

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Vliv oxidačního stresu na telomery u *Drosophila*
*melanogaster***

Bakalářská práce

Barbora Heroutová

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

České Budějovice 2019

Bibliografická citace

Heroutová B. (2019). Vliv oxidačního stresu na telomery u *Drosophila melanogaster*. [Effect of oxidative stress on telomeres in *Drosophila melanogaster*. Bc. Thesis, in Czech] - 33 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

There is a balance between production of free radicals and their degradation by antioxidation mechanisms. Free radicals play roles in numerous physiological functions like immune reactions or detoxification processes. However, overabundance of free radicals, may causes a significant damage of cell structures, including telomeres. Telomeres are terminal sections of eukaryote chromosomes with a number of vital cellular functions. Telomeres are damaged and shortened by free radicals.

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské 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 16.4.2019

.....
Barbora Heroutová

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat své školitelce RNDr. Radmile Čapkové Frydrychové, Ph.D. za možnost pracovat v její laboratoři a za odborné vedení této práce. Dále bych chtěla poděkovat členům laboratoře Mgr. Justině Koubové a Mgr. Tomáši Jehlíkovi za jejich ochotné rady při práci. Velký dík také patří mé rodině, přátelům a partnerovi a všem, kteří mě při mé práci podporovali a věřili mi.

Obsah

1 Úvod	1
1.1 Oxidativní stres	1
1.1.1 Volné kyslíkové radikály a reaktivní formy kyslíku	1
1.1.3 Negativní vliv ROS a poškození způsobená oxidativním stresem	3
1.2 Telomery	4
1.2.1 Funkce telomer	4
1.2.2 Nukleoproteinová struktura telomer	5
1.2.2 Vliv oxidativního stresu na telomery	5
1.2.3 Telomery u <i>Drosophila melanogaster</i>	6
1.2.4 Vliv oxidativního stresu na telomery u <i>Drosophila melanogaster</i>	7
1.3 Chromatin	8
1.3.1 Struktura a funkce chromatinu	8
1.3.2 Heterochromatinový protein 1 (HP1)	9
1.3.3 Role HP1 při oxidativním stresu	10
2 Cíle práce	12
3 Materiál a metody	13
3.1 Chov <i>Drosophila melanogaster</i>	13
3.1.1 Použité linie <i>Drosophila melanogaster</i>	13
3.2 Aplikace parakvatu	14
3.3 Izolace genomové DNA	15
3.4 Izolace RNA	15
3.5 Syntéza cDNA	15
3.6 Real-time PCR	15
3.7 Analýza množství HP1 pomocí ChiP	16
3.8 Statistická analýza	18
4 Výsledky	19

4.1 Vliv chronického působení nízkých dávek parakvatu na modifikátory chromatinu	19
4.1.1 Chronický oxidační stres způsobuje zvýšenou transkripční hladinu genu <i>Su(var)205</i>	19
4.1.2 Množství telomerického proteinu HP1	20
4.2 Vliv délky telomer na rezistenci	21
5 Diskuze	23
6 Závěr	25
7 Literatura.....	26

1 Úvod

1.1 Oxidativní stres

Za fyziologických podmínek jsou volné radikály organismem cíleně produkovány a využívány v řadě procesů, jako je například obrana proti patogenům, signální dráhy nebo detoxikace xenobiotik (Kamata & Hirata, 1999). Součástí bezchybného systému je také redoxní homeostáza, tedy rovnováha mezi volnými radikály a antioxidanty, které v případě potřeby hladinu volných radikálů v organismu snižují. Pokud je redoxní rovnováha porušena a v organismu dochází k nadměrné přítomnosti ROS či současně nedostatečné antioxidační obraně, nastává v organismu jev označovaný jako oxidační stres (Dröge, 2002). Při oxidačním stresu dochází k nadměrnému ataku volných radikálů na důležité makromolekuly, jako jsou nukleové kyseliny, proteiny či lipidy, nebo buněčné struktury, což vede k defektům ve struktuře a funkci buněk vedoucích až k poškozením na úrovni celého organismu (Halliwell & Gutteridge, 1999).

1.1.1 Volné kyslíkové radikály a reaktivní formy kyslíku

Volné radikály jsou atomy nebo molekuly, které ve svém valenčním orbitalu obsahují nepárové elektrony a z toho důvodu vykazují snahu si chybějící elektrony doplnit, a velice ochotně tak reagují s jinými látkami. Mohou reagovat s jinými radikály za vzniku neradikálové molekuly nebo interagují s jinou neradikálovou molekulou v okolí, kterou svou interakcí modifikují. (Miller, Buettner, & Aust, 1990). Z hlediska patogeneze jsou pro organismus nejvýznamnější volné radikály kyslíku, jako je např. superoxidový a hydroxylový radikál. Volné kyslíkové radikály patří do skupiny látek souhrnně označovaných jako reaktivní formy kyslíku (ROS), k nimž krom volných kyslíkových radikálů náleží i látky, které jsou sice neradikálové povahy, ale které se za určitých podmínek ve volné kyslíkové radikály přeměňují (např. se jedná o peroxid vodíku, H_2O_2) (Cadenas & Davies, 2000).

Příkladem vzniku volných kyslíkových radikálů a reaktivních forem kyslíku je redukce molekulárního kyslíku za vzniku superoxidového radikálu ($O_2^{\cdot-}$), který může být dále konvertován na peroxid vodíku, a ten za přítomnosti iontů železa či mědi může být přeměněn na hydroxylový radikál OH^{\cdot} . V organismu většina superoxidu vzniká tímto způsobem v mitochondriích, a to během elektronového transportního řetězce v transmembránových komplexech I (NADH ubiquinon reduktáza) a III (ubiquinol-cytochrom c reduktáza), kdy je sice za běžných okolností kyslík redukován na vodu, ale 1–3 % kyslíku z řetězce uniknou a

jsou zdrojem zmíněného vzniku superoxidu (Hanukoglu, Rapoport, Weiner, & Sklan, 1993). Superoxidový radikál může z kyslíku vznikat také pomocí NADPH oxidázy a xantinoxidázy (Cadenas & Davies, 2000). Dalšími kyslíkovými radikály jsou peroxylové radikály ROO[•]. V peroxizomech vzniká peroxid vodíku (H₂O₂), který je využíván k oxidaci mastných kyselin při jejich metabolismu. Peroxizomy za normálních podmínek samy regulují redoxní rovnováhu, ale při jejich poškození dochází k uvolňování množství peroxidu vodíku a vzniku oxidačního stresu (Valko, Izakovic, Mazur, Christopher, & Telser, 2004).

Vznik ROS může být vyvolán také působením vnějších faktorů, mezi které patří toxické a chemické látky jako pesticidy a herbicidy, dále chemoterapeutika. Pro vznik ROS jsou významné i fyzikální činitele, jako je ionizační a UV záření (Valko, Rhodes, Moncol, Izakovic, & Mazur, 2006).

Za fyziologických podmínek ROS v buňce zastávají řadu životně důležitých funkcí. Hrají roli v buněčné signalizaci a regulaci, kdy jsou po stimulaci cytokiny, růstovými faktory a hormony produkovány například některými interleukiny, TGF α nebo růstovými faktory (Thannickal & Fanburg, 2000). Superoxid je také produkován neutrofily a makrofágy při bakteriální nákaze, kdy je cíleně využíván při destrukci daného patogenu a zároveň v imunitní odpovědi funguje jako signální molekula (Dröge, 2002; Murray, Juangbhanich, Nathan, & Cohn, 1979).

Látky působící v organismu proti reaktivním formám kyslíku se nazývají antioxidanty. Funkcí antioxidantů je neutralizovat volné radikály předtím, než způsobí poškození. Rozlišují se antioxidanty neenzymatické exogenní a enzymatické, které jsou tělu vlastní. Neenzymatické antioxidanty, které musí organismy přijímat v potravě, jsou vitaminy (vitamin A, E a C) a karotenoidy (např. β -karoten) (Blokhina, Virolainen, & Fagerstedt, 2003). Vitamin C, jak se označuje kyselina askorbová, antioxidační funkci vykonává jako donor vodíkového atomu (Frei, England, & Ames, 2006). Vitamin E se vyskytuje v několika formách a nejaktivnějším antioxidantem u člověka je α -tokoferol. V buňkách se vyskytuje navázaný na membránách a jeho hlavní funkcí je ochrana lipidů proti peroxidaci (Burton & Ingold, 1986). Při tomto procesu spolupracuje s kyselinou askorbovou. Když α -tokoferol odevzdá vodík lipidovému radikálu k zajištění jeho neutralizace, sám se stává stabilním a málo reaktivním radikálem (van Acker, Koymans, & Bast, 1993). Do původní formy je regenerován pomocí kyseliny askorbové (Mukai, Nishimura, & Kikuchi, 1991). Karotenoidy jsou barviva vyskytující se v rostlinách a mikroorganismech a dělí se na xantofyly, karoteny a lykopeny

(Edge, McGarvey, & Truscott, 1997). Jejich antioxidační aktivita je zajišťována přítomností dvojně vazby v řetězci. Díky dvojně vazbě v karotenoidu a nespárovanému elektronu v reaktivním radikálu dochází ke vzniku vazby a stabilizaci radikálu (Burton & Ingold, 1984). Endogenní antioxidanty jsou enzymy jako peroxidáza, kataláza a superoxid dismutáza (Frei et al., 2006; Fridovich, 1978).

1.1.3 Negativní vliv ROS a poškození způsobená oxidativním stresem

Při vysokých koncentracích se v organismech ROS stávají problémem. Můžou poškozovat všechny důležité struktury jako DNA, lipidy nebo proteiny (Valko et al., 2006). Reakcí ROS s lipidy vznikají mutagenní a karcinogenní produkty. Oxidativní stres u proteinů zpřičiňuje jejich modifikaci, čímž mění jejich funkci anebo způsobí degradaci (Valko et al., 2007). V DNA poškozují jak purinové a pyrimidinové báze, tak i deoxyribózovou kostru (Halliwell & Gutteridge, 1999). Nejběžnější mutovanou formou vznikající při poškození oxidativním stresem je 8-OH-G (8-oxo-deoxyguanosin). Na poškození DNA vlivem reaktivních kyslíkových radikálů je obzvláště citlivá mitochondriální DNA, protože není oproti jaderné DNA chráněná histony a navíc jsou právě mitochondrie v buňce hlavním producentem volných kyslíkových radikálů. S věkem se v organismech akumulují mutace v DNA způsobené oxidativním stresem, které eventuálně vedou ke karcinogenezi a celkové genomové nestabilitě (Valko et al., 2004). Role oxidativního stresu byla zjištěna u nemocí jako jsou například neurodegenerativní onemocnění (Downův syndrom a Parkinsonova choroba), kardiovaskulární choroby nebo rakovina (Busciglio, 1995; Kukreja & Hess, 1992; Tretter, Sipos, & Adam-Vizi, 2004; Valko et al., 2006).

