

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Katedra genetiky

**Vliv oxidativního stresu na telomerickou
délku u *Drosophila melanogaster***

Diplomová práce

Bc. Klára Szakosová

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

České Budějovice 2015

Szakosová K., 2015: Vliv oxidativního stresu na telomerickou délku u *Drosophila melanogaster*. [Effect of oxidative stress on telomere length in *Drosophila melanogaster*. Mgr. Thesis, in Czech] 35 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

Oxidative stress is caused by an imbalance between high production of reactive oxygen species and ability of organism to detoxify them or counteract their effects. The chromosomal ends – telomeres - are specialized nucleoprotein structures protecting chromosome ends from DNA damage. Telomeres of *Drosophila melanogaster* are arrays of specific non-long terminal repeated (LTR) retrotransposons *HeT-A*, *TART* and *TAHRE*. This thesis evaluates effects of exposure of paraquat, which is a strong oxidative stress inducer, on telomere length and transcription activity in *Drosophila*.

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

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

V Českých Budějovicích dne 23. 4. 2015

.....

Klára Szakosová

Poděkování

Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování své školitelce RNDr. Radmile Čapkové Frydrychové, Ph.D., za cenné rady a celkové odborné vedení této práce. Můj dík také patří všem členům laboratoře a to především Mgr. Michale Korandové a Mgr. Tomáši Krůčkovi. Chtěla bych dále poděkovat celé své rodině za jejich podporu během studia.

Obsah

1	Úvod	1
1.1	Oxidativní stres	1
1.1.1	Definice volných radikálů	1
1.1.2	Reaktivní kyslíkové radikály	2
1.1.3	Oxidativní poškození a jeho role ve vztahu k onemocnění	3
1.2	Telomery	4
1.2.1	Struktura a funkce telomer	4
1.2.2	Telomerické elementy u drozofily	5
1.2.3	Kompenzační mechanismy telomer	6
1.3	Telomery a oxidativní stres	7
2	Cíle práce	9
3	Materiál a metody	10
3.1	Drozofilí linie	10
3.2	Indukce oxidativního stresu	10
3.3	Příprava vzorků	11
3.4	Izolace genomové DNA	11
3.5	Izolace celkové RNA	11
3.6	Syntéza cDNA	11
3.7	Real-time PCR	12
3.8	Analýza hladiny 8-oxoguaninu pomocí Fpg	13
3.9	Indukce nárůstu telomerické délky	13
3.10	Statistická analýza	13
4	Výsledky	14
4.1	Nízké koncentrace parakvatu vedou k nárůstu telomerické délky	14
4.2	Nízké dávky parakvatu zvyšují hladinu transkriptů elementu <i>HeT-A</i>	16
4.3	Nárůst hladiny transkriptů netelomerických elementů po působení parakvatu	17

4.4	Vyhodnocení oxidativní modifikace guaninu 8-oxodG pomocí enzymu formamidopyridin glykosylázy (Fpg)	18
4.5	Testování selekční výhody dlouhých telomer	18
5	Diskuze.....	22
6	Závěr	26
7	Použitá literatura	27

1 Úvod

1.1 Oxidativní stres

Pro aerobní organismy je esenciální příjem a využití kyslíku jako zdroje konečného akceptoru elektronů při buněčné respiraci. Kyslík je však také významným zdrojem tvorby metabolitů, jako jsou volné radikály. Aerobní organismy si osvojily schopnost využívat tyto produkty při přirozených fyziologických procesech. Volné kyslíkové radikály se účastní procesů přeměny energie, dále jsou využívány v buněčných signálních drahách nebo v imunitním systému (Dröge, 2002; Knight, 2000). Všechny tyto procesy probíhají v buňkách pod přísnou kontrolou. Pro případ přebytku volných radikálů si organismy vytvořily řadu kompenzačních mechanismů, které je redukuje a ničí - jde o tzv. antioxidační mechanismy. Za normálních podmínek tedy existuje rovnováha mezi tvorbou volných radikálů a schopností organismu se s tímto stavem vyrovnat. Pokud však dojde k narušení rovnováhy, mluvíme o oxidativním stresu. Poprvé tuto myšlenku buněčné nerovnováhy zformuloval Helmut Sies (1997). Oxidativní stres je tedy způsoben nadměrným vznikem reaktivních forem kyslíku (ROS - Reactive Oxygen Species), ale také vznikem reaktivních forem dusíku (RNS - Reactive Nitrogen Species) (Wiseman & Halliwell, 1996).

Díky své reaktivní povaze ROS a RNS napadají buněčné makromolekuly, jako jsou DNA, RNA, lipidy, proteiny nebo glycidy. Tyto interakce volných radikálů s buněčnými komponenty následně vedou k fyziologickým změnám v organismu, a právě jednou z nich je poškození či ztráta koncových úseků DNA neboli telomer. V konečné fázi může oxidativní stres vyústit až v buněčnou apoptózu. Existuje taktéž spojitost mezi vznikem některých civilizačních či neurodegenerativních onemocnění, a to právě vlivem oxidativního stresu (Valko et al., 2007).

1.1.1 Definice volných radikálů

Pro porozumění definice volného radikálu je důležité říci, že elektrony se v atomu pohybují po orbitalech, které by měly obsahovat minimálně dva elektrony s opačným spinem. Látka (atom nebo molekula), která ve svém valenčním orbitalu obsahuje nepárový elektron, je charakterizována jako volný radikál (Jones, 2008). Tyto částice mohou

v biologických systémech vzniknout přijutím nebo ztrátou jednoho či více elektronů. Radikály se vyznačují svojí vysokou reaktivitou a tím, že nejsou schopny samostatné existence. Proto ve snaze doplnit chybějící párový elektron velmi ochotně interagují s okolními látkami. Volné radikály mohou jednak reagovat spolu navzájem a vytvořit tak neradikálovou molekulu, jednak atakovat jinou látku, která není radikálem, a tím odstartovat řetězec dalších radikálových reakcí (Halliwell, 1991). Mezi volné radikály patří látky odvozené z meziproduktů metabolismu kyslíku a dusíku (Wiseman & Halliwell, 1996).

1.1.2 Reaktivní kyslíkové radikály

Majoritním zdrojem volných radikálů v biologických systémech je molekulární kyslík. Ten plní v organismu řadu fyziologických funkcí a jeho oxidanty jsou produkty běžného aerobního metabolismu (Sies, 1997). Škodlivost těchto látek závisí především na množství, ve kterém jsou generovány. Jako příklad fyziologické funkce ROS je obrana proti bakteriím, antigenům a parazitům, kde jsou zdrojem volných radikálů neutrofily, monocyty, eozinofily a makrofágy (Conner & Grisham, 1996). Dále slouží jako signální molekula (Thannickal & Fanburg, 2000) nebo při detoxikaci xenobiotik (Turrens, 2003). Přeměna kyslíku na reaktivní formy je dána schopností oxidace a redukce nebo vlivem katalytického štěpení. Volné kyslíkové radikály vznikají zejména jako meziprodukty v procesu redukce kyslíku na vodu. ROS můžeme rozdělit do dvou skupin, a to na látky radikálové povahy a neradikály, účastníci se vzniku volných radikálů. Do první skupiny řadíme superoxidový ($O_2^{\cdot-}$), hydroxylový (HO^{\cdot}), hydroperoxylový (HO_2^{\cdot}), peroxylový (ROO^{\cdot}) a alkoxylový (RO^{\cdot}) radikál. Mezi neradikálové formy kyslíku patří peroxid vodíku (H_2O_2), ozón (O_3), singletový kyslík (1O_2) hydroxoperoxyl (HO_2^{\cdot}) a kyselina chlorná ($HOCl$) (Valko et al., 2007).

Reaktivní kyslíkové radikály můžeme také rozdělit dle místa vzniku na endogenní a exogenní. Nejbohatším zdrojem endogenních ROS je především dýchací řetězec mitochondrií, a to zejména transmembránový komplex I (NADH – ubichinonreduktáza) a komplex III (ubichinon-cytochrom-c-reduktáza) (Turrens, 2003). Přibližně 1 – 3 % všech elektronů, které jsou v mitochondrii redukovány na vodu, vedou ke vzniku superoxidu (Valko et al., 2007). Další příkladem významu mitochondrií při generování ROS je vysoká mutační rychlost (asi 10 x vyšší než u nukleární DNA), a to převážně z důvodu absence histonů nebo nižší efektivity reparačních mechanismů (Yang et al., 1994). Mitochondriální lipidy se snadno rozkládají a dochází k peroxidaci

buněčné membrány a následnému uvolnění ROS, což vede k ještě většímu ničení DNA (Finkel & Holbrook, 2000). V endoplazmatickém retikulu jsou ROS generovány komplexem cytochrom P-450 a mají zde funkci biotransformace, kdy reagují s endogenními látkami a xenobiotiky (Zangar et al., 2004). Významným donorem ROS je také NADPH oxidáza, která hraje klíčovou roli při respiračním vzplanutí fagocytujících (monocytů, makrofágů, neutrofilů a lymfocytů) a nefagocytujících buněk (fibroblastů, endoteliálních, kosterních svalových a cévních hladkých svalových buněk), neboť produkuje superoxid a ten může být dále konvertován na další reaktivní formy kyslíku (Van Heerebeek et al., 2002; Magder, 2006). Posledním příkladem organely produkující ROS je peroxizóm, který redukuje molekulární kyslík na peroxid vodíku (při procesu β -oxidace) (Reddy et al., 1986). Do druhé skupiny zdroje ROS patří exogenní faktory, jako jsou herbicidy, pesticidy, toxické a chemické látky, chemoterapeutika a v neposlední řadě ionizační či UV záření (Finkel & Holbrook, 2000; Abdollahi et al., 2004).

1.1.3 Oxidativní poškození a jeho role ve vztahu k onemocnění

Díky svému vysoce reaktivnímu potenciálu mohou buněčné oxidanty ochotně interagovat s buněčnými biomolekulami, jako jsou nukleové kyseliny, lipidy, proteiny či glycidy, a způsobovat tak jejich poškození. Jaderné a mitochondriální nukleové kyseliny patří mezi biomolekuly, jejichž struktura a funkce může být pozměněna útokem volných radikálů a dát tak vzniknout řadě defektů, jako jsou oxidace purinových a pyrimidinových bází a deoxyribózy, abazická místa, „cross-linky“ a jednořetězcové a dvouřetězcové zlomy. Působení ROS na nukleové kyseliny je příčinou mutagenese, karcinogeneze a stárnutí. Může docházet i k zastavení nebo indukci transkripce, narušení signálních drah nebo k replikačním chybám. Tyto změny vedou k celkové genomické nestabilitě buňky (Krokan et al., 1997; Buonocore et al., 2010; Marnett, 2000). Oxidací bází vznikají báze modifikované, které nejsou často přítomny při normálním metabolismu, a proto je můžeme označit za markery oxidativního stresu. Jako vzorový příklad lze uvést oxidaci guaninu na 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) (Fisher-Wellman & Bloomer, 2009). V neposlední řadě vyvolávají ROS oxidativní poškození, jejichž následkem je zkracování telomer (Von Zglinicki, 2002).

