

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Tereza Krajzingrová

Stanovení relativní změny délky telomer pomocí qPCR: výhody a nevýhody metodiky a úskalí
používaných referenčních markerů

Assessment of relative telomere length using qPCR: advantages and disadvantages of this method
and shortcomings of commonly used reference markers

Bakalářská práce

Školitelka: Mgr. Hana Velová
Konzultant: RNDr. Michal Vinkler, Ph.D.

Praha, 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 18. 8. 2016

Tereza Krajzingrová

Abstrakt

Telomery, sestávající se z repetitivních sekvencí, chrání konce eukaryotických chromozomů před erozí. V běžných somatických buňkách se telomery zkracují s každým buněčným dělením. Délka telomer přímo odpovídá stárnutí na buněčné úrovni. Rychlost zkracování telomer, a tím rychlost stárnutí organismu, je individuální. Liší se nejen mezi druhy, ale i mezi jedinci, a může být ovlivněna mnoha faktory jako je stres, nemoci, reprodukce, či vliv vnějších podmínek. Ke stanovení délky telomer můžeme použít různé metody a každá z nich má své limity, které je dobré znát a vyhnout se jejich negativnímu dopadu na získané výsledky.

V současnosti patří mezi nejpoužívanější metody kvantitativní PCR (qPCR). Mezi nejdůležitější faktory, které mohou ovlivnit výsledky měření délky telomer pomocí qPCR, je množství vymezených (tzv. intersticiálních) telomerických sekvencí, správný výběr referenčního markeru, či následné navržení vysoce specifických primerů. I přesto je qPCR vhodná především pro poměrně rychlé a levné stanovení relativní délky telomer u velkého množství vzorků nemodelových organismů.

V práci se věnuji i konkrétním výsledkům studií zabývajících se změnou délky telomer u ptáků a možným příčinám, které dynamiku v délce telomer ovlivňují a to z důvodu, že metoda qPCR je právě ve studiích prováděných na ptácích jednoznačně nejpoužívanější metodou a spousta metodicky opomíjených nedostatků lze tak ukázat právě na základě těchto studií.

Klíčová slova

telomery, intersticiální telomerické sekvence, referenční markery, qPCR, TRF, FISH, STELA, stanovení (relativní) délky telomer, stárnutí, ptáci

Abstract

Telomeres, the ends of eucaryotic chromosomes, consist of tandem repeated sequences, play important role in protection of chromosomal ends. In somatic cells telomeres are getting shorter with each cell division. Telomere length (TL) is directly related to cellular ageing (senescence). The rate of telomere shortening as well as ageing is individual and it differs among species and also among individuals. To the main factors, which can affect the rate of telomere shortening, belong stress, diseases, reproduction or also environmental conditions. Many methods could be used for TL determination. Each of them has its own limitation, which is good to know to be able to avoid the negative impacts on results. qPCR is currently the most used method. The most important factor, which could affect the results, is that qPCR measures besides proper telomeres also interstitial telomeric sequences. Furthermore, the choice of suitable reference marker followed by designing of highly specific primers is also crucial, if qPCR is used. Nevertheless, qPCR is suitable method especially because it offers fast and inexpensive relative TL measurement of large amount samples. My bachelor thesis is moreover a review of studies focused on telomere dynamics in birds and causes which influence different senescence measured by TL. Because based on the studies in birds, we are able to point out the method's deficiencies, which are there often overlooked.

Keywords

telomeres, interstitial telomeric sequences, reference markers, qPCR, TRF, FISH, STELA, (relative) telomere length measurement, senescence, birds

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce paní Mgr. Haně Velové za nadšení, podnětné připomínky a pozitivní přístup a panu RNDr. M. Vinklerovi, Ph.D. za poskytnuté konzultace při psaní této bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala svým rodičům a babičce za podporu. Mé poděkování patří také panu Jiřímu Erhartovi za pomoc s úpravou práce.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	TELOMERY JAKO UKAZATEL BUNĚČNÉHO STÁRNUTÍ.....	2
2.1	TELOMERY	2
2.2	TELOMERÁZA.....	5
3	STANOVENÍ DÉLKY TELOMER POMOCÍ METODY QPCR.....	6
3.1	QPCR.....	7
3.1.1	<i>Primery pro amplifikaci telomerických sekvencí.....</i>	<i>10</i>
3.2	POUŽÍVANÉ REFERENČNÍ MARKERY PRO STANOVENÍ RELATIVNÍ DÉLKY TELOMER	11
3.2.1	<i>Referenční markery využívané při studiu ptáků</i>	<i>12</i>
3.2.2	<i>Referenční markery využívané při studiu dalších skupin živočichů</i>	<i>14</i>
3.3	VMEZEŘENÉ TELOMERICKÉ SEKVENCE (ITS)	15
4	DALŠÍ METODY POUŽÍVANÉ PRO STANOVENÍ DÉLKY TELOMER.....	17
4.1	TRF.....	17
4.1.1	<i>Southernova hybridizace</i>	<i>18</i>
4.1.2	<i>In-gel hybridizace.....</i>	<i>19</i>
4.2	Q-FISH.....	20
4.3	FLOW-FISH.....	21
4.4	STELA.....	23
4.5	THE DOT BLOT TELOMERE ASSAY	24
5	FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ DYNAMIKU ZKRACOVÁNÍ TELOMER U PTÁKŮ.....	25
5.1	RYCHLOST DEGRADACE TELOMER V ZÁVISLOSTI NA MAXIMÁLNÍ DÉLCE ŽIVOTA DRUHU	25
5.2	DÉLKA TELOMER JAKO DĚDIČNÁ ZÁLEŽITOST	27
5.3	VLIV VNĚJŠÍCH PODMÍNEK NA MÍRU ZKRACOVÁNÍ TELOMER	28
5.4	VLIV STRESU NA MÍRU ZKRACOVÁNÍ TELOMER	29
5.5	VLIV NEMOCÍ ČI PARAZITACE NA DYNAMIKU TELOMER	30
5.6	STUDIE ZKOUMAJÍCÍ DYNAMIKU TELOMER U MLÁĐAT	31
6	ZÁVĚR.....	32
7	SEZNAM ZKRATEK.....	34
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	35
9	PŘÍLOHY	41

1 ÚVOD

Telomery, konce eukaryotických chromozomů, jsou v současnosti předmětem zájmu většiny vědců zabývajících se stárnutím na buněčné úrovni. Charakter replikace telomer vede ke zkrácení telomer po každém dokončeném buněčném cyklu. Telomery tak určují, kolikrát se daná buňka může rozdělit, než dojde k zastavení buněčného cyklu a následné apoptóze. Chromozomy s nejkratšími telomerami jsou tak nejbližší stavu replikačního zestárnutí (Levy et al., 1992). Existují ale i výjimky – v některých buňkách (kmenové, zárodečné, nebo např. imortalizované) je exprimován enzym telomeráza, který je schopen udržovat nebo dokonce i prodlužovat délku telomerických sekvencí (Masutomi et al., 2003; Ozturk, 2015). Z těchto důvodů je dynamika telomer předmětem výzkumu zabývajících se nejenom stárnutím ale i rakovinným bujením. Ve své práci se ale věnuji především stárnutí na buněčné úrovni souvisejícího se zkracováním telomer.