Somatické buňky nemají neomezenou schopnost dělení a jejich život končí senescencí, která je mimo jiné charakterizována neschopností dalšího dělení. Snižující se počet dělení u buněk je spojen se stářím organismu. Bylo zjištěno, že peroxid vodíku a další ROS mohou zabránit buňce v dalším dělení podobně jako senescence, což znamená, že oxidativní stres urychluje stárnutí (Chen & Ames, 1994; Dröge, 2002). Se stárnutím organismu, buněčnou senescencí a působením oxidativního stresu souvisí i zkracování nukleoproteinových struktur na koncích chromosomu, tzv. telomer (Harley, Futcher, & Greider, 1990; von Zglinicki, Saretzki, Döcke, & Lotze, 1995).

1.2 Telomery

1.2.1 Funkce telomer

Telomery jsou speciální nukleoproteinové struktury na koncových částech eukaryotických chromosomů (Greider & Blackburn, 1989). Od ostatních částí chromosomů se telomery liší strukturou a funkcí. Specifická struktura telomer slouží k identifikaci chromosomálních konců od chromosomálních zlomů. Ztráta telomer či poškození jejich struktury vede k aktivaci reparačních mechanismů, jejichž účinkem dochází k tvorbě chromosomálních fúzí a následně tím k chromosomální a genomové nestabilitě (Blackburn & Szostak, 1984). Další důležitou funkcí telomer je zajištění kompenzace ztráty DNA, ke které dochází na 5' koncích chromosomů vinou nekompletní replikace DNA (Blackburn & Szostak, 1984), a to na základě principu průběhu replikace a vlastností DNA polymerázy. Syntéza nového vlákna totiž během replikace probíhá zásadně od 5' konce k 3' konci, s tím, že DNA polymeráza pro iniciaci syntézy vyžaduje přítomnost RNA primeru, komplementárně napojeného na templátový řetězec, k jehož 3' konci DNA polymeráza navazuje první nukleotid syntetizovaného řetězce. Jelikož jsou ale RNA primery následně odstraněny, přičemž uvolněné místo nemůže být DNA polymerázou zpětně doplněno, zůstává 5' konec nedosyntetizován, a tím zkrácen (Blackburn, 1991). Vzniklé ztráty na 5' konci jsou nahrazovány zpětně, a to aktivitou některého z tzv. telomerických kompenzačních mechanismů. Nejčastějším telomerickým kompenzačním mechanismem, popsaným u všech obratlovců a naprosté většiny dalších organismů, je aktivita telomerázy. V alternaci k telomeráze, jak bylo popsáno u savčích buněk, funguje dodatkový mechanismus telomerické kompenzace, který je založený na genové konverzi (Walmsley, Chan, Tye, & Petes, 1984). A jako zcela odlišný telomerický kompenzační mechanismus, dosud popsaný pouze u drozofily, byla objevena retrotranspozice telomerických mobilních elementů. Aktivita telomerázy u člověka, tak i aktivita telomerických mobilních elementů u drozofily, se soustředí především do proliferačně aktivních buněk, jako jsou buňky zárodečné, kmenové, či, v případě drozofily, buňky larválních imaginálních disků (George & Pardue, 2003; Walter & Biessmann, 2004; Wright, Piatyszek, Rainey, Byrd, & Shay, 1996). Zároveň se množství telomerázy snižuje s věkem (Harley et al., 1990). Nepřítomnost nebo snížená aktivita telomerázy se projevuje postupným zkracováním telomer až na Hayflickův limit. Po podstoupení určitého množství replikací a dosažení limitu dojde k senescenci (Hayflick & Moorhead, 1961).

1.2.2 Nukleoproteinová struktura telomer

Struktura telomer, a to co se týče jak sekvence DNA, tak i proteinové skladby, je napříč eukaryotními organismy velmi konzervovaná. Telomery se skládají z jednoduchých opakujících se sekvencí DNA, obvykle bohatých na G:C páry, které tvoří klastry až o desítkách tisíc bází (Blackburn, 1991). U obratlovců je telomerickou sekvencí sekvence TTAGGG, u hmyzu je nejrozšířenější sekvencí telomer TTAGG (Gomes, Shay, & Wright, 2010). Jak bylo prokázáno, u savců telomerická sekvence vytváří jednovláknový přesah o délce 200 – 300 nukleotidů, který invazí do dvouvláknové části vytváří telomerickou smyčku (tzv. t-loop) (Griffith et al. 1999; de Lange 2004).

Pro funkci telomer jsou jejich důležitou součástí proteiny, které na telomeře formují či pomáhají formovat tzv. telomerickou čepičku, která chrání telomery před jejich degradací působením DNáz, kryje konce chromosomů před reparačními mechanismy či reguluje aktivitu telomerických kompenzačních mechanismů a tím telomerickou délku. U savců je součástí telomerické čepičky tzv. shelterinový komplex, jehož jádro je tvořeno proteiny TRF1 a TRF2, které se vážou na dvouřetězcovou telomerickou DNA a zprostředkovávají vazbu ostatním proteinům (Liu, O'Connor, Qin, & Songyang, 2004). TRF1 je považován za negativní regulátor telomerické délky; jeho ztráta se projevuje prodloužením telomer a jeho zvýšená exprese naopak zkracováním (Van Steensel & De Lange, 1997). TRF2 chrání telomery proti nukleázám a maskuje konce chromosomů před reparačními mechanismy (Van Steensel, Smogorzewska, & De Lange, 1998). POT1 je protein vázající se na jednovláknovou DNA a jeho přítomnost na dvouvláknových telomerech je určena vazbou na TPP1. POT1 a TPP1 regulují telomerázovou aktivitu, inhibicí obou proteinů najednou dochází k telomerickému prodloužení (Loayza & De Lange, 2003; Wang et al., 2007). Pokud je inhibován jen jeden, porušení POT1-TPP1 komplexu způsobí silné poškození telomerické DNA (Hockemeyer et al., 2007; Kibe, Osawa, Keegan, & de Lange, 2010). Protein TIN2 slouží jako spojovací článek mezi komplexy TRF1-TRF2 a POT1-TPP1. TIN2 spojuje proteiny TRF1 a TRF2 a zároveň váže TPP1, čímž zajišťuje navázání komplexu POT1-TPP1 (Hockemeyer et al., 2007; Ye et al., 2004).

1.2.2 Vliv oxidativního stresu na telomery

Neúplná replikace není jediný faktor způsobující zkracování telomer. Působení oxidativního stresu telomery poškozuje a zkracování telomer tímto urychluje.

Mírný stres způsobuje zkracování telomer, čímž zapříčiňuje i sníženou replikativní schopnost a délku života buňky (Dumont et al., 2000; Von Zglinicki, Pilger, & Sitte, 2000; von Zglinicki et al., 1995). V souladu s tím antioxidanty zvýšenou rychlost zkracování při oxidativním stresu nejen potlačují, ale při jejich nadměrném množství je zkracování telomer pomalejší než u buněk v normálních podmínkách (Lorenz, Saretzki, Sitte, Metzkow, & Von Zglinicki, 2001). Sensitivita telomer k poškození kyslíkovými radikály je také dána tím, že reparační mechanismy zajišťující opravy jednořetězcových zlomů způsobených oxidativním stresem jsou v oblasti telomer méně efektivní než v jiných částech DNA (Petersen, Saretzki, & Von Zglinicki, 1998). Samotné zkrácení telomerické délky může být způsobeno tím, že nespárované nebo poškozené nukleotidy zřejmě prodlužují nereplikovatelnou oblast telomer. Vzhledem ke zvýšené ztrátě telomer, kterou oxidativní stres zapříčiňuje, lze říci, že působení kyslíkových radikálů je hlavní determinantou ovlivňující replikativní schopnost buněk. V souvislosti s tím můžeme tvrdit, že oxidativní stres v konečném důsledku významně ovlivňuje celkové stáří organismu (Von Zglinicki, 2002).

1.2.3 Telomery u *Drosophila melanogaster*

U drozofily byly na koncích chromosomů, namísto běžných repetitivních sekvencí bohatých na G a C báze, objeveny retrotranspozony *TART*, *HeT-A* a *TAHRE*, souhrnně nazývané HTT elementy (Abad et al., 2004; Levis, Ganesan, Houtchens, Tolar, & Sheen, 1993). Zbylé části konců chromosomů mají shodnou strukturu jako u ostatních organismů – na koncových částech telomer je proteinová telomerická čepička a úsek mezi kódujícími sekvencemi a terminálními elementy je region repetitivních sekvencí (TAS) (Mason, Frydrychova, 2008).

Prodlužování telomer je zajišťováno retrotranspozicí. Proces retrotranspozice probíhá tak, že retrotranspozony se v jádře přepíší do mRNA a jsou transportovány do cytosolu. Zde dojde k transkripci Gag-like proteinu a reverzní transkriptázy. Gag-like protein navede transkript zpět do jádra a připojí jej ke 3' koncům chromosomů, kde reverzní transkriptáza přepíše RNA molekulu do DNA. Proces prodloužení telomer je dokončen syntézou druhého vlákna podle vlákna vytvořeného transkriptázou (Capkova Frydrychova, Biessmann, & Mason, 2009).

HeT-A elementy mají velikost 6 kb a nesou otevřený čtecí rámec pro Gag-like protein (ORF1). Gag-like protein při transpozici zajišťuje transport transkriptu mobilního elementu z cytoplasmy zpět do jádra a jeho připojení k chromosomálnímu konci. *HeT-A* element

neobsahuje sekvenci pro reverzní transkriptázu a proto se předpokládá, že element *HeT-A* využívá reverzní transkriptázu kódovanou elementy *TART* či *TAHRE* (Mason & Biessmann, 1995). Promotorová sekvence elementu *HeT-A* se nachází v jeho 5' UTR (Danilevskaya, Arkhipova, Pardue, & Traverse, 1997). Retroposon *TART* je dlouhý 12 kb, nese ORF1 pro Gag-like protein a ORF2 pro reverzní transkriptázu (ORF2) (Levis et al., 1993). Element *TAHRE* (Telomere-Associated and HeT-A-Related Element) má ORF2 shodný s *TART*, ale UTR a ORF1 jsou velice podobné elementu *HeT-A*. Na základě těchto shod je předpokladem, že všechny tři elementy *HeT-A*, *TART* a *TAHRE* vznikly ze společného předka (Abad et al., 2004).

