

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra genetiky**

**Transkripční aktivita telomerického  
elementu *HeT-A* u *Drosophila melanogaster***

**Diplomová práce**

**Bc. Michala Korandová**

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

České Budějovice 2014

Korandová M., 2014. Transkripční aktivita telomerického elementu *HeT-A* u *Drosophila melanogaster*. [Transcriptional analysis of the *HeT-A* retrotransposon in *Drosophila melanogaster*. Mgr.Thesis, in Czech] – 44 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

## **Annotation**

Instead of using telomerase, *Drosophila melanogaster* extends its telomeres by transposition of special telomeric retroelements (*HeT-A*, *TART* and *TAHRE*) targeted specifically to chromosome ends. One key step of the transposition mechanism is a transcription of the elements. Using the expression of a reporter Tomato transgene under *HeT-A* promoter control we obtained a spatial and temporal visualization of *HeT-A* promoter activity during the whole *Drosophila* development. This analysis confirmed that the activity of the *HeT-A* promoter is up-regulated by cell proliferation, however *HeT-A* promoter activity is not limited only to proliferating diploid cells. One important outcome of this study is the observation of variation in *HeT-A* promoter activity in both location and intensity.

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

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

V Českých Budějovicích dne 24. dubna 2014

.....

Bc. Michala Korandová

## Poděkování

Tímto bych velmi ráda poděkovala své školitelce RNDr. Radmile Čapkové Frydrychové, Ph.D., za cenné rady, ochotu, trpělivost a celkové odborné vedení této práce. Dále bych ráda poděkovala doc. RNDr. Michalu Žurovcovi, CSs. za pomoc při transfekci buněk S2 a za poskytnutí vektoru Casper4. Stejně tak prof. RNDr. Františku Marecovi, CSc. za zázemí a celkovou podporu. Za pomoc se sjednocením genetického pozadí kmenů pro studium potencionálních modifikátorů TPE bych chtěla poděkovat J. M. Masonovi, Ph.D., z National Institute of Environmental Health Science (USA). Můj dík také patří všem členům laboratoře a obzvláště jmenovitě Mgr. Tomáši Krůčkovi za podporu a přátelskou atmosféru.

Chtěla bych dále poděkovat celé své rodině za jejich nesmírnou podporu po celou dobu studia a že nikdy nepřestali věřit. Dík patří také přátelům Bc. Nele Hralové a Mgr. Václavu Brožovi.

# Obsah

1. Úvod.....	1
1.1 Telomery .....	1
1.2 Telomery u drozofily .....	1
1.2.1 Telomerické elementy .....	2
1.2.2 Prodlužování telomer – retrotranspozice.....	3
1.2.3 Telomerická čepička drozofily.....	5
1.2.4 Heterochromatinový protein HP1 .....	7
1.3 Vliv chromatinové struktury na útlum genů .....	8
1.3.1 Telomerický poziční efekt (TPE).....	8
1.3.2 Modifikátory TPE .....	11
2. Cíle práce.....	12
3. Materiál a metody .....	13
3.1 Drozofilí kmeny.....	13
3.2 Příprava konstruktů HeTom.....	14
3.2.1 Lokalizace konstruktů HeTom v genomu jednotlivých linií.....	15
3.2.2 Vyhodnocování fluorescenčního signálu u linie 35HeTom.....	15
3.3 Izolace genomové DNA.....	16
3.4 Izolace RNA, syntéza cDNA a kvantitativní Real-time PCR.....	16
3.5 Použité primery.....	16
3.6 Použitá křížení .....	17

3.7 Sledování vlivu environmentálních podmínek na HeT-A .....	18
3.7.1 Příprava vzorků při vyhodnocení vlivu teplotního stresu .....	18
3.7.2 Vliv fotoperiody .....	19
3.7.3 Vliv parakvatu .....	19
4. Výsledky.....	20
4.1 Promotorová aktivita elementu HeT-A.....	20
4.1.1 Exprese konstruktů HeTom v průběhu vývoje jedince .....	20
4.1.2 Variabilita v expresi <i>HeTom</i> .....	25
4.1.3 Korelace mezi <i>HeTom</i> a telomerickým <i>HeT-A</i> .....	26
4.2 Vliv exogenních i endogenních faktorů na expresi HeT-A .....	28
4.2.1 Vliv délky telomer na transkripční aktivitu <i>HeTom</i> .....	29
4.2.2 Vliv teplotního stresu na transkripční hladinu <i>HeTom</i> .....	30
4.2.3 Vliv dalších exogenních faktorů .....	31
4.3 Identifikace trans-modifikátorů TPE .....	31
5. Diskuze .....	34
5.1 Konstrukt HeTom a jeho aktivita.....	34
5.2 Vliv exogenních a endogenních faktorů .....	35
5.3 Modifikátory TPE .....	36
6. Závěr a další perspektiva výzkumu .....	38
7. Použitá literatura.....	39

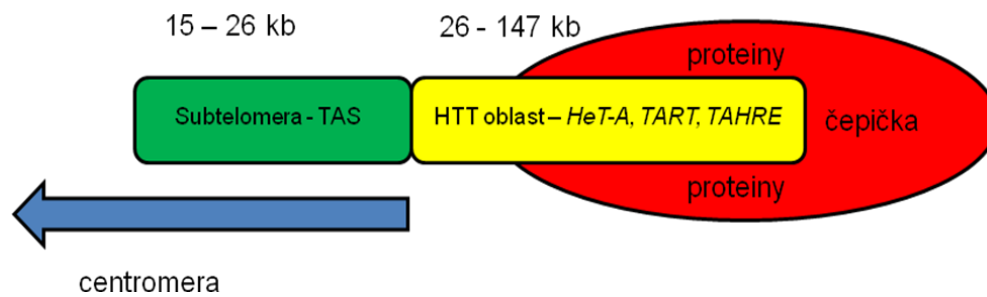
# 1. Úvod

## 1.1 Telomery

Telomery jsou speciální nukleoproteinové struktury na koncích eukaryotních chromozómů. Telomery odlišují přirozené konce chromozómů od konců vzniklých dvouřetězcovými zlomy, brání jejich fúzím reparačními mechanismy a také chrání jejich konce před působením nukleáz. Telomery tak hrají klíčovou roli v zachování stability a celistvosti chromozómů (Chan & Blackburn 2002; von Zglinicki 2002; Cenci et al. 2005; Denchi 2009). Telomery také kompenzují ztráty koncové DNA, které vznikají při replikaci či působením oxidativního stresu. Nejběžnějším mechanismem kompenzace ztrát na koncích chromozómů je aktivita telomerázy, enzymu, který se váže k chromozómovým koncům a přidává zde krátké sekvence telomerické DNA. Telomerázová aktivita je spjata s buněčnou proliferací a najdeme ji nejčastěji u vysoce proliferačně aktivních buněk jako třeba u embryonálních, zárodečných nebo kmenových buněk. Nefungující telomeráza je příčinou procesů stárnutí nebo rakoviny (Wright et al. 1996; Zhu et al. 2011).

## 1.2 Telomery u drozofily

Telomery většiny organismů jsou tvořeny sérií krátkých opakujících se sekvencí jako je například sekvence TTAGGG u člověka (Meyne et al. 1989; Chan & Blackburn 2002). Telomerická sekvence velké části hmyzích řádů je tvořena repeticí TTAGG, výjimku tvoří například *Drosophila melanogaster*. Její telomery se skládají z většího množství kopií třech telomericky specifických non-LTR retroelementů *HeT-A*, *TART* a *TAHRE*. Telomerické elementy jsou v telomeře zastoupeny v různém sledu a počtu. Tyto elementy kompenzují telomerické ztráty pomocí své retrotranspozice vedené specificky ke koncům chromozómů (Mason et al. 2008; Capkova Frydrychova et al. 2009). Oblast, která je tvořena telomerickými elementy, je souhrnně označována jako HTT. K této oblasti přiléhá subtelomerická oblast TAS (telomere associated sequences) a navazuje se speciální proteinový komplex označovaný jako telomerická čepička (Obr. 1) (Mason et al. 2008).



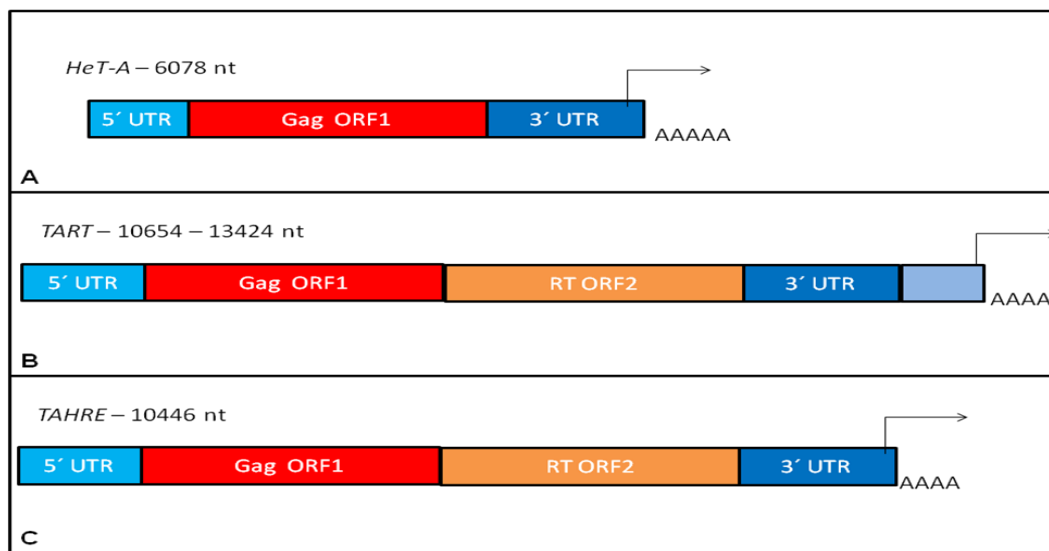
**Obr. 1:** Koncová část chromozómu s telomerickou oblastí HTT (znázorněna žlutě) u *D. melanogaster*, tvořená z retroelementů *HeT-A*, *TART* a *TAHRE*. Délka HTT je značně proměnlivá, a to od 26 do 147 kb. Subtelomerická oblast TAS (znázorněna zeleně) o délce 15- 26 kb přiléhá k oblasti HTT. Na oblast HTT je navázán speciální proteinový komplex označovaný jako telomerická čepička (znázorněna červeně). Šipka znázorňuje směr k centromere.

### 1.2.1 Telomerické elementy

Nejprostudovanějším telomerickým elementem je element *HeT-A* (Obr. 2A). Tento element je dlouhý 6 kb a obsahuje jeden otevřený čtecí rámec (ORF), kódující protein Gag (Biessmann & Mason 2003). Charakteristickou vlastností elementu *HeT-A* je délkově variabilní sekvence oligo(A), kterou je element připojován k chromozomálnímu konci. Nápadným rysem je ovšem jeho promotor, který leží na 3' UTR (tj. 3' netranslatované oblasti) daného elementu a řídí transkripci sousedního, tj. 3' elementu (Pardue & DeBaryshe 2003). Protože počátek transkripce leží rovněž v promotorové oblasti, každý transkript má krátký úsek (přibližně kolem 60 bp) pocházející ze sousedního 5' elementu. Další promotor leží v 5' UTR oblasti, nicméně tento promotor přispívá k celkové transkripci jen nepatrně a zřejmě je důležitý pro tkáňovou specificitu. Protože *HeT-A* nekóduje vlastní reverzní transkriptázu, je při reverzní transkripci závislý na dalších dvou telomerických elementech (Danilevskaya et al. 1997; Danilevskaya et al. 1999; Pardue & DeBaryshe 2003).

Dalším telomerickým retroelementem je 12 kb dlouhý non-LTR retrotranspozón *TART* se dvěma čtecími rámci (Obr. 2B) (Capkova Frydrychova et al. 2009). Oproti elementu *HeT-A* se element *TART* více podobá non-LTR elementům tím, že kóduje kromě proteinu Gag i protein Pol s endonukleázovou doménou a funkcí reverzní transkriptázy (RT) (Casacuberta & Pardue 2005).

Třetím telomerickým retroelementem je *TAHRE* (Telomere-Associated and *HeT-A*-Related Element) (Obr. 2C) (Abad et al. 2004). Jako *TART* i tento element má dva otevřené čtecí rámce. ORF2 kóduje reverzní transkriptázu a endonukleázu, je shodný s ORF2 u elementu *TART*. Stejně tak je ORF1 kódující Gag protein shodné s ORF1 elementu *TART* a je tedy možné, že *TART* a *TAHRE* měly společného předka (Shpiz et al. 2007). Protože 5' UTR oblast, ORF1 a 3' UTR oblast elementu *TAHRE* jsou velmi podobné i sekvencím elementu *HeT-A*, předpokládá se, že element *HeT-A* vznikl odvozením od společného předchůdce ztrátou oblasti ORF2. Podobnost se nachází i v transkripci a existuje proto domněnka, že *TAHRE* společně s *TART* jsou zdrojem enzymatické aktivity reverzní transkriptázy pro transkripci elementů *HeT-A* (Abad et al. 2004).



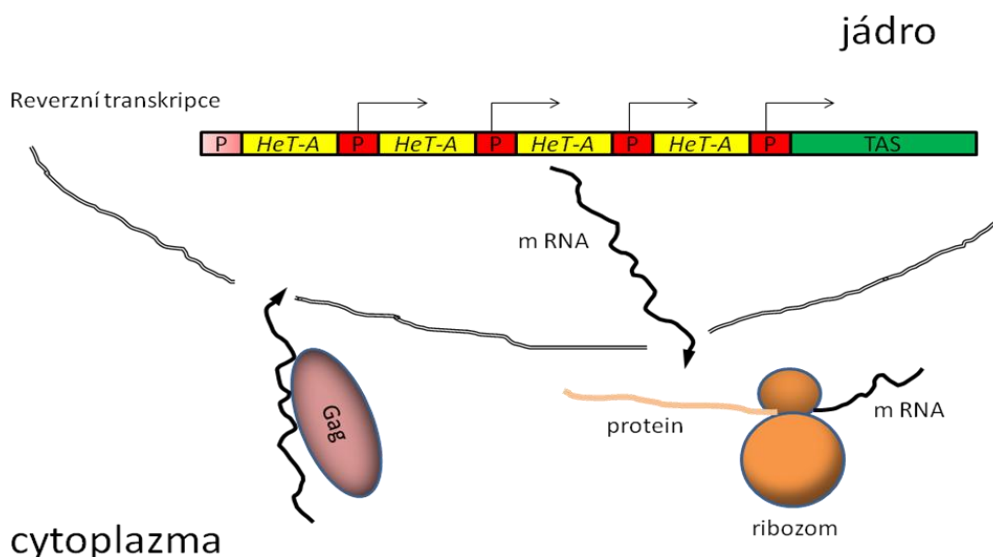
**Obr. 2:** Telomerické retroelementy *HeT-A* (A), *TART* (B) a *TAHRE* (C): 5' UTR – nepřekládaná oblast na 5' konci; Gag ORF1 – kódování proteinu Gag; RT ORF2 – kódování reverzní transkriptázy; 3' UTR – nepřekládaná oblast na 3' konci, AAAAA – polyadeninový konec, kterým se elementy připojují k chromozomálnímu konci. Šipka znázorňuje umístění promotoru a směr transkripce.

### 1.2.2 Prodlužování telomer – retrotranspozice

Retrotranspozice je hlavním mechanismem telomerické elongace. Vedle toho jsou telomery drozofily také prodlužovány genovou konverzí. Mechanismus retrotranspozice se skládá z několika po sobě jdoucích kroků (Obr. 3). Jedná se o analogický proces k jiným retroelementům. Prvním krokem elongace je transkripce. Následně transkripty opouští jádro jadernými póry jako mRNA a jsou translatovány na polypeptid Gag. U elementu *TART* a *TAHRE* ještě dochází k translaci reverzní transkriptázy. Gag protein se váže na transkript



retroelementu a celý tento komplex je transportován zpět do jádra, kde RNA najde konec chromozómu. Vazba na chromozomální konec se pravděpodobně děje na základě interakce proteinů a 3' oligoadeninového konce. Reverzní transkriptáza využívá volnou hydroxylovou skupinu na 3' konci chromozómu a převádí RNA do řetězce DNA, tím se telomerický konec prodlužuje (George & Pardue 2003; Biessmann & Mason 2003).

