telomerase. *Cell*, 113(7), s. 881-889.
- Lundblad, V. a Blackburn, E. H. (1993). An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1– senescence. *Cell*, 73(2), s. 347-360.
- Mason, J. M., Randall, T. A., Čapková Frydrychová, R. (2016). Telomerase lost? *Chromosoma*, 125(1), s. 65-73.
- McEachern, M. J. a Hicks, J. B. (1993). Unusually large telomeric repeats in the yeast *Candida albicans*. *Molecular And Cellular Biology*, 13(1), s. 551-560.
- Meyne, J., Ratliff, R. L., Moyzis, R. K. (1989). Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 86(18), s. 7049-7053.
- Mora, P., Vela, J., Sanllorente, O., Palomeque, T., Lorite Martínez, P. (2015). Molecular cytogenetic studies in the ladybird beetle *Henosepilachna argus* Geoffroy, 1762

- (Coleoptera, Coccinellidae, Epilachninae). *Comparative Cytogenetics*, 9(3), s. 423-434.
- Moyzis, R. K., Buckingham, J. M., Cram, L. S., Dani, M., Deaven, L. L., Jones, M. D., Meyne, J., Ratliff, R. L., Wu, J. R. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 85(18), s. 6622-6626.
- Mravinač, B., Meštrović, N., Čavrak, V. V., Plohl, M. (2011). TCAGG, an alternative telomeric sequence in insects. *Chromosoma*, 120(4), s. 367-376.
- Nielsen, L. a Edström, J. E. (1993). Complex telomere-associated repeat units in members of the genus *Chironomus* evolve from sequences similar to simple telomeric repeats. *Molecular And Cellular Biology*, 13(3), s. 1583-1589.
- Nozaki, H., Takano, H., Misumi, O., Terasawa, K., Matsuzaki, M., Maruyama, S., Nishida, K., Yagisawa, F., Yoshida, Y., Fujiwara, T., Takio, S., Tamura, K., Chung, S. J., Nakamura, S., Kuroiwa, H., Tanaka, K., Sato, N., Kuroiwa, T. (2007). A 100 %-complete sequence reveals unusually simple genomic features in the hot-spring red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *BMC Biol* 5 (1), s. 1-8.
- Okazaki, S., Tsuchida, K., Maekawa, H., Ishikawa, H., Fujiwara, H. (1993). Identification of a pentanucleotide telomeric sequence, (TTAGG)_n, in the silkworm *Bombyx mori* and in other insects. *Molecular And Cellular Biology*, 13(3), s. 1424-1432.
- Osanai-Futahashi, M. a Fujiwara, H. (2011). Coevolution of Telomeric Repeats and Telomeric Repeat-Specific Non-LTR Retrotransposons in Insects. *Molecular Biology And Evolution*, 28(11), s. 2983-2986.
- Osanai, M., Kojima, K. K., Futahashi, R., Yaguchi, S., Fujiwara, H. (2006). Identification and characterization of the telomerase reverse transcriptase of *Bombyx mori* (silkworm) and *Tribolium castaneum* (flour beetle). *Gene*, 376(2), s. 281-289.
- Pardue, M. L. a DeBaryshe, P. G. (2003). Retrotransposons Provide an Evolutionarily Robust Non-Telomerase Mechanism to Maintain Telomeres. *Annual Review Of Genetics*, 37(1), s. 485-511.
- Peška, V., Fajkus, P., Fojtová, M., Dvořáčková, M., Hapala, J., Dvořáček, V., Polanská, P., Leitch, A. R., Sýkorová, E., Fajkus, J. (2015). Characterisation of an unusual telomere motif (TTTTTTAGGG) _n in the plant *Cestrum elegans* (Solanaceae), a species with a large genome. *The Plant Journal*, 82(4), s. 644-654.
- Rhee, D. B., Ghosh, A., Lu, J., Bohr, V. A., Liu, Y. (2011). Factors that influence telomeric oxidative base damage and repair by DNA glycosylase OGG1. *Dna Repair*, 10(1), s. 34-44.
- Roth, C. W., Kobeski, F., Walter, M. F., Biessmann, H. (1997). Chromosome end elongation by recombination in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Molecular And Cellular Biology*, 17(9), s. 5176-5183.