Stárnutí je obecně širokým pojmem, a proto je poměrně těžké dojít k jakékoliv jednotné definici. Zpravidla je stárnutí spojováno s fyziologickým chátráním, změnou fenotypu (Vleck et al., 2007) a poklesem úspěšné reprodukce s postupujícím věkem (Kirkwood and Rose, 1991). Dnes existuje celá řada hypotéz, proč ke stárnutí dochází, respektive proč různí jedinci, či druhy stárnou různě rychle. Mezi teorie o stárnutí patří např. teorie antagonistické pleiotropie či hypotéza o akumulaci mutací (Hughes et al., 2002). První ze zmíněných teorií tvrdí, že pleiotropní geny (tj. geny ovlivňující více znaků) poskytují v mládí selekční výhody, kdežto ve stáří jsou svému nositeli na obtíž. Jedná se tedy o trade-off, kdy lepší fitness v době rozmnožování, vede ke zvýšenému reprodukčnímu úspěchu, ale také k vyššímu stresu a vyšší míře ztráty telomer (Williams, 1957). Teorie o akumulaci mutací tvrdí, že stárnutí je zapříčiněno hromaděním škodlivých mutací. Jelikož v obou případech se negativní projevy projevují až po reprodukci, udrží se tyto alely v populaci do dalších generací.

Další, především v oblasti ekologie často zmiňovanou teorií, proč ke stárnutí dochází, je teorie zvaná „disposable soma“ (Kirkwood and Rose, 1991). Tato teorie poukazuje na to, kam jedinec investuje své zdroje. Jde o trade-off, kdy získané zdroje lze alokovat v různém poměru buď do růstu, či rozmnožování, anebo do údržby organismu. Délka života podle této hypotézy proto souvisí s množstvím zdrojů věnovaným údržbě organismu a efektivitou této údržby na úkor ostatních aktivit. Jedním z navrhovaných mechanismů stárnutí je imunosenescence, neboli chátrání imunitního systému v souvislosti se zvyšujícím se věkem (Palacios et al., 2011). Narušení funkcí imunity může vést k autoimunitním chorobám, zvýšenému riziku infekce, ke vzniku rakovinného bujení a tím ke zvýšené mortalitě mezi staršími jedinci. Dalším faktorem, jenž patrně ovlivňuje míru ztráty telomerických sekvencí, je oxidativní stres. Reaktivní formy kyslíku (ROS), jako je např. hydroxylový radikál, mohou poškodit proteiny, lipidy nebo DNA – zejména pak telomery (Speakman and Selman, 2011; Wang et al., 2010).

V současnosti je stárnutí nejčastěji dáváno do souvislosti se zkracováním telomer. Právě možnost stanovení délky telomer otevírá nové možnosti ve výzkumu stárnutí i jeho příčin. Metod, které umožňují měřit délku telomer anebo její změny, existuje celá řada (např. analýza TRF, na FISH založené metody nebo STELA – viz kapitolu č. 4). V současnosti je především u nemodelových druhů, např. ptáků, nejvíce využívána kvantitativní PCR (qPCR, podrobněji v kapitole č. 3) a to především u nemodelových druhů organismů, např. ptáků. qPCR, jako ostatně i zbylé metody, má své výhody i úskalí.

Tato práce si za cíl klade shrnout nejčastější metody využívané ke studiu dynamiky délky telomer a poukázat na jejich přednosti i úskalí. Další neméně podstatnou část práce tvoří literární rešerše, která se zabývá výsledky studií, které řeší změnu délky telomer u ptáků a možné příčiny ovlivňující dynamiku v jejich délce. Metoda qPCR je ve studiích prováděných na ptácích momentálně nejpoužívanější, a proto mnoho metodicky opomíjených nedostatků lze ukázat právě na základě těchto studií.

2 TELOMERY JAKO UKAZATEL BUNĚČNÉHO STÁRNUTÍ

Jak již bylo naznačeno, zkracování a způsob replikace telomer hraje podstatnou úlohu v otázce buněčného stárnutí. Právě proto věnuji ve své práci telomerám, jejich biologii a funkci samostatnou kapitolu. Souvislost mezi zkracováním telomer a stárnutím byla naznačena více studiemi (Barrett et al., 2013; Bauch et al., 2013). Není však zcela zřejmé, zda je zkracování telomer příčinou anebo pouze průvodním jevem stárnutí.

2.1 TELOMERY

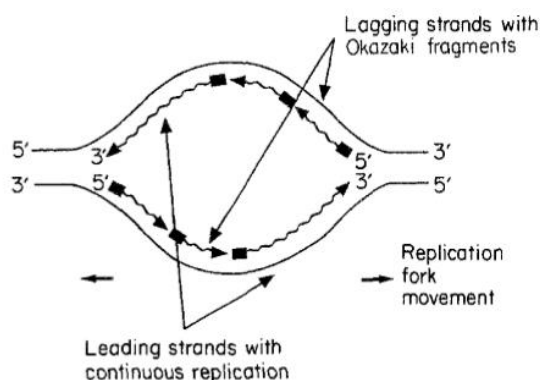
Telomery jsou repetitivní nekódující sekvence, které se nalézají na koncích eukaryotických chromozomů. Jsou klíčové pro chromozomální stabilitu a zabraňují například případným fúzím dvou samostatných chromozomů (Counter et al., 1992; Rudolph, 2008). Tyto struktury hrají také důležitou roli při dělení chromozomů.

Na odlišnosti v replikaci chromozomálních konců upozornil počátkem 70. let 20. stol. A. M. Olovnikov (Olovnikov, 1973). Ve své teorii (A Theory of Marginotomy) navrhnul několik vysvětlení, proč dochází ke zkracování zreplikované genomové DNA oproti původnímu templátu. Replikace probíhá s pomocí DNA-polymerázy, kdy je replika zkrácena o délku postulované inaktivní zóny DNA-polymerázy.

Další vysvětlení, které navrhnul, počítalo s existencí iniciačního RNA primeru. Replika by v tomto případě byla zkrácena právě o délku RNA-primeru, který by z výsledné zreplikované molekuly

DNA byl odstraněn (Olovnikov, 1973). Další výzkum potvrdil, že replikace telomer je neúplná (Levy et al., 1992) a ukázal na správnost druhého zmíněného vysvětlení.

Při každé této replikaci dochází ke zkrácení jednoho z vláken na samotném konci chromozomu. Důvodem je, že každé vlákno dvoušroubovice DNA je při replikaci syntetizováno odlišným způsobem. DNA polymeráza může syntetizovat nové komplementární nukleotidy pouze ve směru od 5' k 3' konci. Vlákna jsou v dvoušroubovici orientována antiparalelně – vedoucí řetězec směřuje od 5' k 3' konci (tzv. leading strand), druhé opoždějící vlákno je orientováno od 3' k 5' konci (tzv. lagging strand) a je syntetizováno přerušovaně pomocí krátkých, dílčích úseků. Aby během replikace mohlo dojít k syntéze komplementárního vlákna, potřebuje DNA polymeráza krátkou sekvenci oligonukleotidů, tzv. primer o délce 10 nukleotidů, jež se naváže do replikačního počátku (Waga and Stillman, 1998). Jelikož DNA polymeráza syntetizuje pouze jednosměrně od 5' k 3' konci, tak je nové vlákno na 3' konci zkráceno o délku primeru (Snustad et al., 2009). Schéma replikace znázorňuje obr. č. 1, kde primery jsou znázorněny vyplněným obdélníkem.