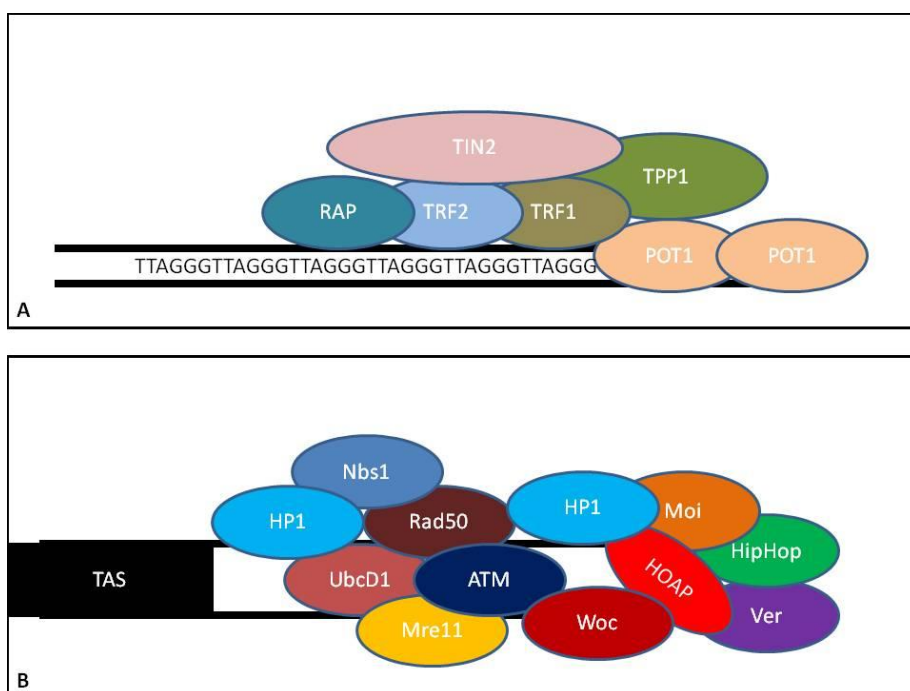


**Obr. 3:** Schéma retrotranspozice telomerických elementů drozofily. Ze 3' UTR oblasti, kde se nachází promotor elementu *HeT-A*, dochází k transkripci. Vytvořené transkripty, mRNA, opouští jádro jadernými póry. V cytoplasmě dochází na ribozomech k translaci a ke vzniku proteinů Gag a reverzní transkriptázy. Protein Gag se v cytoplasmě naváže na transkripty a tento nukleoproteinový komplex je jadernými póry transportován zpět do jádra. Pomocí 3' oligoadeninového konce a na základě interakce proteinů dochází k navázání ke konci chromozómu. Zde dochází k reverzní transkripci do DNA díky činnosti reverzní transkriptázy. Následně dojde k vytvoření telomerické čepičky.

Klíčovým krokem pro prodlužování telomer u drozofily je transkripce telomerických retroelementů. Její tkáňově a vývojově specifický charakter byl studován v několika studiích (Danilevskaya et al. 1999; Pardue & DeBaryshe 2003; Walter & Biessmann 2004). Pro vyhodnocení transkripční úrovně byla využita RNA *in situ* hybridizace s protilátkou proti elementům *HeT-A* a *TART* (Walter & Biessmann 2004) nebo transgenní mouchy s promotorem *HeT-A*, který řídí expresi reportérového genu  $\beta$ -galaktosidázy (Danilevskaya et al. 1999; Pardue & DeBaryshe 2003). Těmito experimenty bylo zjištěno, že aktivita telomerických elementů koreluje s buněčnou proliferací a je především zacílená do diploidních tkání (George & Pardue 2003).

### 1.2.3 Telomerická čepička drozofily

Telomerická čepička je multiproteinová struktura na konci chromozómu, která zajišťuje stabilitu a celistvost genomu. Její poškození může mít za následek chromozomální fúze, které jsou následovány chromozomálními zlomy, ztrátou genetického materiálu, celkovou genomovou nestabilitou vedoucí až k apoptóze (Linger & Price 2010). Telomerická čepička u člověka (Obr. 4A) je tvořena komplexem, který se nazývá shelterin, a dalšími telomerickými proteiny. Telomerická čepička drozofily (Obr. 4B) je tvořena proteinovým komplexem označovaným jako terminin. Komponenty termininu se od proteinů lidského shelterinu liší (Capkova Frydrychova & Mason 2013). Kromě proteinů shelterinu a termininu jsou v telomerické čepičce další proteiny, z nichž některé jsou totožné u obou organismů. Jedná se například o DDR proteiny, které jsou často zapojeny do oprav dvouřetězcových zlomů. Dále pak proteiny ATM, ATR nebo Ku70/80 (Cenci et al. 2005). Shelterin se skládá z šesti proteinů - TRF1, TRF2, TIN2, TPP1, POT1 a Rap1, které se specificky a výhradně váží na lidskou telomerickou sekvenci TTAGGG o dostatečné délce. Na proteiny TRF1 a TRF2 nasedají TIN2 a TPP1. Protein TPP1 spojuje proteiny TRF s POT1 (Raffa et al. 2005; Raffa et al. 2011).



**Obr. 4:** Proteinové složení telomerické čepičky u člověka (A) a u drozofily (B) (upraveno podle Capkova Frydrychova & Mason 2013; Raffa et al. 2011). Lidský shelterin je tvořen z šesti proteinů - TRF1, TRF2, TIN2, TPP1, POT1 a Rap1, které se specificky a výhradně váží na sekvenci TTAGGG. Na proteiny TRF1 a TRF2 nasedají TIN2 a TPP1. Protein TPP1 spojuje proteiny TRF s POT1(A). Drozofilí terminin je tvořen z proteinů HOAP, Moi, Ver a HipHop. Na terminin nasedají další proteiny telomerické čepičky (B).

U drozofily bylo prozatím určeno několik proteinů, které jsou pro strukturu a funkci telomerické čepičky esenciální (Tab. 1). Jedná se o geny *Su(var)205* a *carravagio (cav)*, které kódují HP1 a HOAP, dále pak gen *UbcD1*, který se enzymem E2 podílí na ubikvitinaci proteinů, drozofilí homology genů *ATM*, *RAD50*, *MRE11* a *NBS1*, gen *without children (woc)*, který kóduje transkripční faktor spojený s RNA polymerázou II, gen *modigliani (moi)*, který kóduje „HOAP-binding“ protein, gen *verrocchio (ver)*, který kóduje protein se strukturální homologií s proteinem STN1 a protein HipHop (HP1-HOAP interacting protein) (Cenci et al. 2005; Raffa et al. 2005; Mason et al. 2008). HOAP a Moi mají vlastnosti, které je odlišují od ostatních proteinů spojených s drozofilí telomerickou čepičkou. Jedná se o to, že se nacházejí pouze v oblasti telomer a jejich jedinou funkcí je udržování struktury a funkčnosti telomer. Tyto vlastnosti naznačují, že právě komplex HOAP-Moi je funkčním základem termininu (Raffa et al. 2011).

**Tab. 1:** Přehled dosud známých proteinů esenciálních pro ochranu konců chromozómů (převzato z Raffa et al. 2011; Mason et al. 2008).

Zkratka genu	Zkratka proteinu	Název proteinu	Funkce mimo telomeru
<i>cav</i>	HOAP	HP1-ORC-Associated Protein	neznámá
<i>hiphop</i>	HIPHOP	HP1-HOAP-interacting protein	neznámá
<i>moi</i>	Moi	Modigliani	neznámá
<i>ver</i>	Ver	Verrocchio	neznámá
<i>Su(var)205</i>	HP1	Heterochromatin Protein 1	regulace heterochromatinu, transkripční faktor
<i>eff</i>	UbcD1	Ubiquitin Conjugating Enzyme D1	konjugační enzym ubikvitin E2
<i>woc</i>	Woc	Without Children	transkripční faktor
<i>mre11</i>	Mre11	Meiotic recombination 11	oprava DNA, v komplexu MRN
<i>rad50</i>	Rad50	Radiation sensitive 50	oprava DNA, v komplexu MRN
<i>nbs</i>	Nbs	Nijmegen breakage syndrome	oprava DNA, v komplexu MRN
<i>tefu</i>	ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated	kináza, funkce při reparaci DNA
<i>mei-41</i>	ATR	Ataxia Telangiectasia Related	kináza, funkce při reparaci DNA
<i>mus-304</i>	ATRIP	ATR interacting protein	helikáza, funkce při reparaci DNA
<i>armi</i>	Armi	Armitage	helikáza, biogeneze piRNA
<i>aub</i>	Aub	Aubergine	biogeneze piRNA
<i>Irbp</i>	Ku70	Ku subunit 70	oprava DNA pomocí NHEJ
<i>Ku80</i>	Ku80	Ku subunit 80	oprava DNA pomocí NHEJ
<i>spn-E</i>	SPN-E	Spindle-E	RNA helikáza, RNA interference
<i>E(tc)/Tel</i>	E(TC) / TEL	Enhancer of telomeric gene conversion / Telomere elongation	neznámá

Terminin je multiproteinový komplex pokrývající oblast přibližně 10 kb a skládající se z proteinů HOAP, Moi, Ver a HipHop. Základní proteinové složení termininu a shelterinu se liší, ale proteiny, které kromě vytvoření telomerické čepičky zaujímají v buňce ještě další funkce, jsou stejné. Nicméně nejvýznamnějším rozdílem těchto dvou komplexů je to, že se terminin neváže na specifickou telomerickou sekvenci, kdežto shelterin pro svou vazbu a formaci vyžaduje přítomnost telomerických repetitiv (Capkova Frydrychova & Mason 2013).

Na rozdíl od telomer člověka při poškození telomer drozofily nemusí nevyhnutelně dojít ke ztrátě stability genomu a buněčné smrti, a to právě díky sekvencně nezávislé formaci termininu. Tento komplex může vzniknout *de novo* na konci zlomeného chromozómu a poskytnout mu stejnou ochranu jako původní telomeře (Capkova Frydrychova & Mason 2013). Významným rysem drozofilí telomery je to, že tvorba čepičky na konci chromozómu je nezávislá na sekvenci a tedy čepička může být formována na jakémkoliv konci DNA (Capkova Frydrychova et al. 2009). Místo specifické sekvence DNA hrají důležitou roli při formování telomerické čepičky epigenetické mechanismy. Navzdory tomu je u drozofily využíváno vysoce konzervativních faktorů, které jsou podobné těm, které využívají organismy s telomerázovou aktivitou. Jedná se o využívání ATM a ATR kináz společně s komplexem MRN (Mre11, Rad50 a Nbs) a ATRIP protein (Gao et al. 2008).

#### **1.2.4 Heterochromatinový protein HP1**

Heterochromatinový protein 1 (HP1) je chromozomální protein, který je přednostně spojován s heterochromatinem, a to především s pericentrickým. Nicméně vyskytuje se také v oblasti telomer a na specifických euchromatinových místech, kde plní úlohu transkripčního regulátoru (Cryderman et al. 1999; Cryderman et al. 2005). Bylo prokázáno, že HP1 je součástí komplexu telomerické čepičky a vyskytuje se podél celé oblasti HTT. Svou přítomností reguluje elongaci telomer. Pokud je mutován, dochází jak k výraznému zesílení transkripce telomerických elementů a genové konverze v telomerické oblasti, tak prodloužení telomerické délky (Perrini et al. 2004; Capkova Frydrychova et al. 2008). Předpokládá se, že tento vliv HP1 není omezen na specifickou telomerickou oblast, ale že zasahuje po celé délce oblasti HTT (Capkova Frydrychova et al. 2008). Jeho funkce v telomerické čepičce je pravděpodobně díky jeho přímé vazbě k telomerické DNA, zatímco v proximální části telomery je vázán prostřednictvím interakce s metylovaným lysinem 9

histonu H3 (me-K9H3) a prostřednictvím této interakce také dochází k formaci heterochromatinové struktury v oblasti TAS a umlčování genů. Gen *Su(var)205* je jedním z mála známých genů, u nichž se prokázala spojitost s regulací telomerické délky, a jediným známým genem, u jehož mutací je pozorováno nadměrné prodlužování telomer (Perrini et al. 2004; Capkova Frydrychova et al. 2008).

## 1.3 Vliv chromatinové struktury na útlum genů

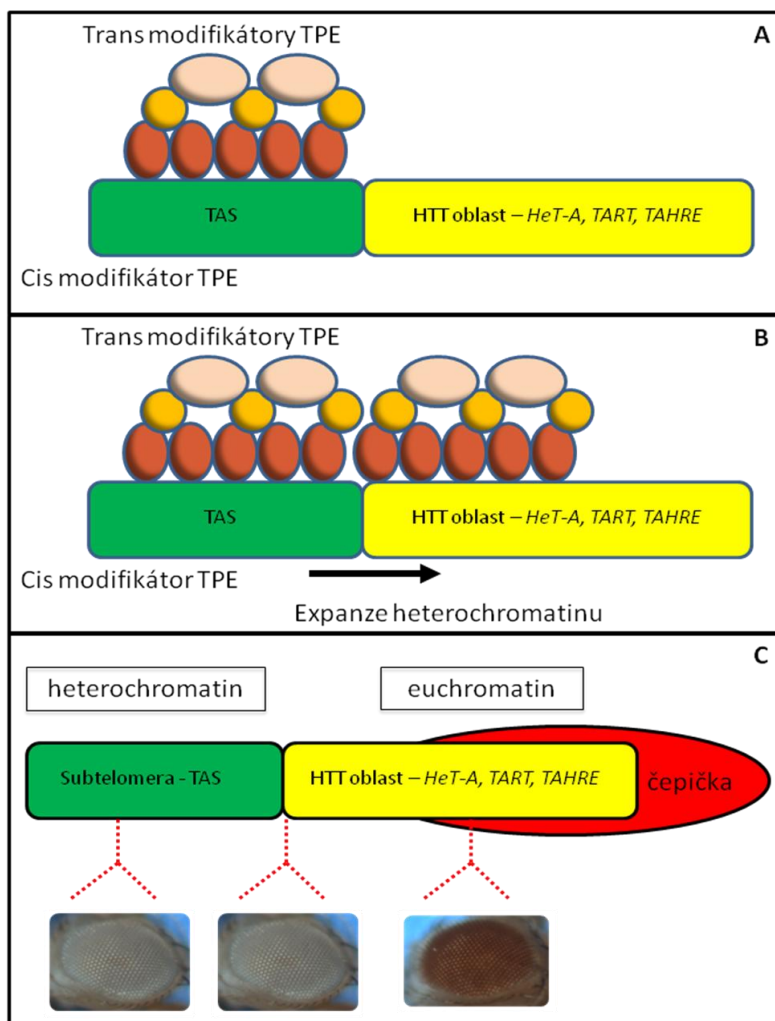
### 1.3.1 Telomerický poziční efekt (TPE)

Mezi faktory, které ovlivňují telomerickou aktivitu patří vliv subtelomerické oblasti TAS, a to prostřednictvím telomerického pozičního efektu (TPE) (Capkova Frydrychova et al. 2009). Subtelomerická oblast TAS se skládá ze satelitních sekvencí a je dlouhá 15 až 26 kb. Sekvenčně se liší mezi jednotlivými telomery, které ale i tak sdílí některé sekvenční motivy (Mason et al. 2008). Délka opakujících se jednotek se liší, a to od 460 bp na rameni 2L až po 1 kb na rameni 3R. Dva odlišné sekvenční motivy (400 a 800 bp) jsou kombinovány na rameni chromosomu X (Biessmann & Mason 2003).