- Říha, K., Fajkus, J., Široký, J., Vyskot, B. (1998). Developmental Control of Telomere Lengths and Telomerase Activity in Plants. *The Plant Cell*, 10(10), s. 1691-1698.
- Sahara, K., Marec, F., Traut, W. (1999). TTAGG Telomeric Repeats in Chromosomes of Some Insects and Other Arthropods. *Chromosome Research*, 7(6), s. 449-460.
- Sasaki, T. a Fujiwara, H. (2000). Detection and distribution patterns of telomerase activity in insects. *European Journal Of Biochemistry*, 267(10), s. 3025-3031.
- Shay, J. W. a Wright, W. E. (2000). Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(1), s. 72-76.
- Vítková, M., Král, J., Traut, W., Zrzavý, J., Marec, F. (2005). The evolutionary origin of insect telomeric repeats, (TTAGG) N. *Chromosome Research*, 13(2), s. 145-156.
- Webb, C. J. a Zakian, V. A. (2015). Telomerase RNA stem terminus element affects template boundary element function, telomere sequence, and shelterin binding. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 112(36), s. 11312-11317.
- Wellinger, R. J. a Sen, D. (1997). The DNA structures at the ends of eukaryotic chromosomes. *European Journal Of Cancer*, 33(5), s. 735-749.
- Wheeler, W. (2001). The Phylogeny of the Extant Hexapod Orders. *Cladistics*, 17(2), s. 113-169.
- Yu, G. L., Bradley, J. D., Attardi, L. D., Blackburn, E. H. (1990). In vivo alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated Tetrahymena telomerase RNAs. *Nature*, 344(6262), s. 126-132.
- Zakian, V. A. (1995). Telomeres: Beginning to Understand the End. *Science*, 270(5242), s. 1601-1607.

8 Příloha

Tab. IV: Databáze genomových dat poskytnutá Mgr. Vratislavem Peškou, PhD., seřazení odpovídá fylogenetickému stromu dle publikace Hunt et al. (2007), (+) značí přítomnost telomerické sekvence (TTAGG nebo TCAGG), (-) značí absenci telomerické sekvence (TTAGG nebo TCAGG).

PODRÁD	NADČELEĎ	ČELEĎ	DRUH	TTAGG	TCAGG	
Adephaga		Carabidae	Tetracha sp.	(-)	(-)	
			Selenophorus alternans	(-)	(-)	
			Miquihuana rhadiniformis	(+)	(-)	
			Pseudamara arenaria	(+)	(-)	
			Bembidarens sp.	(+)	(-)	
			Bembidion chilioperypus	(+)	(-)	
			Bembidion eupetedromus	(+)	(-)	
			Bembidion orion	(+)	(-)	
			Bembidion castor	(+)	(-)	
			Bembidion flohri	(+)	(-)	
			Bembidion laponicum	(-)	(-)	
			Bembidion subfusum	(+)	(-)	
			Bembidion aeruginosum	(+)	(-)	
			Bembidion breve	(-)	(-)	
			Bembidion laxatum	(-)	(-)	
			Bembidion lachnophoroides	(+)	(-)	
			Bembidion obscuripenne	(-)	(-)	
			Bembidion ulkei	(+)	(-)	
			Bembidion clemens	(+)	(-)	
			Bembidion scenicum	(+)	(-)	
			Bembidion musae	(+)	(-)	
			Lionepha casta	(+)	(-)	
			Lionepha chintimini	(+)	(-)	
			Lionepha erasa	(-)	(-)	
			Lionepha lindrothellus	(+)	(-)	
			Pogonus chalceus	(+)	(-)	
Polyphaga	Staphylinoidea	Dytiscidae	Stictotarsus aequinoctialis	(+)	(-)	
		Silphidae	Nicrophorus orbicollis	(+)	(-)	
			Staphylinidae	Adranes taylori	(+)	(-)
				Carpelimus sp.	(-)	(-)
				Aenictocupidus jacobsonorum	(+)	(-)
				Mimaenictus wilsoni	(+)	(-)
				Weissflogia rhopalogaster	(+)	(-)
				Dalotia coriaria	(+)	(-)
				Earota dentata	(+)	(-)
				Diploeciton nevermanni	(+)	(-)
				Deinopsis erosa	(+)	(-)
				Dorylogaster longipes	(+)	(-)
				Ecitomorpha arachnoides	(+)	(-)
				Ecitophya simulans	(+)	(-)