Výzkum patologických projevů oxidativního stresu má velký význam zejména v medicíně. Oxidativní stres může přispívat či doprovázet řadu patologických stavů, jako

jsou kardiovaskulární choroby (Griendling & FitzGerald, 2003), rakovina (Klaunig et al., 2010), neurodegenerativní onemocnění - Parkinsonova choroba, Alzheimer či amyotrofická laterální skleróza (Barnham et al., 2004), diabetes (Maritim et al., 2003) nebo proces stárnutí (Cadenas & Davies, 2000). ROS dokáží nejen nemoci vyvolávat, ale také zhoršovat či komplikovat jejich průběh. Během života dochází k akumulaci buněčných poškození a klesá schopnost antioxidační obrany a opravných mechanismů tyto nedokonalosti odstraňovat (Holeček & Rokyta, 2005). Tato vlastnost může vést k postupné akumulaci modifikovaných makromolekul a mít tak vliv na normální průběh metabolismu a změnu buněčných funkcí, narušení růstu a vyvrcholit až smrtí buňky (Bandyopadhyay et al., 1999).

1.2 Telomery

1.2.1 Struktura a funkce telomer

Konce lineárních eukaryotických chromosomů jsou opatřeny speciálními nukleoproteinovými komplexy neboli telomerami, které jsou esenciální pro život buňky (Chan & Blackburn, 2002). Funkcí telomery je udržovat celistvost a stabilitu chromosomů tím, že odlišuje přirozené konce chromosomů od dvouřetězcových zlomů, čímž zabraňuje chromosomálním fúzím a degradacím způsobeným exonukleázami (Blackburn, 1991; Chan & Blackburn, 2004). Fúzané chromosomy, ať už dicentrické, kruhové či jiné nestabilní formy, vedou ke špatnému dělení během mitózy nebo meiozy, a tím ke ztrátě genetické informace (Blackburn, 1991). Další kritickou funkcí telomery je kompenzace ztráty koncové DNA, ke které dochází z důvodu neschopnosti DNA polymerázy dokončit replikaci (Watson, 1972; Olovnikov, 1973). Každým dělením tak dochází ke ztrátě části koncových repetitivních sekvencí na 5' konci dceřiného řetězce, a tím tedy i ke zkrácení telomery. Pokud je telomera zkrácena na minimální, kritickou délku označovanou jako tzv. Hayflickův limit, ztrácí buňka schopnost dělení (Hayflick & Moorhead, 1961). Telomery jsou proto považovány za tzv. „buněčné hodiny“, protože jsou spojeny s počtem dělení somatických buněk (Allsopp et al., 1992). U většiny eukaryotických organismů jsou telomery tvořeny dlouhými úseky repetitivní DNA. Telomerická DNA se obvykle skládá z jednoduché sekvence (TnGn)_n (Meyne et al., 1989; Chan & Blackburn, 2002). Ačkoliv telomery nemají

vždy úplně shodnou sekvenci, společným znakem je vysoký obsah G bází na 3' konci a C bází na 5' konci (Blackburn, 1991). Telomerická sekvence je ve fylogenezi značně konzervovaná. Obratlovci mají sekvenci (TTAGGG)_n, rostliny většinou (TTTAGGG)_n a většina hmyzu (TTAGG)_n (McKnight & Shippen, 2004; Maeshima et al., 2001; Meyne et al., 1989; Chan & Blackburn, 2002). Nicméně existuje několik výjimek alternativní skladby telomer, mezi které patří i *Drosophila melanogaster*. Telomery drozofily jsou tvořeny třemi specifickými retrotransposibilními elementy neboli retrotransposony *HeT-A*, *TART* a *TAHRE* (Frydrychova et al., 2008; Mason et al., 2008).

Pokud dojde u obratlovců ke ztrátě telomer, buňka není schopna udržet stabilitu a nastává buněčná smrt. U drozofily nemusí tento úbytek vést k buněčné apoptóze. K formaci čepičky totiž může dojít na jakémkoli chromosomálním konci včetně těch netelomerických, a to díky nezávislému formování multiproteinového komplexu termininu na jakékoliv sekvenci DNA (Frydrychova et al., 2008; Frydrychova & Mason, 2013).

1.2.2 Telomerické elementy u drozofily

Telomery drozofily jsou tvořeny HTT oblastí, to jest sérií telomerově-specifických non-LTR retroposonů *HeT-A*, *TART* a *TAHRE* (Mason & Biessmann, 1995; Pardue et al., 1996; Pardue & DeBaryshe, 2003). HTT oblast má značně variabilní délku, a to od 26 do 147 kb, z důvodu různého počtu kopií retrotransposonů v náhodném uspořádání (Abad et al., 2004a). Elementy HTT oblasti kompenzují telomerické ztráty pomocí procesu retrotranspozice (Frydrychova et al., 2008). Všechny tři telomerické retroelementy obsahují čtecí rámec ORF1 pro protein Gag-like, jež se stará o transport RNA elementů do jádra a jeho navázání při procesu transpozice. Elementy *TART* a *TAHRE* mají navíc druhý čtecí rámec pro reverzní transkriptázu (RT) (Rashkova et al., 2002). Elementy dále obsahují charakteristicky dlouhý netranslatovaný úsek UTR na 3' konci, který tvoří až polovinu jejich sekvence (George et al., 2006; Abad et al., 2004a).

Nejprostudovanějším telomerickým elementem je element *HeT-A*. Rodina elementů *HeT-A* drozofily byla poprvé identifikována klonováním DNA fragmentu ve fágovi λ XT-A (Young et al., 1983). Elementy *HeT-A* jsou vysoce konzervované sekvence přerušované krátkými inzercemi, delecemi a duplikacemi (Biessmann et al., 1992). *HeT-A* je 6 kb dlouhý atypický element obsahující pouze jeden otevřený čtecí rámec, kódující protein Gag-like, který se specificky váže na nukleovou kyselinu při procesu transpozice. Na rozdíl

od ostatních elementů nekóduje reverzní transkriptázu, což vede k předpokladu, že je RT produkována z neznámého zdroje (Biessmann & Mason, 2003; Abad et al., 2004a). Možným donorem RT pro transpozici elementu *HeT-A* by mohl být *TART* (Levis et al., 1993; Rashkova et al., 2002) nebo *TAHRE* (Abad et al., 2004b). Transkripce vyžaduje promotor, který je umístěn v 3' UTR oblasti sousedícího elementu (Danilevskaya et al., 1997). Jedním z charakteristických rysů tohoto elementu je oligo (A) segment variabilní délky tvořící jeden konec každého elementu (Biessmann et al., 1992). Element *HeT-A* je dvakrát častější než element *TART* (Abad et al., 2004a).

Druhý telomerický element, zvaný *TART*, byl získáný přímou analýzou telomer z drozofily (Levis et al., 1993). Tento 12 kb dlouhý retrotransposon obsahuje, jako ostatní LINE transposomy, dva čtecí rámce ORF1 a ORF2, kódující protein Gag-like a protein Pol s endonukleázovou doménou a funkcí reverzní transkriptázy (Sheen & Levis, 1994).

Třetím telomerickým retroelementem je 11 - 13 kb velký element *TAHRE* (Telomere-Associated and *HeT-A*-Related Element), který vykazuje sekvenční podobnost s *HeT-A* po celé své délce až na ORF2 pro reverzní transkriptázu, a proto předpokládáme, že element *HeT-A* vznikl odvozením od společného předchůdce ztrátou oblasti ORF2 (Abad et al., 2004a; Shpiz et al., 2007). *TAHRE* element má stejně jako *TART* dva otevřené čtecí rámce kódující reverzní transkriptázu, endonukleázu a protein Gag-like. Tato shoda čtecích rámců opět signalizuje, že *TART* a *TAHRE* měly společného předka (Shpiz et al., 2007).

1.2.3 Kompenzační mechanismy telomer

Existuje několik mechanismů kompenzace ztráty koncové sekvence. Většina organismů prodlužuje telomery pomocí enzymu telomerázy. Telomeráza je ribonukleoproteinový komplex s reverzně transkriptázovou aktivitou, který byl poprvé objeven v roce 1985 u *Tetrahymena thermophila* (Greider & Blackburn, 1985). Funkcí telomerázy je kompenzace telomerické repetitivní sekvence prodloužením 3' konce, která je úzce spojená s buněčnou proliferací (Blackburn, 2005; Shay et al., 2001). Telomeráza se skládá ze dvou základních podjednotek, enzymu reverzní transkriptázy zvaného TERT (telomerase reverse transcriptase) a telomerázové RNA sloužící jako templát (Blackburn, 2005). Telomeráza přisedá ke koncům chromosomů a dle své templátové molekuly RNA k nim syntetizuje nové telomerické repetice. Její aktivita závisí na typu

buňky, ve které se nachází. Nejaktivnější je zejména v zárodečných buňkách, ale najdeme ji i v buňkách somatických (Sharma et al., 1995; Thomson et al., 1998).

U drozofily se vyvinul alternativní způsob prodloužení telomer, a to pomocí genové konverze a retrotranspozice telomerických elementů. Hlavním typem je však právě retrotranspozice, přičemž se jedná o stejný princip jako u tradičních retroelementů, které jsou schopné vkládat své vlastní kopie do nových poloh v genomu mechanismem „zkopíruj a vlož“ (copy and paste). Retrotranspozice je nejprve zahájena transkripcí příslušného retroelementu na mRNA, která prochází jadernými póry do cytoplazmy, kde je následně translatována na protein Gag-like. U elementu *TART* a *TAHRE* ještě dochází k translaci reverzní transkriptázy. Protein Gag-like je navázán na transkript a transportován zpět do jádra, kde se RNA díky protein-proteinové interakci spojí s čepičkou na konci telomery a stane se templátem pro prodloužení sekvence pomocí reverzní transkriptázy. Proces je zakončen odstoupením templátu a doplněním druhého řetězce telomery (Biessmann & Mason, 2003; Mason et al., 2008; Frydrychova et al., 2008).