Obr. 1 – Schéma replikace DNA; přejato a upraveno ze studie Levy a kolegů (1992)

Bez telomerických sekvencí by tak při každé replikaci docházelo ke ztrátě důležitých genů přítomných uvnitř chromozomu před těmito koncovými sekvencemi (Monaghan, 2010). Životnost jednotlivých buněčných linií je tedy úměrná délce telomerických sekvencí, protože buňky s delšími telomerami se mohou vícekrát rozdělit (Allsopp et al., 1992). Struktura telomer je tvořena opakujícími se sekvencemi (repeticemi) bohatými na guanin. Motiv telomerických sekvencí je mezi taxony velmi konzervativní, přesto však můžeme najít jisté taxonomické rozdíly, jak ukáží na několika následujících příkladech.

Lidské telomery se vyznačují opakováním sekvence (TTAGGG)_n (Moyzis et al., 1988). Délka lidských telomer se pohybuje v rozmezí 5-15 kbp (Monaghan, 2010; Samassekou et al., 2010). Při každém dělení dojde ke zkrácení telomery o 50-150 bp (Martens et al., 2000). Kritická délka telomer, tedy délka nutná k tomu, aby mohlo dojít ke správnému rozdělení buňky, činí u lidí cca 2 kbp (Allsopp and Harley, 1995; Martens et al., 2000). Ukázalo se, že sekvence telomer vyskytující se u lidí je patrně sdílena všemi obratlovci. Zakonzervovaný motiv telomer

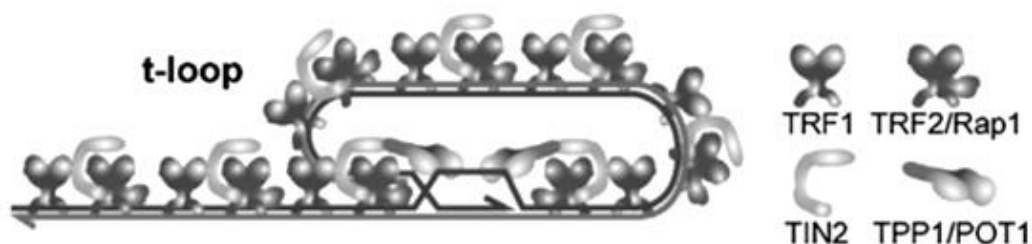
u obratlovců (TTAGGG)_n byl nejspíše přítomen již u společného předka obratlovců žijícího před více než 400 miliony lety (Meyne et al., 1989).

Telomerická sekvence typická pro obratlovce se vyskytuje dokonce i u některých druhů mořských bezobratlých jako je sumýš obecný (*Holothuria tubulosa*), nebo violetka obecná (*Donax trunculus*) (Plohl et al., 2002). Oproti tomu u většiny zkoumaných zástupců hmyzu byly objeveny telomerické repetice (TTAGG)_n (Kuznetsova et al., 2015; Okazaki et al., 1993). Telomerické sekvence nálevníka rodu *Tetrahymena* se skládají z repetice (TTGGGG)_n (Greider and Blackburn, 1985). Většina vyšších rostlin (včetně modelového huseníčka, *Arabidopsis thaliana*) na koncích svých chromozomů obsahuje repetice motivu (TTTAGGG)_n (Fuchs et al., 1995). Existují ale i výjimky. Zvláštností rostlinné říše je např. rod česnek (*Allium*), jehož telomery jsou tvořeny relativně dlouhými repeticemi (TTATGGGCTCGG)_n (Fajkus et al., 2016).

Pro stabilitu telomer je důležitý tzv. shelterinový komplex. Shelterinový komplex je soubor šesti proteinů. V případě lidského shelterinového komplexu se jedná o podjednotky TRF1 (Telomere Repeat Factor 1), TRF2 (Telomere Repeat Factor 2), POT1 (Protection of Telomeres-1), TIN2 (TRF1- and TRF2-Interacting Nuclear Protein 2), TPP1 (Tripeptidyl Peptidase 1) a RAP1 (Repressor / Activator Protein 1) (de Lange, 2005). Působení tohoto komplexu ovlivňuje organizaci struktury telomer. V literatuře zmiňovaným příkladem je vliv shelterinového komplexu na kondenzaci telomer, která chrání konce chromozomů před poškozením, tzv. DNA damage response (DDR) (Bandaria et al., 2016).

DDR je proces vedoucí k zastavení buněčného cyklu do doby, než dojde k opravení poškození, např. dvouvláknového zlomu. Neopravitelné poškození DNA způsobené exogenními činiteli v blízkosti telomery (např. ionizujícím zářením) vede k navození persistentní DDR a spouští buněčné stárnutí, kdy buňka ztrácí schopnost se správně rozdělit (Fumagalli et al., 2012).

Na 3' přesahu telomery se nachází jednořetězcový úsek, jenž je patrně klíčový pro prodloužení chromozomů pomocí telomerázy (Henderson and Blackburn, 1989). Další výzkum v *in vitro* podmínkách zjistil, že tato oblast má za pomoci proteinu TRF2 schopnost vytvořit tzv. t-smyčku (Griffith et al., 1999). K potvrzení existence t-smyčky *in vivo* došlo až s použitím metody STORM, Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (Doksani et al., 2013). T-smyčky vznikají zanořením jednořetězcového 3' přesahu mezi vlákna telomerických sekvencí dále od konce, jak je znázorněno na obr. č. 2. Přesahující vlákno je zde na základě komplementarity spárováno s původním vláknem. T-smyčka patrně významně přispívá ke stabilitě chromozomálních konců (Doksani et al., 2013; Griffith et al., 1999). K rozvolnění t-smyčky dochází po interakci TRF2 a helikázy RTEL1, Regulator of Telomere Length 1 (Sarek et al., 2015). Uvolnění t-smyčky je důležité především během S fáze buněčného cyklu, kdy dochází k replikaci DNA.



Obr. 2 – Znáznornění t-smyčky a proteinů, které se účastní; přejato a upraveno dle Doksani a kol. (2013)

2.2 TELOMERÁZA

Samostatnou podkapitolu jsem se rozhodla věnovat enzymu zvanému telomeráza, protože je její funkce pro udržování telomer zásadní. Telomeráza svým působením dokáže udržovat délku nebo dokonce i prodlužovat telomery od jejich 3' konce (Greider and Blackburn, 1985; Shippenlantz and Blackburn, 1990). Lidská telomeráza se skládá ze dvou podjednotek – katalytické (telomerase reverse transcriptase - TERT) a velké RNA podjednotky (telomerase RNA - TER) (Terali and Yilmazer, 2016; Wenz et al., 2001). Funguje jako reverzní transkriptáza, což znamená, že dokáže nasyntetizovat DNA vlákno dle RNA templátu. RNA templát obratlovců o délce 11 nukleotidů má sekvenci (5'-CUAACCCUAAC-3') (Feng et al., 1995). Mechanismus prodlužování telomer za pomoci telomerázy je následující. Telomeráza nasedne na 3' konec chromozomu a zde ve směru od 5' ku 3' konci přidává telomerické sekvence. Dosyntetizování komplementárního vlákna zajišťuje DNA polymeráza (Snustad et al., 2009).

Ve většině somatických buněk je telomeráza prakticky inaktivní, což je důvodem zkracování telomer po každém dělení. Právě zkracování telomer je v oblasti gerontologie interpretováno jako důkaz replikativního stárnutí (Haussmann et al., 2003a). Z tohoto důvodu je pravděpodobné, že telomeráza je klíčovým faktorem pro počet dělení, které buňka může podstoupit (Vaziri and Benchimol, 1998). V lidských fibroblastech byl nález telomerázy dán do souvislosti s regulací S fáze buněčného cyklu (Masutomi et al., 2003). Telomeráza byla nalezena v buňkách zárodečných linií modelové transgenní myši *Pou5f1-GFP* (Coussens et al., 2006).