		<i>Drusilla canaliculata</i>	(+)	(-)
		<i>Ecitoglossa quadriceps</i>	(+)	(-)
		<i>Platyusa sonomae</i>	(+)	(-)
		<i>Tetradonia laticeps</i>	(+)	(-)
		<i>Labidoglobus nevermanni</i>	(+)	(-)
		<i>Labidopullus appendiculatus</i>	(+)	(-)
		<i>Pseudomimeciton antennatum</i>	(+)	(-)
		<i>Oxypoda opaca</i>	(+)	(-)
		<i>Sceptobius lativentris</i>	(+)	(-)
		<i>Coproporus ventriculus</i>	(-)	(-)
Scarabaeoidea	Scarabaeidae	<i>Oryctes borbonicus</i>	(-)	(-)
		<i>Chrysinia resplendens</i>	(-)	(-)
		<i>Popillia japonica</i>	(-)	(-)
		<i>Canthidium</i> sp.	(-)	(-)
		<i>Onthophagus taurus</i>	(-)	(-)
		<i>Pachysoma endroeydi</i>	(-)	(-)
		<i>Pachysoma striatus</i>	(-)	(-)
Elateroidea	Lampyridae	<i>Ellychnia corrusca</i>	(+)	(-)
		<i>Lucidota atra</i>	(+)	(-)
		<i>Lucidota punctata</i>	(+)	(-)
		<i>Phausis reticulata</i>	(+)	(-)
		<i>Photinus australis</i>	(+)	(-)
		<i>Photinus brimleyi</i>	(+)	(-)
		<i>Photinus carolinus</i>	(+)	(-)
		<i>Photinus cooki</i>	(+)	(-)
		<i>Photinus indictus</i>	(+)	(-)
		<i>Photinus macdermotti</i>	(+)	(-)
		<i>Photinus obscurellus</i>	(+)	(-)
		<i>Photinus pyralis</i>	(-)	(-)
		<i>Photinus sabulosus</i>	(-)	(-)
		<i>Photinus scintillans</i>	(-)	(-)
		<i>Pyractomena angulata</i>	(+)	(-)
		<i>Pyractomena borealis</i>	(+)	(-)
		<i>Pyractomena marginalis</i>	(+)	(-)
		<i>Pyropyga decipiens</i>	(+)	(-)
		<i>Aquatica lateralis</i>	(+)	(-)
		<i>Photuris frontalis</i>	(+)	(-)
Buprestoidea	Buprestidae	<i>Agrilus planipennis</i>	(+)	(-)
Curculionoidea	Curculionidae	<i>Anthonomus grandis</i>	(-)	(-)
		<i>Sitophilus oryzae</i>	(-)	(-)
		<i>Dendroctonus jeffreyi</i>	(-)	(-)
		<i>Dendroctonus ponderosae</i>	(-)	(-)
		<i>Hypothenemus hampei</i>	(+)	(-)
Chrysomeloidea	Cerambycidae	<i>Phymatodes lengi</i>	(+)	(-)
		<i>Xylotrechus colonus</i>	(+)	(-)
		<i>Anoplophora glabripennis</i>	(-)	(-)
Cucujoidea	Coccinellidae	<i>Eriopis connexa</i>	(+)	(-)
		<i>Harmonia axyridis</i>	(+)	(-)

		Nephaspis sp.	(+)	(-)
Tenebrionoidea	Meloidae	Hycleus cichorii	(-)	(+)
		Hycleus phaleratus	(-)	(+)
	Tenebrionidae	Lagriinae gen.	(-)	(-)
		Gridelliopus subsquamosus	(-)	(-)
		Loensus sp.	(-)	(-)
		Melambius mideltensis	(-)	(-)
		Phylacinus fisheri	(-)	(+)
		Tribolium castaneum	(-)	(+)