Alternativou k transpozici je u drozofily genová konverze neboli prodlužování telomer výměnou úseků sesterských chromatid t-SCE (telomeric Sister Chromatid Exchange). Při tomto procesu dochází k hybridizaci zkráceného vlákna telomery se sekvencí telomery sesterské chromatidy, která poslouží jako templát. Řetězec je elongován a následně se odpojuje. Proces je dokončen prodloužením druhého řetězce (Mikhailovsky et al., 1999; Melnikova & Georgiev, 2002).

1.3 Telomery a oxidativní stres

Ke zkracování telomerické oblasti, v důsledku neúplné replikace, dochází v buňkách přirozeně. Pokud dojde k úplné ztrátě nebo významnému zkrácení telomer, buňka se dostane do stádia senescence a podléhá apoptóze. Nekompletní replikace, nízká telomerázová aktivita a oxidativní stres významně přispívají k urychlení zkracování telomer (Epel et al., 2004; Von Zglinicki, 2002). Konstatní rychlost zkracování délky telomer u drozofily byla odhadnuta na 75 bp za generaci (Biessmann & Mason, 1988). Oxidativní stres může vytvořit zlomy na DNA buď přímo pomocí reaktivních forem kyslíku, a to zejména hydroxylovými radikály produkujícími jednořetězcové zlomy, nebo jako mezistupeň při opravě oxidovaných bází (Houben et al., 2008). Jednořetězcové zlomy vedou ke zkracování telomer při tvorbě replikační vidličky, kdy je dvouřetězcová DNA disociována

na jednořetězcovou. Dalším možným vysvětlením častějšího poškození telomer oproti ostatním částem chromosomů je vysoké zastoupení guaninu, který je snadným cílem oxidativních modifikací jako je 8-oxo-deoxyguanosin (8-oxodG) (Oikawa & Kawanishi, 1999; Kawanishi & Oikawa, 2004). Dále bylo zjištěno, že senescentní buňky obsahují o třetinů více těchto modifikovaných guaninů a čtyřikrát tolik volných 8-oxodG bází (Von Zglinicki et al., 2005). Posledním rozdílem mezi telomerickou DNA a většinou genomové DNA je snížená aktivita telomerických reparačních procesů, pravděpodobně z důvodu blokace přístupu telomerickým proteinem TRF2 (telomeric repeat binding protein) (Richter et al., 2007).

Ačkoli se častěji hovoří o škodlivých účincích oxidativního stresu, existuje tzv. pojem hormetický efekt neboli hormeze, který je používán v toxikologii a je definován jako dvojitá odpověď na chemické, biologické či fyzikální látky. Zatímco vysoká dávka může mít inhibující či toxický účinek nebo naopak nízká může u organismu vyvolat stimulační až benefiční účinky. Množství vyvolávající hormetický efekt je velmi individuální, a proto ho nelze stanovit standardně. Existuje mnoho studií popisujících dvojitý efekt chemických látek v závislosti na množství použité látky (Calabrese, 2005a). Poprvé byl tento jev ukázán v práci Schulz (1887, 1888), který zjistil, že mnoho chemických dezinfekčních přípravků má při nízkých dávkách zvýšený efekt na metabolismus kvasinek, zatímco při vyšších dávkách dochází k efektu inhibičnímu. Za zmínku stojí rozsáhlá práce Calabrese & Baldwin (2001), kteří katalogizovali řadu hormetických analýz u chemických látek, teploty, záření či příjmu energie. Navýšení aktivity antioxidantních enzymů po vystavení herbicidu parakvatu bylo zaznamenáno v práci Krůček et al. (2015).

2 Cíle práce

Tato diplomová práce je součástí širšího projektu naší laboratoře, jehož záměrem je studium oxidativního stresu a jeho vliv na telomery hmyzu. Cíle této magisterské práce byly stanoveny na základě našich dřívějších studií (Krůček et al., 2015; Szakosová, 2013), kde jsme prokázali, že antioxidační mechanismy jsou stimulovány nízkými dávkami parakvatu. V návaznosti na to bylo ústředním bodem této magisterské práce určení, zda stimulační účinky nízkých dávek parakvatu lze pozorovat i u telomer. Konkrétní cíle zahrnovaly (1) vyhodnocení vlivu chronického oxidativního stresu vyvolaného nízkými koncentracemi parakvatu na telomerickou délku a hladinu transkriptů telomerických a netelomerických mobilních elementů pomocí kvantitativní Real-time PCR, (2) vyhodnocení přítomnosti oxidativní modifikace guaninu na 8-oxodG pomocí enzymu formamidopyridin glykosylázy (Fpg) a (3) vliv délky telomer na přežití *D. melanogaster* při působení oxidativního stresu.

3 Materiál a metody

3.1 Drozofilí linie

Ke své práci jsem používala linie drozofily, které byly standardně chovány při 25 °C na běžném médiu z kukuřičného šrotu s melasou (163 g kukuřičného šrotu, 33 g sušených kvasnic, 16 g agaru, 200 ml melasy a 2,6 l vody) spolu s dezinfekčním roztokem (12 g kyseliny benzoové, 2,5 g kyseliny sorbové a 240 ml denaturovaného etylalkoholu). Fotoperioda chovu byla 16 hodin světlo a 8 hodin tma. Použité linie *D. melanogaster* byly mutantní linie y^1w^{67c23} ; $Su(var)205^{02}$, y^1w^{67c23} ; $Su(var)205^{04}$ a y^1w^{67c23} ; $Su(var)205^{05}$, nesoucí mutaci v genu *Su(var)205* pro Heterochromatinový protein 1 (HP1), Gaiano III, nesoucí mutaci *Tel*, y^1w^{67c23} ; *Sco/SM1* a divoké linie Oregon R, RaL 882 a RaL 161. Linie byly získány z kmenového centra v Bloomingtonu.

3.2 Indukce oxidativního stresu

Pro vyvolání oxidativního stresu byl použit herbicid parakvat dichlorid (Sigma - Aldrich, kat. č. 36541). Pokusy byly prováděny na adultních jedincích o stáří jednoho dne od vylíhnutí. K indukci oxidativního stresu u testované linie Oregon R bylo použito několika nízkých koncentrací parakvatu: 16×10^{-8} mM, 16×10^{-7} mM, 16×10^{-6} mM, 16×10^{-5} mM, 16×10^{-4} mM a 16×10^{-3} mM. Parakvat byl připraven v roztoku s destilovanou vodou. Pokusným jedincům byl roztok o objemu 6 ml aplikován na 1,35 g instantního media (Formula 4-24; Carolina biological supply company) ve skleněné vialce. Vzorek negativní kontroly obsahoval pouze dH₂O. Inkubace probíhala po dobu 11 - 14 dní, tj. po dobu nutnou k vylíhnutí. Každá nově vylíhlá generace byla umístěna na čerstvě připravené medium s parakvatem. Pro stanovení LD₅₀, testované u divoké linie Oregon R, RaL 161, RaL 882 a mutantních linií Gaiano III, y^1w^{67c23} a y^1w^{67c23} ; *Sco/SM1* byl používán parakvat o koncentracích 10 – 70 mM. Parakvat o koncentracích 20 a 30 mM byl použit pro zjištění mortality jedinců vystavených dlouhodobému působení nízkých dávek parakvatu. Roztok parakvatu ředěný 1 % roztokem sacharózy byl aplikován o objemu 400 µl na čtvereček buničiny o velikosti 1 × 1 cm² a doba inkubace trvala 24 hodin.

3.3 Příprava vzorků

Pro přípravu jednoho vzorku bylo použito 20 jedinců. Ti byli po vylíhnutí z jednotlivých generací roztríděni na virginilní samice a samce a po 24 hodinách zamražení v tekutém dusíku. Vzorky byly uchovávány v -80 °C.

3.4 Izolace genomové DNA

Jednotlivé vzorky byly homogenizovány pomocí umělohmotného tloučku v 600 µl extrakčního pufru (100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH = 8,0; 50 mM EDTA, pH = 8,0; 0,5 % Sarkosyl; 100 µg/ml proteinázy K) a poté za mírného promíchávání inkubovány 12 hodin při 37 °C. K extrakci DNA byla použita klasická fenol-chloroformová metoda, kdy byly vzorky za mírného promíchávání inkubovány 2krát se stejným dílem fenolu (pH=8,0), poté se stejným dílem fenol-chloroform-isoamylalkoholu (25:24:1) a na závěr se stejným dílem chloroform-isoamylalkoholu. Každá inkubace byla prováděna po dobu 15 min. Centrifugace probíhala při 5000 g, 15 min. DNA byla precipitována pomocí 3 M octanu sodného a rozpuštěna ve 100 µl dH₂O. Kvantita genomové DNA (gDNA) byla vyhodnocena pomocí nanodropu (NanoDrop 2000; Thermo Scientific).

3.5 Izolace celkové RNA

Izolace RNA byla provedena pomocí kitu NucleoSpin RNA II (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, kat. č. 740955.50), a to dle postupu doporučeného výrobcem. Přesná koncentrace získané celkové RNA byla vyhodnocena spektrofotometricky pomocí nanodropu.

3.6 Syntéza cDNA

K syntéze cDNA byl použit kit Super Script III First-Strand (Invitrogen, kat. č. 18080-051). Reakce byla prováděna dle instrukcí doporučených výrobcem. Tzn., k provedení reakce o celkovém objemu 10 µl bylo použito 1 µg celkové RNA, 50 µM oligo dT, 100 U reverzní transkriptázy SmartScribe RT a 100 mM DTT. Reakce byla prováděna při 42 °C, 90 minut a na závěr proběhla inaktivace reverzní transkriptázy při 70 °C po dobu 15 minut.

3.7 Real-time PCR

Pro vyhodnocování relativní telomerické délky a relativní hladiny transkriptů telomerických elementů bylo využito kvantitativní Real-time PCR s využitím qPCR 2 × SYBR MIX (Top–Bio s.r.o., kat. č. P553). Kvantifikace pomocí Real-time PCR přístrojem cycler Light Cycler CFX96 BioRad Real-time PCR systém (BioRad) byla provedena ze čtyř nezávislých experimentů, přičemž reakce byly vždy nanášeny v duplikátech o objemu 25 µl, s primery o koncentraci 0,2 pmol/µl a s 5 µl 10krát ředěné cDNA. Jako vnitřní kontrola sloužil gen pro ribozomální protein *RpL 32*. Pro ověření funkčnosti referenčního genu *RpL 32* byly reakce provedeny ještě s další vnitřní kontrolou, a to s primery ke genu aktinu *Act 79PO*. Průběh reakcí byl 95 °C, 3 min – (95 °C, 30 s; 58 °C, 30 s; 72 °C, 20 s)_{30x}. U každé reakce byla vyhodnocena hodnota ct („cycle trashold“), definující cyklus amplifikace, ve kterém hodnota fluorescence reakce překoná prahovou fluorescenci („threshold“). Získané hodnoty ct byly následně přepočítány na základě komparativní metody dle vztahu $R = \text{Eff}_{\text{Ref}}^{\text{ct Ref}} / \text{Eff}_{\text{Target}}^{\text{ct Target}}$ (Ref je referenční gen, Eff je účinnost reakce, ct je získaná hodnota „cycle trashold“, target je cílový gen). Absolutní kvantifikace byla provedena pomocí genu *white (w)*. Primery navržené firmou Generi Biotech ke kódujícím sekvencím daných genů jsou uvedeny v tabulce 1.