U drozofily jsou sekvence tvořící telomery méně odlišné od zbytků chromosomů a proteiny telomerické čepičky zde nasedají nespecificky na sekvenci. Telomerická čepička se tvoří i na obnažených koncích po ztrátě telomer, například při zlomech, a tyto chromosomy jsou udrženy po generaci bez fatálních následků (Mason & Biessmann, 1995).

Telomery drozofily chrání tzv. terminin. Je tvořen proteiny HOAP, HipHop, Moi a Ver, které se vyskytují pouze v drozofile. Proteiny termininu se vyskytují jen na telomerách, ale na rozdíl od sekvencně specifického shelterinového komplexu je vazba nezávislá na přítomnosti HTT elementů. Stabilita chromosomů je tedy zajištěna i při ztrátě terminálních elementů (Cenci, Siriaco, Raffa, Kellum, & Gatti, 2003; Fanti, Giovinazzo, Berloco, & Pimpinelli, 1998). Ovšem specifickou lokalizací a funkcí je terminin analogický k savčímu shelterinu. Další důležitý protein, který se vyskytuje na telomerách a zajišťuje jejich funkci, je HP1. HP1 ale není řazen mezi proteiny termininu, protože se nevyskytuje výhradně na telomerách a v genomu zastává více funkcí (Raffa, Ciapponi, Cenci, & Gatti, 2011).

1.2.4 Vliv oxidativního stresu na telomery u *Drosophila melanogaster*

Vysoké dávky oxidantů způsobují zkracování telomer, ale při nízkých dávkách dochází ke kompenzaci škodlivých účinků, například stimulací antioxidačních mechanismů (Krůček et al., 2015). U drozofily chronickým působením nízkých dávek parakvatu, látky, která indukuje produkci volných kyslíkových radikálů, byl po několika generacích testovaných linií pozorován nárůst transkripční aktivity telomerických elementů a telomerické délky. Zároveň byla u linií s delšími telomerami pozorována vyšší odolnost při vystavení vysokým dávkám parakvatu, takže je pravděpodobné, že delší telomery mohou poskytovat selekční výhodu při oxidativním stresu (Korandová et al., 2018).

Tyto skutečnosti lze vysvětlit tak, že vlivem oxidačního stresu dochází k posílení kompenzačních mechanismů telomer. Možným způsobem může být změna v epigenetické modifikaci telomer (Korandová et al., 2018).

1.3 Chromatin

1.3.1 Struktura a funkce chromatinu

DNA eukaryotických chromosomů je formovaná do struktury zvané chromatin, který je dle stupně své kondenzace, typu histonových modifikací, přidružených proteinových komplexů či hladiny genové exprese rozlišován na transkripčně aktivní a strukturně více rozvolněný euchromatin a transkripčně neaktivní či málo aktivní a strukturou kondenzovaný heterochromatin. Formace heterochromatinu je v genomu iniciována na konkrétních místech, čímž dochází k epigenetické regulaci genové exprese, která ovlivňuje diferenciaci a vývoj buňky a celého organismu. Typicky se heterochromatinové domény nachází v oblasti centromer a telomer (Grewal & Moazed, 2003). U centromer má heterochromatinová struktura zásadní roli při segregaci sesterských chromatid, u telomer zajišťuje jejich stabilitu a chrání repetitivní sekvence před homologní rekombinací (Bernard et al., 2001; Grewal & Klar, 1997).

S expanzí heterochromatinu je spjat fenomén PEV (position effect variegation) či TPE (telomeric position effect) jako analog PEV v telomerách (Frydrychova, Mason, & Archer, 2008). V obou případech se jedná o inaktivaci exprese běžně aktivního euchromatinového genu, a to pokud je tento gen integrován do oblasti heterochromatinu či jeho blízkosti, s tím, že k inaktivaci dochází následkem zmíněné heterochromatinové expanze (Wallrath & Elgin, 1995). Síla efektu může být pozměněna tzv. PEV modifikátory, což jsou obecně strukturální nebo regulační komponenty chromatinu (Schulze & Wallrath, 2007). PEV modifikátory tvoří dvě skupiny - geny *Su(var)* a *E(var)*. Mutace v *Su(var)* genech se projevují jako supresory PEV efektu a patří sem i geny *Su(var)205* kódující heterochromatinový protein HP1 a *Su(var)3-9* (Eissenberg et al., 1990). Jejich aktivita zahrnuje přidávání heterochromatinových značek a zároveň odstraňování euchromatinových modifikací. Antagonistickou funkci mají geny skupiny *E(var)* mající schopnost chromatin rozvolnit degradací heterochromatinových modifikací a stabilizací euchromatinové struktury (Grigliattia, 1991; Reute & Spierer, 1992).

Jak euchromatin, tak heterochromatin nesou specifické modifikace na úrovni histonů, v podobě metylace, acetylace či fosforylace, které vedou k různé úrovni kondenzace chromatinu, navazování odlišných proteinových komplexů, a tak ve svém důsledku k různé úrovni genové exprese. Typickou histonovou modifikací heterochromatinu je metylace a

deacetylase (Grewal & Elgin, 2002). Histonové modifikace jsou zajišťovány specifickými enzymy, jako jsou histon metyltransferázy či histon acetylázy, respektive deacetylázy. Jednou z histon metyltransferáz je drozofilí Su(var)3-9 (homolog k lidské SUV39H1), zajišťující metylaci Lys9 H3 (Rea et al., 2000). Jak tato modifikace, tak enzym Su(var)3-9 navzájem interagují s HP1 (Heterochromatinový protein 1) a společně se tak podílí na formaci a expanzi heterochromatinu (v angličtině označovaný jako „heterochromatin spreading“) (Schotta et al., 2002).

1.3.2 Heterochromatinový protein 1 (HP1)

Protein HP1 je ve většině organismů přítomen v pericentrické oblasti, na telomerách, v telomerické čepičce a také, jak bylo potvrzeno u drozofily, v euchromatinu po celém chromosomu (Fanti et al., 1998; Piacentini, Fanti, Berloco, Perrini, & Pimpinelli, 2003). U savců se HP1 vyskytuje ve třech izoformách – HP1 α , HP1 β a HP1 γ . Funkcí HP1 je stabilizace heterochromatinu a jeho expanze, účastní se také regulace transkripční aktivity genů jako aktivátor i represor (Nielsen et al., 2001; Piacentini et al., 2003). Na telomerách zajišťuje stabilitu a zároveň svou přítomností zabraňuje jejich transkripci a prodlužování a účastní se regulace délky telomer (Fanti et al., 1998; Savitsky, Kravchuk, Melnikova, & Georgiev, 2002).

HP1 se skládá ze dvou domén, které zajišťují jeho funkci – chromo domény a chromoshadow domény (Wallrath, 1998). V případě heterochromatinu se váže specificky k meLys9H3 (histon H3 metylovaný v lysinu 9) pomocí chromodomény (Bannister et al., 2001), u ochranné čepičky se váže přímo na DNA (Perrini et al., 2004). Expanze heterochromatinu probíhá tak, že metyltransferáza Su(var)3-9 metyluje histon H3 a protein HP1 toto místo rozpozná pomocí své chromodomény a naváže se. Následně se na protein HP1 naváže metyltransferáza a modifikuje vedlejší histon. Takto se heterochromatin řetězově šíří po chromosomu (Bannister et al., 2001).

U drozofily je HP1 významným regulátorem telomerické délky. Mutace *Su(var)205* způsobuje stonásobné navýšení transkripce HTT elementů a vede tak k výraznému prodloužení telomer, což naznačuje, že přítomnost HP1 na telomerách inhibuje transkripci elementů (Perrini et al., 2004; Savitsky et al., 2002). Prodloužení je způsobeno zvýšenou transpozicí elementů nebo také pomocí rekombinace s jinými telomerami a extrémní délka telomer je zachována po několik generací (Savitsky et al., 2002). Klíčovou roli v regulaci telomerické délky představuje chromodoména proteinu HP1. Chromodoména se účastní metylace H3K9 a u mutací *Su(var)205*, které způsobují špatnou funkci chromodomény nebo

úplnou nepřítomnost proteinu, dochází k tomu, že se na telomerách meLys9H3 nevyskytuje. Nepřítomnost chromodomény HP1 a metylovaného H3-K9 se také projevuje zvýšenou transkripcí HTT elementů a jsou tedy zásadní pro regulaci telomerické délky (Perrini et al, 2004).

1.3.3 Role HP1 při oxidativním stresu

HP1 ovlivňuje transkripci a replikaci DNA i tvorbu a udržení heterochromatinu. Mimo to existují studie spojující HP1 s oxidativním stresem a reparačními mechanismy při poškození DNA. Bylo zjištěno, že HP1 funguje jako inhibitor i aktivátor mechanismů zajišťujících opravy DNA. V heterochromatinu působí jako inhibitor těchto mechanismů s tím, že jeho disociací od heterochromatinu je vlákno DNA opravě lépe přístupné (Ayoub, Jeyasekharan, Bernal, & Venkitaraman, 2008; Goodarzi et al., 2008). V případě dvouřetězcových zlomů se kompaktní heterochromatin jeví jako struktura znemožňující přístup opravných mechanismů a u buněk, které mají deficit nějakého heterochromatinového faktoru, například proteinu HP1 nebo Suv39h1, probíhají opravy zlomů DNA efektivněji (Goodarzi et al., 2008). Důvodem je zřejmě rozvolnění heterochromatinové struktury. Naproti tomu HP1 zřejmě přímo umožňuje opravy DNA v případě poškození a zlomů způsobených oxidativním stresem nebo UV zářením (Luijsterburg et al., 2009; Zarebski, Wiernasz, & Dobrucki, 2009). V případě izoformy HP1 β dochází k jeho mobilizaci uvolněním z H3K9me a k navázání na poškozená místa, kde napomáhá provedení oprav poškozené DNA (Ayoub et al., 2008).

Dalším proteinem účastnícím se tvorby heterochromatinu i stresové odpovědi je SirT1. Je to jeden ze savčích Sirtuinů. SirT1 umožňuje tvorbu heterochromatinu svojí deacetylázovou aktivitou a interakcí se Suv39h1 (Vaquero et al., 2004). Zároveň zvyšuje stabilitu Suv39h1 a snižuje rychlost, s jakou dochází k degradaci Suv39h1. To je zajištěno tím, že SirT1 inhibuje polyubiquitinaci Suv39h1, která je způsobena ubiquitin ligázou MDM2. Při oxidativním stresu dochází k posílení této inhibice (Bosch-Presegué et al., 2011). Bylo zjištěno, že stejným mechanismem probíhá regulace dynamiky Suv39h1 i pomocí proteinu HP1 a účastní se jí izoformy HP1 α a HP1 γ (u HP1 β tato regulace prokázána nebyla). Při absenci HP1 α a HP1 γ dochází k výraznému poklesu množství Suv39h1 s tím, že tato změna probíhá jen na úrovni proteinu, kdežto množství mRNA *Suv39h1* se nemění. Při oxidativnímu stresu tedy dochází ke zvýšení koncentrace Suv39h1 i H3K9me3, což vede k utužení heterochromatinu a zvyšuje se stabilita a integrita genomu. Dalším faktorem oxidativního stresu je specifická interakce proteinů HP1 α a HP1 γ se SirT1. To pravděpodobně znamená, že proteiny SirT1 a HP1 při

stresu spolupracují a že protein HP1 α je pro tuto regulaci klíčový. Recipročně s aktivitou Suv39h1 vzrůstá množství HP1 α (Kane-Goldsmith et al., 2017).