Ukázalo se, že společným rysem indukovaných pluripotentních buněk a buněk kmenových je mimo jiné i aktivní telomeráza (Takahashi et al., 2007). Tento enzym byl nalezen v imortalizovaných buňkách (např. buněčná linie HEK – human embryonic kidney transformována onkogenními viry SV40 a Ad5). Výsledky naznačují, že telomery imortalizovaných buněk se při dělení díky zaktivované telomeráze nezkracují a buňky tak získávají schopnost se neomezeně dělit (Counter et al., 1992). Imortalizace buněk je podmínkou pro případnou transformaci buněk. Proto je také často poukazováno na souvislost telomerázy s rakovinným bujením a vznikem metastáz (Kim et al., 1994). Přítomnost telomerázy u velké části buněk maligních nádorů toto tvrzení podporuje.

Nabízí se také otázka, zda utlumení telomerázy v somatických buňkách není obranou před onkologickými nemocemi (Kim et al., 1994). Oproti tomu výsledky ve studii provedené u burňáčka dlouhokřídlého, *Oceanodroma leucorhoa*, (Hausmann et al., 2007) poukazují na zvýšenou telomerázovou aktivitu i u starších jedinců např. ve tkáních gonád. Při porovnání burňáčka oproti jiným druhům ptáků studie zjistila vyšší aktivitu telomerázy i v dalších tkáních (např. v mozku či v játrech), což by mohlo být dáno tím, že je tento druh ptáka relativně dlouhověký. O inhibici telomerázové aktivity se proto uvažuje i jako o možném způsobu léčby onkologických onemocnění, např. rakoviny prsu (Rao et al., 2016).

3 STANOVENÍ DÉLKY TELOMER POMOCÍ METODY QPCR

Kvantitativní polymerázová řetězcová reakce, z anglického quantitative polymerase chain reaction (qPCR), je metoda založená na klasické PCR, tj. dochází k naamplifikování určité části DNA pomocí primerů, polymerázy a dalších chemikálií. Metoda qPCR se někdy v literatuře vyskytuje pod označením real-time PCR, protože můžeme sledovat jednotlivé kroky PCR v reálném čase. Je důležité metodu qPCR rozlišovat od tzv. reverse transcription-qPCR (RT-qPCR). RT-qPCR ve svém procesu využívá reverzní transkripce k vytvoření DNA z RNA a stanovení míry genové exprese (Bustin et al., 2009).

Kvantitativní PCR nám umožňuje amplifikovat sekvence nukleových kyselin (při výzkumu telomer se jedná o vybrané sekvence DNA). Na rozdíl od klasické PCR se metoda qPCR liší použitím fluorescenčního značení (pomocí sondy anebo aplikací DNA vázající se fluorescenční barvy) a termálního cykleru (LightCycler) s detekčním systémem. Termální cykler musí být schopen detekovat emise uvolněné z excitovaných fluorescenčních molekul, poté co dojde k navázání fluorescenčního barviva na DNA. Jelikož je uvolněná hladina fluorescence emitovaná během amplifikace přímo úměrná množství amplifikované DNA, tak jsme schopni v jednotlivých cyklech přímo sledovat změny v koncentraci amplifikované DNA. Právě díky možnosti sledovat změnu koncentrace DNA v průběhu času, je tato metoda označována přívlastky kvantitativní a real-time (Heid et al., 1996).

Použití metody qPCR pro stanovení relativní délky telomer s sebou přineslo obrovský posun ve výzkumu dynamiky telomer. Je pravděpodobné, že rozšíření této metody je jedním z faktorů, které přispěly ke vzrůstajícímu počtu studií zabývajících se výzkumem telomer. Od vydání klíčového článku (Criscuolo et al., 2009), ve kterém byla tato metoda aplikována na ptáky, byla provedena většina studií související s dynamikou telomer u ptáků právě s pomocí metody qPCR.

Oproti do té doby obvykle používané metodě Telomere Restriction Fragment Assay (TRF), má qPCR několik zcela zásadních výhod.

- (1) qPCR je poměrně nenáročná a levná laboratorní metoda. Metody založené na TRF patří mezi ty časově nákladné. Provedení celého protokolu může zabrat i více než čtyři dny (Hausmann and Mauck, 2008; Hausmann and Vleck, 2002).
- (2) Pro provedení qPCR je potřeba daleko menší množství DNA (obvykle méně než 50 ng) (Gutierrez-Rodrigues et al., 2014), u obou nejčastěji prováděných TRF metod (Southernovou nebo in-gel hybridizací) je potřeba vzorek DNA větší než 3 µg (Kimura et al., 2010).
- (3) Použití metod pro měření délky TRF je komplikováno nutností vybrat správný restriční enzym, který může také ovlivnit dosažený výsledek (Cawthon, 2002).

Používáme-li metodu qPCR, je třeba si ale uvědomit i některá její omezení.

- (1) Délka telomer je stanovena relativně pomocí poměru T/S (telomere/single copy gene). Tento poměr poukazuje na počet opakujících se kopií telomer ku množství kontrolního genu. Objevily se i pokusy upravit qPCR přidáním oligonukleotidového standardu o známé délce tak, aby bylo možné stanovit délku telomer absolutně (Barrett et al., 2012; O'Callaghan et al., 2008). Nicméně o správnosti dosažených výsledků se vede diskuze (Nussey et al., 2014).
- (2) Při použití qPCR je tudíž klíčovým parametrem výběr vhodného referenčního markeru.
- (3) Metoda qPCR také není schopná stanovit celkovou délku jednotlivé telomery, poněvadž jako výsledek je udávána průměrná délka všech telomer.
- (4) Především je však nutné počítat s tím, že tato metoda neodlišuje skutečné telomery od intersticiálních telomerických sekvencí, které tak ovlivňují výsledný odhad relativní délky telomer.

3.1 qPCR

Stanovení délky telomer pomocí qPCR bylo umožněno teprve s navržením primerů, které úspěšně tyto repetitivní sekvence amplifikovaly (Cawthon, 2002). Pro stanovení délky telomer u ptáků byla tato metoda upravena o pár let později (Criscuolo et al., 2009). Pro provedení qPCR je důležité, aby získaný vzorek DNA byl kvalitní, a proto byly použity postupy, které mají za úkol zabránit degradaci nukleových kyselin a tím i znehodnocení vzorků. U ptáků se krev obvykle odebírá z pažní žíly (Angelier et al., 2015; Badas et al., 2015; Quirici et al., 2016; Stier et al., 2015). Někdy je možné krev odebírat ze žíly krční anebo i tarzální žíly (Becker et al., 2015).

Genomická DNA je u ptáků obvykle získávána přímo z krve. Využívá se skutečnosti, že ptáci mají jaderné erytrocyty (Lucas and Jamroz, 1961). U jiných taxonů (např. savci), jejichž erytrocyty jsou bezjaderné, se genomická DNA (gDNA) obvykle získává z leukocytů, kožních nebo svalových buněk (Dantzer and Fletcher, 2015). Krev je odebírána jehlou propláchnutou antikoagulační látkou (kyselinou ethylendiamintetraoctovou – EDTA nebo heparinem), aby nedošlo ke sražení krve (Zanet et al., 2013). Pokud není gDNA ze vzorku izolována ihned, je obvykle skladována při nízkých teplotách (3 °C až -80 °C), aby nedocházelo k degradaci DNA ve vzorku tkáně

(Bauch et al., 2013; Stier et al., 2015; Voropaeva et al., 2015; Watson et al., 2015). Centrifugací lze oddělit plazmu od erytrocytů (Watson et al., 2015). Plazma může být poté využita i k jiným analýzám, např. pro analýzu hladiny látek naznačující oxidativní stres (Quirici et al., 2016). K extrakci gDNA mohou být využity různé izolační kity, např. DNeasy Blood and Tissue Kit (Atema et al., 2013; Becker et al., 2015; Criscuolo et al., 2009; Stier et al., 2015). Další možností, jak vyizolovat gDNA z krve, je za pomoci octanu amonného (Badas et al., 2015), nebo fenol-chloroformovou metodou (Asghar et al., 2015). Vyizolovanou gDNA je vhodné skladovat v pufru (např. AE pufr) při nízkých teplotách (od -20 °C do -80 °C), aby se její degradace snížila na minimum. Čistotu a množství extrahované DNA lze ověřit např. pomocí spektrofotometru (Watson et al., 2015) nebo s využitím gelové elektroforézy.