Tab. 1: Sekvence použitých primerů *D. melanogaster*.

Gen	Název primeru	Velikost produktu (pb)	Teplota nasedání primeru (°C)	Sekvence primeru
<i>HeT-A</i>	<i>HeT-A</i> (forward)	150	58	5'– ATTGTCTTCTCCTCCGTCCACC – 3'
	<i>HeT-A</i> (reverse)	150	58	5'– TTCTCTATGCTATTGTGCTGTGC – 3'
<i>Rpl 32</i>	<i>RpL 32</i> (forward)	145	58	5'– GGACAGTATCTGATGCCCAAC – 3'
	<i>RpL 32</i> (reverse)	145	58	5'– ATCTCGCCGCAGTAAACGC – 3'
<i>White</i>	<i>WExo2</i> (forward)	146	57	5'– CCTCTTTATCGGCTCCCTAACG – 3'
	<i>WExo2</i> (reverse)	146	57	5'– TCGTGTGCTGACATTTGCTGAG – 3'
<i>Gypsy</i>	<i>Gypsy</i> (forward)	195	58	5'– GCTAGAGAAGCAGAGGCAAG – 3'
	<i>Gypsy</i> (reverse)	195	58	5'– GTCCTTGTGGTTTGTCCGT – 3'
<i>I-element</i>	<i>I-el</i> (forward)	175	57	5'– GGGATGCAAACGTACAAGAG – 3'
	<i>I-el</i> (reverse)	175	57	5'– GTCGATGTGTCTAAGGTCGT – 3'
<i>Jockey</i>	<i>Jockey</i> (forward)	174	57	5'– ATATGACCGGGTTTCGCTTTG – 3'
	<i>Jockey</i> (reverse)	174	57	5'– GTTGTGGAGTTTGAGTGTG – 3'
<i>Actin</i>	<i>Act79PO</i> (forward)	171	55	5'– TGTATGCCAACAAATGTGC – 3'
	<i>Act79PO</i> (reverse)	171	55	5'– ACAACGAAGCCAGGATGGAG – 3'

3.8 Analýza hladiny 8-oxoguaninu pomocí Fpg

Ke své práci jsem používala stejnou gDNA jako v pokusu pro zjišťování vlivu parakvatu na počet elementů *HeT-A* (viz. 4.1.1). Tato gDNA byla nejprve spektrofotometricky změřena a naředěna tak, aby množství DNA použité ke štěpení bylo ve všech vzorcích srovnatelné. DNA byla následně štěpena pomocí enzymu Fpg, který specificky rozeznává a štěpí místa s 8-oxodG, které vznikají v důsledku oxidativního stresu. K provedení štěpící reakce o objemu 10 μ l bylo použito 200 ng DNA a 8 U Fpg. Reakce byla prováděna při 37 °C, 12 hodin a následně byla 5krát naředěna. Tato našťipaná gDNA byla poté vyhodnocena pomocí kvantitativní Real-time PCR s primery k telomerickému elementu *HeT-A*.

3.9 Indukce nárůstu telomerické délky

Pro indukování nárůstu délky telomer byly využity mutantní linie $y^1w^{67c23};Su(var)205$, které byly kříženy s linií $y^1w^{67c23};Sco/SM1$. Alely $Su(var)205^{02}$, $Su(var)205^{04}$ a $Su(var)205^{05}$ kódují HP1, který nese defekty v doménách pro správnou lokalizaci proteinu v jádře (Powers & Eissenberg, 1993).

3.10 Statistická analýza

Získaná data byla vyhodnocována metodami jednocestné ANOVY a dvoucestné ANOVY s Bonferroni posttestem (pro porovnání kontrolních vzorků se vzorky ošetřenými parakvatem) pomocí statistického programu GraphPadPrism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Výsledky uvedené v grafech na obrázcích (Obr. 1, 2 a 3) reprezentují průměr z alespoň čtyř opakování \pm standardní chyba. U vyhodnocení LD₅₀ jsou uvedeny průměry ze dvou opakování \pm standardní chyba.

4 Výsledky

Pro mou studii jsem využila chronické působení parakvatu, který byl aplikován o velmi nízkých koncentracích (16×10^{-8} mM, 16×10^{-7} mM, 16×10^{-6} mM, 16×10^{-5} mM, 16×10^{-4} , 16×10^{-3} mM) do živného média, v němž proběhl celý vývojový cyklus studovaných jedinců linie Oregon R. Celkem bylo připraveno pět po sobě jdoucích generací s tím, že každá nově vzniklá generace byla přenesena na čerstvé médium. Z každé generace byli odebíráni jedinci, u kterých byla testovaná telomerická délka, hladina transkriptů a přítomnost oxidačně modifikovaného guaninu 8-oxodG. Rovněž byl testován vliv telomerické délky na míru mortality much po krátkodobém podání vysokých dávek parakvatu. U všech vzorků každé generace byly vyhodnocovány počty vylíhlých jedinců. S výjimkou vzorku s nejvyšší koncentrací parakvatu, tj. 16×10^{-3} mM, byl počet vylíhlých jedinců mezi jednotlivými vialkami statisticky srovnatelný (kolem 250 jedinců na vialku v průběhu prvních dvou dnů od počátku líhnutí). U vzorku s 16×10^{-3} mM se líhlo o 35 ± 10 % much méně.

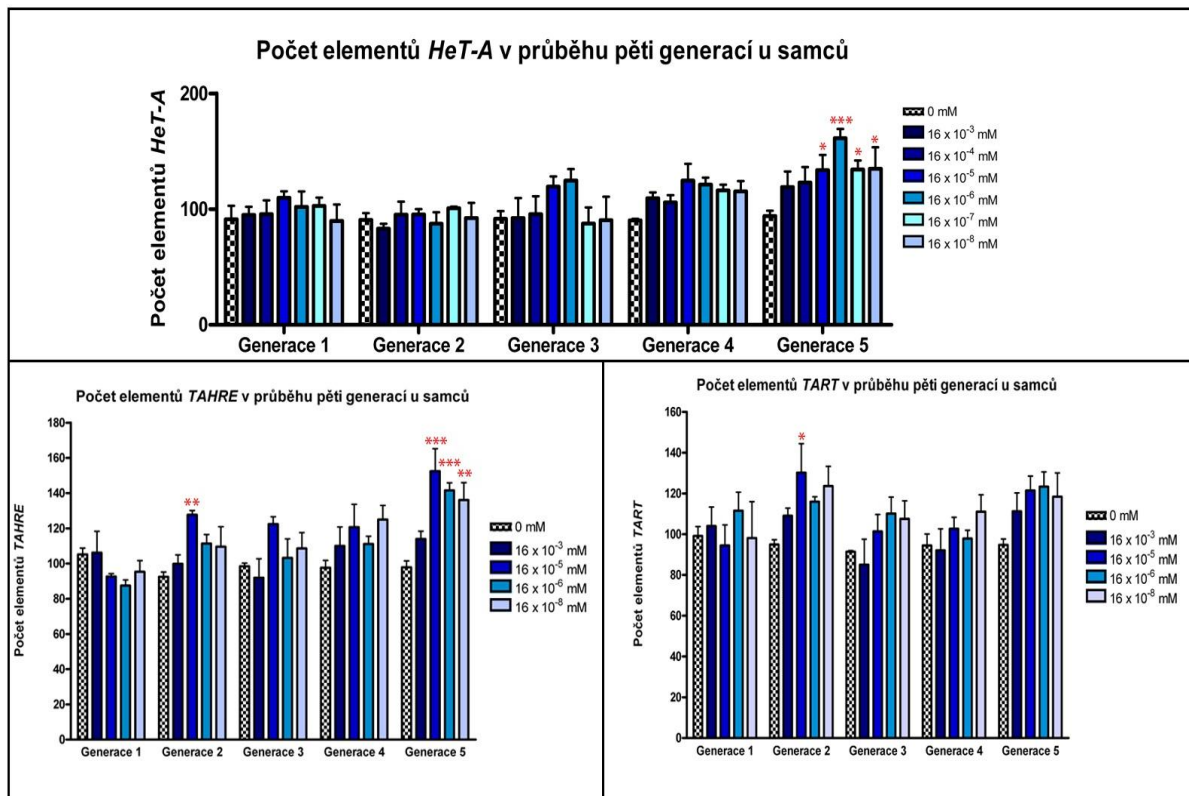
4.1 Nízké koncentrace parakvatu vedou k nárůstu telomerické délky

Jako marker telomerické délky byl použit počet telomerických elementů, který byl u studovaných jedinců vyhodnocován v jejich genomové DNA, a to pomocí kvantitativní Real-time PCR. Nejprve byla provedena relativní kvantifikace srovnáním ke genu *RpL 32* jako nanášecí kontroly a následně absolutní kvantifikace srovnáním ke dvěma kopiím genu *w*, které se v genomu nachází na chromosomu X. Absolutní kvantifikací byl tedy stanoven konkrétní počet kopií elementu nacházející se v genomu daných jedinců. Pro ověření vhodnosti *RpL 32* jako referenčního genu byla v jednom z pilotních experimentů provedena kvantifikace rovněž s pomocí primerů ke genu aktinu *Act 79PO*. Nicméně srovnáním výsledků s využitím obou referenčních genů nebyl zaznamenán žádný rozdíl (výsledky neukázány).

Test byl proveden u samčího pohlaví, a to nejprve u elementu *HeT-A*. Ze získaných výsledků (Obr. 1A) je patrné, že vlivem působení nízkých koncentrací parakvatu dochází v po sobě jdoucích generacích k postupnému nárůstu počtu kopií elementu *HeT-A*. Nárůst můžeme zaznamenat jak v počtu kopií *HeT-A* mezi generacemi ($P < 0,0001$), tak i oproti

kontrolním vzorkům v rámci jednotlivých koncentrací ($P = 0,0011$). Rozdíl v počtu kopií *HeT-A* mezi kontrolními a parakvatem ošetřenými vzorky se zvyšoval s postupujícími generacemi a jako nejvyšší byl tedy zaznamenán u páté generace. Největších nárůstů bylo dosahováno u koncentrace 16×10^{-6} mM, u nichž byla tato navýšení statisticky vyhodnocena jako vysoce průkazná ($P < 0,001$). Statisticky průkazný nárůst ($P < 0,05$) byl rovněž zaznamenán u koncentrací 16×10^{-5} mM, 16×10^{-7} mM a 16×10^{-8} mM.