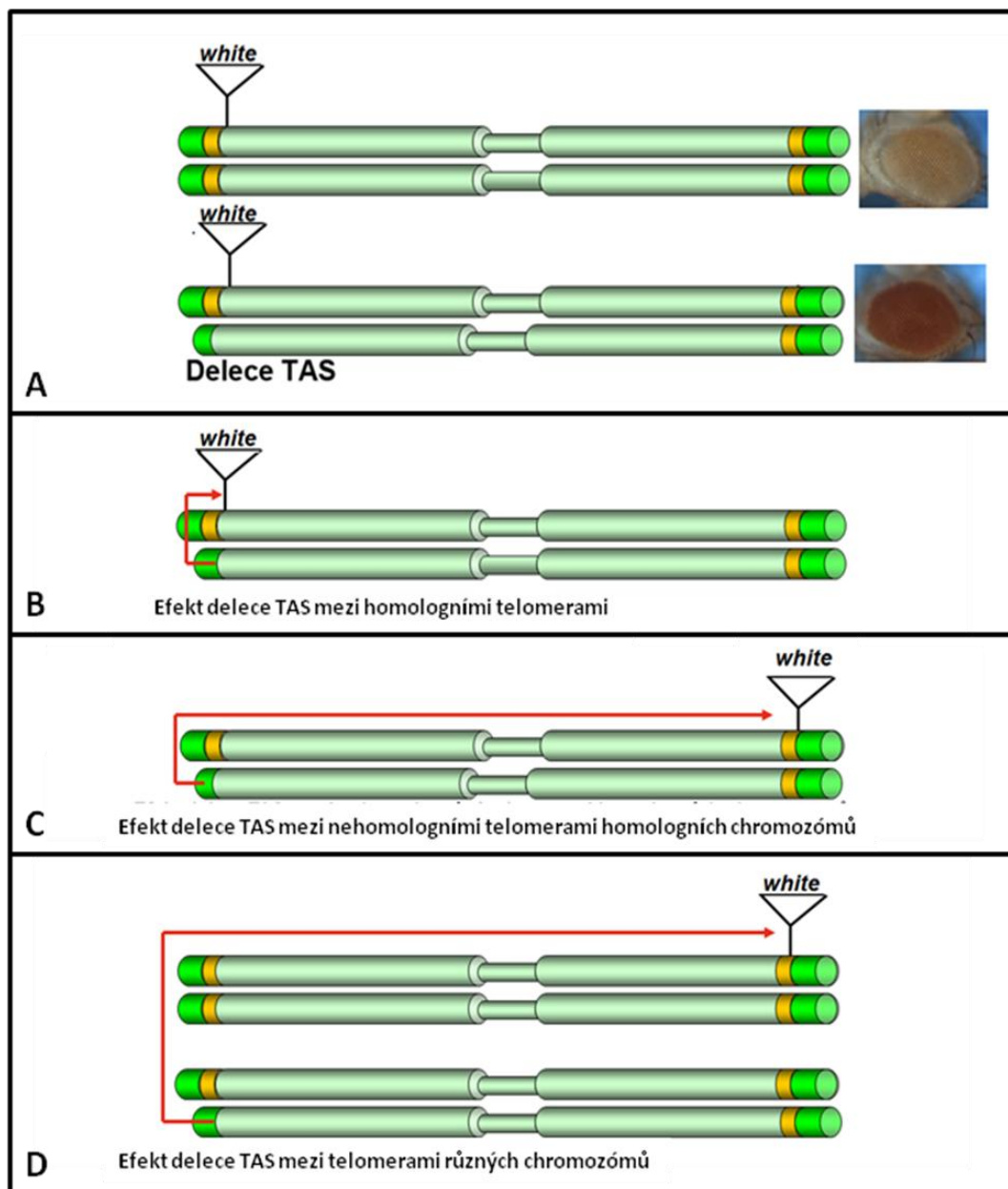
Princip TPE se jeví jako totožný s efektem PEV (position effect of variegation) vyvolaným působením centromerického heterochromatinu. U obou jevů se jedná o inhibici transkripce euchromatinových transgenů, pokud jsou včleněny do heterochromatinové oblasti či jen blízko heterochromatinové oblasti, a to díky expanzi heterochromatinové struktury do euchromatinového inzertu (Obr. 5). Pro studium pozičního efektu u drozofily se využívá reportérový transgen *white (w)*. Gen *w* u divokého typu leží na chromozómu X a je zodpovědný za jasně červené zbarvení oka drozofily. Pokud je přenesen do blízkosti heterochromatinu, vede to k celé škále zbarvení oka od světle červené, po oranžové, žluté až bílé. Oko může být zbarveno homogenně nebo jsou patrné ostrůvky různých odstínů (Capkova Frydrychova et al. 2007).

Zdrojem TPE v drozofilích telomerech jsou oblasti TAS (Mason et al. 2004; Capkova Frydrychova et al. 2009). TPE je směřované ke konci chromozómů a vyznačuje se snížením efektu s narůstající vzdáleností transgenů od oblasti TAS. Telomerický poziční efekt je dán jak chromatinovými proteiny (tzv. trans-modifikátory), tak samotnou DNA sekvencí oblasti TAS (tzv. cis-modifikátor). Pokud je sekvence TAS zkrácena, dochází k supresi TPE. K této supresi dochází jak v rámci jedné telomery, tzv. cis-efekt, tak v rámci různých telomer, to

jak homologních, tak nehomologních, což je označováno jako trans-efekt (Obr. 6). Suprese TPE díky deleci TAS byla pozorována jak u telomerického transgenu *w*, tak i u elementu *HeT-A* v proximální části oblasti HTT (Golubovsky et al. 2001; Capkova Frydrychova et al. 2007). Proto se předpokládá, že TPE může ovlivňovat i aktivitu telomerických elementů, a tudíž i telomerickou délku (Capkova Frydrychova et al. 2007). Byl navržen tzv. *HeT-A* aktivační model, který předpokládá, že nepřítomností TAS, například díky ztrátě konce celého chromozómu, dochází k potlačení TPE, tím k aktivaci telomerických elementů v rámci celého genomu a tím k rychlé kompenzaci vzniklé ztráty (Mason et al. 2003).



**Obr. 5:** Model expanze heterochromatinové struktury z oblasti TAS do oblasti HTT. Oblast TAS jako tzv. *cis* modifikátor TPE a tzv. trans-modifikátory, tj. heterochromatinové proteiny v oblasti TAS (A). Dochází k šíření heterochromatinu, tj. heterochromatinových proteinů, podél chromozómu z oblasti TAS směrem k oblasti HTT vedoucím k utlumení transkripční aktivity v proximální části HTT (B). V důsledku rozšíření heterochromatinové struktury ze subtelomerické oblasti TAS dochází k utlumení funkčního euchromatinového genu. Gen *w*, který leží na rozhraní oblasti HTT a subtelomerické oblasti TAS či uvnitř oblasti TAS, je vlivem TPE utlumen a drozofila má oko bílé. Pokud gen *w* leží v distální části HTT, je mimo dosah vlivu TPE a jeho transkripce tak není tlumena (C).



**Obr. 6:** Suprese TPE studovaná pomocí genu *w*. Částečnou či úplnou delecí TAS dochází k supresi TPE, čímž dochází k silnější expresi telomerických transgenů *w* či elementů *HeT-A* lokalizovaných v blízkosti TAS (A). Pokud je oblast TAS na homologní telomeře deletována, dochází k supresi TPE, a tím k zesílení exprese telomerického *w* oproti kmeni s původní délkou TAS. Oko drozofily tím získává tmavší odstín. Suprese TPE delecí TAS má globální vliv v celém genomu, tj. působí mezi homologními telomerami (B), různými telomerami homologních chromozómů (C) a telomerami nehomologních chromozómů (D).

### 1.3.2 Modifikátory TPE

Využitím transgenu *w* byla detekována celá škála modifikátorů PEV. Obecně se jedná o geny kódující proteiny chromatinu. Jedná se o geny tzv. *Su(var)* (*Suppressor of variegation*), tzn. geny, jejichž poškozením dochází k tlumení PEV, a geny *E(var)* (*Enhancer of variegation*), jejichž mutacemi je tento jev zesilován. Příkladem supresoru centromerického pozičního efektu je gen *Su(var)205*, který kóduje HP1 (Heterochromatinový protein 1). Ačkoliv se TPE a PEV jeví jako fenotypicky totožné, tyto dva mechanismy se u drozofily od sebe výrazně odlišují. Přesto, že byla provedena řada studií, vždy se ukázalo, že modifikátory PEV nemají žádný vliv na reportérový *w*, pokud je umístěn v telomerách. Obecně se přijímá, že modifikátory TPE jsou dosud neznámé (Cryderman et al. 1998; Cryderman et al. 1999; Mason et al. 2004).



## 2. Cíle práce

Celkově je tato diplomová práce směřovaná na aktivitu telomerického elementu *HeT-A*. Hlavním záměrem bylo *in vivo* studium promotorové aktivity telomerického elementu *HeT-A* v průběhu vývoje drozofily. Prvořadým cílem bylo proto vytvoření transgenního konstruktů HeTom, který by toto studium umožnil. Konstrukt HeTom nese gen pro fluorescenční protein Tomato pod kontrolou promotoru *HeT-A*.

Po přípravě transgenních linií s tímto konstruktem bylo následujícím cílem sledování exprese proteinu Tomato v transgenních liniích ve všech vývojových stádiích a různých orgánech a vyhodnocení, zda transkripční aktivita *HeTom* koreluje s transkripční aktivitou telomerických *HeT-A*.

Součástí práce bylo i posouzení vhodnosti využití transgenu *HeTom* při sledování vlivu environmentálních faktorů na aktivitu telomerického kompenzačního mechanismu u drozofily.

Rovněž byl sledován vliv některých mutací, jako potenciálních supresorů či enhancerů TPE, na aktivitu elementu *HeT-A*.

## 3. Materiál a metody

### 3.1 Drozofilí kmeny

Kmeny drozofily byly chovány při 25 °C na mediu z kukuřičného šrotu s melasou (163 g kukuřičného šrotu, 16 g agaru, 33 g sušených kvasnic, 200 ml melasy, 2,6 l vody) a dezinfekčním roztokem (12 g kyseliny benzoové, 2,5 g kyseliny sorbové, 240 ml denaturovaného etylalkoholu) při fotoperiodě: 16 hodin světlo + 8 hodin tma a 60 – 75 % vlhkosti.

Drozofilí kmeny byly získány ze sbírky kmenů z Bloomingtonu. Kromě divokého kmene *Oregon R*, byly všechny kmeny na pozadí  $y^1 w^{67c23}$  (v textu dále zkracováno jako *yw*), tedy s mutacemi v genu *white* (*w*) a genu *yellow* (*y*). Fenotypově byly mouchy bělooké a se světlejším tělem než je divoký typ.

Použité kmeny byly:

- *yw; P{w<sup>var</sup>}11-5*, tj. kmen nesoucí inzerci telomerického transgenu *w* mezi oblastí HTT a oblastí TAS na levém rameni 2. chromosomu (2L), (v textu dále zkracováno jako *11-5*)
- *In(1)w[m4h]; Su(var)205[2] / SM1* s bodovou mutací v genu *Su(var)205* v části kódující chromodoménu (v textu dále zkracováno jako *Su(var)205<sup>02</sup>/SM1*)
- *In(1)w[m4h]; Su(var)205[4] / In(2L)t In(2R)Cy, Cy[1] amos[Roi-1] pr[1] cn[1]* s mutací genu *Su(var)205* vedoucí ke zkrácenému proteinu HP1 o doménu důležitou pro lokalizaci proteinu v jádře (v textu dále zkracováno jako *Su(var)205<sup>04</sup>/SM1*)
- *yw; Sco / SM1*, tj. kmen nesoucí mutaci na druhém chromozómu, jedinci mají menší počet chlupů na hrudním segmentu těla (v textu dále jako *Sco/SM1*)
- *yw; Sb / TM6, Ubx*, tj. kmen nesoucí mutace na třetím chromozómu, jedinci mají kratší chlupy na hrudním segmentu těla a jejich haltery jsou zvětšené (v textu dále *Sb/TM6*)

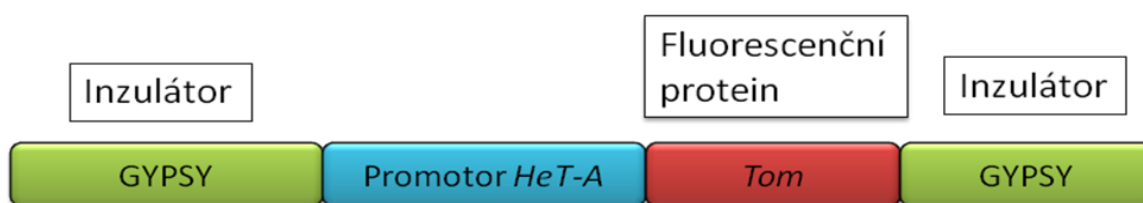
Jako kmeny pro identifikaci trans-modifikátorů TPE byly použity linie: *yw; Z<sup>A</sup> / TM3*; *yw; Chro<sup>DKG</sup> / TM3*; *yw; Spn<sup>E03987</sup> / TM3*; *yw; Jil-1 / TM3*; *yw; Scm<sup>ET50</sup> / TM3* a *yw; Scm<sup>DI</sup> / TM3*. Pro křížení a jako kontrolní kmen byl využit *yw; Sb / TM3, GFP*.

## 3.2 Příprava konstruktů HeTom

Konstrukt HeTom nese v sobě reportérový gen pro fluorescenční protein Tomato (Clontech) pod kontrolou promotoru *HeT-A*. Část s promotorem *HeT-A* byla připravena metodou PCR s primery navrženými podle dříve publikované sekvence (Danilevskaya et al., 1994) (GenBank accession number U06920). Sekvence použité pro reakci PCR byly nukleotidy 70 až 961 ze sekvence U06920.

Jako templát pro reakci PCR byla použita genomová DNA izolovaná z kmene *11-5*. Izolace DNA byla prováděna pomocí komerčního kitu PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, kat. číslo: K1820-01) podle návodu dodávaného výrobcem. Produkt PCR byl zaklonován do vektoru pGEM (Promega, kat. číslo: A1360) a následně osekvenován a publikován v GenBank (GenBank accession number je KJ081250). Díky restričním místům byl promotor *HeT-A* překlónován do konstruktů GypsyTOM, který byl komerčně připraven firmou GenScript (USA).

Konstrukt HeTom (Obr. 7) je na obou koncích ohraničen inzulátory gypsy, které brání pozičnímu efektu při inzerci konstruktů do genomu. Konstrukt byl následně zaklonován přes restriční místa do vektoru pCasper4. Funkčnost konstruktů byla ověřena transfekcí do buněk S2. Pro transfekci byl využit kit „Efectene Transfection Reagent“ (Qiagen, kat. číslo: 301427) a bylo postupováno dle instrukcí dodaných výrobcem. Poté byl konstrukt injikován do vajíček drozofily kmene *yw*, a to komerčně firmou Rainbow transgenic, Inc. (USA). Integrace vektoru do genomu drozofily proběhla na základě *P*-elementové inzercí prostřednictvím *P*-elementových konců přítomných ve vektoru pCasper4.



**Obr. 7:** Schéma konstruktů HeTom. *Tom* je gen pro fluorescenční protein Tomato o velikosti 1.4 kbp. Transkripce Tomato je řízená promotorem elementu *HeT-A*, který má velikost 860 bp. Konstrukt je opatřen inzulátory GYPSY pro zabránění pozičního efektu po integraci konstruktů do genomu.

Z komerčně injikovaných vajíček se vylíhli běloocí jedinci, potenciálně nesoucí transgen v zárodečné linii. Tito jedinci byli po jednom křížení s jedincem opačného pohlaví kmene *yw*. Transformanti v potomstvu byli selektováni na základě červeného zbarvení očí, které

bylo dáno expresí genu *w* přítomného ve vektoru pCasper4. Transformanti v jednotlivých liniích byli kříženi navzájem. Z tohoto křížení bylo selektováno homozygotní potomstvo. Takto bylo získáno deset transgenních linií.

### 3.2.1 Lokalizace konstruktů HeTom v genomu jednotlivých linií

Poloha transgenu v genomu drozofily byla určena pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace. Preparáty byly připravovány z polytenních chromozómů slinných žláz larev třetího instaru. Protokol byl převzatý z práce (Sahara et al. 1999). Pro hybridizaci byla použita směs dvou biotinylovaných sond, specifických ke genu *w* (gen *w* je součástí konstruktů pCasper4). Sonda  $w^1$  byla získána pomocí PCR s primery w6248F a w8748R, sonda  $w^2$  s primery w1056 a w13065.

w6248F (forward) 5' - CGAGCTTCACTCAACCAACA - 3', 61 °C, 1500 bp

w8748R (reverse) 5' - GAAGGAGGCGCAATTATTCA - 3', 61 °C, 1500 bp

w1056 (forward) 5' - TTGGAAACTCGGATCTTGG - 3', 61 °C, 1500 bp

w13065 (reverse) 5' - ACGGAACCATGAGAGGTACG - 3', 61 °C, 1500 bp

Preparáty byly pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem (Zeiss, Axioplan 2) s vhodnými filtry a následně foceny pomocí fotoaparátu (Olympus, XM10). Fotografie byly upraveny v programu Adobe Photoshop 11.0.2. Podle nich a podle map jednotlivých chromozómů (Lindsley & Zimm 1992) byla určena poloha konstruktů HeTom.