Po získání DNA ze vzorku tkáně dochází k amplifikacím telomer a single copy genu pomocí qPCR. Kvantitativní PCR pro telomerické sekvence je prováděna odděleně na samostatném platičku, než kde probíhá qPCR pro sekvence referenčního genu. Obvykle, ale není to pravidlem, je pro každou reakci vyhrazena 96 jamková PCR destička (Angelier et al., 2013; Cawthon, 2002; Criscuolo et al., 2009). Reakční směs pro qPCR obsahuje vyizolovanou gDNA (2,5–50 ng), primery pro úsek, který amplifikujeme (koncentrace v řádech stovek nanomolů – nM), deoxyribonukleotidy – dNTP (koncentrace v desetinách nM od každého ze čtyř nukleotidů), fluorescenční barvu nebo sondu vázající se přímo na dvoušroubovici DNA (obvykle se jedná o SYBR Green Master Mix nebo Taqman probe), pufr (s různým obsahem Mg^{2+} iontů), termostabilní DNA polymerázu (např. AmpliTaq Gold DNA polymeráza) a destilovanou vodu (Cawthon, 2002; Criscuolo et al., 2009; Heid et al., 1996). Jako templát pro amplifikaci funguje samotná DNA.

qPCR je prováděna s použitím termálního lightcyklu, do něhož se vkládá, např. 96 jamková PCR destička (Criscuolo et al., 2009). Před každou qPCR je nutné spočítat její efektivitu. Ta se stanoví díky tzv. ředící (kalibrační) řadě, která obsahuje jako templát sériově rozředěnou referenční DNA (např. 10x v každém ředění), díky níž je pak možné určit efektivitu, s jakou daná PCR na konkrétní destičce probíhá.

Efektivita PCR většinou koresponduje se specifíčností primerů, tj. s jakou přesností se daná dvojice primerů dokáže za daných podmínek navázat na DNA templát a umožnit tak amplifikaci požadovaného PCR produktu. Dosahuje-li efektivita qPCR 100%, znamená to, že se v každém kroku počet DNA molekul přesně zdvojnásobí. Je nutné, aby byl stejný vzorek nanášen do tří jamek v tzv. triplicátech. Díky třem nezávislým výsledkům (křivkám) je možné odlišit případné chyby vzniklé při pipetování, či během vlastní reakce.

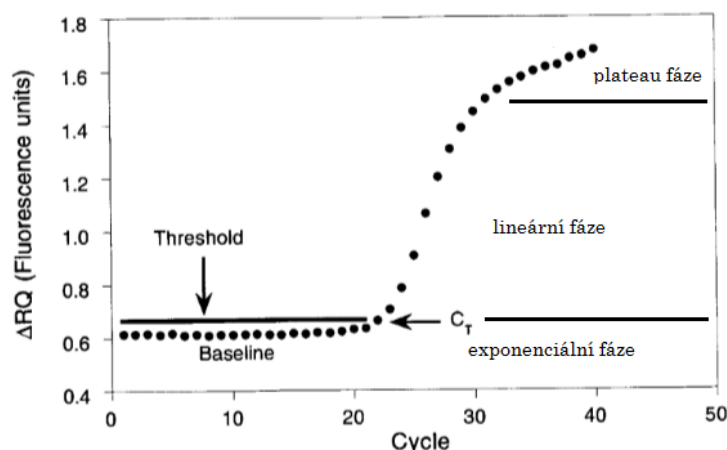
Termální LightCycler dokáže zaznamenat záření produkované excitací fluorescenční barvy (fluorescenci) přímo během amplifikace DNA (Cawthon, 2002). V případě použití fluorescenční barvy dojde ke fluorescenci ve chvíli, kdy se fluorescenční barva naváže na nově vzniklou

dvouvláknovou DNA. Ve studiích zabývajících se výzkumem ptáků a zkracováním telomer jsou obvykle použity tyto fluorescenční barvy, neboť se jedná o výrazně levnější a lépe dostupnou variantu. Používáme-li namísto fluorescenčních barviček sondu, k flourescenci dochází poté, co DNA polymeráza během elongační fáze odštěpí sondu svou nukleolytickou aktivitou. Využití sondy je dražší, ale tento postup poskytuje přesnější výsledky, protože se váže specificky (Heid et al., 1996).

Podmínky qPCR, během nichž dochází k amplifikaci požadovaných produktů, jsou do jisté míry závislé na použitém kitu (a především na polymeráze) a obvykle začínají při teplotě 95 °C, kdy dochází k aktivaci polymerázy (v závislosti na typu polymerázy to může být od 5 do 15 minut). Během této fáze také dochází k denaturaci dvoušroubovice DNA. Následně proběhne cca 30 cyklů, kdy se opakují tři kroky. Po provedení úvodního kroku, kdy dochází k aktivaci polymerázy a denaturaci DNA při teplotě 95 °C, nastává fáze, kdy nasedají primery na rozvolněné řetězce DNA. Teplota v této fázi se odvíjí od použitých primerů, ale obecně lze konstatovat, že se pohybuje mezi 50–60 °C. Poslední fáze elongace, kdy dochází k syntéze komplementárního řetězce, probíhá při 72 °C. Čas je úměrný délce amplifikované DNA, ale obvykle se jedná o cca 10 minut (Watson et al., 2015).

Výstupem z lightcycleru jsou standardní křivky pro každou PCR destičku (Cawthon, 2002, 2009). Pomocí standardní křivky (vztahení hodnoty C_t ke koncentraci referenční DNA na počátku amplifikace) lze určit i účinnost qPCR (Criscuolo et al., 2009). Ta by se měla pohybovat kolem $100 \pm 15 \%$ (Watson et al., 2015).

qPCR pro každou jamku stanovuje hodnotu C_t (cycle of treshold). Tato hodnota označuje hladinu fluorescence, která překročí danou hranici, hodnotu spočítanou softwarem nebo manuálně nastavenou (Cawthon, 2002; Criscuolo et al., 2009). Nízká C_t hodnota je důkazem pro vysoké množství DNA na počátku amplifikace. Pro tuto hodnotu se v literatuře objevují také jiné názvy – crossing point (C_p) nebo quantification of cycle (C_q) (Bustin et al., 2009; Nussey et al., 2013). Na obr. č. 3 je také znázorněna kinetika reakce, která je popsána sigmoidní křivkou. Během exponenciální fáze produkt přibývá exponenciálně (2^x , kde x značí číslo cyklu), intenzita fluorescence dosahuje hodnoty threshold, kdy je termální lightcykler schopen ji zaznamenat. Kvantitativní PCR využívá skutečnosti, že intenzita fluorescence je úměrná množství templátové DNA (Yuan et al., 2006). Poté nastává lineární fáze, kdy dochází ke strmému nárůstu intenzity fluorescence a nakonec přichází na řadu plateau fáze, kde je reakce limitována docházejícími zdroji, a proto nedochází k výraznému přibývání produktu.