Protože element *HeT-A* je pouze jedním ze tří telomerických elementů rozhodla jsem se vyhodnotit počet kopií dvou zbývajících retroelementů - *TAHRE* a *TART*. U těchto telomerických elementů jsem se rozhodla otestovat pouze některé koncentrace (16×10^{-8} mM, 16×10^{-6} mM, 16×10^{-5} mM, 16×10^{-3} a 0 mM). U elementu *TAHRE* byl zaznamenán nárůst v počtu kopií a to jak mezi generacemi ($P < 0,001$), tak i oproti kontrolním vzorkům v rámci jednotlivých koncentrací ($P < 0,001$) (Obr. 1B). Stejně jako u elementu *HeT-A*, byl i u *TAHRE* pozorován postupný nárůst vrcholící v páté generaci. Nejvyšších nárůstů oproti kontrolní skupině bylo dosahováno u koncentrace 16×10^{-5} mM ($P < 0,001$). Navýšení počtu kopií u elementu *TART* bylo opět prokázáno jak mezi generacemi ($P = 0,0046$), tak i oproti kontrolním vzorkům v rámci jednotlivých koncentrací ($P = 0,0053$). Statisticky významná hodnota byla zjištěna pouze u koncentrace 16×10^{-5} mM v druhé generaci (Obr. 1C).



Obr. 1: Počet elementů *HeT-A* (A), *TAHRE* (B) a *TART* (C) u samců v průběhu pěti generací, vyhodnocený pomocí kvantitativní Real-time PCR. Jako referenční gen byl použit *RpL 32*, absolutní kvantifikace byla prováděna vzhledem k počtu genomových kopií genu *w*. Pro statistické vyhodnocení byla využita dvoucestná ANOVA s Bonferroni posttestem (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

4.2 Nízké dávky parakvatu zvyšují hladinu transkriptů elementu

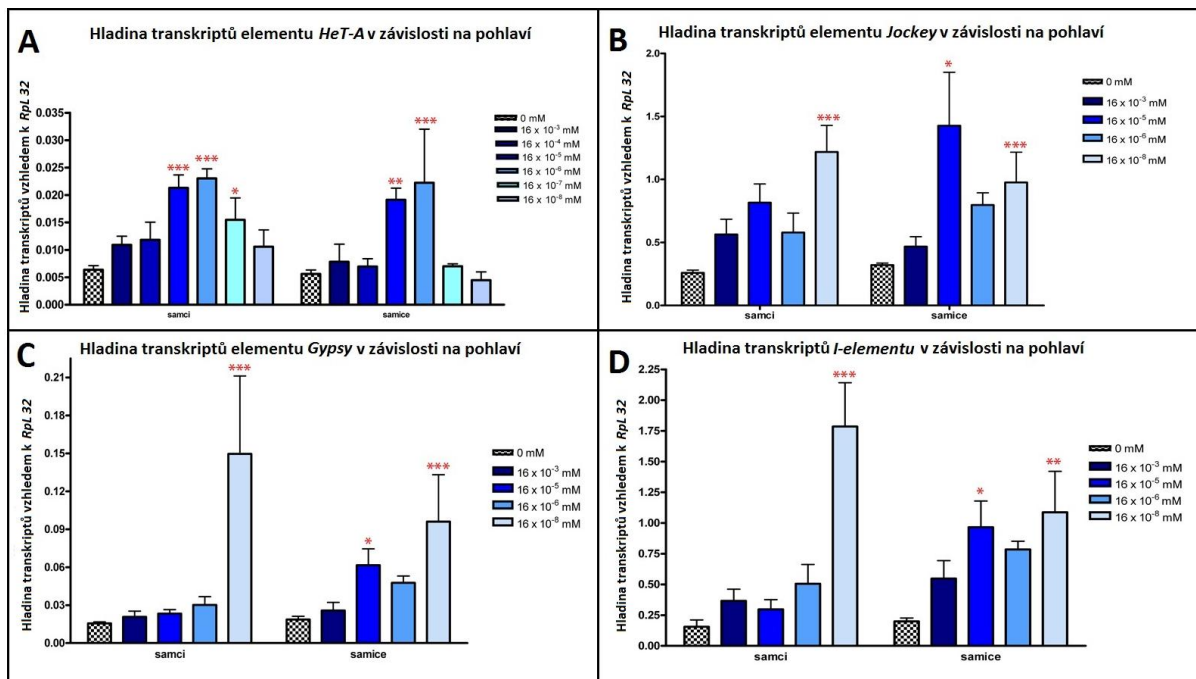
HeT-A

Pozorovaný nárůst počtu kopií mobilních elementů po působení nízkých dávek parakvatu lze vysvětlit posílenou aktivitou některého z kompenzačních mechanismů, tedy aktivitou transpozice či genové konverze. Vzhledem k tomu, že transkripční aktivita mobilních elementů je klíčovým krokem pro jejich transpozici, tak jsem se u testovaných jedinců rozhodla vyhodnotit hladinu jejich transkriptů. Test jsem prováděla u elementu *HeT-A*, a to pomocí kvantitativní Real-time PCR. Vzhledem k možným rozdílům v transkripční regulaci mezi samčím a samičím pohlavím, byly experimenty prováděny u obou pohlaví, a to v první, druhé, čtvrté a páté generaci. Zjistila jsem, že k nárůstu hladiny transkriptů elementu *HeT-A* vzhledem ke kontrole dochází jak v závislosti na koncentraci ($P < 0,0001$), tak mezi pohlavími ($P < 0,0001$) a že jednotlivé generace se mezi sebou v tomto nárůstu neliší. Vzhledem k absenci rozdílu mezi jednotlivými generacemi, byla data ze všech generací sloučena a vyhodnocena dohromady (Obr. 2A). Nejvyšší nárůst hladiny

transkriptů oproti kontrolnímu vzorku byl zaznamenán u jedinců s koncentrací parakvatu 16×10^{-6} mM, u nichž byla tato navýšení statisticky vyhodnocena jako vysoce průkazná ($P < 0,001$). Pomocí těchto experimentů jsem tedy potvrdila, že nízké dávky parakvatu vedou k posilování transkripce testovaného retroelementu a že nárůst hladiny transkriptů, porovnávaných vzhledem ke kontrole, se v průběhu postupujících generací nemění.

4.3 Nárůst hladiny transkriptů netelomerických elementů po působení parakvatu

Pro zjištění, zda má působení oxidativního stresu vliv nejen na telomerické elementy, ale i na ostatní mobilní elementy nacházející se jinde v genomu, jsem se rozhodla otestovat hladinu transkriptů tří netelomerických elementů. Jednalo se o LTR elementu *Gypsy* a non-LTR elementů *Jockey* a *I-elementu*. Experimenty byly provedeny u obou pohlaví. Podobně jako u telomerických elementů byl po působení parakvatu zaznamenán nárůst hladin transkriptů v závislosti na koncentraci podávané dávky (*Jockey*, $P = 0,0008$; *Gypsy*, $P = 0,0015$; *I-element*, $P < 0,001$) a rovněž nebyl pozorován rozdíl mezi generacemi. Nejvyššího nárůstu oproti kontrolnímu vzorku bylo dosaženo u koncentrace parakvatu 16×10^{-8} mM ($P < 0,01$), a to s výjimkou samic u elementu *Jockey*, kde hladina transkriptů vrcholila u koncentrace 16×10^{-6} mM ($P < 0,05$) (Obr. 2B, 2C, 2D). Na základě těchto pozorování můžeme říci, že nízké dávky parakvatu vedou k posílení transkripčních hladin jak telomerických, tak i netelomerických mobilních elementů.



Obr. 2: Nárůst hladiny transkriptů mobilních elementů. *HeT-A* (A), *Jockey* (B), *Gypsy* (C) a *I*-elementu (D). Hladina transkriptů byla vyhodnocována pomocí kvantitativní Real-time PCR. Jako referenční gen byl použit *Rpl 32*. Pro statistické vyhodnocení byla využita dvoucestná ANOVA s Bonferroni posttestem (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

4.4 Vyhodnocení oxidativní modifikace guaninu 8-oxodG pomocí enzymu formamidopyridin glykosylázy (Fpg)

Získanými výsledky z předchozích pokusů jsem potvrdila, že mírným působením parkvatu dochází k posílení transkripce v telomerách, což může být spjato s celou řadou genetických či epigenetických modifikací v telomerických oblastech či genetických defektů. Přítomnost 8-oxodG je v poškozené DNA považována za jeden z hlavních markerů oxidativního poškození. Jeho hladina byla vyhodnocována pomocí enzymu formamidopyridin glykosylázy (Fpg). Měření jednotlivých pokusů však vycházela nejednoznačně, výsledky byly opakovaně značně variabilní (data nejsou ukázána).

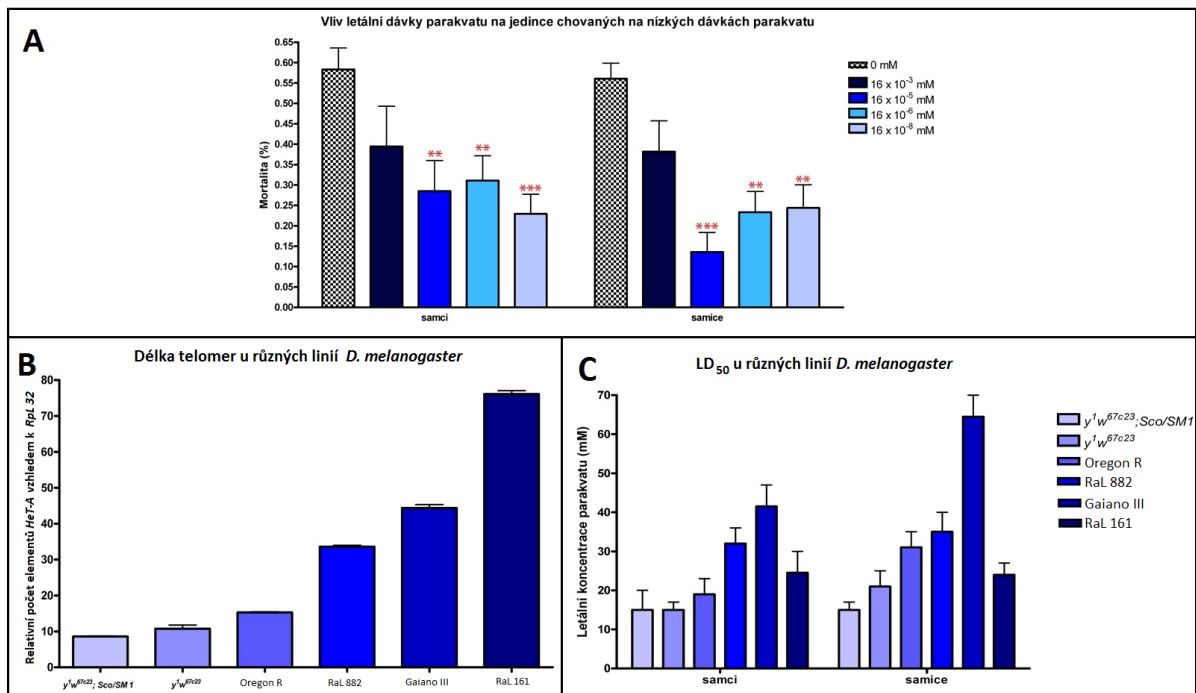
4.5 Testování selekční výhody dlouhých telomer