### 3.2.2 Vyhodnocování fluorescenčního signálu u linie 35HeTom

U transgenních jedinců byla fotografována fluorescence pod stereo-mikroskopem (Olympus, SZX12) s filtrem pro červené spektrum pomocí fotoaparátu Olympus (E-600). Byli vyhodnocováni buď celí jedinci, nebo jednotlivé orgány. Pro pitvu larválních orgánů byly použity larvy třetího vývojového instaru. Pitva probíhala na podložním sklíčku v kapce fyziologického roztoku. K hodnocení intenzity fluorescenčního signálu v testes byly použity larvy před zakuklením. Intenzita fluorescenčního signálu byla vyhodnocována na získaných snímcích pomocí programu Adobe Photoshop 11.0.2. Byla zaznamenána plocha a integrovaná denzita. Ta byla využita ke kvantifikaci fluorescenčního signálu.

### **3.3 Izolace genomové DNA**

DNA byla izolována pomocí fenol-chloroformu. Vždy 20 jedinců bylo homogenizováno v 700  $\mu$ l extrakčního pufru (100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH = 8,0; 50 mM EDTA, pH = 8,0; 0,5% Sarkosyl; 100  $\mu$ g/ml Proteináza K). Po 12 hodinách horizontálního promíchávání při 37 °C bylo přidáno 700  $\mu$ l fenolu (pH = 8,0). Po 30 minutách byly vzorky centrifugovány (5000g, 15 min.) a odebrána vrchní fáze. Postup s fenolem byl 2x zopakován a pak přidána směs fenol-chloroform-isoamylalkohol (25:24:1). Po 15 minutách mírného horizontálního třepání následovala centrifugace za stejných podmínek jako u fenolu a opatrné odebrání horní fáze. Dále bylo přidáno 600  $\mu$ l směsi chloroform-izoamylalkohol (24:1) a třepáno a centrifugováno za stejných podmínek. DNA byla precipitována 3M Na-acetátem a 96% etanolem a rozpuštěna ve 100  $\mu$ l miliQ vody. Integrita a kvantita genomové DNA byla vyhodnocena spektrofotometricky (Biochrom, WPA Biowavw II).

### **3.4 Izolace RNA, syntéza cDNA a kvantitativní Real-time PCR**

Pro izolaci vzorků RNA byl použit komerční kit NucleSpin RNA II (Macherey-Nagel, kat. číslo: 740955.50) a bylo postupováno přesně podle instrukcí přiložených výrobcem. Vzorky RNA byly převedeny do vzorků cDNA použitím oligo(dT) a reverzní transkriptázy Superscript II (Clontech, kat. číslo: 1308819A). Pro kvantitativní Real-time PCR byl použit cycler Light Cycler CFX96 BioRad Real-time PCR systém (Biorad) a SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II (Takara, kat. číslo: RR820A). Tato metoda byla zvolena pro získání relativní úrovně cílového transkriptu v porovnání s referenčním transkriptem ribozomálního proteinu RpL32. Kvantifikace byla provedena ze dvou nezávislých experimentů, které byly vždy v triplikátech.

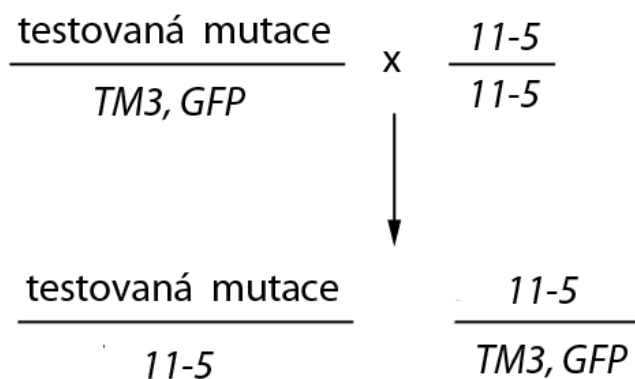
### **3.5 Použité primery**

Zde jsou uvedeny sekvence, teploty nasedání a velikost produktů všech primerů, které byly v práci použity. Všechny primery byly komerčně nasyntetizovány firmou Generi Biotech.

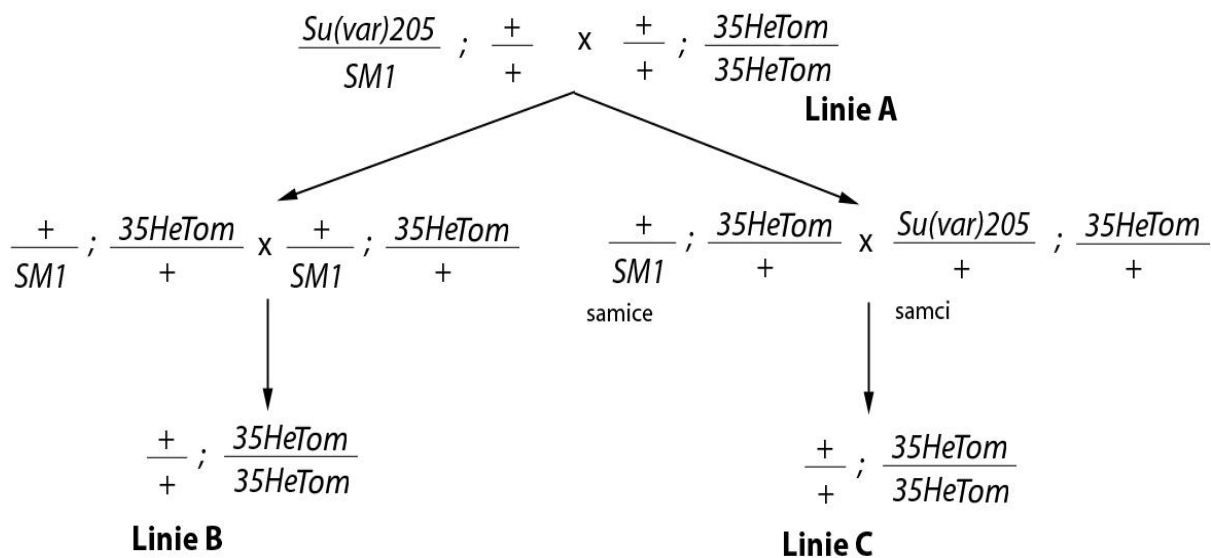
*HeT-A* (forward) 5'- ATGTCTTCTCCTCCGTCCACC – 3', 58 °C, 150 bp  
*HeT-A* (reverse) 5'- TTCTCTATGCTATTGTCGCTGTGC – 3', 58 °C, 150 bp  
*RpL32* (forward) 5'- GGACAGTATCTGATGCCCAAC – 3', 58 °C, 145 bp  
*RpL32* (reverse) 5'- ATCTCGCCGCAGTAAACGC – 3', 58 °C, 145 bp  
*Tom1115* (forward) 5'- GGGCGAGGGCCGCCCC – 3', 58 °C, 102 bp  
*Tom1299* (reverse) 5'- CGAAGTTCATCACGCGCTC – 3', 58 °C, 102 bp  
*Hsp70a Ft* (forward) 5'- CAGACGCAGTCATCACAGTTC - 3', 58 °C, 151 bp  
*Hsp70Aa Rt* (reverse) 5'- TTGAGGTTCTTGTCCAGTCCG - 3', 58 °C, 151 bp  
*W-MN 1a* (forward) 5'- CTGTTACCACATCGTCCGTG – 3', 56 °C, 312 bp  
*W-MN 1b* (reverse) 5'- TGTTGTCGTCCCGTTTCG – 3', 56 °C, 312 bp  
*WExo02 1a* (forward) 5'- CCTCTTTATCGGCTCCCTAACG – 3', 57 °C, 146 bp  
*WExo02 1b* (reverse) 5'- TCGTGTGCTGACATTTGCTGAG – 3', 57 °C, 146 bp  
*Het\_3UTR* (forward) 5'- CACTTACCTCCAATTTCCCATC – 3', 56 °C, 891 bp  
*Het\_Rev* (reverse) 5'- TTTAACTTTGCTGGTGGAGGTA – 3', 56 °C, 891 bp

### 3.6 Použitá křížení

Při identifikaci modifikátorů TPE bylo použito křížení kmene *11-5* s jednotlivými mutantními liniemi (Obr. 8). Pro přípravu linie *35HeTom* s různou telomerickou délkou byla linie *35HeTom* křížena s mutantními kmeny *Su(var)205<sup>02</sup>/SM1* a *Su(var)205<sup>04</sup>/SM1* (Obr. 9).



**Obr. 8:** Schéma křížení linií s mutací značenou GFP s kmenem *11-5*.



**Obr. 9:** Schéma křížení linie 35HeTom s kmeny *Su(var)205/SM1* pro vytvoření různě dlouhých telomer v linii 35HeTom. Linie A je základní linie s nejkratšími telomery. Tato linie byla křížena s kmenem *Su(var)205/SM1* nesoucí mutaci v genu pro HP1 a tím stimulující telomerickou elongaci. Křížením byla vytvořena linie B nesoucí delší telomery a linie C nesoucí nejdelší telomery.

### 3.7 Sledování vlivu environmentálních podmínek na *HeT-A*

#### 3.7.1 Příprava vzorků při vyhodnocení vlivu teplotního stresu

Čerstvě vylíhnutí dospělci byli vybíráni a drženi odděleně po dobu 3 dnů. Následně byli samci i samice společně vystaveni na 1 hodinu teplotě 35 °C nebo 0 °C. Po uplynutí hodiny byli jedinci umístěni na živné médium do teploty 25 °C. Teplotní stres byl testován jak po jedné generaci, tak opakovan u čtyř po sobě jdoucích generací. Byla izolována RNA a provedena kvantitativní Real-time PCR.

Rovněž byly testovány larvy třetího instaru. Ty byly na dobu jedné hodiny vystaveny změně teploty na 0 °C a na 35 °C. RNA byla u larev izolována jak hned po stresu, tak i po jedné hodině při 25 °C.

### 3.7.2 Vliv fotoperiody

Jedinci z jedné původní vialky byli rozděleni na dvě poloviny. Jedna polovina byla ponechána při světelné fotoperiodě a druhá byla umístěna do absolutní tmy. Následně byl sledován rozdíl v intenzitě fluorescenčního signálu v testes u třetího larválního instaru. Pokus byl následně dále rozšířen a to tak, že byly pozorovány rozdíly v expresi několik po sobě následujících dnů a i v dalších generacích při stejném světelném režimu. Aby bylo možné zjistit, zda se jedná o reakci vyvolanou pouze působením světla na expresi nebo zda se jedná o nějakou vnitřní fyziologickou příčinu jedince, byla do pokusu přidána třetí vialka, která byla na otočené světelné fotoperiodě.

Další částí byla analýza toho, jaký vliv má na expresi *HeTom* střídání světelných režimů mezi generacemi. Pokus probíhal jako v předchozích případech, jen dospělcům vždy byla fotoperioda mezi jednotlivými generacemi změněna.

### 3.7.3 Vliv parakvatu

Pro zjištění účinků chemických látek na aktivitu elementu *HeT-A* byl zvolen herbicid parakvat, u kterého byly potvrzeny toxické vlastnosti a schopnost vyvolávat oxidativní stres. Parakvat-dichlorid (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridin-1,1'-dium-dichlorid,  $C_9H_{13}N_5O$ ) je neselektivní herbicid na hubení plevelů. V dnešní době je však již jeho používání zakázáno.

Opět jako při zjišťování vlivu teplotního stresu byli čerstvě vylíhnutí jedinci drženi tři dny odděleně. Následně byli rozděleni do šesti vialek – samotní samci, samotné samice a obě pohlaví společně (vždy po 2 vialkách). Parakvat (Sigma – Aldrich, kat. číslo: 36541) byl aplikován na terčík filtračního papíru na dně vialky. Byl použit roztok o koncentraci 20 mM parakvatu v 1% sacharóze a celkovém objemu 300  $\mu$ l. Jako kontrola byl použit roztok 1% sacharózy. Mouchy byly s parakvatem inkubovány 16 hodin. Pak byla izolována RNA a provedena kvantitativní Real-time PCR.



## 4. Výsledky

### 4.1 Promotorová aktivita elementu *HeT-A*

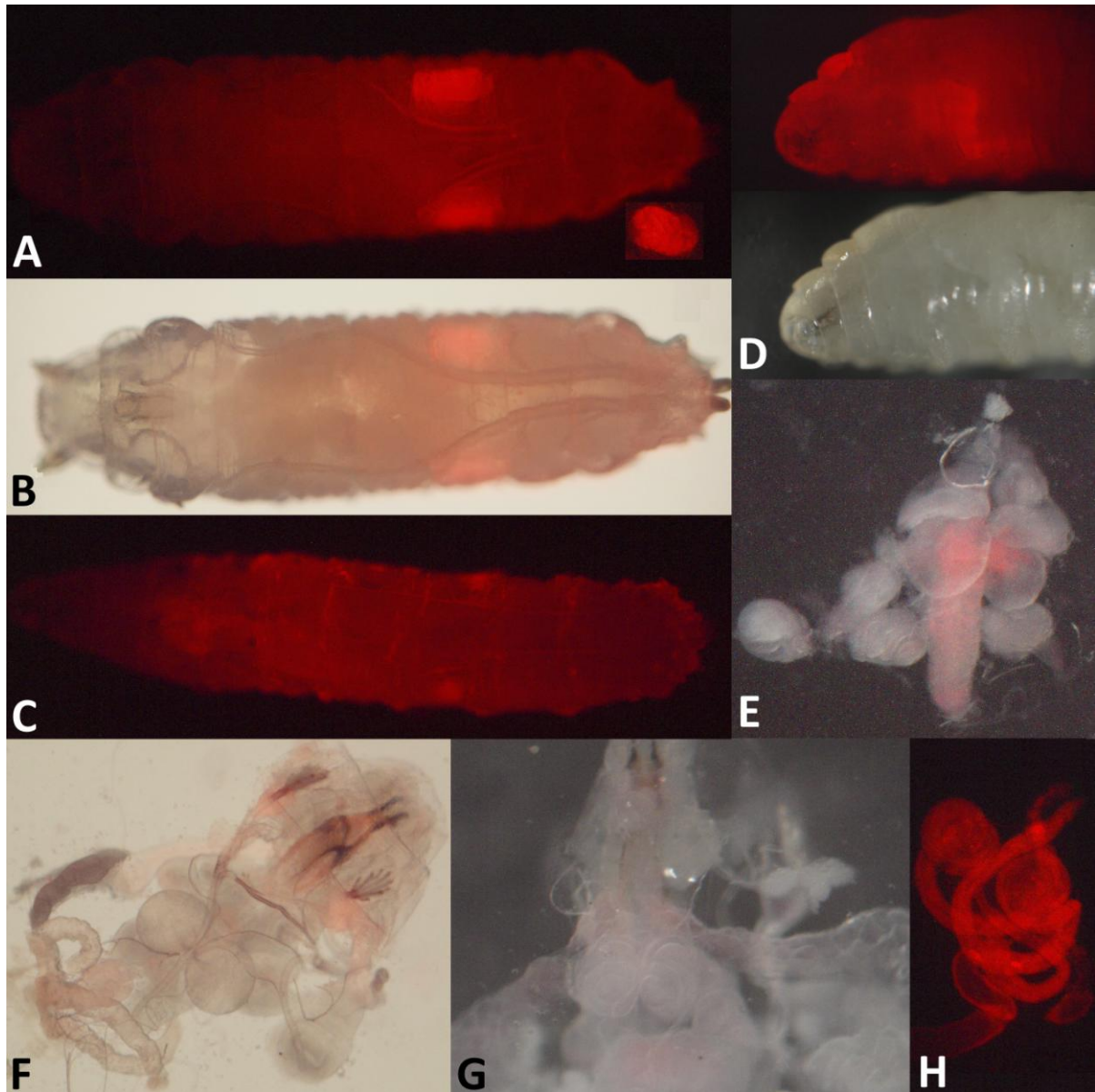
Pro studium aktivity promotoru *HeT-A* byl kombinací PCR a klonování vytvořen konstrukt HeTom, jehož funkčnost byla ověřena transfekcí buněk S2. Vytvořený konstrukt byl poté injikován firmou Rainbow Transgenic do kmene *yw*. Na základě exprese genu *w* byli identifikováni transgenní jedince a připraveny homozygotní linie. Takto bylo získáno deset transgenních linií s konstruktem HeTom. U třech z těchto linií byla pozice transgenů určena pomocí *in situ* hybridizace. U všech těchto linií byl transgen mapován na chromozóm 3, u linie 35HeTom je inserce v místě 86E, v linii 2HeTom v pozici 65E a v linii 3HeTom v místě 89E. U zbylých linií bylo umístění inzertu určeno pouze na daný chromozóm, a to využitím standardního křížení s kmeny *Sco/SM1* a *Sb/TM6* nesoucími mutace na chromozómu 2 a chromozómu 3. Takto bylo určeno, že všechny linie nesou transgen na chromozómu 3, s výjimkou linie 29HeTom, která má integrovaný konstrukt na chromozómu 2. Při srovnání umístění konstruktů s intenzitou a lokalizací fluorescence mezi jednotlivými liniemi nebyl zaznamenán žádný výrazný rozdíl, což znamená, že pozice konstruktů v genomu, patrně díky ochranné funkci inzulátorů, nehraje významnou roli v aktivitě *HeTom*. Pro další experimenty byla zvolena linie 35HeTom.