Obr. 3 – Křivka značící průběh qPCR. Každý bod křivky znázorňuje hodnotu vyzářené fluorescence naměřené daný cyklus. C_t je hraniční hodnota, kdy lze množství fluorescence uvolněné po dostatečném namnožení templátu odlišit od pozadí. Převzato a upraveno dle (Heid et al., 1996).

Naměřené vzorky telomer jsou vždy porovnávány k referenční DNA. K výpočtu poměru T/S se používá vzorec: $2^{(-\Delta C_t)} = (2^{C_{t_{tel}}} / 2^{C_{t_{single\ copy\ gen}}})^{-1}$. Je-li poměr T/S roven jedné, v praxi to znamená, že námi zkoumaná DNA se poměrem telomerických sekvencí ku single copy genu neliší od referenčního vzorku DNA, kterou přidáváme na destičky ke vzorkům (Cawthon, 2002).

3.1.1 PRIMERY PRO AMPLIFIKACI TELOMERICKÝCH SEKVENCÍ

Navržení vhodných primerů bylo dlouhou dobu hlavní překážkou, která bránila využití metody PCR pro amplifikaci telomerických sekvencí. Hlavní důvod spočíval v tom, že telomerické sekvenční jsou tvořené mnohokrát opakující se repetici krátkého telomerického motivu. Primery amplifikující sekvenční telomer obratlovců (TTAGGG anebo CCCTAA) tak dávaly vznikat produktům, jež byly často odvozeny od dimerů těchto primerů (Callicott and Womack, 2006; Cawthon, 2002). Tento problém byl prolomen teprve po roce 2000 Richardem Cawthonem (Cawthon, 2002). sekvenční průlomových primerů (ve směru: 5' → 3'):

tel 1: GGT TTT TGA GGG TGA GGG TGA GGG TGA GGG TGA GGGT,
tel 2: TCC CGA CTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA.

Klíčem ke vzniku fungujících primerů je jen částečná komplementarita primeru k telomeře (viz obr. č. 4), kde se posledních šest bází u 5' konce nemůže spárovat s telomerou, ale zároveň kde každá šestá báze je nesouhlasná se sekvencí telomery. U 3' konce je naopak prvních pět bází komplementárních s templátem. DNA polymeráza pak přidává další báze vždy za 3' konec primeru.

2008). Jelikož je délka telomer stanovena metodou qPCR vyjádřena relativně, tj. poměrem T/S (poměr kopií telomer ku množství referenčního genu), je pro co nejpřesnější výsledky této metody nezbytné, aby se referenční marker v celém genomu vyskytoval pouze v jedné kopii. Navíc je potřeba, aby byly primery navrženy vysoce specificky, a tak nedocházelo k jejich vyvázání, případně k amplifikaci jiné části genomu.

V další podkapitole se pokusím vyjmenovat všechny referenční markery využívané při studiu telomer ptáků. Sekvence primerů uvedených v této podkapitole jsou k nahlédnutí v příloze (Tabulka č. 1). Dále také zmíním nejčastěji používané referenční markery ve studiích provedených na savcích i plazech, kteří jsou ptákům evolučně blízcí.

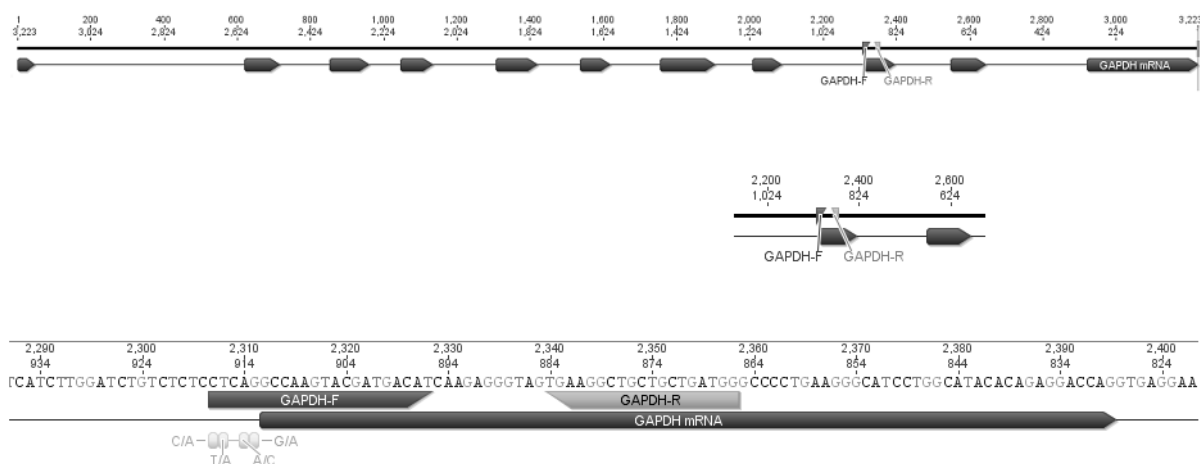
3.2.1 REFERENČNÍ MARKERY VYUŽÍVANÉ PŘI STUDIU PTÁKŮ

Nejčastěji používaným referenčním markerem je gen pro glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázu (GAPDH). Gen pro GAPDH je velmi využíván ve značné části studií prováděné na ptácích (Angelier et al., 2013, 2015; Atema et al., 2013; Badas et al., 2015; Becker et al., 2015; Criscuolo et al., 2009; Quirici et al., 2016). Ve studiích se však používá více variant primerů amplifikujících sekvenci tohoto genu. Ačkoliv je tento referenční marker vědci s oblibou přejímán, jeho použití by mělo být dobře zváženo, zejména co se týče otázky výběru primerů.

Názorným příkladem jsou primery pro GAPDH použité v první studii, kde byla qPCR použita u ptáků (Criscuolo et al., 2009). Jelikož se jedná o studii v této oblasti průlomovou, není překvapující, že jsou tyto primery přejímány do dalších studií (Badas et al., 2015; Becker et al., 2015; Reichert et al., 2013, 2014). Sekvence těchto primerů jsou:

F: 5'-AAC CAG CCA AGT ACG ATG ACAT-3'; R: 5'-CCA TCA GCA GCA GCC TTCA-3'.

Úskalím těchto primerů je pouze částečné navázání primeru F na gDNA, které může způsobit menší a především kolísající efektivitu qPCR, což pochopitelně může ovlivnit dosažené výsledky. Tyto primery byly totiž pravděpodobně navrženy pro komplementární DNA (cDNA) neobsahující introny, nikoliv pro gDNA. Aplikace primerů na gDNA obsahující i introny vede k tomu, že prvních pět bází F primeru (AACCA) není specifických k intronu před exonem 9, ale k exonu 8. Pro lepší ilustraci, viz obr. č. 5.