Získané výsledky indikují, že působení nízkých dávek parkvatu vede k prodloužení délky telomer. Existuje obecně známá domněnka, že delší telomery přinášejí organismu určitou výhodu, protože krátké telomery souvisí s buněčným a celkovým stárnutím. Naproti

tomu dlouhé telomery jsou atributem zdraví a dlouhověkosti (Heidinger et al., 2012). To vede k otázce, jestli pozorovaný nárůst telomerické délky vlivem mírného oxidativního stresu může při výrazné oxidativní zátěži vést k určité selekční výhodě. Pro potvrzení této hypotézy jsem jednak testovala míru mortality po akutním podání vysokých dávek parakvatu u parakvatem chronicky exponovaných much, a také závislost mortality na délce telomer různých linií *D. melanogaster*.

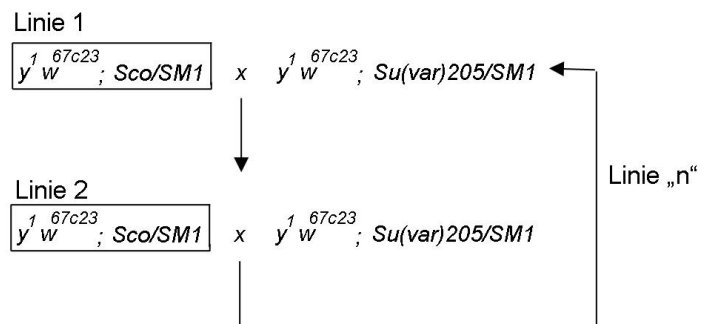
V prvním experimentu byly použity mouchy linie Oregon R, jejichž předchozí tři generace byly chovány na nízkých dávkách parakvatu. Výsledek tohoto experimentu naznačuje, že mortalita much při akutním podání vysoké dávky parakvatu (20 mM u samců, 30 mM u samic) je snižena, pokud jsou jedinci v průběhu jejich vývoje chronicky exponováni nízkým koncentracím parakvatu ($P < 0,0001$) (Obr. 3A). Snižování mortality vzhledem ke kontrole bylo pozorováno až téměř o 50 %.

Dále byla pomocí kvantitativní Real-time PCR s primery k elementu *HeT-A* u několika vybraných laboratorních linií odhadnuta relativní délka telomer samců, a to odvozením od relativního počtu elementu *HeT-A* (Obr. 3B) a následně byla u těchto linií testována odolnost k parakvatu pomocí LD_{50} (Obr. 3C), kde se statisticky lišily jak jednotlivé linie ($P < 0,0001$), tak samci a samice ($P = 0,0128$). Hodnota LD_{50} udává, při jaké koncentraci v průběhu 24 hodin uhynie 50 % testovaných jedinců. Nejvyšší rezistence vůči působícímu parakvatu, tj. nejvyšší LD_{50} (45 mM u samců, 65 mM u samic), byla naměřena u linie Gaiano III, která vykazovala druhou nejdelší telomerickou délku a která nese mutaci *Tel*, zodpovědnou právě za zesílenou elongaci telomer (Siriaco et al., 2002). Jako linie s nejkratšími telomery byla identifikována $y^I w^{67c23}; Sco/SMI$, což je linie projevující se nejnižší odolností vůči aplikovanému parakvatu (LD_{50} byla 15 mM). Kromě linie RaL 161 odolnost k parakvatu u všech testovaných linií korespondovala s délkou jejich telomer. Ta byla statisticky vysoce průkazná mezi pohlavími ($P < 0,0001$) i u jednotlivých linií ($P < 0,0001$).



Obr. 3: Vyhodnocení mortality u much chronicky exponovaných parakvatu (A). Vyhodnocení relativního počtu elementu *HeT-A* u samců (B) a LD₅₀ (C) u linií y^1w^{67c23} , $y^1w^{67c23};Sco/SM1$, Oregon R, RaL 882, Gaiano III, RaL 161. Vyhodnocení počtu elementu *HeT-A* bylo provedeno pomocí kvantitativní Real-time PCR. Jako referenční gen byl použit *RpL 32*. Pro statistické vyhodnocení byla využita dvoucestná ANOVA s Bonferroni posttestem (A, C) a jednocestná ANOVA (B) (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

Pro důkladné ověření závislosti parakvatové rezistence na telomerické délce s minimalizací možného vlivu rozličného genetického pozadí testovaných linií jsem se rozhodla pro přípravu experimentu, v němž pomocí mutantních linií $y^1w^{67c23};Su(var)205$ připravím linie o podobném genetickém pozadí, ale nesoucí různé dlouhé telomery. *Su(var)205* je totiž gen kódující Heterochromatin protein 1 (HP1), jehož mutace vede nadměrné telomerické elongaci (Frydrychova et al., 2008). Byly využity alely $Su(var)205^{02}$, $Su(var)205^{04}$ a $Su(var)205^{05}$ a provedena série křížení (Obr. 4), jejichž cílem je postupně získat několik linií $y^1w^{67c23};Sco/SM1$ s narůstající telomerickou délkou. Vzhledem k časové náročnosti experiment ještě nebyl dokončen.



Obr. 4: Schéma křížení s mutantní linií $y^1 w^{67c23}; Su(var)205$ pro indukci postupného nárůstu délky telomer v linii $y^1 w^{67c23}; Sco/SM1$. Gen $Su(var)205$ kóduje HP1 a jeho mutace vede k nadměrné telomerické elongaci (Frydrychova et al., 2008). Opakovaným křížením jsou získány linie $y^1 w^{67c23}; Sco/SM1$ s postupně narůstající telomerickou délkou a označené jako 1 až n.

5 Diskuze

Hlavním cílem této diplomové práce bylo stanovit, zda nízké dávky parakvatu mají stimulační účinky na telomery *D. melanogaster*, a to co se týče jejich délky a transkripční aktivity. Délka telomer byla vyhodnocována u dospělců v průběhu pěti generací, které byly vystaveny chronickému působení mírných dávek herbicidu parakvatu.

Ve svém projektu jsem vycházela ze dvou předpokladů. Zaprvé, že oxidativní stres obecně přispívá k urychlení zkracování telomer (Von Zglinicki, 2002; Houben et al., 2008). A naopak zadruhé, že pokud chemické, biologické či fyzikální látky ovlivňují organismus dlouhodobě, a to v optimálně nízkých dávkách, může to u daného jedince vyvolat stimulační, resp. až benefiční účinky, označované jako efekt hormeze (Calabrese & Baldwin, 2002). Ačkoliv účinky vysokých hladin volných radikálů na zkracování délky drozofilích telomer nebyly dosud publikovány, i přesto je lze teoreticky dost dobře předpokládat. Toto je i v souladu s našimi nepublikovanými výsledky, kde jsme po aplikaci vysokých dávek parakvatu sledovali zkrácení telomer pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace na polytenních chromosomech. Naproti tomu hormetický efekt volných radikálů na telomerickou délku drozofily byl dosud jev zcela nejasný, a proto byl vybrán jako primární objekt mého studia. Při této práci jsem vycházela z našich předchozích studií, ve kterých jsme studovali aktivitu antioxidantních enzymů SOD a katalázy a ve kterých jsme potvrdili, že optimálně nízká hladina parakvatu vykazuje hormetické účinky (Szakosová, 2013; Krůček et al., 2015).

Chronické působení parakvatu, použité v mé studii, skutečně naznačuje důsledky v prodlužování telomerické délky. U drozofily existují dva mechanismy. Jedná se o genovou konverzi telomerických oblastí a transpozici telomerických elementů k chromosomálním koncům (Mason et al., 2008; Frydrychova et al., 2008). Ve své práci jsem potvrdila, že působením parakvatu dochází k posílení transkripčních hladin telomerických elementů. V souladu s tím, že transkripce těchto elementů je jednou z klíčových aktivit vedoucích k jejich transpozici, zvýšené hladiny transkriptů naznačují telomerickou elongaci skrze posílený transpoziční mechanismus. Nicméně variantu současně zvýšené genové konverze telomerických oblastí jsem nevyloučila, a tak lze stále uvažovat, že působením mnou zvolených podmínek dochází k oběma kompenzačním mechanismům,

a to na základě řady genetických či epigenetických změn ve struktuře a biologii telomerických oblastí. Příkladem může být celkové uvolnění chromatinové struktury, které vede k uvolnění transkripce, posílení genové konverze, zvýšení přístupnosti telomerického konce k nově transponujícím se elementům (Mason et al., 2008).

Telomerická délka se u vzorků po působení parakvatu zvyšovala s počtem generací, což napovídá tomu, že k daným změnám, které vedou k prodlužování telomer po parakvatovém ošetření, musí docházet v zárodečné linii, případně v zárodečné i somatické linii. Spojitost transkripční aktivity telomerických elementů s proliferačně aktivními buňkami zárodečné linie a imaginálních disků byla jako obecný jev pozorována ve dvou předešlých studiích (George & Pardue, 2003; Walter & Biessmann, 2004). To, jestli k posilování aktivity telomerických elementů vlivem působícího parakvatu dochází pouze v proliferačně aktivních buňkách, tj. v buňkách s přirozenou aktivitou telomerických elementů, je třeba ještě ověřit.