2 Cíle práce

Tato práce navazuje na předchozí výzkumy naší laboratoře, při nichž bylo zjištěno, že nízké dávky parakvatu, které byly na pokusné linii aplikovány v průběhu několika po sobě jdoucích generací, stimulují transkripční aktivitu HTT elementů a telomerickou délku (Korandová et al., 2018). Hlavní ideou této práce bylo blíže objasnit mechanismus pozorovaného jevu. Protože lze předpokládat, že posílená transkripční aktivita HTT elementů je spjata s epigenetickými změnami na chromatinové úrovni v oblasti HTT elementů, práce se zaměřila na HP1 jako známý regulátor telomerické délky u drozofily (Capkova Frydrychova et al., 2008), a to co se týče jeho hladiny v oblasti telomer a výše jeho transkripce. Míra transkripce byla otestována i u genů *Atf2* a *Mekk1*. *Atf2* je transkripčním faktorem, který se taktéž podílí na tvorbě heterochromatinu. Při stresu navíc dochází k fosforylaci *Atf2* pomocí *Mekk1*, což má za následek rozvolnění heterochromatinu (Seong, Li, Shimizu, Nakamura, & Ishii, 2011). Dalším cílem bylo ověření předcházejících výsledků (Szakosová, 2015), které naznačily spojitost rezistence proti oxidačnímu stresu s telomerickou délkou.

Konkrétní cíle práce tedy byly:

1. Vyhodnocení množství HP1 na telomerách a transkripčních hladin HP1 po chronickém působení nízkých koncentrací parakvatu.
2. Vyhodnocení transkripční hladiny dalších epigenetických regulátorů, které na základě dostupných informací mohou hrát roli v obraně vůči oxidačnímu stresu a interagovat s HP1.
3. Za použitím mutace *Su(var)205* vytvořit linie, které mají prodlouženou telomerickou délku, a tyto linie otestovat na rezistenci/senzitivitu vůči letálním dávkám parakvatu.

3 Materiál a metody

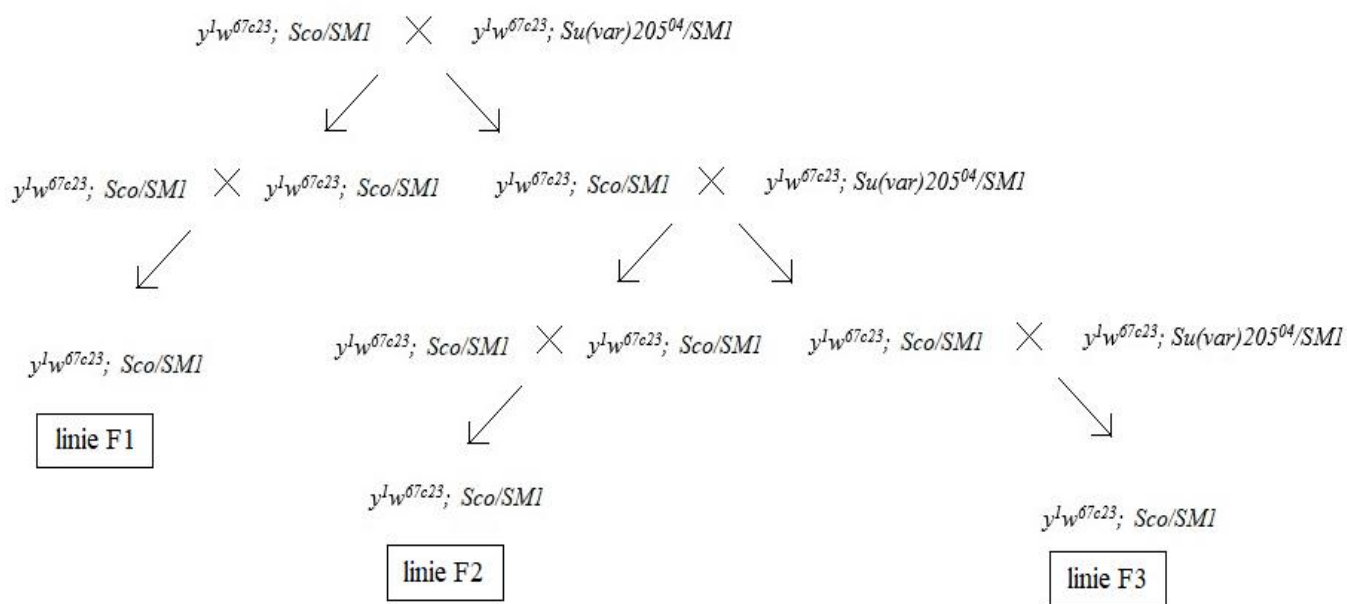
3.1 Chov *Drosophila melanogaster*

K pokusům byly použity mouchy *Drosophila melanogaster*. Chov probíhal při 25 °C na 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), ke kterému byl přidán dezinfekční roztok (12 g kyseliny benzoové, 2,5 g kyseliny sorbové a 240 ml denaturovaného etylalkoholu). Při chovu byla udržována fotoperioda 16 hodin světla a 8 hodin tmy. Linie pocházely z kmenového centra v Bloomingtonu.

3.1.1 Použité linie *Drosophila melanogaster*

Transkripční aktivita a množství proteinu HP1 na telomerách při chronickém působení parakvatu byly testovány na mouchách linie Oregon R.

K získání much s různou délkou telomer byly použity linie $y^1w^{67c23}; Su(var)205^{04}/SM1$ a $y^1w^{67c23}; Sco/SM1$. Cílem křížení bylo získat jedince s genotypem $y^1w^{67c23}; Sco/SM1$, a to opakovaným zpětným křížením jedinců $y^1w^{67c23}; Sco/SM1$ s linií $y^1w^{67c23}; Su(var)205^{04}/SM1$. Předpokladem bylo, že s každou přítomností této mutace v daných jedincích dojde k prodloužení telomer v důsledku nefunkčního proteinu HP1. Kmen $y^1w^{67c23}; Sco/SM1$ nese mutaci na chromozomu 2, která se vyznačuje redukovaným počtem chlupů na dorzální straně thoraxu jako fenotypový marker. Linie $y^1w^{67c23}; Su(var)205^{04}/SM1$ má mutaci v genu *Su(var)205*, která způsobuje ztrátu domény proteinu HP1 potřebnou k lokalizaci proteinu v jádře. *SM1* je označení pro tzv. balancerový chromosom, který nese mnohonásobné inverze bránící případné rekombinaci. Jako marker chromosomu *SM1* je na chromosomu přítomna mutace genu *Cy* projevující se zahnutými křídly daného jedince. Schéma postupu v křížení je uvedeno na Obr.1. Opakovaným zpětným křížením mezi filiálními generacemi $y^1w^{67c23}; Sco/SM1$ (filiální generace F1 až F6) a $Su(var)205^{04}/SM1$ (parentální generace P0) bylo vytvořeno 6 linií $y^1w^{67c23}; Sco/SM1$.



Obr. 1. Schéma křížení much $y^{Iw^{67c23}}; Sco/SMI$ s mouchami s mutací v genu pro protein HP1 $Su(var)205^{04}$. Jedinci linie F1 $y^{Iw^{67c23}}; Sco/SMI$ byli s parentální linií $y^{Iw^{67c23}}; Su(var)205^{04}/SMI$ zkříženi jednou, linie F2 byla zkřížena dvakrát, linie F3 byla zkřížena třikrát. Tímto způsobem probíhalo křížení až do 6. linie.

3.2 Aplikace parakvatu

Pro navození chronického působení nízkých dávek parakvatu byl parakvat dichlorid (Sigma - Aldrich, kat. č. 36541) aplikován do chovného média. K pokusům byla použita laboratorní linie Oregon R s tím, že celý vývoj jedinců probíhal za přítomnosti parakvatu v médiu. Parakvat byl použit o koncentracích 10^{-3} mM, 10^{-4} mM, 10^{-5} mM a 10^{-6} mM, tyto koncentrace byly zvoleny na základě předcházejících výsledků (Korandová et al., 2018). Pro přípravu média s parakvatem bylo použito instantní médium (Formula 4-24; Carolina biological supply company). Parakvat byl připraven v roztoku s destilovanou vodou a o objemu 6 ml byl aplikován na 1,35 g instantního média. U negativní kontroly bylo na médium aplikováno 6 ml destilované vody. K pokusům byli použiti jedinci staří 1-3 dny.

Pro stanovení mortality při akutní dávce parakvatu byl na čtvereček buničiny o rozměrech 1×1 cm aplikován roztok parakvatu s 1M sacharózou. Na buničinu bylo aplikováno 400 μ l roztoku o koncentraci 0,25 mM. K pokusu bylo použito 20 samic a 20 samců stáří 2-4 dny, kteří byli testováni zvlášť. Inkubace probíhala 24 hodin, po jejichž uplynutí bylo zjištěno množství uhynulých jedinců.

3.3 Izolace genomové DNA

Izolace DNA probíhala pomocí kitu E.Z.N.A.[®] Tissue DNA kit (Omega bio-tek, kat. č. D3396-02 podle protokolu od výrobce. DNA byla izolována vždy z 10 jedinců, kteří byli rozděleni na samce a samice. Čistota a koncentrace získané DNA byla vyhodnocována pomocí přístroje Nanodrop (NanoDrop 2000; Thermo Scientific).

3.4 Izolace RNA

Izolace RNA byla uskutečněna pomocí kitu Hybrid-R[™] (GeneAll[®], kat. č. 305-101) podle postupu dodaného výrobcem. K pokusu byli využiti samci a samice po 10 jedincích, testováni byli zvlášť. Kvalita a koncentrace RNA byla zjištěna pomocí přístroje Nanodrop (NanoDrop 2000; Thermo Scientific).

3.5 Syntéza cDNA

K syntéze cDNA byl použit kit HyperScript[™] RT master mix (GeneAll, kat. č. 601-740). Reakce byla provedena podle instrukcí výrobce. Byl použit 1 µg celkové RNA na reakci o celkovém objemu 20 µl. Reakce obsahovala oligo dT (50µM), DEPC vodu a 10 µl Hyperscript[™] master mixu. Probíhala 1 hodinu při 55 °C.