Obr. 5 – Schéma primeru pro GAPDH ze studie Criscuolo s kol. (2009), Použitá referenční sekvenční GAPDH zebříčky pestré (NCBI GI:224381666), vytvořeno v programu Geneious R9

Pochybnosti o spolehlivosti GAPDH, jako referenčního markeru, byly vyjádřeny i proto, že je ovlivněn homologními segmentálními duplikacemi vyskytujícími se v genomu (Ghani et al., 2013). Varianta primeru pro GAPDH gen původně navržený pro výzkum dynamiky telomer zebříčky pestré, *Taeniopygia guttata* (Criscuolo et al., 2009), byl po úpravě využit i při výzkumu dynamiky telomer sýkory koňadry (*Parus major*) a sýkory modřinky, *Cyanistes caeruleus*, obojí Atema a kol. (2013). Tyto primery (GAPDH-F: 5'-TGT GAT TTC AAT GGT GAC AGC-3'; GAPDH-R: 5'-AGC TTG ACA AAA TGG TCG TTC-3') amplifikovaly část exonu o velikosti 80 bp. Byla navržena ještě třetí varianta primerů, která byla optimalizována také na pěvce (GAPDH-F: 5'-TGA CCA CTG TCC ATG CCA TCAC-3'; GAPDH-R: 5'-TCC AGA CGG CAG GTC AGG TC-3') a amplifikuje pro qPCR překvapivě dlouhý úsek (přibližně 2000 bp), kde F primer leží na začátku exonu č. 7 a R primer na konci exonu č. 8. Tyto primery se v poslední době objevily ve více studiích (Angelier et al., 2013, 2015; Quirici et al., 2016).

Dalším používaným referenčním markerem se stal zinc finger protein neboli ZENK, který byl použit při výzkumu tučňáka kroužkového, *Pygoscelis adeliae* (Beaulieu et al., 2011), sýkory koňadry (Stier et al., 2015) nebo tučňáka patagonského - *Aptenodytes patagonicus* (Vaillant et al., 2015). Beaulieu a kolegové použili jiné primery (viz Tabulku č. 1 v příloze) než byly aplikovány u zbylých dvou zmíněných studií. Jednoznačnou výhodou využití ZENKu coby referenčního markeru při studiu telomer ptáků, je obsah vysoce zakonzervovaných sekvencí mezi jednotlivými taxony této třídy a mezi ptáky i savci (Long and Salbaum, 1998). Vzhledem k sekvenční podobnosti ptačího ZENKu s tím savčím, by se teoreticky dalo přemýšlet i nad jeho použitím ve studiích zabývajících se savčími telomerami. Gen pro ZENK kóduje transkripční regulátor. U ptáků bylo zvýšení hladiny exprese tohoto genu dáno do souvislosti se sluchovými vjemy, především v oblasti vnímání zpěvu ostatních jedinců (Mello and Ribeiro, 1998).

Vědci zabývající se dynamikou telomer burňáčka malého navrhli využití genu pro ornithin dekarboxylázu (OCD) coby referenčního markeru (Watson et al., 2015). Ornithin dekarboxyláza

je enzym katalyzující syntézu polyaminů, které jsou spjaty s buněčným cyklem a proliferací, kde regulují přestavbu cytoskeletu (Mäkitie et al., 2009). Ačkoliv se použití tohoto referenčního markeru nerozšířilo, Watsonová s kolegy zkonstatovali, že účinnost amplifikace při použití OCD je přijatelná (Watson et al., 2015).

Možnou alternativou je také gen pro SFSR/3, který byl využit při výzkumu vlivu ptačí malárie na délku telomer u rákosníka velkého, *Acrocephalus arundinaceus* (Asghar et al., 2015) a čížka lesního, *Spinus spinus* (Asghar et al., 2016). SFSR/3 neboli serine/arginine-rich splicing factor 3 je součástí spliceozomu. Tato oblast je mezi obratlovci velmi konzervovaná (Bejerano et al., 2004), což je pro referenční marker výhodné, protože ho lze přejímat mezi jednotlivými studii zkoumajícími různé druhy. Primery amplifikující produkt o délce 114 bp byly použity v obou výše zmíněných studiích.

Nejpoužívanějším referenčním markerem je patrně z historických důvodů stále gen pro GAPDH. Při jeho použití je však nutné zvolit vhodné primery, protože např. s oblibou přejímané primery použité v jedné z prvních studií (Criscuolo et al., 2009) nejsou zcela specifické a tak je pravděpodobné, že amplifikují templát s kolísající efektivitou a tím může být do jisté míry ovlivněn výsledek studií, které ho používají. Další primery pro tento gen však byly navrženy lépe (Angelier et al., 2013; Atema et al., 2013) a jsou tak vhodnější, protože nevykazují tento nedostatek. Primery pro OCD dle autorů (Watson et al., 2015) amplifikují s dobrou efektivitou, jejich použití se však zatím nerozšířilo, a tudíž toto prohlášení není definitivně ověřeno.

Mezi další rozšířené a vědci používané referenční markery patří gen pro ZENK a SFSR/3. U primerů navržených pro tyto referenční markery se zatím neobjevila žádná skutečnost zpochybňující jejich spolehlivost. Přesto bychom neměli zapomínat, že výběr vhodného referenčního markeru a spolehlivých primerů je naprosto klíčový, a tudíž je nutné postupovat obezřetně. To je třeba mít na paměti i v případě, přejímáme-li primery z jiných studií zabývajících se studiem telomer ptáků.

3.2.2 REFERENČNÍ MARKERY VYUŽÍVANÉ PŘI STUDIU DALŠÍCH SKUPIN ŽIVOČICHŮ

V původní studii zkoumající lidské telomery, kde byla navržena i první dvojice primerů amplifikujících telomery (tel 1 a tel 2), využili jako referenční marker gen pro 36B4 (Cawthon, 2002). Tento gen kóduje kyselý ribozomální fosfoprotein (PO). Důvodem pro použití tohoto referenčního markeru tkví v jeho evoluční zakonzervovanosti (Callicott and Womack, 2006). Sekvence těchto primerů ve směru 5' → 3' je: F: CAG CAA GTG GGA AGG TGT AAT CC; R: CCC ATT CTA TCA ACG GGT ACAA.

Tento referenční marker byl poté přejat i týmem vědců, kteří se zabývali telomerami myši domácí (Callicott and Womack, 2006), avšak primery byly navrženy *de-novo* do jiného místa tohoto genu: F: 5' ACT GGT CTA GGA CCC GAG AAG 3'; R: 5' TCA ATG GTG CCT CTG GAG ATT 3'.

Ve studii zkoumající dynamiku telomer mořských želv – kareta obecná byl coby referenční marker využit gen pro 18S rRNA (Hatase et al., 2008), přičemž primery byly využity komerčně prodávané firmou Takara Bio Inc., které byly původně navrženy pro lidi. Sekvence primerů je: F: 5'-ACT CAA CAC GGG AAA CCT CA-3'; R: 5'-AAC CAG ACA AAT CGC TCC AC-3'.

Oba zmíněné referenční markery si jsou podobné svou zakonzervovaností, a proto by se patrně dalo uvažovat i o jejich použití ve výzkumu telomer ptáků.

3.3 VMEZEŘENÉ TELOMERICKÉ SEKvence (ITS)

Analýzu délky telomerických sekvencí může zkomplikovat fakt, že sekvence typické pro telomery (u obratlovců TTAGGG) se nemusí vyskytovat pouze na koncích, ale i kdekoli uprostřed chromozomů. Tyto repetitivní sekvence, jež jsou k nalezení uvnitř chromozomů, bývají označovány jako vmezeřené telomerické sekvence (interstitial telomeric sequences – ITS). Jako ITS tedy bývají označovány všechny sekvence s telomerickým motivem mimo těch, které se vyskytují na koncích chromozomů a v oblasti centromery (Nanda et al., 2002). Bylo vytvořeno mnoho hypotéz, které se snaží osvětlit příčinu vzniku ITS (Lin and Yan, 2008). Obecně se soudí, že jejich přítomnost je známkou v minulosti proběhlé chromozomální fúze. Další možností je, že se jedná o výsledek různých opravných mechanismů telomerázy (např. po dvouvláknovém zlomu). Nabízí se i hypotéza, že ITS vznikají sklouznutím DNA polymerázy při syntéze DNA. Délka ITS navíc není úplně zanedbatelná, může se pohybovat od jednotek až po stovky kb (Lin and Yan, 2008).