Kromě zvýšené aktivity telomerických elementů byla po působení parakvatu pozorována i zvýšená aktivita netelomerických mobilních elementů. To je ve shodě s mnoha předcházejícími studiemi, které potvrdily, že expozice řady modelových organismů environmentálním stresovým podmínkám vede v jejich genomech k aktivizaci mobilních elementů (Mourier et al., 2014). Ty byly nalezeny u většiny testovaných eukaryotních organismů, u kterých tvoří podstatnou část jejich genomů (3 – 30 %). Aktivita mobilních elementů je spjata s genomovou nestabilitou, o čemž svědčí také to, že je často nalézána u nádorových buněk. Na druhou stranu, protože mají mobilní elementy schopnost účinně zvyšovat genetickou variabilitu, je jejich aktivita chápána jako výkonný evoluční mechanismus pro adaptaci organismů k novým environmentálním podmínkám. Přitom to není pouze náhodná inserční mutageneze, která vede k adaptaci k novým podmínkám, ale i často ne-náhodná integrace elementů do genomu, resp. integrace elementů do genů hrajících důležitou roli v adaptabilitě k daným stresovým podmínkám (Mourier et al., 2014). Příkladem může být preferovaná integrace LTR retrotransposonu *Tf1* do genomu *Schizosaccharomyces pombe* s navýšením exprese genů *spn7a* a *css1* jako odpověď na teplotní a oxidativní stres (Feng et al., 2012). U *D. melanogaster* můžeme nalézt příklad mobilního elementu *Doc1420* inzerovaného do genu *CHKov1*, který zřejmě ovlivňuje metabolismus acetylcholin esterázy, jež je cílem několika typů pesticidů (Aminetzach et al., 2005). Další příklady mobilních elementů ovlivňující geny pro rezistenci k pesticidům byly zjištěny u *Heliothis virescens* (Gahan et al., 2001), *D. melanogaster*

(Daborn et al., 2002) a *D. simulans* (Schlenke & Begun, 2004). Tato zjištění podporují důležitost mobilních elementů v adaptivní evoluci k pesticidové rezistenci. K aktivaci mobilních elementů při stresových podmínkách a změnách vnějšího prostředí dochází u všech eukaryot, avšak jejich regulační sekvence jsou velice variabilní (Grandbastien, 1998). Vystává tedy otázka, zdali při stresových podmínkách dochází k aktivaci všech mobilních elementů nebo pouze určitých typů či rodin. Pokud by stresové podmínky ovlivňovaly veškeré mobilní elementy, pak by prodloužení telomer transpozicí, tak jak jsem to pozorovala ve své studii, mohlo být pouze vedlejším produktem adaptace. V opačném případě, při cílené aktivaci telomerických elementů stresovými podmínkami, bychom mohli spekulovat o možné adaptační roli telomer a jejich délky v průběhu evoluce organismů.

Významným závěrem mé studie je i to, že při chronickém působení nízkých parakvatových koncentrací nedocházelo k poklesu životaschopnosti a plodnosti testovaných jedinců. To totiž naznačuje, že nárůst telomerické délky v testovaných liniích nebyl pouze skrze získání určité selekční výhody jedinců obdařených delšími telomery, a tudíž jejich upřednostněním před jedinci s krátkou telomerickou délkou, ale přímou stimulací telomerické aktivity. To indikuje, že zvolené dávky parakvatu působí na telomery hormetickým efektem.

Hormeze je jev, který je charakterizován nelineární, dvoufázovou závislostí reakce na množství určitého chemického, fyzikálního či biologického agens. Vysoké či střední dávky látky působí na organismus inhibičně a toxicky, naopak nízké mají účinky stimulující až benefiční (Calabrese & Baldwin, 2003a; Calabrese, 2004). Při hormezi platí, že expozice organismu subletálními dávkami stresového faktoru spustí adaptivní obranné mechanismy chránící daného jedince proti jinak letálními dávkami stejného či jiného stresového faktoru. Hormeze vede k aktivaci exprese proteinů zodpovědných za stresovou rezistenci, jako jsou proteiny teplotního stresu (tzv. heat-shock proteiny), antioxidantní enzymy superoxid dismutáza a glutation peroxidáza či růstové faktory jako „insulin-like growth factors“ (Mattson, 2008). Působení jednoho typu stresu může vést k indukci krosmodálních hormetických mechanismů, tj. k realizaci více než jedné adaptivní odpovědi (Mattson & Cheng, 2006; Mattson, 2008). Stimulační účinky, které obvykle nastávají pouze v mírných odezvách, velmi závisí nejen na optimální dávce, ale také na vhodném dávkování v čase (Calabrese, 2005a). Hormeze byla studována u řady organismů, co se týče různých biologických faktorů jako je růst, délka života, metabolické a molekulární procesy,

kognitivní funkce či imunitní odpověď (Calabrese & Baldwin, 2003a; Calabrese & Baldwin, 2003b; Calabrese, 2005b). Hormetický efekt byl pozorován ve spojitosti jak s chemickými agens jako jsou pesticidy, herbicidy, těžké kovy (Calabrese & Baldwin, 2003a; Duke et al., 2006), tak fyzikálními stresory jako je radiace (Macklis & Beresford, 1991) nebo biologickými a environmentálními stimuly zastoupenými například teplotou, hladověním, pohybem či infekcí (Le Bourg, 2009; Le Bourg, 2015; McClure et al., 2014). U *D. melanogaster* byla taktéž pozorována spojitost působení nízkých dávek teplotního stresu, navýšení gravitace či infekce entomopatogenními houbami s mírným prodloužením délky života, navýšením teplotní rezistence či opožděným behaviorálnímu stárnutím (Le Bourg, 2007; Hercus et al., 2003; McClure et al., 2014). Je tedy zřejmé, že hormetický efekt lze pozorovat u celé řady fyziologických parametrů a stresorů.

6 Závěr

Celkově se na základě této práce jeví, že chronické působení subtoxických hladin parakvatu funguje jako účinný mechanismus při získávání obranyschopnosti k jeho jinak toxickým dávkám. Ačkoliv jsou některé výsledky zatím předběžné a je třeba provést experimenty i s jinými induktory oxidativního stresu než je parakvat, má studie naznačují, že je to pravděpodobně mimo jiné i délka telomer, která je díky optimálně zvolené koncentraci parakvatu prodlužována, a že délka telomer jako taková ovlivňuje odolnost k oxidativnímu stresu. Lze zatím jen spekulovat o mechanismech, kterými je daný signál z telomer přenášen, resp. z čeho vlastně pramení výhoda dlouhých telomer k dané rezistenci.

7 Použitá literatura

- Abad JP, de Pablos B, Osoegawa K, de Jong PJ, Martín-Gallardo a & Villasante a (2004a). Genomic analysis of *Drosophila melanogaster* telomeres: full-length copies of *HeT-A* and *TART* elements at telomeres. *Molecular Biology and Evolution*, 21(9), 1613-1619.
- Abad JP, de Pablos B, Osoegawa K, de Jong PJ, Martín-Gallardo a & Villasante a (2004b). *TAHRE*, a novel telomeric retrotransposon from *Drosophila melanogaster*, reveals the origin of *Drosophila* telomeres. *Molecular Biology and Evolution*, 21(9), 1620-1624.
- Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S & Rezaiee a (2004). Pesticides and oxidative stress: a review. *Medical Science Review*, 10(6), RA141-RA147.
- Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, ... & Harley CB (1992). Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *The National Academy of Sciences*, 89(21), 10114-10118.
- Aminetzach YT, Macpherson JM & Petrov DA (2005). Pesticide resistance via transposition-mediated adaptive gene truncation in *Drosophila*. *Science*, 309(5735), 764-767.
- Bandyopadhyay U, Das D & Banerjee RK (1999). Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Current Science*, 77(5), 658-666.
- Barnham KJ, Masters CL & Bush AI (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(3), 205-214.
- Biessmann H & Mason JM (1988). Progressive loss of DNA sequences from terminal chromosome deficiencies in *Drosophila melanogaster*. *The EMBO Journal*, 7(4), 1081.
- Biessmann H & Mason JM (2003). Telomerase-independent mechanisms of telomere elongation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(11), 2325-2333.

- Biessmann H, Valgeirsdottir K, Lofsky A, Chin C, Ginther B, Levis RW & Pardue ML (1992). *HeT-A*, a transposable element specifically involved in "healing" broken chromosome ends in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology*, 12(9), 3910-3918.
- Blackburn EH (1991). Structure and function of telomeres. *Nature*, 350(6319), 569-573.
- Blackburn EH (2005). Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *Febs Letters*, 579(4), 859-862.
- Buonocore G, Perrone S & Tataranno ML (2010). Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. In *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 15(4), 186-190.
- Cadenas E & Davies KJ (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(3), 222-230.
- Calabrese EJ & Baldwin LA (2001). Hormesis: U-shaped dose responses and their centrality in toxicology. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(6), 285-291.
- Calabrese EJ & Baldwin LA (2002). Defining hormesis. *Human & Experimental Toxicology*, 21(2), 91-97.
- Calabrese EJ & Baldwin LA (2003a). The hormetic dose-response model is, more common than the threshold model in toxicology. *Toxicological Sciences*, 71(2), 246-250.
- Calabrese EJ & Baldwin LA (2003b). Toxicology rethinks its central belief. *Nature*, 421(6924), 691-692.
- Calabrese EJ (2004). Hormesis: from marginalization to mainstream: a case for hormesis as the default dose-response model in risk assessment. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 197(2), 125-136.
- Calabrese EJ (2005a). Cancer biology and hormesis: human tumor cell lines commonly display hormetic (biphasic) dose responses. *Critical Reviews in Toxicology*, 35(6), 463-582.
- Calabrese EJ (2005b). Hormetic dose-response relationships in immunology: occurrence, quantitative features of the dose response, mechanistic foundations, and clinical implications. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 35(2-3), 89-295.

- Conner EM & Grisham MB (1996). Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition*, 12(4), 274-277.
- Daborn PJ, Yen JL, Bogwitz MR, Le Goff G, Feil E, Jeffers S, ... & Wilson TG (2002). a single P450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. *Science*, 297(5590), 2253-2256.
- Danilevskaya ON, Arkhipova IR, Pardue ML & Traverse KL (1997). Promoting in tandem: the promoter for telomere transposon *HeT-A* and implications for the evolution of retroviral LTRs. *Cell*, 88(5), 647-655.
- Dröge W (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47-95.
- Duke SO, Cedergreen N, Velini ED & Belz RG (2006). Hormesis: is it an important factor in herbicide use and allelopathy? *Outlooks on Pest Management*, 17(1), 29-33.
- Epel ES, Blackburn EH, Lin J, Dhabhar FS, Adler NE, Morrow JD & Cawthon RM (2004). Accelerated telomere shortening in response to life stress. *The National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(49), 17312-17315.
- Feng G, Leem YE & Levin HL (2012). Transposon integration enhances expression of stress response genes. *Nucleic acids research*, gks1185.
- Finkel T & Holbrook NJ (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239-247.
- Fisher-Wellman K & Bloomer RJ (2009). Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dynamic Medicine*, 8(1), 1.
- Frydrychova RC & Mason JM (2013). *Telomeres: Their Structure and Maintenance*. INTECH Open Access Publisher.
- Frydrychova RC, Biessmann H & Mason JM (2008). Regulation of telomere length in *Drosophila*. *Cytogenetic and Genome Research*, 122(3-4), 356.
- Gahan LJ, Gould F & Heckel DG (2001). Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science*, 293(5531), 857-860.