#### 4.1.1 Exprese konstruktů HeTom v průběhu vývoje jedince

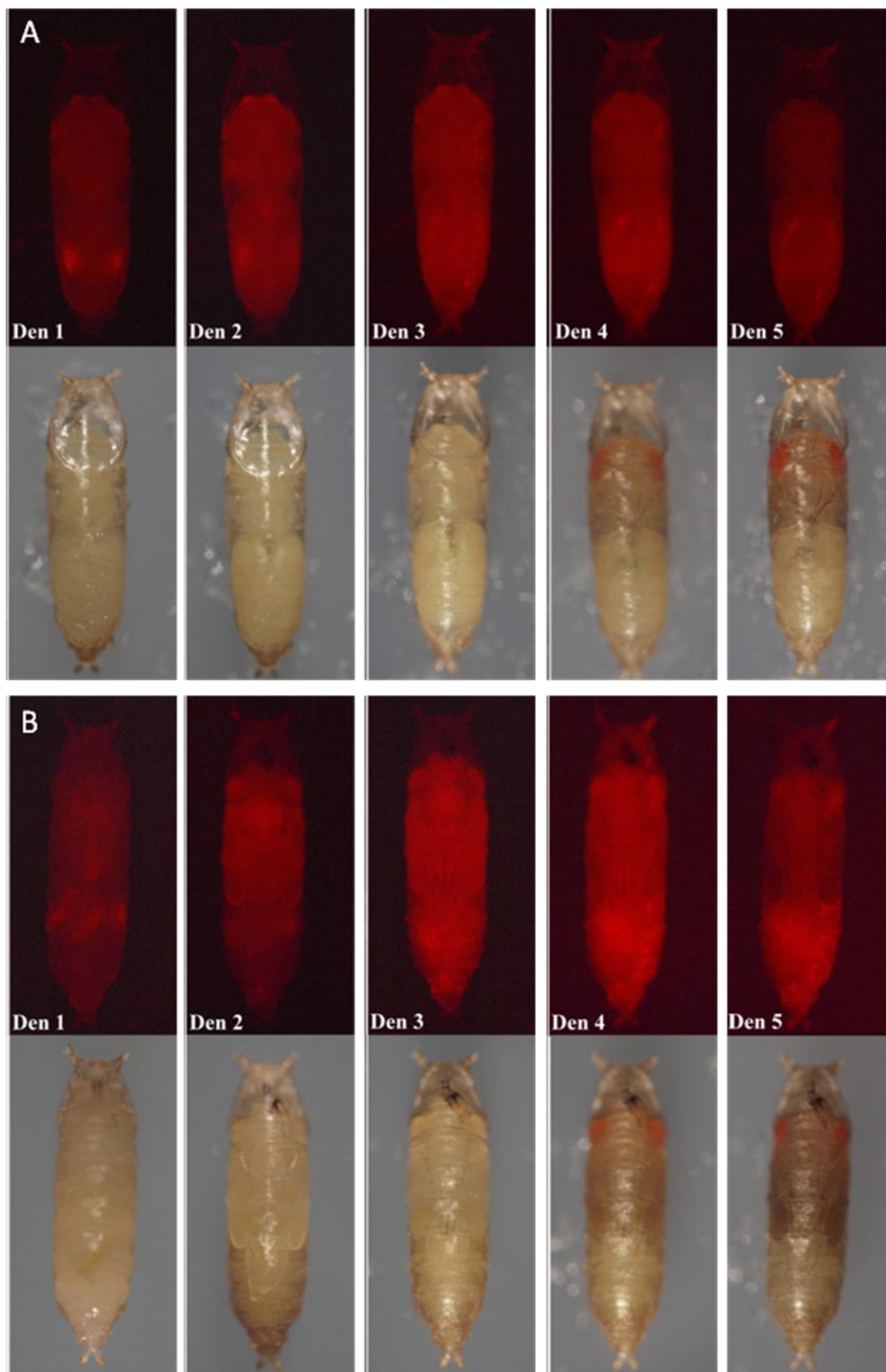
Intenzita a lokalizace exprese konstruktů HeTom byla sledována v průběhu vývoje drozofily. Nebyla pozorována žádná exprese u embryí. V larválním období byly na expresi *HeTom* vyhodnocovány larvy třetího instaru. Zde byla exprese patrná v celém těle, nicméně výrazněji zesílená v diploidních tkáních, což bylo v souladu s dřívějšími studiemi aktivity *HeT-A* (George & Pardue 2003; Walter & Biessmann 2004). Exprese byla nacházena v mozku a v imaginálních discích jako jsou oční, antenální, nožní a křídelní disky, stejně tak v labrálních a labiálních discích, dorzálních prothorakálních imaginálních discích, imaginálních discích slinných žláz a imaginálních prstencích předního a zadního střeva (Obr. 10). Charakter exprese pozorovaný v mozku byl nápadně podobný charakteru endogenního elementu *HeT-A* (Walter & Biessmann 2004). Obzvláště silné centrum exprese bylo v optických lalocích a ventrálním gangliu. Na rozdíl od mozku byla exprese

v antenálních, nožních a křídelních discích poměrně slabá. Překvapivě fluorescence, i když slabá, byla pozorována ve slinných žlázách. Nejvýraznější exprese byla ovšem pozorována v testes. Byla pozorována u všech samců, ale její intenzita se mezi jednotlivými jedinci značně lišila, od velmi silné až po chabě patrnou (Obr. 10A, C). Překvapivě exprese nebyla pozorována v ováriích.

Expresi konstruktů *HeTom* byla pozorována po celou dobu vývoje kukly. Fluorescence v jednotlivých kuklách byla zaznamenávána každý den jejich vývoje, a to jak z dorzální, tak z ventrální strany (Obr. 11). V průběhu prvních hodin od zakuklení charakter exprese připomínal expresi pozorovanou u larev třetího instaru, tj. bez žádných velkých změn v intenzitě nebo lokalizaci signálu. Náhlý nárůst v intenzitě exprese nastal druhý den a vrchol byl pozorován třetí až čtvrtý den. Během vývoje v kukle byla exprese *HeTom* spojena s vývojem adultních orgánů. Aby bylo vyloučeno, že pozorované fluorescenční signály pochází z autofluorescence, byli vyhodnoceni také kontrolní jedinci kmene *yw* a *Oregon R*. U těchto kmenů nebyla pozorována žádná fluorescence (Obr. 12A). U dospělých samic a samců srovnání s kontrolními jedinci *yw* naznačilo, slabou expresi *HeTom* v celém těle transgenních jedinců (Obr. 12B, C). Srovnání exprese mezi dospělými samci a samicemi bylo rovněž provedeno pomocí kvantitativní Real-time PCR. V porovnání se samicemi samci vykazují přibližně dvakrát větší hodnotu exprese (Obr. 13).



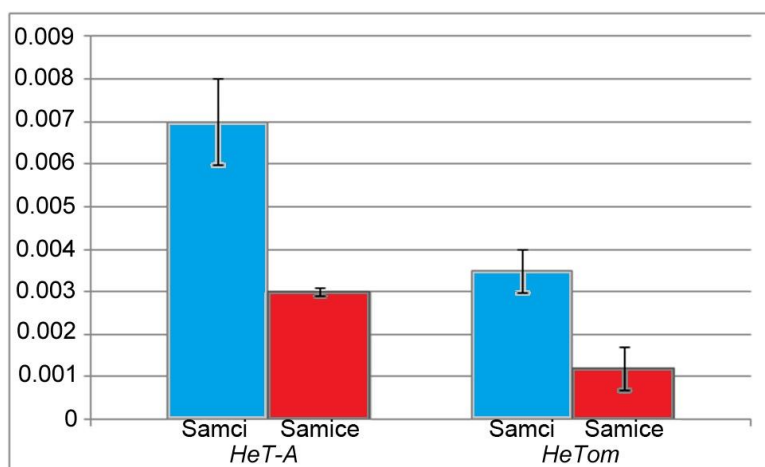
**Obr. 10:** Expresse elementu *HeT-A* v jednotlivých orgánech drozofily. Celá larva s expresí v testes (A), celá larva při průniku bílého světla i fluorescence (B), celá larva s expresí v různých segmentech těla (C), přední část larvy s mozkem při fluorescenčním světle a při bílém světle (D), mozek (E), přední část těla s mozkem a počátkem střeva proventrikulem (F), přední část těla s křídelními, nožními a očními disky (G), testes (H).



**Obr. 11:** Vývoj exprese v po celou dobu vývoje kukly z dorzální (A) a ventrální (B) strany.



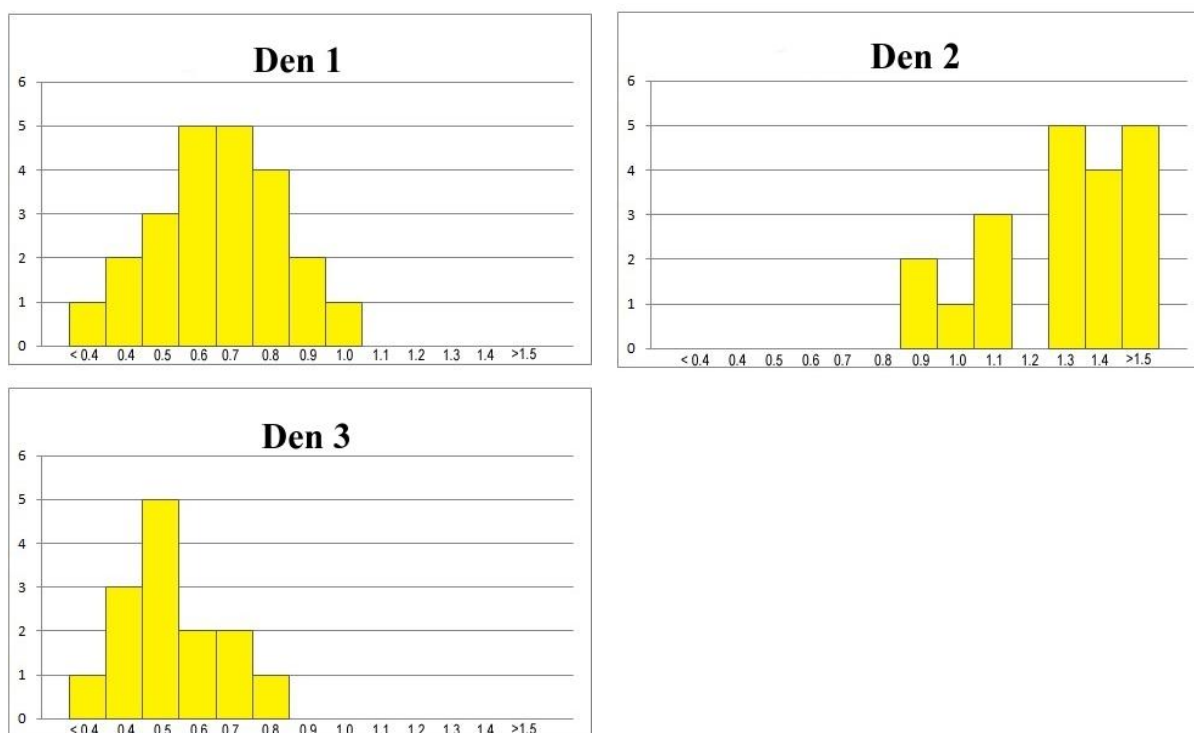
**Obr. 12:** Srovnání fluorescence u jedinců linie *HeTom* a kontrolních jedinců kmenů *yw* a *Oregon R*. Kontrolní kukly *Oregon R* pod viditelným světlem (levý panel) a fluorescenčním světlem (pravý panel) (A). Srovnání u dospělých samců (B) a dospělých samic (C) pod fluorescenčním světlem (horní panely) a viditelným světlem (dolní panely).



**Obr. 13:** Hladina transkriptu *HeTom* a *HeT-A* u samců a samic. Transkripční hladiny byly normalizovány k hladině transkriptu *RpL 32*.

### 4.1.2 Variabilita v expresi *HeTom*

Okamžitý dojem, který byl získán při pozorování jednotlivých larev, byla variabilita v expresi *HeTom*. Obecně lze říci, že žádná larva nevykazovala expresi ve všech výše zmíněných orgánech. Byla patrná jednak variabilita v lokalizaci fluorescence, ale také i variabilita v intenzitě signálu. Bylo proto rozhodnuto variabilitu vyhodnotit. Pro její vyhodnocení byla využita fluorescence v testes. Byla hodnocena intenzita fluorescence a velikost oblastí s tímto signálem. Intenzita exprese v testes se výrazně lišila jak mezi různými jedinci, tak různými vialkami, tak i v rámci jedné vialky v průběhu po sobě následujících dnů. Lze konstatovat, že změny byly nepředvídatelné a velmi individuální. Jedno z měření je zaznamenáno na Obr. 14. Rozdílné výsledky v míře transkripční aktivity byly také získány při porovnání různých linií *HeTom*, i když patern zůstával vždy stejný.



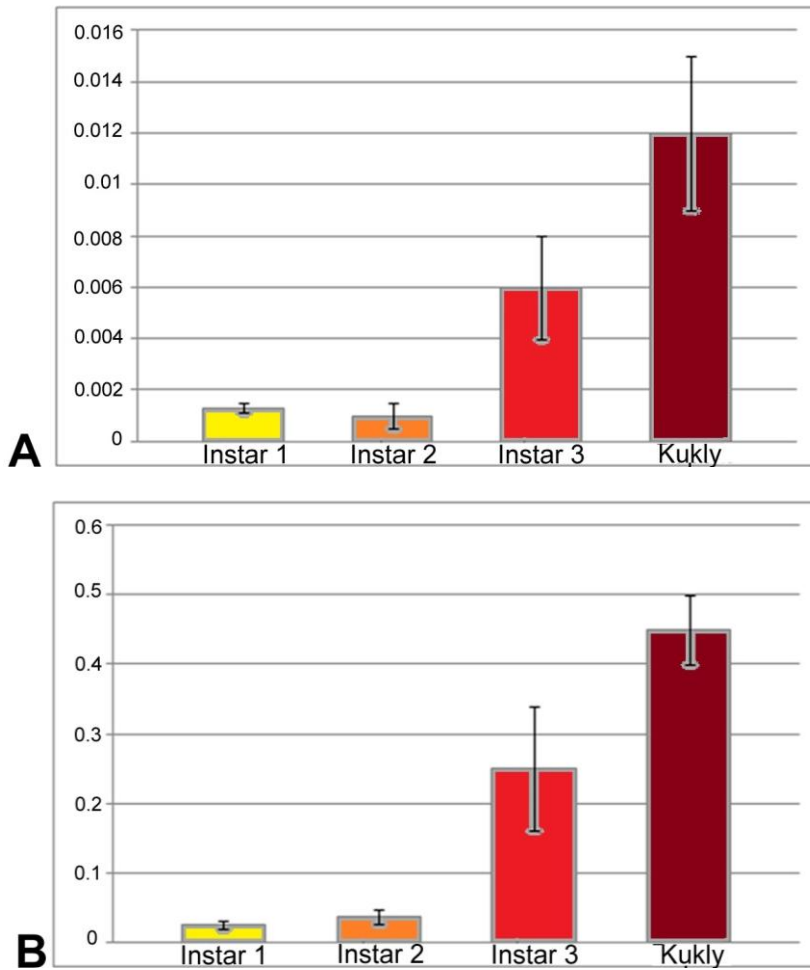
**Obr. 14:** Variabilita v intenzitě fluorescence. Variabilita v intenzitě fluorescence byla vyhodnocována u larev třetího instaru z jedné vialky. Vyhodnocení bylo prováděno v prvním, druhém a třetím dni, kdy se tyto larvy začaly objevovat. Jednotlivé larvy byly vyfotografovány a intenzita fluorescence vyhodnocena pomocí programu Adobe Photoshop. Na ose *x* je zaznamenána intenzita fluorescence, na ose *y* počet larev s danou intenzitou. Z grafů je patrné, že intenzita byla různá jak mezi různými jedinci, tak mezi různými dny.