3.6 Real-time PCR

Metoda Real-time PCR byla použita k relativní kvantifikaci telomerické délky a hladiny transkriptů. K reakci byl využit qPCR 2×Master Mix (Top-Bio, kat. č. P553). Kvantifikace proběhla v přístroji CFX96 (BioRad). Reakce byly nanášeny v duplikátech, objem jedné reakce byl 25 µl, templát činil 5µl. V případě cDNA byla DNA nanášena 10x ředěná. Jako vnitřní kontrola sloužil referenční gen *RpL32* pro ribozomální protein. Průběh reakce byl 95 °C, 3 min – (94 °C, 15 s, 57 °C, 30 s, 72 °C, 20 s)_{39x}. Relativní kvantifikace byla zjištěna výpočtem $R = \text{Eff}_{(\text{ref})}^{\text{CT}(\text{ref})} / \text{Eff}_{(\text{target})}^{\text{CT}(\text{target})}$. V Tab.1 jsou uvedeny použité primery. Primery pro geny *Atf2*, *Mekk1* a *HPI* byly vytvořené firmou Generi Biotech.

Tab. 1. Primery používané při Real-time PCR.

Gen	Název primeru	Teplota nasedání (°C)	Sekvence primeru
<i>RpL 32</i>	RpL 32 forward	58	5' - GGACAGTATCTGATGCCCAAC - 3'
	RpL 32 reverse	58	5' - ATCTCGCCGCAGTAAACGC - 3'
<i>HeT-A</i>	HeT-A forward	58	5' - ATTGTCTTCTCCTCCGTCCACC - 3'
	HeT-A reverse	58	5' - TTCTCTATGCTATTGTCGCTGTGC - 3'
<i>Su(var)205</i>	HP1 forward	57	5' - AAATCGACAA CCCTGAGAGC - 3'
	HP1 reverse	57	5' - GTTCTCAGT TT CGGGATAGC - 3'
<i>Mekk1</i>	Mekk1 forward	57	5' - TATGGTTTCTTTACACGCTCC - 3'
	Mekk1 reverse	57	5' - CAGAAATTGTGCTCCAACAGT - 3'
<i>Atf2</i>	Atf2 forward	57	5' - ATGGACACCGCCGGAGAC - 3'
	Atf2 reverse	57	5' - ACTTCTGCCCGAGAGAAATG - 3'

3.7 Analýza množství HP1 pomocí ChIP

Ke kvantifikaci množství proteinu HP1 přítomného na telomerách jsem použila metodu Chromatin immuno precipitation assay (ChIP). K pokusům bylo využito 150–200 jedinců. Samotné ChIP předcházela homogenizace testovaných jedinců v tekutém dusíku a izolace jader. Samotná ChIP byla prováděna na fragmentované DNA, která byla získána sonikací na lyzovaných jádrech. Imunoprecipitace byla provedena pomocí monoklonální protilátky proti HP1 (Covance) s využitím proteinu A na agarozových kuličkách. Po přečištění imunoprecipitátu byla provedena extrakce DNA klasickou fenol-chloroformovou extrakcí. Získaná DNA byla dále kvantifikována pomocí Real-time PCR s primery specifickými k *HeT-A* elementům. Jako nanášecí kontrola byla použita tzv. input DNA, která byla izolována z 50μl vstupního vzorku do imunoprecipitační reakce. Detailnější popis protokolu je uveden následovně.

Homogenizace vzorků proběhla v keramických miskách s tloučkem pomocí tekutého dusíku. Homogenizovaná tkáň byla smíchána s 3ml pufru A+ (1M KCl, 5M NaCl, 0,5M EDTA, 0,5M EGTA, 1M Tris-HCl, Nonidet P-40 a H₂O a proteázové inhibitory 0,1M PMSF, 1mg/ml pepstatin, 1mg/ml aprotinin, 0,7M spermin, 0,5M spermidin, 1M DTT). Pro homogenizaci byl použit 7 ml skleněný homogenizátor, v němž byla homogenizace provedena 5 stlaky, poté byl homogenát přelit do 15 ml Dounce homogenizátoru (Wheaton) a homogenizován 10 stlaky pomocí volného tloučku a směs byla přefiltrována přes membránu Miracloth. Filtrát byl smíchán s 1ml pufru AS (1M KCl, 5M NaCl, 0,5M EDTA, 0,5M EGTA, 1M Tris-HCl, Nonidet P-40 a H₂O a proteázové inhibitory 0,1M PMSF, 1mg/ml pepstatin,

1mg/ml aprotinin, 0,7M spermin, 0,5M spermidin, 1M DTT) a směs byla stočena při 3000 rpm a 4 °C 5 minut. Poté byl pelet resuspendován v 3ml pufru A+ a protlačen v 7 ml Dounce homogenizátoru (Kontes Glass co.) pomocí těsného tloučku a 5 stlaky, pak smíchán s 1ml pufru AS a směs byla stočena při 3000 rpm a 4 °C po dobu 5 min. Nakonec byl pelet resuspendován v 3ml pufru A (1M KCl, 5M NaCl, 0,5M EDTA, 0,5M EGTA, 1M Tris-HCl, Nonidet P-40 a H₂O a proteázové inhibitory 0,1M PMSF, 1mg/ml pepstatin, 1mg/ml aprotinin, 0,7M spermin, 0,5M spermidin, 1M DTT) v 7 ml Dounce homogenizátoru s volným tloučkem na 5 stlaků, následně proběhla centrifugace při 3000 rpm při 4 °C 5 min v centrifuze a získaný pelet byl resuspendován v 1ml pufru A.

Ke crosslinkování, tedy vytvoření kovalentní vazby mezi DNA a proteiny, bylo použito 28μl 37 % formaldehydu a směs byla třepána při 4 °C po 8 min. Poté byla provedena lýze jaderné membrány pomocí 1ml SDS lyzačního pufru (1 % SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8) za použití proteázových inhibitorů (0,1M PMSF, 1,46 μM pepstatin, 150 μM aprotinin).

DNA byla fragmentována sonikací (BioLogics, Inc., Model 150 V/T), pulzy trvaly 10 sekund a byly provedeny osmkrát, mezi pulzy byly vzorky chlazeny na ledu po dobu 20 sekund.

K imunoprecipitaci bylo na 400μl vzorku použito 3,6ml pufru sloužícího k navázání protilátky (0,01 % SDS, 1,1 % Triton X-100, 1,2 mM EDTA, 16,7 mM Tris-HCl, pH 8,01, 167 mM NaCl) s proteázovými inhibitory (0,1 M PMSF, 1,46 μM pepstatin, 150 μM aprotinin). Pro vyvázání nespecifických protilátek byly vzorky inkubovány s 150μl proteinu A agaróza (EMD Millipore Corp., kat. č. 2971001) při 4 °C po 30 min na třepače. Nespecifické komplexy byly stočeny na 500 × g 2 min a k dalšímu používání byl odebrán supernatant. Jako input DNA bylo odebráno 50μl supernatantu. K navázání specifických komplexů bylo použito 10μg monoklonální protilátky k proteinu HP1 (Covance) na 1ml supernatantu. Inkubace vzorku s protilátkou probíhala při 4 °C na třepače přes noc.

K imunoprecipitaci komplexů protilátky anti HP1 a proteinu HP1 bylo použito 60μl proteinu A agaróza a inkubace s konstantním mícháním trvala 1 hod při 4 °C. Navázané komplexy byly stočeny při 1000 rpm po 2 min. Potom došlo k promývání těchto komplexů po dobu 5 min na třepače při 4 °C pomocí 1ml LSW pufru (0,1 % SDS, 1 % Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM TrisHCl, pH 8, 150 mM NaCl), pak dvakrát po stejnou dobu s 1ml HSW pufru (stejně jako LSW, jen 500 mM NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 8,1), dvakrát za stejných

podmínek v 1ml LiCl pufru (0,25 M LiCl, 1 % NP40, 1 % sodium deoxycholat, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8,1) a nakonec promytí třikrát v 1ml TE za stejných podmínek. Po každém promytí byly komplexy stočeny při 1000 rpm 2 min a 4 °C. K získání komplexů protein-DNA a odstranění protein A agarózy bylo použito 250μl elučního pufru (1 % SDS, 0,1 M NaHCO₃) a směs byla inkubována 15 min na třepačce při pokojové teplotě. K rozrušení kovalentních vazeb mezi proteiny a DNA bylo použito 20μl 5 M NaCl, inkubace probíhala při 65 °C 4 h. Nakonec byl vzorek ošetřen 5μl proteinázy K (New England Bio Labs® Inc., 800 units/ml), 10 μl 0,5 M EDTA a 20μl 1M Tris-HCl, pH 6,5.

Extrakce DNA byla provedena nejprve fenol chloroform izoamylalkoholem (25:24:1), následně jen chloroform izoamylalkoholem (24:1). Vyčištění a vysrážení DNA bylo provedeno s octanem sodným (0,3 M, pH 5,2), jehož bylo použito množství 1/10 objemu vzorku, 1 μl glykogenu (20 mg/ml) a absolutním etanolem, jehož bylo použito 2,5 objemu vzorku. Inkubace vzorku s etanolem proběhla v - 20 °C přes noc.

3.8 Statistická analýza

Získaná data byla vyhodnocována pomocí statistického programu GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Byla využita metoda jednocestná ANOVA, jednocestná ANOVA s Dunnettovým testem a nepárový oboustranný t-test. Výsledné průměry byly u všech experimentů získány z alespoň tří opakování.