- George JA & Pardue ML (2003). The promoter of the heterochromatic *Drosophila* telomeric retrotransposon, *HeT-A*, is active when moved into euchromatic locations. *Genetics*, 163(2), 625-635.
- George JA, DeBaryshe PG, Traverse KL, Celniker SE & Pardue ML (2006). Genomic organization of the *Drosophila* telomere retrotransposable elements. *Genome Research*, 16(10), 1231-1240.
- Grandbastien MA (1998). Activation of plant retrotransposons under stress conditions. *Trends in Plant Science*, 3(5), 181-187.
- Greider CW & Blackburn EH (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell*, 43(2), 405-413.
- Griendling KK & FitzGerald GA (2003). Oxidative stress and cardiovascular injury part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation*, 108(16), 1912-1916.
- Halliwell B (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *The American Journal of Medicine*, 91(3), S14-S22.
- Hayflick L & Moorhead PS (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25(3), 585-621.
- Heidinger BJ, Blount JD, Boner W, Griffiths K, Metcalfe NB & Monaghan P (2012). Telomere length in early life predicts lifespan. *The National Academy of Sciences*, 109(5), 1743-1748.
- Hercus MJ, Loeschcke V & Rattan SI (2003). Lifespan extension of *Drosophila melanogaster* through hormesis by repeated mild heat stress. *Biogerontology*, 4(3), 149-156.
- Holeček V, Rokyta R (2005). Volně radikálová teorie stárnutí. *Česká geriatrická revue* 2005, 3, 1, s. 27–33.
- Houben JMJ, Moonen HJJ, van Schooten FJ & Hageman GJ (2008). Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress? *Free Radical Biology and Medicine*, 44(3), 235-246.

- Chan SR & Blackburn EH (2004). Telomeres and telomerase. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 359(1441), 109-122.
- Chan SWL & Blackburn EH (2002). New ways not to make ends meet: telomerase, DNA damage proteins and heterochromatin. *Oncogene*, 21(4), 553-563.
- Jones DP (2008). Radical-free biology of oxidative stress. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 295(4), C849-C868.
- Kawanishi S & Oikawa S (2004). Mechanism of telomere shortening by oxidative stress. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1019(1), 278-284.
- Klaunig JE, Kamendulis LM & Hocevar BA (2010). Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicologic Pathology*, 38(1), 96-109.
- Knight JA (2000). Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 30(2), 145-158.
- Krokan H, Standal R & Slupphaug G (1997). DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochemical Journal*, 325, 1-16.
- Krůček T, Korandová M, Šerý M, Frydrychová RČ & Szakosová K (2015). Effect of low doses herbicide paraquat on antioxidant defense in *Drosophila*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*.
- Le Bourg É (2007). Hormetic effects of repeated exposures to cold at young age on longevity, aging and resistance to heat or cold shocks in *Drosophila melanogaster*. *Biogerontology*, 8(4), 431-444.
- Le Bourg É (2009). Hormesis, aging and longevity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1790(10), 1030-1039.
- Le Bourg É (2015). Fasting and other mild stresses with hormetic effects in *Drosophila melanogaster* can additively increase resistance to cold. *Biogerontology*, 1-11.
- Levis RW, Ganesan R, Houtchens K, Tolar LA & Sheen FM (1993). Transposons in place of telomeric repeats at a *Drosophila* telomere. *Cell*, 75(6), 1083-1093.
- Macklis RM & Beresford B (1991). Radiation hormesis. *The Journal of Nuclear Medicine*, 32(2), 350-359

- Maeshima K, Janssen S & Laemmli UK (2001). Specific targeting of insect and vertebrate telomeres with pyrrole and imidazole polyamides. *The EMBO Journal*, 20(12), 3218-3228.
- Magder S (2006). Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life. *Critical Care*, 10(1), 208.
- Maritim AC, Sanders RA & Watkins J III. (2003). Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17(1), 24-38.
- Marnett LJ (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21(3), 361-370.
- Mason JM & Biessmann H (1995). The unusual telomeres of *Drosophila*. *Trends in Genetics*, 11(2), 58-62.
- Mason JM, Frydrychova RC & Biessmann H (2008). *Drosophila* telomeres: an exception providing new insights. *Bioessays*, 30(1), 25-37.
- Mattson MP & Cheng A (2006). Neurohormetic phytochemicals: Low-dose toxins that induce adaptive neuronal stress responses. *Trends in Neurosciences*, 29(11), 632-639.
- Mattson MP (2008). Hormesis defined. *Ageing Research Reviews*, 7(1), 1-7.
- McClure CD, Zhong W, Hunt VL, Chapman FM, Hill FV & Priest NK (2014). Hormesis results in trade-offs with immunity. *Evolution*, 68(8), 2225-2233.
- McKnight TD & Shippen DE (2004). Plant telomere biology. *The Plant Cell Online*, 16(4), 794-803.
- Melnikova L & Georgiev P (2002). Enhancer of terminal gene conversion, a new mutation in *Drosophila melanogaster* that induces telomere elongation by gene conversion. *Genetics*, 162(3), 1301-1312.
- Meyne J, Ratliff RL & Moyzis RK (1989). Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(18), 7049-7053.
- Mikhailovsky S, Belenkaya T & Georgiev P (1999). Broken chromosomal ends can be elongated by conversion in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*, 108(2), 114-120.

- Mourier T, Nielsen LP, Hansen AJ & Willerslev E (2014). Transposable elements in cancer as a by-product of stress-induced evolvability. *Frontiers in Genetics*, 5.
- Oikawa S & Kawanishi S (1999). Site-specific DNA damage at GGG sequence by oxidative stress may accelerate telomere shortening. *FEBS letters*, 453(3), 365-368.
- Olovnikov AM (1973). A theory of marginotomy: the incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *Journal of Theoretical Biology*, 41(1), 181-190.
- Pardue ML & DeBaryshe PG (2003). Retrotransposons provide an evolutionarily robust non-telomerase mechanism to maintain telomeres. *Annual Review of Genetics*, 37(1), 485-511.
- Pardue ML, Danilevskaya ON, Lowenhaupt KY, Slot F & Traverse KL (1996). *Drosophila* telomeres: new views on chromosome evolution. *Trends in Genetics*, 12(2), 48-52.
- Powers JA & Eissenberg JC (1993). Overlapping domains of the heterochromatin-associated protein HP1 mediate nuclear localization and heterochromatin binding. *The Journal of Cell Biology*, 120(2), 291-299.
- Rashkova S, Karam SE & Pardue ML (2002). Element-specific localization of *Drosophila* retrotransposon Gag proteins occurs in both nucleus and cytoplasm. *National Academy of Sciences*, 99(6), 3621-3626.
- Reddy JK, Goel SK, Nemali MR, Carrino JJ, Laffler TG, Reddy MK, ... & Lalwani ND (1986). Transcription regulation of peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase and enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in rat liver by peroxisome proliferators. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(6), 1747-1751.
- Richter T, Saretzki G, Nelson G, Melcher M, Olijslagers S & von Zglinicki T (2007). TRF2 overexpression diminishes repair of telomeric single-strand breaks and accelerates telomere shortening in human fibroblasts. *Mechanisms of Ageing and Development*, 128(4), 340-345.
- Sharma HW, Sokoloski JA, Perez JR, Maltese JY, Sartorelli AC, Stein CA & Narayanan R (1995). Differentiation of immortal cells inhibits telomerase activity. *National Academy of Sciences*, 92(26), 12343-12346.

- Shay JW, Zou Y, Hiyama E & Wright WE (2001). Telomerase and cancer. *Human Molecular Genetics*, 10(7), 677-685.
- Sheen FM & Levis RW (1994). Transposition of the LINE-like retrotransposon *TART* to *Drosophila* chromosome termini. *National Academy of Sciences*, 91(26), 12510-12514.
- Shpiz S, Kwon D, Uneva A, Kim M, Klenov M, Rozovsky Y, ... & Kalmykova a (2007). Characterization of *Drosophila* telomeric retroelement *TAHRE*: transcription, transpositions, and RNAi-based regulation of expression. *Molecular Biology and Evolution*, 24(11), 2535-2545.
- Schlenke TA & Begun DJ (2004). Strong selective sweep associated with a transposon insertion in *Drosophila simulans*. *National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(6), 1626-1631.
- Schulz H (1887). Zur lehre von der arzneiwirkung. *Virchows Archiv*, 108(3), 423-445.
- Schulz H (1888). Ueber hefegifte. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 42(1), 517-541.
- Sies H (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82(2), 291-295.
- Siriaco, GM, Cenci G, Haoudi A, Champion LE, Zhou C, Gatti M & Mason JM (2002). Telomere elongation (Tel), 245, 235–245.
- Szakosová K (2013). Vliv oxidativního stresu na antioxidační enzymy u *Drosophila melanogaster*. Bakalářská práce. University of south bohemia in České Budějovice, Faculty of Science.
- Thannickal VJ & Fanburg BL (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279(6), L1005-L1028.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS & Jones JM (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282(5391), 1145-1147.

- Turrens JF (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*, 552(2), 335-344.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M & Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44-84.
- Van Heerebeek L, Meischl C, Stooker W, Meijer CJLM, Niessen HWM & Roos D (2002). NADPH oxidase (s): new source (s) of reactive oxygen species in the vascular system? *Journal of Clinical Pathology*, 55(8), 561-568.
- Von Zglinicki T (2002). Oxidative stress shortens telomeres. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(7), 339-344.
- Von Zglinicki T, Saretzki G, Ladhoff J, di Fagagna FDA & Jackson SP (2005). Human cell senescence as a DNA damage response. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126(1), 111-117.
- 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(5), 211-219.
- Watson JD (1972). Origin of concatemeric T7DNA. *Nature*, 239(94), 197-201.
- Wiseman H & Halliwell B (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *The Journal of Biochemistry*, 313, 17-29.
- Yang JH, Lee HC, Lin KJ & Wei YH (1994). A specific 4977- bp deletion of mitochondrial DNA in human aging skin. *Archives of Dermatological Research*, 286, s. 386-390.
- Young BS, Pession A, Traverse KL, French C & Pardue ML (1983). Telomere regions in *Drosophila* share complex DNA sequences with pericentric heterochromatin. *Cell*, 34(1), 85-94.
- Zangar RC, Davydov DR & Verma S (2004). Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 199(3), 316-331.