Pozorování *in vivo* exprese *HeTom* bylo prováděno po dobu více než jednoho roku a v průběhu tohoto času, i navzdory tomu, že jednotlivé linie byly chovány v konstantních laboratorních podmínkách, byly pozorovány překvapující změny v charakteru exprese.

Ačkoliv z časových důvodů nebylo možné se tímto detailněji zabývat, lze říci, že v průběhu letních měsíců (červenec – srpen) více než 80% larev vykazovalo vyšší expresi v mozku než na podzim a v zimě, kdy pozorovaná exprese v mozku byla přibližně jen u 30 % larev. Významné bylo především pozorování exprese v dorzálních prothorakálních imaginálních discích (Obr. 10F). Tato exprese nebyla pozorována v průběhu celého roku, jen na konci srpna, kdy exprese náhle a neočekávaně narostla a byla velmi intenzivní a jednoduše pozorovatelná i přes kutikulu jedince. Tato exprese byla pozorována u více než 50% larev. Za několik týdnů začala exprese v dorzálních prothorakálních imaginálních discích postupně slábnout až zmizela úplně. Důležitým rysem těchto změn byl současný nárůst fluorescence u všech vialek a všech linií. Proti tomu nebyly pozorovány žádné změny a rozdíly v expresi reportérového transgenu *white*, který je součástí konstruktu *HeTom*.

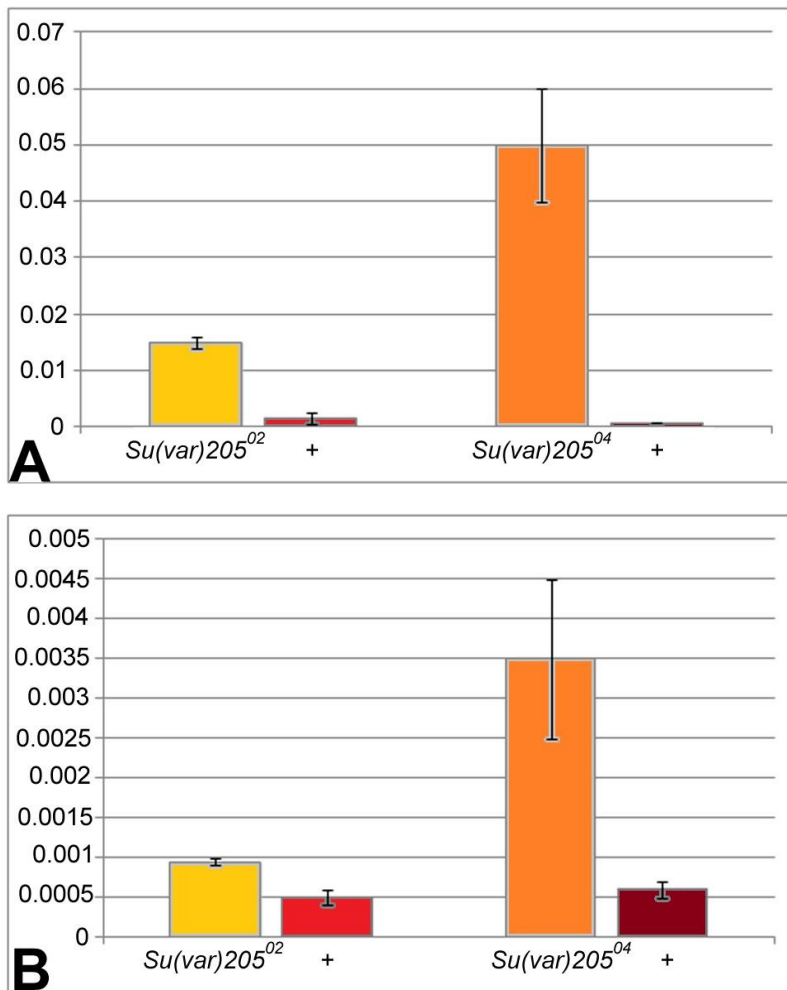
#### 4.1.3 Korelace mezi *HeTom* a telomerickým *HeT-A*

Lze namítat, že kvůli různému „prostředí“ v genomu, aktivita *HeTom* nemusí odpovídat aktivitě telomerického *HeT-A*. Aby bylo možné potvrdit nebo vyvrátit, že transkripce *HeTom* a *HeT-A* jsou regulovány stejným způsobem jako odpověď na rozdílné podněty, byl zjišťován tento vztah pomocí metody kvantitativní Real-time PCR. Hladina transkripce *HeT-A* a *HeTom* byla sledována v průběhu vývoje drozofily. V obou případech byl pozorován postupný nárůst u larev prvního, druhého i třetího instaru a stejně tak i u kukel (Obr. 15). Korelace ve změnách hladiny transkriptu *HeTom* a *HeT-A* byla také pozorována při testování vlivu mutace HP1. Genetickým křížením byly získány linie *HeTom*, které měly v genomu mutace *Su(var)205*. Byly využity mutace *Su(var)205<sup>04</sup>* a *Su(var)205<sup>02</sup>*. U *HeT-A* i *HeTom* byl pozorován nárůst transkripční úrovně u dospělých jedinců *Su(var)205/+* ve srovnání s kontrolními dospělými jedinci *Su(var)205<sup>+</sup>*. Ačkoli nárůst způsobený mutacemi HP1 byl výrazně silnější u *HeT-A* než u *HeTom* (Obr. 16), musíme vzít v úvahu, že telomerický *HeT-A* se v genomu vyskytuje ve vícero kopiích, zatímco *HeTom* pouze ve dvou. Z tohoto důvodu lze předpokládat, že v případě *HeT-A* by potenciální efekt mutace na celkovou hladinu transkriptu *HeT-A* mohl být větší. Rovněž byla pozorována určitá korelace mezi transkripční úrovní *HeT-A* a *HeTom* při porovnání samců a samic (Obr. 13). Spojitost mezi *HeT-A* a *HeTom* byla nalezena při srovnávání vlivu teplotního stresu (viz. dále v textu). Celkově tyto data naznačují, že *HeTom* by mohl být dobrým reporterem transkripční aktivity telomerického elementu *HeT-A*.



**Obr. 15:** Transkripční aktivita *HeT-A* a *HeTom* v průběhu vývoje. Transkripční aktivita byla vyhodnocována pomocí kvantitativní Real-time PCR u prvního, druhého a třetího larválního instaru a u kukel, a to jak elementu *HeT-A* (A), tak *HeTom* (B). Jako referenční gen byl použit *RpL32*.





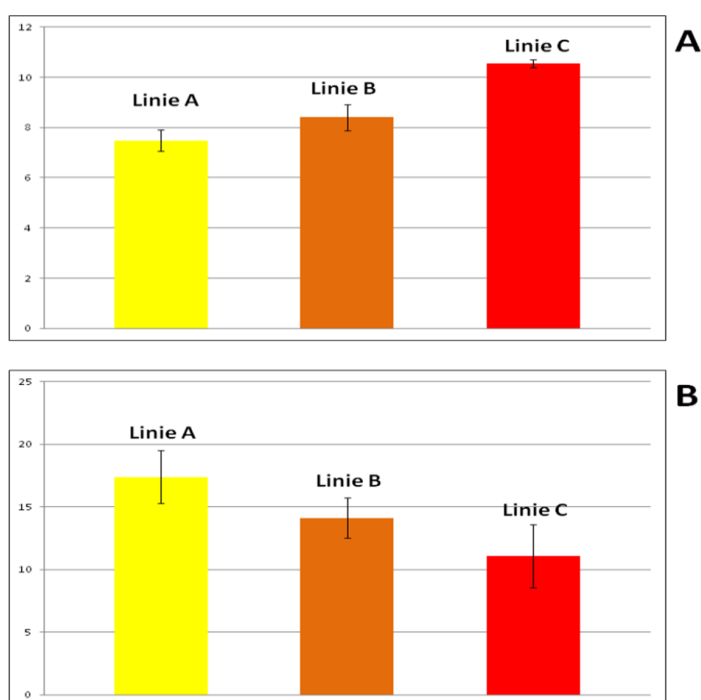
**Obr. 16:** Vliv mutace v  $Su(var)205$  na transkripční aktivitu  $HeT-A$  a  $HeTom$ . Porovnání transkripční aktivity elementu  $HeT-A$  (A) a konstruktů  $HeTom$  (B) mezi jedinci  $Su(var)205$  a  $Su(var)205^+$ .

## 4.2 Vliv exogenních i endogenních faktorů na expresi $HeT-A$

Předpokládá se, že délka telomer a aktivita telomerických kompenzačních mechanismů je ovlivňovaná řadou exogenních a endogenních faktorů. Variabilita, která byla pozorována v expresi  $HeTom$  nasměrovala tuto práci právě k identifikaci faktorů, které telomerickou délku u drozofily ovlivňují. Cílem nebylo žádné detailní studium vlivu těchto faktorů, ale spíše identifikace potenciálu transgenů  $HeTom$  pro studium regulace telomerické délky environmentálními vlivy. Pro toto testování byl vybrán faktor délky telomer, vliv teplotního a oxidativního stresu a vliv fotoperiody.

### 4.2.1 Vliv délky telomer na transkripční aktivitu *HeTom*

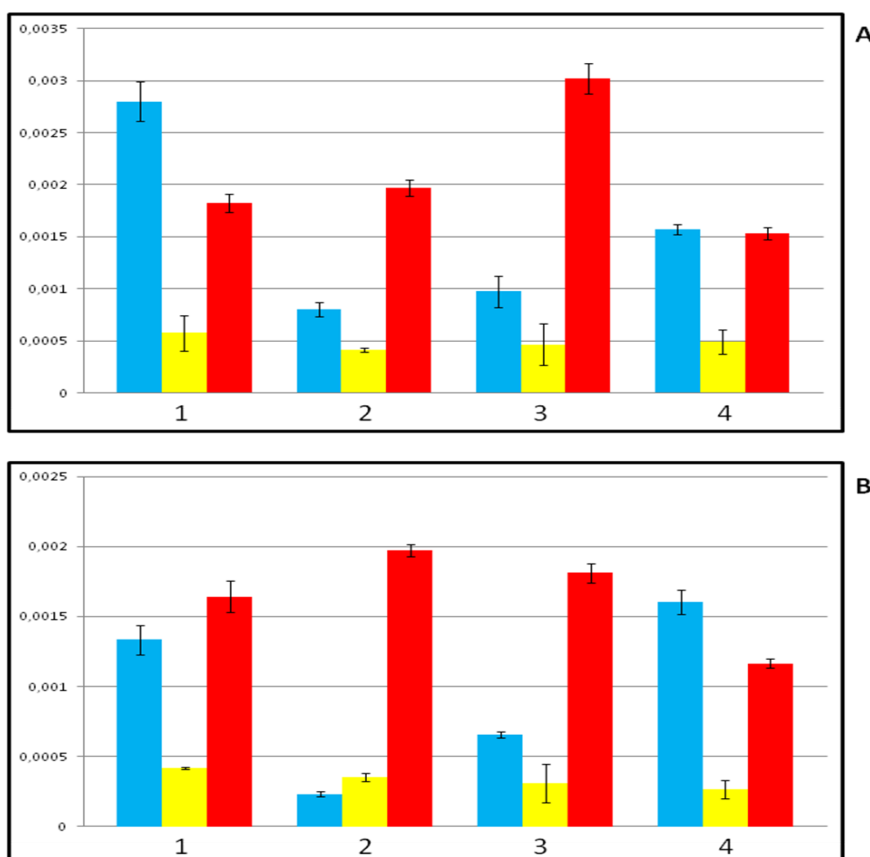
Lze předpokládat, že s narůstající délkou telomer roste celková transkripční aktivita elementu *HeT-A* a to díky většímu počtu opakování tohoto retroelementu v telomeře. Je možné ale také předpokládat, že mezi délkou telomer a aktivitou elementu *HeT-A* existuje negativní zpětná vazba, tj. pokud jsou telomery dlouhé, je to signál pro nižší aktivitu elementu *HeT-A* a naopak. Studovat transkripční aktivitu *HeT-A* relativně k počtu *HeT-A* elementů v genomu lze jen s obtížemi. Telomery jsou totiž tvořeny směsicí funkčních a především nefunkčních, různě zkrácených telomerických elementů. Transgen *HeTom* se naproti tomu v genomu vyskytuje jen v neměnném počtu. To vedlo k nápadu využití transgenu *HeTom* pro testování vlivu telomerické délky na aktivitu promotoru *HeT-A*. Využitím mutace v genu *Su(var)205* byly vytvořeny linie s různou délkou telomer. Relativní délka telomer u získaných linií byla srovnána pomocí kvantitativní Real-time PCR (Obr. 17A). Expres *HeTom* byla vyhodnocena u testes larev třetího instaru na základě fluorescenčního signálu (Obr. 17B). Z výsledků vyplývá, že expres *HeTom* v testes je ovlivňovaná délkou telomer, protože čím jsou telomery delší, tím je intenzita exprese *HeTom* nižší.



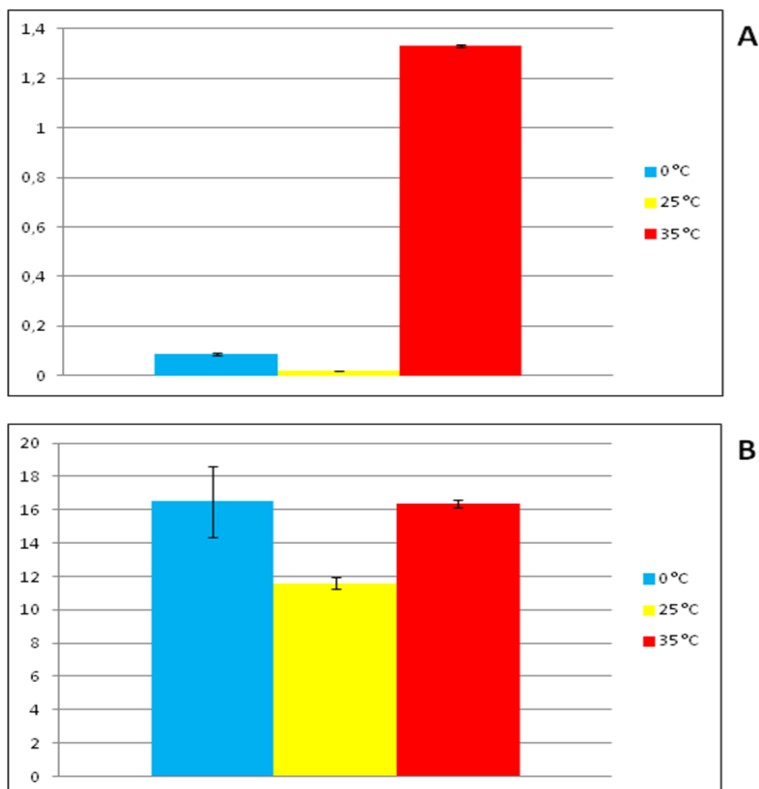
**Obr. 17:** Vliv telomerické délky na expresi *HeTom* v testes. Využitím mutace v *Su(var)205* byly vytvořeny linie 35*HeTom* A, B a C s různou délkou telomer. Relativní telomerická délka byla vyhodnocena pomocí kvantitativní Real-time PCR s primery pro element *HeT-A*. Byl tedy vyhodnocován relativní počet elementů *HeT-A* vzhledem ke genu *RpL32* (A). U linií 35*HeTom* A, B a C byla u larev třetího instaru vyhodnocena intenzita fluorescence *HeTom* v testes (B).

## 4.2.2 Vliv teplotního stresu na transkripční hladinu *HeTom*

Vliv teplotního stresu byl studován na transkripční úrovni jak *HeTom*, tak *HeT-A*. Jako stresové teploty byly využívány teploty 35 °C a 0 °C po dobu jedné hodiny. Kontrolní mouchy byly vystaveny teplotě 25 °C. Vliv teplotního stresu byl vyhodnocován u čtyř po sobě jdoucích stresovaných generací. U každé z těchto generací byl zaznamenán nárůst transkripce u obou skupin stresovaných jedinců (Obr. 18). Pokud dojde ke zvýšení aktivity telomerických elementů, teoreticky by mělo dojít také k prodloužení telomer. Proto bylo rozhodnuto vyhodnotit telomerickou délku přímých potomků stresovaných dospělců. Jak bylo patrné, telomerická délka potomků stresovaných jedinců byla mírně delší než délka u kontrolních jedinců (Obr. 19A). Paralelně jako kontrola byla sledovaná transkripční aktivita genu pro heat-shock proteinu Hsp70 (Obr. 19B), zde byl pozorován nárůst transkripční hladiny především při 35 °C.