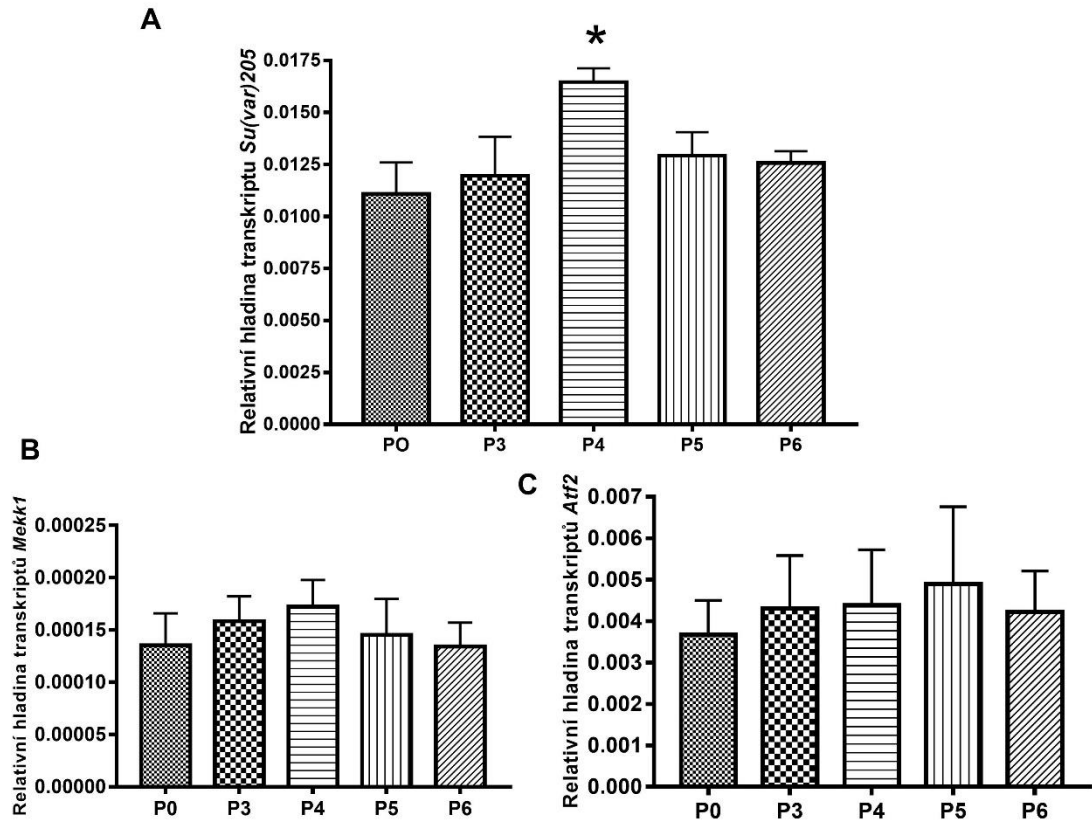
4 Výsledky

4.1 Vliv chronického působení nízkých dávek parakvatu na modifikátory chromatinu

Mouchy Oregon R byly umístěny na médium s přidaným parakvatem o různých koncentracích (10^{-3} mM, 10^{-4} mM, 10^{-5} mM, 10^{-6} mM). Tyto koncentrace byly zvoleny na základě předcházející studie, která tyto koncentrace použila pro indukci chronického působení parakvatu a zároveň ukázala, že koncentrace parakvatu 10^{-4} mM posiluje transkripční hladinu telomerických mobilních elementů a stimuluje telomerickou elongaci (Korandová et al., 2018). U získaných much byla vyhodnocena transkripční hladina genů *Su(var)205*, *Atf2* a *Mekk1* a dále relativní hladina proteinu HP1 na elementu *HeT-A*.

4.1.1 Chronický oxidační stres způsobuje zvýšenou transkripční hladinu genu *Su(var)205*

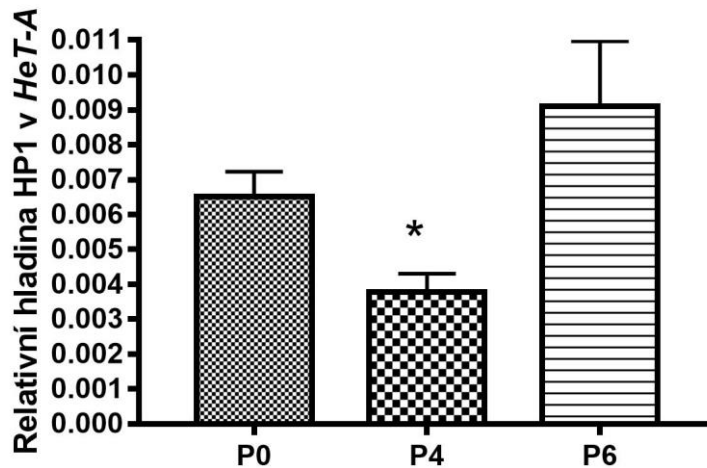
U much Oregon R, u kterých proběhl vývoj na médiu s přidaným parakvatem o koncentracích 10^{-3} mM, 10^{-4} mM, 10^{-5} mM, 10^{-6} mM, byla vyizolována RNA, z RNA byla syntetizována cDNA a pomocí cDNA bylo vyhodnoceno množství transkriptů genů *Su(var)205*, *Atf2* a *Mekk1* metodou Real-time PCR. Množství transkriptů bylo vztaženo k hladině transkriptu genu *Rpl 32* (Obr. 2). U genu *Su(var)205* byl zaznamenán nárůst hladiny transkripce u koncentrace parakvatu 10^{-4} mM ($P < 0,05$), u této koncentrace byl pozorován nárůst transkriptů také u genu *Mekk1*, nicméně bez statistické průkaznosti. Naproti tomu na hladinách transkriptů genu *Atf2* nebyly pozorovány žádné změny ani u jedné z testovaných koncentrací.



Obr. 2. Relativní hladina transkriptů po chronickém působení nízkých dávek parakvatu. Byla vyhodnocována transkripční hladina genu *Su(var)205* (A), *Mekk1* (B) a *Atf2* (C), k analýze byla použita jednocestná ANOVA. V případě *Su(var)205* byl prokazatelný nárůst transkripční hladiny oproti kontrole na 5 % hladině významnosti (* $P < 0,05$). Hodnoty P3 – P6 představují vzorek much vystavených parakvatu o koncentracích 10^{-3} – 10^{-6} mM, P0 jsou kontrolní skupinou bez parakvatu v živném médiu.

4.1.2 Množství telomerického proteinu HP1

Pro testování hladiny telomerického HP1 byla vybrána koncentrace parakvatu 10^{-4} mM, a to vzhledem k mým výsledkům, které ukázaly, že tato koncentrace vede k posilování transkripční hladiny HP1. Dále jsem testovala koncentraci parakvatu 10^{-6} mM, která oproti kontrole nevykázala žádné změny na úrovni transkripce HP1. V pokusu byla zahrnuta také kontrolní skupina much chovaných bez parakvatu. Ze získaných výsledků (Obr. 3) je zřejmé, že v porovnání s kontrolními mouchami při koncentraci parakvatu 10^{-4} M dochází ke statisticky významnému poklesu množství proteinu HP1 na elementech *HeT-A* ($P = 0,0305$). Naproti tomu u koncentrace parakvatu 10^{-6} mM je množství HP1 na *HeT-A* elementech statisticky stejné jako u kontrolní skupiny ($P = 0,2615$).

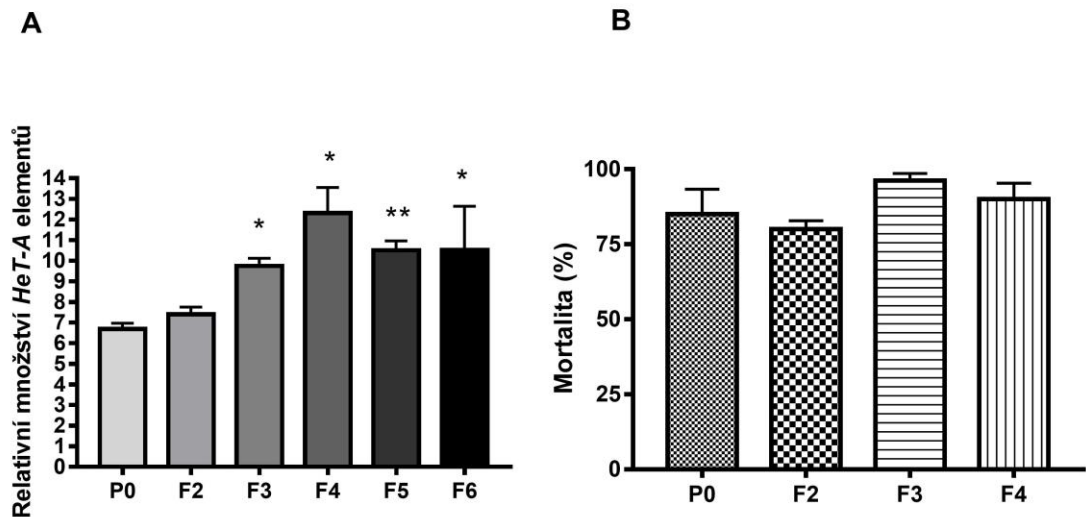


Obr. 3. Relativní množství proteinu HP1 navázaného na elementech *HeT-A* u much vyvíjejících se při chronickém působení parakvatu o koncentraci 10^{-4} mM (označeno P4) a 10^{-6} mM (značeno P6), P0 je kontrolní skupinou. U skupiny P4 je statisticky významný pokles navázaného HP1 na 5 % hladině významnosti (* $P=0,0305$), analýza byla provedena metodou nepárového oboustranného t-testu.

4.2 Vliv délky telomer na rezistenci

Ke studiu vlivu délky telomer na rezistenci k oxidačnímu stresu byly zpětným křížením vytvořeny linie drozofily $y^l w^{67c23}; Sco/SM1$, které nesly odlišnou telomerickou délku. Nárůst telomerické délky těchto linií byl kvantifikován relativním množstvím *HeT-A* elementů metodou Real-time PCR. Vytvořené linie byly použity na testování mortality způsobené akutním oxidačním stresem.

Samci a samice byli otestováni zvlášť, ale u obou pohlaví se projevil stejný trend, a proto byly výsledky sloučeny (Obr. 4 A). Výsledky potvrdily, že množství *HeT-A* elementů se zvýšilo v závislosti na počtu zpětných zkřížení. U získaných linií byla otestována jejich rezistence na letální dávku parakvatu. Pro testování byly použity generace P0, F2, F3 a F4 (Obr. 4 B). Žádný průkazný vliv délky telomer jednotlivých generací na získanou rezistenci u testovaných much ovšem pozorován nebyl ($P=0,1785$).



Obr. 4. Rezistence linií s odlišnou telomerickou délkou k letálním dávkám parakvatu. Z generací much $y^l w^{67c23}; Sco/SM1$, které vznikly opakovaným zpětným křížením s $y^l w^{67c23}; Su(var)205^{04}$, byla vyizolována genomová DNA a bylo otestováno relativní množství *HeT-A* elementů pomocí Real-time PCR. Relativní množství elementů bylo vyhodnoceno metou jednocestná ANOVA a byl prokázán nárůst elementů *HeT-A* oproti kontrolní skupině ($P < 0,0001$). Analýza byla doplněna Dunnettovým testem (* $P < 0,01$, ** $P < 0,05$) (**A**). Mouchy získaných generací byly poté testovány na rezistenci vůči letálním koncentracím parakvatu, analýza byla provedena metodou jednocestná ANOVA (**B**). Počet generací opakovaného zpětného křížení je označen jako F2 – F6. P0 představuje mouchy parentální generace P0 linie $y^l w^{67c23}; Sco/SM1$, které byly využity pro křížení s linií $y^l w^{67c23}; Su(var)205$.

5 Diskuze

Moje práce se zabývala především rolí proteinu HP1 při oxidativním stresu a vlivem HP1 na délku telomer. Vycházela jsem z předchozí studie naší laboratoře naznačující, že chronické působení nízkých dávek oxidačních agens parakvatu a peroxidu vodíku způsobuje zvýšenou expresi telomerických mobilních elementů a prodlužování telomer (Korandová et al., 2018), přičemž za jeden z možných mechanismů zvýšené transkripční aktivity HTT elementů byly uvažovány epigenetické změny na úrovni chromatinu. A dále jsem využila informace ze studií zkoumajících vliv proteinu HP1 na délku telomer, které prokázaly, že snížená hladina proteinu HP1 způsobuje několikanásobné prodloužení telomer (Frydrychova et al., 2008; Savitsky et al., 2002). Dalším předpokladem pro mou práci byly studie zabývající se funkcí proteinu HP1 při poškození DNA a oxidativním stresu. Tyto studie prokázaly, že protein HP1 je při poškození DNA mobilizován a uvolněn z heterochromatinu a že HP1 zřejmě hraje aktivní roli v reparačních kaskádách a napomáhá opravám DNA zlomů. Zároveň samotné rozvolnění chromatinu způsobené přerušением vazeb mezi histony a HP1 pravděpodobně zefektivňuje opravy vlákna DNA tím, že se vlákno stává přístupnějším (Ayoub et al., 2008; Luijsterburg et al., 2009).

Mé výsledky jsou s těmito studiemi v souladu, neboť množství proteinu HP1 na telomerách se při chronickém působení parakvatu snížilo, ale zároveň se zvýšila transkripce genu *Su(var)205*. To může být vysvětleno tím, že drozofila se mírnému oxidačnímu stresu přizpůsobuje, a to pomocí účinnějších oprav DNA. Toho je dosaženo rozvolněním chromatinu, což je způsobeno disociací HP1 od vlákna DNA. Spolu s tím také dochází k vyšší transkripci *Su(var)205*, což by mohlo potvrzovat aktivní roli HP1 při reparacích. Prokazatelně zvýšená transkripce a zároveň snížené množství HP1 na telomerách bylo pozorováno jen u parakvatu o koncentraci 10^{-4} M. Z toho lze předpokládat, že mechanismy, jejichž úkolem je snížení míry poškození DNA a jichž se účastní HP1, jsou aktivovány jen při určitých koncentracích oxidačního agens. Koncentrace menší než 10^{-4} M je možné považovat na příliš nízké k vyvolání kompenzační reakce. Můžeme spekulovat, že se jedná o projev hormeze. Při hormezi dochází ke stimulaci kompenzačních mechanismů, vlivem optimálně nízké koncentrace nějakého stresoru, vedoucích v organismu k prospěšným účinkům. Vysoké koncentrace daného stresoru naopak působí na buněčné či orgánové funkce negativně a jsou pro organismus toxické či letální (Davis, Huff, Burns, Thayer, & Melnick, 2006). Hormeze se vyznačuje transkripcí proteinů zajišťujících rezistenci vůči stresovým faktorům, příkladem jsou heat-shock proteiny a antioxidační enzymy (Mattson, 2008). Je tedy možné spekulovat,

zda protein HP1 patří mezi proteiny, jejichž exprese je hormeticky stimulována. Stimulační koncentrace parakvatu se shoduje s koncentrací, u které v předchozí studii naší laboratoře docházelo ke zvýšení počtu elementů a transkripční hladiny *HeT-A* (Korandová et al., 2018). Z toho by mohlo vyplývat, že právě snížení na elementech navázaného HP1 hraje při tomto jevu klíčovou roli.

Experiment, v němž jsem hodnotila rezistenci proti vysoké dávce parakvatu u much s různou délkou telomer, navazoval na předchozí pozorování naší laboratoře. Rezistence byla v předchozím případě testována na různých náhodně vybraných laboratorních liniích a byla pozorována korelace mezi délkou telomer a odolností vůči oxidativnímu stresu s tím, že linie s delšími telomery se vyznačovaly nižší mortalitou (Szakosová, 2015). Já jsem k testování vytvořila linie much se sjednoceným genetickým pozadím a různě dlouhých telomer bylo dosaženo mutací *Su(var)205⁰⁴*. Vliv délky telomer na rezistenci se v mém pokusu nepotvrdil. Možným vysvětlením je, že v předchozí studii byl pozorovaný vliv náhodný.

Některé studie naznačují, že při oxidativním stresu je požadována vyšší stabilita a integrita genomu zajišťovaná kompaktnějším heterochromatinem. Tyto teorie jsou podloženy vyšší stabilitou metyltransferázy Suv39h1 při oxidativním stresu, která je zajištěna proteinem HP1 (Kane-Goldsmith et al., 2017). Z toho důvodu by bylo vhodné se v dalších studiích zaměřit na to, jak množství HP1 koreluje s množstvím Suv39h1 při oxidativním stresu a zdali jeho zvýšená exprese způsobuje vyšší stabilitu a aktivitu Suv39h1.

Podobné vlastnosti při stresu jako u proteinu HP1 byly pozorovány i u aktivačního transkripčního faktoru Atf2. Atf2 se také účastní vytváření heterochromatinu a spolupracuje s HP1. Fosforylace Atf2 pomocí Mekk1, která je indukovaná stresem, způsobuje rozvolnění heterochromatinu (Seong et al., 2011). Z toho důvodu jsem zjišťovala, zdali má chronický oxidativní stres a snížené množství HP1 na telomerech, prokázané v mé práci pomocí ChIP, vliv na transkripci genů *Atf2* a *Mekk1*. Statisticky významný vliv ovšem nebyl pozorován.

6 Závěr

Stěžejním výsledkem mé práce je, že při chronickém působení optimálních dávek parakvatu dochází k poklesu množství HP1 na telomerách. Toto pozorování doplňuje předchozí výsledky laboratoře, které prokázaly zvýšený počet elementů *HeT-A* a také zvýšenou transkripční hladinu *HeT-A* při chronickém oxidačním stresu (Korandová et al., 2018). Pravděpodobným vysvětlením těchto jevů je rozvolnění chromatinové struktury. Má práce tudíž potvrzuje předchozí studie (Ayoub et al., 2008; Luijsterburg et al., 2009), že rozvolněná struktura chromatinu je jedním z mechanismů při obraně proti oxidačnímu stresu. V mé práci jsem zároveň pozorovala zvýšenou transkripční hladinu HP1 při chronickém oxidačním stresu a v této oblasti je třeba provést další pokusy. V dalších experimentech by bylo vhodné se zaměřit na metyltransferázu Suv39h1 jako další heterochromatinový regulátor spolupracující s HP1.

7 Literatura

- Abad, J. P., De Pablos, B., Osoegawa, K., De Jong, P. J., Martín-Gallardo, A., & Villasante, A. (2004). TAHRE, a novel telomeric retrotransposon from *Drosophila melanogaster*, reveals the origin of *Drosophila* telomeres. *Molecular Biology and Evolution*, *21*(9), 1620–1624.
- Ayoub, N., Jeyasekharan, A. D., Bernal, J. A., & Venkitaraman, A. R. (2008). HP1- β mobilization promotes chromatin changes that initiate the DNA damage response. *Nature*.
- Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C., & Kouzarides, T. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, *410*(6824), 120–124.
- Bernard, P., Maure, J. F., Partridge, J. F., Genier, S., Javerzat, J. P., & Allshire, R. C. (2001). Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. *Science*.
- Blackburn, E. H. (1991). Structure and function of telomeres. *Nature*.
- Blackburn, E. H., & Szostak, J. W. (1984). The Molecular Structure of Centromeres and Telomeres. *Annual Review of Biochemistry*.
- Blokhina, O., Virolainen, E., & Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Annals of Botany*, *91*(2), 179–194.
- Bosch-Presegué, L., Raurell-Vila, H., Marazuela-Duque, A., Kane-Goldsmith, N., Valle, A., Oliver, J., ... Vaquero, A. (2011). Stabilization of Suv39H1 by SirT1 Is Part of Oxidative Stress Response and Ensures Genome Protection. *Molecular Cell*, *42*(2), 210–223.
- Burton, G. W., & Ingold, K. U. (1984). β -Carotene: An unusual type of lipid antioxidant. *Science*.
- Burton, G. W., & Ingold, K. U. (1986). Vitamin E: Application of the Principles of Physical Organic Chemistry to the Exploration of Its Structure and Function. *Accounts of Chemical Research*.
- Busciglio G, Y. B. (1995). Apoptosis and increased generation of ROS in DS neurons in vitro. *Nature*, *378*(21), 776–779.

- Cadenas, E., & Davies, K. J. a. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging¹¹This article is dedicated to the memory of our dear friend, colleague, and mentor Lars Ernster (1920–1998), in gratitude for all he gave to us.Cadenas, E., & Davies, K. J. a. (2000). Mito. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(3–4), 222–230.
- Capkova Frydrychova, R., Biessmann, H., & Mason, J. M. (2009). Regulation of telomere length in *Drosophila*. *Cytogenetic and Genome Research*, 122(3–4), 356–364.
- Cenci, G., Siriaco, G., Raffa, G. D., Kellum, R., & Gatti, M. (2003). The drosophila HOAP protein is required for telomere capping. *Nature Cell Biology*.
- Chen, Q., & Ames, B. N. (1994). Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(10), 4130 LP-4134.
- Danilevskaya, O. ., Arkhipova, I. ., Pardue, M. ., & Traverse, K. . (1997). Promoting in Tandem: The Promoter for Telomere Transposon HeT-A and Implications for the Evolution of Retroviral LTRs. *Cell*, 88(5), 647–655.
- Davis, D., Huff, J., Burns, K., Thayer, K. A., & Melnick, R. (2006). Hormesis: A New Religion? *Environmental Health Perspectives*.
- Dröge, W. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47–95.
- Dumont, P., Burton, M., Chen, Q. M., Gonos, E. S., Fripiat, C., Mazarati, J. B., ... Toussaint, O. (2000). Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radical Biology and Medicine*.
- Edge, R., McGarvey, D. J., & Truscott, T. G. (1997). The carotenoids as anti-oxidants - A review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*.
- Eissenberg, J. C., James, T. C., Foster-Hartnett, D. M., Hartnett, T., Ngan, V., & Elgin, S. C. (1990). Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(24), 9923–9927.
- Fanti, L., Giovinazzo, G., Berloco, M., & Pimpinelli, S. (1998). The heterochromatin protein 1 prevents telomere fusions in *Drosophila*. *Molecular Cell*, 2(5), 527–538.