**Obr. 18:** Vliv teplotního stresu na transkripční aktivitu *HeT-A* a *HeTom*. Dospělé mouchy linie 35HeTom byly vystaveny teplotám 0 °C (modré sloupce), 25 °C (žluté sloupce) a 35 °C (červené sloupce) po dobu jedné hodiny. Z poloviny jedinců byla izolovaná RNA pro další zpracování a druhá polovina jedinců byla použita pro založení další generace. Pomocí kvantitativní Real-time PCR byla hodnocena hladina transkriptu *HeT-A* (A) a *HeTom* (B) v jednotlivých generacích (1, 2, 3 a 4).



**Obr. 19:** Vliv teplotního stresu na telomerickou délku. Genomová DNA byla izolovaná z larev jako potomků první generace rodičů stresovaných teplotou 0 °C a 35 °C a kontrolních rodičů držených při 25 °C. DNA byla vyhodnocována na relativní množství elementu *HeT-A* v genomu vzhledem ke genu *RpL32* (A) a na hladinu transkriptu *Hsp70* (B) u kontrolních a stresovaných much.

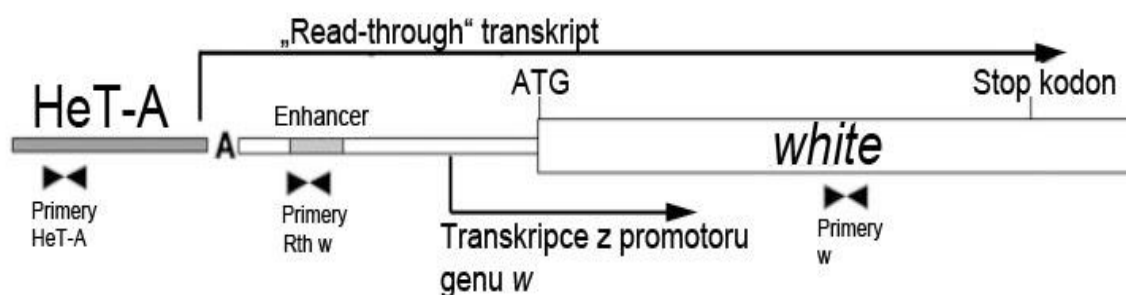
#### 4.2.3 Vliv dalších exogenních faktorů

Dále byl testován vliv oxidativního stresu po indukci herbicidem parakvatem a vliv světelné fotoperiody. Nicméně, výsledky z této části pokusu byly rozporuplné a je třeba je s větší důkladností zopakovat.

### 4.3 Identifikace trans-modifikátorů TPE

Na základě předcházejících studií vznikl předpoklad, že využití genu *w* pro identifikaci modifikátorů TPE je nevhodné. Spekulovalo se o tom, že promotorová aktivita *w* je příliš silná na to, aby reflektovala změny v působení TPE a že vhodnějším reportérem změn TPE bude *HeT-A* element, který sousedí přímo s oblastí TAS a jehož promotorová aktivita je 10-15x slabší než je aktivita *HeT-A* (Capkova Frydrychova et al. 2008).

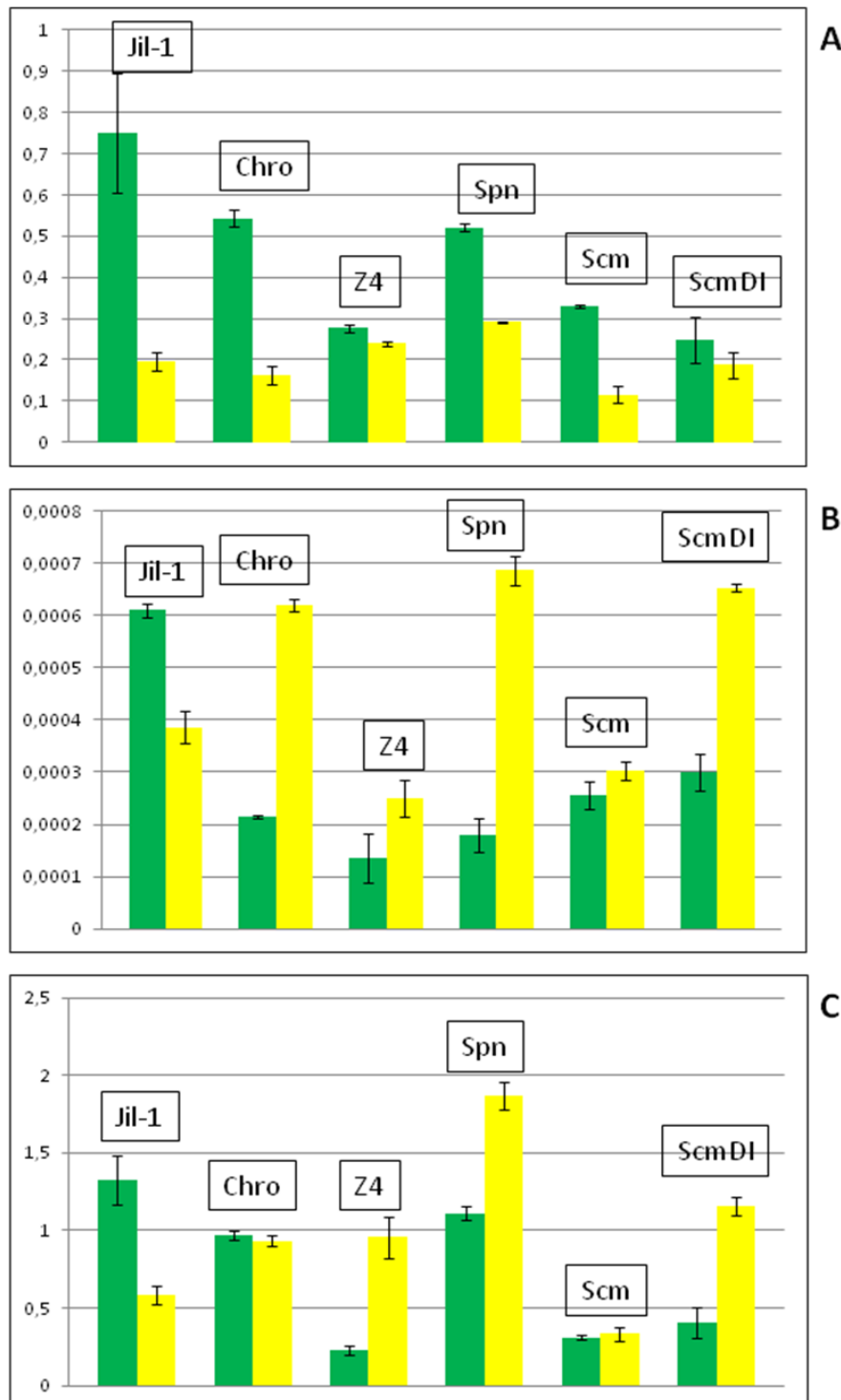
Pro identifikaci trans-modifikátorů TPE byl využit kmen *11-5*, který na chromozómu 2 mezi oblastí HTT a oblastí TAS nese transgen *w*. Ten je přepisován jak ze svého vlastního promotoru, tak promotoru přilehlého elementu *HeT-A* jako tzv. *HeT-A/w* „read-through“ transkript (Capkova Frydrychova et al. 2007). Bylo vybráno několik genů s potenciální rolí při TPE. Jednalo se o geny *Jil-1*, *Chro<sup>DKG</sup>*, *Scm<sup>ET50</sup>*, *Scm<sup>DI</sup>*, *Spn<sup>E03987</sup>* a *Z<sup>4</sup>*, které leží na chromozómu 3. Mutantní kmeny byly získány z kmenového centra v Bloomingtonu a genetickým křížením bylo u nich sjednoceno genetické pozadí. Tyto experimenty byly provedeny J. Masonem (NIEHS, USA). Jednotlivé kmeny byly kříženy s kmenem *yw*; *Sb/TM3, GFP*. Poté byli selektováni jedinci *yw; mutace/ TM3, GFP*. Následně tito jedinci byli kříženi s kmenem *11-5*. Pomocí fluorescence GFP byli v třetím larválním stádiu selektováni jedinci *yw; 11-5/+; mutace/+* a jedinci *yw; 11-5/+; +/TM3, GFP*. Byla vyizolována RNA a provedena kvantitativní Real-time PCR. Vliv přítomné mutace byl testován na transkripční aktivitu tzv. *HeT-A/w* „read-through“ transkriptu, telomerického transgenu *w* a elementu *HeT-A*. Pro testování „read-through“ transkriptu byly využity primery k oblasti genu *w*, které leží nad jeho promotorem, a tudíž tato oblast nemůže být promotorem *w* přepisovaná a je tedy kontrolována pouze promotorem sousedního *HeT-A*. Dále byly použity primery ke kódující oblasti genu *w* (oblast 2. exonu) a kódující oblasti elementu *HeT-A* (Obr. 20).



**Obr. 20:** Schéma umístění primerů v transgenu *w* v kmeni *11-5*. Transgen *w* je umístěn na druhém chromozómu levé telomery mezi oblastí HTT a oblastí TAS a je přepisován jak ze svého vlastního promotoru, tak formou „read-through“ transkriptu (Rth *w*), který je veden z přilehlého elementu *HeT-A*. Pro kvantifikaci „read-through“ transkriptu byly použity primery k oblasti enhanceru genu *w*, tj. oblasti, která je nad promotorem genu *w*. Dále byly využity primery k 2. exonu genu *w* a kódující oblasti elementu *HeT-A*.

Výsledky, které byly z tohoto experimentu získány, byly neočekávané. Charakter výsledků byl víceméně totožný mezi *HeT-A* a *HeT-A/w* „read-through“ transkripty, kde

mutace *Chro*<sup>DKG</sup>, *Scm*<sup>ET50</sup>, *Scm*<sup>DI</sup>, *Spn*<sup>E03987</sup> a *Z4* stimulovaly transkripci a mutace *Jil-1* transkripci naopak potlačovala. V případě genu *w* docházelo k potlačení transkripce u všech mutací (Obr. 21).



**Obr. 21:** Porovnání transkripčních aktivit genu *w* (A), *HeT-A/w* „read-through“ (B) a elementu *HeT-A* (C) u jednotlivých potenciálních modifikátorů TPE. Zelený sloupec znázorňuje vždy kontrolní larvy, tedy larvy s proteinem GFP.

## 5. Diskuze

### 5.1 Konstrukt *HeTom* a jeho aktivita

Hlavním cílem pro tuto práci bylo získat prostorovou a časovou vizualizaci aktivity promotoru *HeT-A*. Využitím exprese reportérového transgenu *Tomato* bylo možné pozorovat aktivitu promotoru *HeT-A* po celou dobu vývoje drozofily. Jako promotor byla využita oblast 3' UTR od nukleotidu -888 do nukleotidu +3.

Touto prací byla potvrzena a rozšířena předchozí pozorování (George & Pardue 2003; Walter & Biessmann 2004), že aktivita *HeT-A* koreluje s proliferací buněk a je zaměřena na diploidní buňky ve tkáních larev a vyvíjejících se orgánech dospělců během vývoje v kukle. Nejsilnější exprese byla pozorována v testes larev třetího instaru a dospělých samců. Zajímavé je, že v ováriích samic nebyla exprese přítomná vůbec nebo jen na spodní hranici detekovatelnosti, přestože předcházející studie expresi *HeT-A* v ováriích potvrdily (George & Pardue 2003; Walter & Biessmann 2004). Důležitým výsledkem této práce je zjištění změn v charakteru exprese *HeTom* v průběhu roku. Získaná data podporují přesvědčení, že ačkoli se na první pohled telomerická elongace telomerázou a telomerickými retroelementy jeví jako zcela odlišná, můžeme vidět jednu důležitou shodu, kterou je těsné spojení mezi elongací telomer a kontrolou buněčného cyklu.

Předešlá studie Danilevskaya et al. (1997) charakterizovala promotor elementu *HeT-A* využitím různě dlouhých fragmentů jeho 3' UTR, a to v konstrukt s reportérového genem pro  $\beta$ -galaktosidázu při tranzientní expresi v kulturách buněk drozofily. Byly využity různě dlouhé úseky od nukleotidu -590 po nukleotid -1, které byly připojeny k sekvenci oblasti 5' UTR od nukleotidu +1 do nukleotidu +646. Bylo prokázáno, že oblast -133 až -1 je bezpodmínečně nutná pro promotorovou aktivitu. Tato aktivita se postupně zvětšuje se zvyšující se délkou sekvence 3' UTR. Odstranění sekvence oblasti 5' UTR z konstrukt snížilo aktivitu promotoru o 10% (Danilevskaya et al. 1997). Ty samé konstrukty byly použity pro studium tkáňově a vývojově specifické exprese a to jejich inzercí do euchromatinových oblastí (George & Pardue 2003). Exprese u konstrukt se sekvencí -404 až +646 ukazovala podobný charakter, který byl nalezen u endogenního transkriptu *HeT-A*. Překvapivě na rozdíl od studie využívající transfekci (Danilevskaya et al., 1997), narůstající délka přidáním nukleotidů -590 až -405 snižovala aktivitu *HeT-A* a to tak, že exprese byla

pozorovatelná jen v křídelních discích. Nicméně, závěrem bylo, že telomerické „prostředí“ není potřebné pro základní aktivitu elementu *HeT-A* a její regulaci (George & Pardue 2003).

Nedávné studie zaznamenaly, že variabilita v sekvencích retrotranspozónů *HeT-A* je mnohem větší než se původně odhadovalo (Piñeyro et al. 2011). S ohledem na variabilitu sekvencí *HeT-A* není jasné, zda jednotlivé elementy *HeT-A* mají vždy stejné regulační sekvence. Existuje proto možnost, že v průběhu transgenní studie při použití sekvence pouze jednoho určitého elementu nelze pozorovat úplně celé spektrum transkripce, se všemi vývojovými a tkáňovými specifikami, tak jak je to možné při pozorování endogenních elementů *HeT-A*, například při *in situ* hybridizaci (Walter & Biessmann 2004). Toto může být vysvětlením pro výsledky této práce, konkrétně pro nepřítomnost fluorescenčního signálu v ováriích samic a pro přítomnost jen velmi slabého signálu v některých imaginálních discích.

## 5.2 Vliv exogenních a endogenních faktorů

Předpokládá se, že stres vyvolaný vnějšími stresovými vlivy má dopad na celkovou transkripci v genomu a že délka telomer může reagovat na vnější signály přes transkripční změny genů, které se podílejí na telomerickém kompenzačním mechanismu (Shachar et al. 2008; Romano et al. 2013). Obecně se předpokládá, že mezi vnějším stresem a délkou telomer existuje spojitost, ale žádná data nenabízí hlubší vysvětlení tohoto vztahu na molekulární bázi. V této práci byla pozorována různorodost aktivity promotoru *HeT-A*. Tato fluktuace může být vysvětlována jednak jako odpověď regulace telomerické délky na rozdíly vnějšího prostředí, ale stejně tak jako odpověď na vnitřní podmínky. Lze spekulovat také o sezónním vlivu, který byl patrný při rozdílech v expresi v průběhu roku. Je možné také namítnout, že i přes důkladnou snahu o konstantní podmínky mohly být jednotlivé kmeny v laboratoři ovlivněny nekontrolovatelnými faktory prostředí, které vedly k vnitřnímu řízení sezónních změn. Význam sezónních vlivů za „stálých“ laboratorních podmínek je dokládán pozorováním sezónních změn v rámci fertility, fekundity i velikosti těla nebo zastoupení jednotlivých pohlaví v laboratorních kmenech (Drickamer 1977; Drickamer 1990) nebo dokonce i frekvencí spontánních mutací (Mason et al. 1985). Ačkoliv by bylo třeba provést dlouhodobou analýzu změn v expresi *HeTom*, lze říci, že tato práce dokládá to, že je vždy potřeba velmi pečlivě zvážit informace o telomerické aktivitě, která může být značně



variabilní a jednoduše ovlivnitelná neznámými podmínkami daleko za hranicí našeho nynějšího chápání.

Uspokojivým výsledkem této práce bylo zjištění, že jak *HeTom*, tak element *HeT-A* transkripčně reagují na působení teplotního stresu. Většinou je zmiňován vliv environmentálního stresu na zkracování telomer u člověka (Entringer et al. 2011; Lin et al. 2012). Můžeme ale předpokládat podobný vliv i u bezobratlých. Příkladem je pakomár rodu *Chironomus*, jehož telomery jsou tvořeny komplexem satelitních sekvencí, u nichž za působení stresových podmínek byla pozorována transkripční aktivace (Martínez-Guitarte et al. 2008). Podobně zvýšenou aktivitu za působení stresu můžeme předpokládat i u telomerických elementů drozofily, protože je známo, že environmentální stres může mobilní elementy aktivovat u řady organismů (Capy et al. 2000). Nicméně, žádné detailní studie vlivu environmentálních faktorů na telomery hmyu doposud nebyly provedeny.

### 5.3 Modifikátory TPE

V této práci byly testovány mutace některých genů jako potenciální modifikátory TPE. Kandidátní geny byly vybrány na základě dříve publikovaných studií, kde je prokázána jejich funkce při stavbě chromatinu (Eggert et al. 2004; Wang et al. 2001; Savitsky et al. 2009; Rath et al. 2004; Bornemann et al. 1998). Jednalo se o *Jil-1*,  $Z^4$ , *Spn-E*, *Scm* a *Chro*. Protein *Chro* ovlivňuje spiralizaci chromozómu a jeho segregaci (Rath et al. 2004). *Spn-E* je RNA helikáza. Pravděpodobně hraje roli v regulaci signální dráhy pro správnou reorganizaci struktury mikrotubulů během vývoje jedince obzvláště během oogeneze. Mutace v tomto proteinu způsobuje eliminaci krátkých RNAs ve vajíčkách. Zvýšená frekvence elementů *TART*, ale nikoliv *HeT-A*, byla pozorována u jedinců s heterozygotní mutací *Spn-E*. Naopak zvýšená frekvence elementů *HeT-A* byla zaznamenána při homozygotní mutaci tohoto proteinu (Savitsky et al. 2006). Dalšími zkoumanými proteiny a jejich mutacemi jsou *Scm*<sup>ET50</sup> a *Scm*<sup>DI</sup>. *Scm* (Sex comb on midleg) patří do skupiny transkripčních represorů (Bornemann et al. 1998). *Jil-1* a  $Z^4$  jsou chromozomální proteiny lokalizované v oblasti HTT (Andreyeva et al. 2005), podílející se na regulaci telomerického chromatinu a expresi telomerických elementů. Protein  $Z^4$ , který je známý také pod názvem Putzig, je důležitým kofaktorem při modelování struktury chromatinu. Protein *Jil-1* je chromozomální kináza, která je zodpovědná za fosforylaci serinu 10 histonu 3 v průběhu interfáze (Eggert et al. 2004; Wang et al. 2001). Tyto dva proteiny mají opačný účinek na transkripci elementu

*HeT-A*. Zatímco  $Z^4$  ji zesiluje, Jil-1 ji zeslabuje (Silva-Sousa et al. 2012). Jil-1 a  $Z^4$  vytvářejí spolu komplex, na který se připojuje i Chro (Gan et al. 2011; Rath et al. 2006; Eggert et al. 2004).

Výsledky této části práce byly překvapivé. Rozdílné výsledky mezi transkripční aktivitou *w* a elementu *HeT-A* značí rozdíly v transkripční regulaci těchto dvou genů a rovněž se zdá, že zvolené proteiny se spíše jeví jako enhancery než jako supresory TPE. Předchozí studie vedly ke spekulaci, že gen *w* je silný a poněkud netečný vůči supresi TPE. Na základě toho bylo navrhováno pro identifikaci modifikátorů TPE používat promotor telomerického elementu *HeT-A*. *HeT-A* má zhruba 10x nižší promotorovou aktivitu než má gen *w*. Proto se předpokládalo, že díky tomu a díky i snad své přirozené telomerické lokalizaci, *HeT-A* může lépe odrazet změny v chromatinové struktuře TAS a tedy i intenzitu TPE (Capkova Frydrychova et al. 2008). Předchozí studie potvrdila, že *HeT-A* a *HeT-A/w* „read-through“ reagují obdobně, co se týče delece TAS (Capkova Frydrychova et al. 2007). Je proto překvapivé, že studie v této diplomové práci objevila jejich rozdílnou reakci k použitým mutacím. Z výsledků práce lze vyvodit, že část oblasti HTT přilehlá k oblasti TAS reaguje k mutacím obdobně jako elementy na opačném konci HTT. Z toho vyplývá, že transkripční regulace telomerických elementů prostřednictvím TPE a mutací proteinů HTT oblasti jsou dva odlišné mechanismy.

Celkově lze říci, že výsledky této části práce jsou neočekávané, ale pro jednoznačnou interpretaci by bylo však potřeba důkladnější a komplexnější analýzy.

## 6. Závěr a další perspektiva výzkumu

Využitím transgenu *HeTom* byla pozorována aktivita promotoru telomerického elementu *HeT-A*. Aktivita byla zaznamenána u diploidních tkání u larev třetího instaru, zejména pak v testes. Vysoká aktivita promotoru byla sledovaná v průběhu vývoje kukly s vývojem adultních orgánů. U dospělců byla aktivita pozorovaná opět především v testes. Dle získaných výsledků se zdá, že transgen *HeTom* je dobrým reportérem aktivity elementu *HeT-A*. Aktivita *HeTom* nebyla pozorována v dostatečné intenzitě ve všech očekávaných tkáních. Lze proto předpokládat různou tkáňovou či orgánovou specifitu různých promotorů *HeT-A* danou jejich sekvenční variabilitou. Toto zjištění vybízí k *in vivo* analýze aktivity dalších sekvenčně odlišných promotrů *HeT-A*.

Při *in vivo* pozorování exprese *HeTom* byla získána představa o obrovské variabilitě v aktivitě promotoru *HeT-A*. Významným zjištěním byla reakce *HeTom* na působení teplotního stresu, což vyjevuje významný potenciál tohoto transgenu ke studiu vlivu environmentálních faktorů na délku telomer a aktivity telomerického kompenzačního mechanismu u drozofily s možnými výstupy pro studium telomer u dalších organismů.

## 7. Použitá literatura

- Abad JP, De Pablos B, Osoegawa K, De Jong PJ, Martín-Gallardo A, Villasante A (2004) Genomic analysis of *Drosophila melanogaster* telomeres: full-length copies of *HeT-A* and *TART* elements at telomeres. *Molecular Biology and Evolution* 21: 1613–1619.
- Andreyeva EN, Belyaeva ES, Semeshin VF, Pokholkova GV, Zhimulev IF (2005) Three distinct chromatin domains in telomere ends of polytene chromosomes in *Drosophila melanogaster* Tel mutants. *Journal of Cell Science* 118(23): 5465-5477.
- Biessmann H, Mason JM (2003) Telomerase-independent mechanisms of telomere elongation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60: 2325–2333.
- Bornemann D, Miller E, Simon J (1998) Expression and Properties of Wild-Type and Mutant Forms of the *Drosophila* Sex Comb on Midleg (SCM) Repressor Protein. *Genetics* 150: 675-686.
- Capkova Frydrychova R, Biessmann H, Konev AY, Golubovsky MD, Johnson J, Archer TK, Mason JM (2007) Transcriptional activity of the telomeric retrotransposon *HeT-A* in *Drosophila melanogaster* is stimulated as a consequence of subterminal deficiencies at homologous and nonhomologous telomeres. *Molecular and Cellular Biology* 27: 4991–5001.
- Capkova Frydrychova R, Mason JM (2013) Telomeres: Their structure and maintenance. David Stuart (ed.) *The Mechanisms of DNA Replication*. Intech, Open Access Publisher, Rijeka, Croatia, pp. 423-443.
- Capkova Frydrychova R, Mason JM, Archer TK (2008) HP1 is distributed within distinct chromatin domains at *Drosophila* telomeres. *Genetics* 180: 121–131.
- Capkova Frydrychova R, Mason JM, Biessmann H (2009) Regulation of telomere length in *Drosophila*. *Cytogenetic and Genome Research* 122: 356–364.
- Capy P, Gasperi G, Biémont C, Bazin C (2000) Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites? *Heredity* 85: 101-106.

- Casacuberta E, Pardue M-L (2005) *HeT-A* and *TART*, two *Drosophila* retrotransposons with a bona fide role in chromosome structure for more than 60 million years. *Cytogenetic and Genome Research* 110: 152–159.
- Cenci G, Ciapponi L, Gatti M (2005) The mechanism of telomere protection: a comparison between *Drosophila* and humans. *Chromosoma* 114: 135–145.
- Cryderman DE, Cuaycong MH, Elgin SC, Wallrath LL (1998) Characterization of sequences associated with position-effect variegation at pericentric sites in *Drosophila* heterochromatin. *Chromosoma* 107: 277–285.
- Cryderman DE, Grade SK, Li Y, et al. (2005) Role of *Drosophila* HP1 in euchromatic gene expression. *Developmental Dynamics* 232: 767–774.
- Cryderman DE, Morris EJ, Biessmann H, Elgin SC, Wallrath LL (1999) Silencing at *Drosophila* telomeres: nuclear organization and chromatin structure play critical roles. *EMBO J* 18: 3724–3735.
- Danilevskaya ON, Arkhipova IR, Traverse KL, 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 ON, Slot Treverse KL, Hogan NC, Pardue M-L (1994) *Drosophila* telomere transposon HeT-A produces a transcript with tightly bound protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91: 6679-3382.
- Danilevskaya ON, Traverse KL, Hogan NC, DeByryshe PG, Pardue M-L (1999) The two *Drosophila* telomeric transposable elements have very different patterns of transcription. *Molecular and Cellular Biology* 19: 873–881.
- Denchi EL (2009) Give me a break: how telomeres suppress the DNA damage response. *DNA Repair* 8: 1118–1126.
- Drickamer LC (1977) Seasonal variation in litter size, bodyweight and sexual maturation in juvenile female house mice (*Mus musculus*). *Laboratory Animals* 11: 159–162.

- Drickamer LC (1990) Seasonal variation in fertility, fecundity and litter sex ratio in laboratory and wild stocks of house mice (*Mus domesticus*). *Laboratory Animal Science* 40: 284-288.
- Eggert H, Gortchakov A, Saumweber H (2004) Identification of the *Drosophila* interband-specific protein Z4 as a DNA-binding zinc-finger protein determining chromosomal structure. *Journal of Cell Science* 117: 4253-4264.
- Entringer S, Epel ES, Kumsta R, Lin J, Hellhammer DH, Blackburn EH, Wüst S, Wadhwa PD (2011) Stress exposure in intrauterine life is associated with shorter telomere length in young adulthood. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA* 108: E513–E518.
- Gan M, Moebus S, Eggert H, Saumweber H (2011) The Chriz-Z4 complex recruits JIL-1 to polytene chromosomes a requirement for interband-specific phosphorylation of H3S10. *Journal of Biosciences* 36(3): 425-438.
- Gao G, McMahon C, Chen J, Rong YS (2008) A powerful method combining homologous recombination and site-specific recombination for targeted mutagenesis in *Drosophila*. *Proceedings of National Academy of Science of the USA* 105: 13999–14004.
- George JA, 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.
- Golubovsky MD, Konev a Y, Walter MF, Biessmann H, Mason JM (2001) Terminal retrotransposons activate a subtelomeric white transgene at the 2L telomere in *Drosophila*. *Genetics* 158: 1111–1123.
- Chan SW, Blackburn EH (2002) New ways not to make ends meet: telomerase , DNA damage proteins and heterochromatin. *Oncogene* 21: 553–563.
- Lin J, Epel E, Blackburn E (2012) Telomeres and lifestyle factors: roles in cellular aging. *Mutation Research* 730: 85–89.

- Lindsley DL, Zimm GG (1992). The Genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, Inc. San Diego. ISBN 0-12-450990-8.
- Linger BR, Price CM (2010) Conservation of Telomere protein complexes: Shuffling through Evolution. National Institutes of Health Public Access. 44: 434–446.
- Martínez-Guitarte JL, Díez JL, Morcillo G (2008) Transcription and activation under environmental stress of the complex telomeric repeats of *Chironomus thummi*. Chromosome Research 16: 1085–1096.
- Mason JM, Capkova Frydrychova R, Biessmann H (2008) *Drosophila* telomeres: an exception providing new insights. BioEssays 30: 25–37.
- Mason JM, Konev AY, Biessmann H (2003) Telomeric position effect in *Drosophila melanogaster* reflects a telomere length control mechanism. Genetica 117: 319–325.
- Mason JM, Ransom J, Konev AY (2004) A deficiency screen for dominant suppressors of telomeric silencing in *Drosophila*. Genetics 168: 1353–1370.
- Mason JM, Valencia R, Woodruff RC, Zimmering S (1985) Genetic drift and seasonal variation in spontaneous mutation frequencies in *Drosophila*. Environmental Mutagenesis 7: 663–676.
- Meyne J, Ratliff RL, Moyzis RK (1989) Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> among vertebrates. Proceedings of National Academy of Science of the USA 86: 7049–7053.
- Pardue M-L, DeBaryshe PG (2003) Retrotransposons provide an evolutionarily robust non-telomerase mechanism to maintain telomeres. Annual Review of Genetics 37: 485–511.
- Perrini B, Piacentini L, Fanti L, Altieri F, Chichiarelli S, Berloco M, Turano C, Ferraro A, Pimpinelli S (2004) HP1 controls telomere capping, telomere elongation, and telomere silencing by two different mechanisms in *Drosophila*. Molecular Cell 15: 467–476.

- Piñeyro D, López-Panadès E, Lucena-Pérez M, Casacuberta E (2011) Transcriptional analysis of the *HeT-A* retrotransposon in mutant and wild type stocks reveals high sequence variability at *Drosophila* telomeres and other unusual features. *BioMed Central Genomics* 12: 573.
- Raffa GD, Cenci G, Siriaco G, Goldberg ML, Gatti M (2005) The putative *Drosophila* transcription factor *woc* is required to prevent telomeric fusions. *Molecular Cell* 20: 821–831.
- Raffa GD, Ciapponi L, Cenci G, Gatti M (2011) A protein complex that mediates epigenetic maintenance of *Drosophila* telomeres Terminin. *Nucleus* 2(5): 383–391.
- Rath U, Ding Y, Deng H, Qi H, Bao X, Zhang W, Girton J, Johansen J, Johansen KM (2006) The chromodomain protein, Chromator, interacts with JIL-1 kinase and regulates the structure of *Drosophila* polytene chromosomes. *Journal of Cell Science* 119: 2332-2341.
- Rath U, Wang D, Ding Y, Xu YZ, Qi H, Blacketer MJ, Girton J, Johanson J, Johanson KM (2004) Chromator, A Novel and Essential Chromodomain Protein Interacts Directly With the Putative Spindle Matrix Protein Skeletor. *Journal of Cellular Biochemistry* 93: 1033-1047.
- Romano GH, 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 Genetics* 9: e1003721.
- Sahara K, Marec F, Traut W (1999) TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. *Chromosome Research* 7: 449–60.
- Savitsky M, Kwon D, Georgiev P, Kalmykova A, Gvozdev V (2006) Telomere elongation is under the kontrol of the RNAi-based mechanism in the *Drosophila* germline. *Genes & Development* 20: 345–354.



- Shachar R, Ungar L, Kupiec M, Ruppin E, Sharan R (2008) A systems-level approach to mapping the telomere length maintenance gene circuitry. *Molecular Systems Biology* 4: 172.
- 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. *Molecular Biology and Evolution* 24: 2535–2545.
- Silva-Sousa R, Lopés-Panadès E, Piñeyro D, Casacuberta E (2012) The Chromosomal Proteins JIL-1 and Z4/Putzig Regulate the Telomeric Chromatin in *Drosophila melanogaster*. *Plos Genetics* 8(12): 1-12.
- Walter MF, Biessmann H (2004) Expression of the telomeric retrotransposon *HeT-A* in *Drosophila melanogaster* is correlated with cell proliferation. *Development Genes and Evolution* 214: 211–219.
- Wang Y, Zhang W, Jin Y, Johansen J, Johansen KM (2001) The JIL-1 Tandem Kinase Mediates Histone H3 Phosphorylation and Is Required for Maintenance of Chromatin Structure in *Drosophila*. *Cell* 105(4): 433-443.
- Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW (1996) Telomerase Activity in Human Germline and Embryonic Tissues and Cells. *Developmental Genetics* 18: 173–179.
- Von Zglinicki T (2002) Oxidative stress shortens telomeres. *Trends in Biochemical Sciences* 27: 339–344.
- Zhu H, Belcher M, van der Harst P (2011) Healthy aging and disease: role for telomere biology? *Clinical Science* 120: 427–440.