- Frei, B., England, L., & Ames, B. N. (2006). Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Fridovich, I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science*.
- Frydrychova, R. C., Mason, J. M., & Archer, T. K. (2008). HP1 is distributed within distinct chromatin domains at drosophila telomeres. *Genetics*.
- George, J. a, & Pardue, M.-L. (2003). The promoter of the heterochromatic Drosophila telomeric retrotransposon, HeT-A, is active when moved into euchromatic locations. *Genetics*, 163(2), 625–635.
- Gomes, N. M. V, Shay, J. W., & Wright, W. E. (2010). Telomere biology in Metazoa. *FEBS Letters*, 584(17), 3741–3751.
- Goodarzi, A. A., Noon, A. T., Deckbar, D., Ziv, Y., Shiloh, Y., Löbrich, M., & Jeggo, P. A. (2008). ATM Signaling Facilitates Repair of DNA Double-Strand Breaks Associated with Heterochromatin. *Molecular Cell*.
- Greider, C. W., & Blackburn, E. H. (1989). A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature*, 337(6205), 331–337.
- Grewal, S. I. S., & Elgin, S. C. R. (2002). Heterochromatin: New possibilities for the inheritance of structure. *Current Opinion in Genetics and Development*, 12(2), 178–187.
- Grewal, S. I. S., & Klar, A. J. S. (1997). A recombinationally repressed region between mat2 and mat3 loci shares homology to centromeric repeats and regulates directionality of mating-type switching in fission yeast. *Genetics*.
- Grewal, S. I. S., & Moazed, D. (2003). Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science*.
- Grigliattia, T. (1991). Chapter 22 Position-Effect Variegation—An Assay for Nonhistone Chromosomal Proteins and Chromatin Assembly and Modifying Factors. *Methods in Cell Biology*.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1999). *Free radicals in biology and medicine* (3rd ed.). Oxford University Press.

- Hanukoglu, I., Rapoport, R., Weiner, L., & Sklan, D. (1993). Electron Leakage from the Mitochondrial NADPH-Adrenodoxin Reductase-Adrenodoxin-P450_{scc} (Cholesterol Side Chain Cleavage) System. *Archives of Biochemistry and Biophysics*.
- Harley, C. B., Futcher, A. B., & Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*.
- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*.
- Hockemeyer, D., Palm, W., Else, T., Daniels, J. P., Takai, K. K., Ye, J. Z. S., ... Hammer, G. D. (2007). Telomere protection by mammalian Pot1 requires interaction with Tpp1. *Nature Structural and Molecular Biology*.
- Kamata, H., & Hirata, H. (1999). Redox regulation of cellular signalling. *Cellular Signalling*, *11*(1), 1–14.
- Kane-Goldsmith, N., Brown, J. P., Bosch-Presegue, L., Singh, P. B., Casal, C., Vaquero, A., ... Gonzalez, J. (2017). An HP1 isoform-specific feedback mechanism regulates Suv39h1 activity under stress conditions. *Epigenetics*, *12*(2), 166–175.
- Kibe, T., Osawa, G. A., Keegan, C. E., & de Lange, T. (2010). Telomere Protection by TPP1 Is Mediated by POT1a and POT1b. *Molecular and Cellular Biology*.
- Korandová, M., Krůček, T., Szakosová, K., Kodrík, D., Kühnlein, R. P., Tomášková, J., & Čapková Frydrychová, R. (2018). Chronic low-dose pro-oxidant treatment stimulates transcriptional activity of telomeric retroelements and increases telomere length in *Drosophila*. *Journal of Insect Physiology*.
- Krůček, T., Korandová, M., Šerý, M., Frydrychová, R. Č., Krůček, T., Korandová, M., & Szakosová, K. (2015). Effect of low doses of herbicide paraquat on antioxidant defense in *Drosophila*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*.
- Kukreja, R. C., & Hess, M. L. (1992). Cardiovascular Injury and Protection.
- Levis, R. W., Ganesan, R., Houtchens, K., Tolar, L. A., & Sheen, F. miin. (1993). Transposons in place of telomeric repeats at a *Drosophila* telomere. *Cell*.

- Liu, D., O'Connor, M. S., Qin, J., & Songyang, Z. (2004). Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins. *Journal of Biological Chemistry*.
- Loayza, D., & De Lange, T. (2003). POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature*.
- Lorenz, M., Saretzki, G., Sitte, N., Metzkow, S., & Von Zglinicki, T. (2001). BJ fibroblasts display high antioxidant capacity and slow telomere shortening independent of hTERT transfection. *Free Radical Biology and Medicine*.
- Luijsterburg, M. S., Dinant, C., Lans, H., Stap, J., Wiernasz, E., Lagerwerf, S., ... Van Driel, R. (2009). Heterochromatin protein 1 is recruited to various types of DNA damage. *Journal of Cell Biology*.
- Mason, J. M., & Biessmann, H. (1995). The unusual telomeres of *Drosophila*. *Trends in Genetics*, 11(2), 58–62.
- Mattson, M. P. (2008). Hormesis and disease resistance : activation of cellular stress response pathways. *Human & Experimental Toxicology*, 155–162.
- Miller, D. M., Buettner, G. R., & Aust, S. D. (1990). Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions. *Free Radical Biology and Medicine*, 8(1), 95–108.
- Mukai, K., Nishimura, M., & Kikuchi, S. (1991). Stopped-flow investigation of the reaction of vitamin C with tocopheroxyl radical in aqueous Triton X-100 micellar solutions. The structure-activity relationship of the regeneration reaction of tocopherol by vitamin C. *Journal of Biological Chemistry*, 266(1), 274–278.
- Murray, H. W., Juangbhanich, C. W., Nathan, C. F., & Cohn, Z. A. (1979). Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. II. The role of oxygen intermediates. *The Journal of Experimental Medicine*, 150(4), 950 LP-964.
- Nielsen, S. J., Schneider, R., Bauer, U.-M., Bannister, A. J., Morrison, A., O'Carroll, D., ... Kouzarides, T. (2001). Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature*, 412, 561.
- Perrini, B., Piacentini, L., Fanti, L., Altieri, F., Chichiarelli, S., Berloco, M., ... Pimpinelli, S. (2004). HP1 controls telomere capping, telomere elongation, and telomere silencing by two different mechanisms in *Drosophila*. *Molecular Cell*, 15(3), 467–476.

- Petersen, S., Saretzki, G., & Von Zglinicki, T. (1998). Preferential accumulation of single-stranded regions in telomeres of human fibroblasts. *Experimental Cell Research*.
- Piacentini, L., Fanti, L., Berloco, M., Perrini, B., & Pimpinelli, S. (2003). Heterochromatin protein 1 (HP1) is associated with induced gene expression in *Drosophila* euchromatin. *Journal of Cell Biology*, *161*(4), 707–714.
- Raffa, G. D., Ciapponi, L., Cenci, G., & Gatti, M. (2011). Terminin: A protein complex that mediates epigenetic maintenance of *Drosophila* telomeres. *Nucleus*.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B. D., Sun, Z. W., Schmid, M., ... Jenuwein, T. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*.
- Reute, G., & Spierer, P. (1992). Position effect variegation and chromatin proteins. *BioEssays*.
- Savitsky, M., Kravchuk, O., Melnikova, L., & Georgiev, P. (2002). Heterochromatin protein 1 is involved in control of telomere elongation in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(9), 3204.
- Schotta, G., Ebert, A., Krauss, V., Fischer, A., Hoffmann, J., Rea, S., ... Reuter, G. (2002). Central role of *Drosophila* SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *EMBO Journal*, *21*(5), 1121–1131.
- Schulze, S. R., & Wallrath, L. L. (2007). Gene regulation by chromatin structure: paradigms established in *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Entomology*, *52*, 171–192.
- Seong, K. H., Li, D., Shimizu, H., Nakamura, R., & Ishii, S. (2011). Inheritance of stress-induced, ATF-2-dependent epigenetic change. *Cell*, *145*(7), 1049–1061.
- 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.
- Thannickal, V. J., & Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *279*(78), 1005–1028.

- Tretter, L., Sipos, I., & Adam-Vizi, V. (2004). Initiation of Neuronal Damage by Complex I Deficiency and Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *Neurochemical Research*, 29(3), 569–577.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Christopher, J., & Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and.pdf, 37–56.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(1), 44–84.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1–40.
- van Acker, S. A. B. E., Koymans, L. M. H., & Bast, A. (1993). Molecular pharmacology of vitamin E: Structural aspects of antioxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine*.
- Van Steensel, B., & De Lange, T. (1997). Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature*.
- Van Steensel, B., Smogorzewska, A., & De Lange, T. (1998). TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell*.
- Vaquero, A., Scher, M., Lee, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Reinberg, D. (2004). Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Molecular Cell*.
- Von Zglinicki, T. (2002). Oxidative stress shortens telomeres. *Trends in Biochemical Sciences*.
- Von Zglinicki, T., Pilger, R., & Sitte, N. (2000). Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. *Free Radical Biology and Medicine*.
- von Zglinicki, T., Saretzki, G., Döcke, W., & Lotze, C. (1995). Mild Hyperoxia Shortens Telomeres and Inhibits Proliferation of Fibroblasts: A Model for Senescence? *Experimental Cell Research*.

- Wallrath, L. L. (1998). Unfolding the mysteries of heterochromatin. *Current Opinion in Genetics and Development*, 8(2), 147–153.
- Wallrath, L. L., & Elgin, S. C. R. (1995). Position effect variegation in *Drosophila* is associated with an altered chromatin structure. *Genes and Development*, 9, 1263–1277.
- Walmsley, R. W., Chan, C. S. M., Tye, B. K., & Petes, T. D. (1984). Unusual DNA sequences associated with the ends of yeast chromosomes. *Nature*.
- Walter, M. F., & Biessmann, H. (2004). Expression of the telomeric retrotransposon HeT-A in *Drosophila melanogaster* is correlated with cell proliferation. *Development Genes and Evolution*, 214(5), 211–219.
- Wang, F., Podell, E. R., Zaug, A. J., Yang, Y., Baciu, P., Cech, T. R., & Lei, M. (2007). The POT1–TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature*, 445, 506.
- Wright, W. E., Piatyszek, M. A., Rainey, W. E., Byrd, W., & Shay, J. W. (1996). Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Developmental Genetics*.
- Ye, J. Z. S., Donigian, J. R., Van Overbeek, M., Loayza, D., Luo, Y., Krutchinsky, A. N., ... De Lange, T. (2004). TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres. *Journal of Biological Chemistry*.
- Zarebski, M., Wiernasz, E., & Dobrucki, J. W. (2009). Recruitment of heterochromatin protein 1 to DNA repair sites. *Cytometry Part A*.