Fenomén ITS je podle všeho poměrně rozšířený. ITS byly totiž popsány nejenom u živočichů, ale i u některých druhů vyšších rostlin, např. bob obecný – *Vicia faba* (Fuchs et al., 1995). Kromě ptáků byly intersticiální telomerické sekvence prokázány i u jiných taxonů, jmenovitě u vačnatých savců - Marsupialia (Metcalf et al., 1997) nebo u kostnatých ryb – *Teleostei* (Pomianowski et al., 2012). U kostnatých ryb se o ITS uvažovalo jako o případných cytogenetických markerech pro určení rodičovských chromozomů v hybridních organismech nebo ve studiích zabývajících se evolucí chromozomu u sivenů – *Salvelinus* (Pomianowski et al., 2012). Genom ptáků se obvykle vyznačuje značným obsahem ITS, množství těchto vmezeřených telomerických sekvencí se může lišit dle taxonu. Genom běžců (Palaeognathae) zpravidla obsahuje vysoký obsah ITS (Nanda et al., 2002).

Stejná studie poukázala na to, že po divergenci Palaeognathae a Neognathae došlo k postupnému snižování množství ITS v genomu. Autoři považují za pravděpodobné, že tyto nepotřebné sekvence byly během evoluce odstraněny. Zvláštností je také absence ITS na Z chromozomu,

kteřá je vysvětlována zakonzervováním tohoto chromozomu v průběhu evoluce. U velké části pčvců (resp. u většiny jedinců daného druhu) délka koncových telomer převažuje nad délkou vmezeřených telomerických sekvencí (Foote et al., 2013). Výjimkou z tohoto pozorování je např. zebřička pestrá nebo vlaštovka obecná (Foote et al., 2013). Délka ITS se liší nejenom mezidruhově, ale i mezi jedinci daného druhu (Foote et al., 2013). Z délky koncových telomer tak pravděpodobně nejsme schopni usoudit množství ITS ve zbytku genomu.

Je dobré si uvědomit, že v praxi existence ITS přímo ovlivňuje výsledky studií zabývajících se stanovením nebo změnou délky telomer. Délka ITS se může pohybovat od jednotek až po stovky kb (Lin and Yan, 2008). Existence těchto intersticiálních telomerických sekvencí tak komplikuje stanovení (relativní) délky telomer u metod, v jejichž výsledku jsou obsaženy i ITS (qPCR, TRF pomocí Southernovy hybridizace, The dot blot telomere assay). Tyto metody totiž nejsou schopné rozlišit telomerické sekvence objevující se na konci chromozomů od těch vyskytujících se uvnitř. Ačkoliv délka ITS nemusí být větší než délka samotných telomer, měla by být jejich existence brána v úvahu.

Bohužel až na výjimky (Atema et al., 2015) bývá přítomnost ITS v genomu ve studiích zaměřených na dynamiku telomer u ptáků opomíjena, a to i přesto, že na tento problém bylo v minulosti upozorněno v jednom z klíčových metodických článků o analýze telomer pomocí qPCR (Criscuolo et al., 2009). Přitom existují jasné příklady, kdy přítomnost rozsáhlých ITS komplikovala stanovení délky telomer, např. u modelového organismu háďátka obecného – *Caenorhabditis elegans* (Cheung et al., 2004). Posun ve výzkumu telomer háďátka přinesla až metoda STELA (o níž zmíním více později), která měří pouze koncové telomerické sekvence.

Vzhledem k rozdílnému množství ITS u různých druhů by bylo vhodné podobný postup použít, měříme-li telomerické sekvence pomocí qPCR u nového modelového organismu, jehož genom z hlediska množství ITS neznáme. Tento postup by zároveň umožnil objasnit variabilitu v délce ITS mezi jedinci daného druhu. Je zřejmé, že výrazná variabilita v množství ITS mezi jedinci (podobně jako situace, kdy množství ITS převažuje nad koncovými telomerickými sekvencemi), by mohla negativně ovlivnit výsledky pozdějších analýz a vést k nepříliš relevantním výsledkům. Nakolik budou výsledky ovlivněny přítomností ITS souvisí tedy s variabilitou délky ITS mezi jedinci studovaného druhu a také tím, zda studujeme plošně populaci, nebo se zajímáme o jedince v rámci časového úseku. Vzhledem k tomu, že délka ITS se patrně během života nemění, tak studium změny délky telomer u jednotlivce by ovlivněno být nemělo. Mezi metody schopné rozlišit koncové od ITS patří např. STELA, analýza TRF In-gel hybridizací, Q-FISH anebo metoda Flow-FISH (Nussey et al., 2014). I z tohoto důvodu se budu v následující kapitole věnovat dalším metodám, kterými lze stanovit délku telomer.

4 DALŠÍ METODY POUŽÍVANÉ PRO STANOVENÍ DÉLKY TELOMER

Metod, kterými lze stanovit relativní nebo absolutní délku telomerických sekvencí je celá řada (Aubert et al., 2012; Nussey et al., 2014). Před rozšířením metody qPCR se hojně využívala analýza terminálních restrikčních fragmentů – TRF (Goehring et al., 2014). Při výběru metody je důležité si uvědomit, že každá z běžně používaných metod má své výhody i úskalí. Umíme-li určit délku telomer, můžeme se pokusit určit biologické stáří jedince v divoké populaci (Vleck et al., 2003). Pokud měříme změnu délky telomer za časovou jednotku, lze studovat vliv různých faktorů na rychlost zkracování, popř. prodlužování telomer (Asghar et al., 2015; Stier et al., 2015; Sudyka et al., 2016; Watson et al., 2015).

Některé metody viz TRF (Terminal restriction fragment) stanoví délku telomer absolutně v jednotkách bp. Délka telomerických sekvencí stanovená absolutně poskytuje vědcům možnost porovnávat výsledky různých studií mezi sebou (Kimura et al., 2010). Jiné metody (např. qPCR) určují délku telomer relativně pomocí poměru T/S (telomere/single copy gene), jedná se o poměr počtů opakujících se kopií telomer ku množství kontrolního genu. Je proto zcela zásadní, aby se kontrolní gen vyskytoval v genomu pouze v jedné kopii (Cawthon, 2002; Criscuolo et al., 2009). Relativně, pomocí intenzity fluorescence, jsou vyjádřeny i výsledky získané z měření pomocí metody Flow-FISH (Kimura et al., 2010). V dalších podkapitolách budou tyto metody probrány podrobněji.

4.1 TRF

TRF je metoda zabývající se rozbořem terminálních restrikčních fragmentů (Terminal Restriction Fragment Assay). Odhady průměrné délky telomer získané pomocí této metody jsou mnohými považovány za zlatý standard. (Criscuolo et al., 2009; Goehring et al., 2014). Jednou z příčin pro toto přizvisko patrně bude schopnost metody udávat výsledky v absolutních číslech, tj. v kb. Dalším důvodem pro toto označení může být fakt, že přesnost dosažených výsledků ostatních používaných metod je obvykle stanovena právě porovnáním s TRF (Carbonari et al., 2014; Criscuolo et al., 2009; Gutierrez-Rodrigues et al., 2014).

Tato metoda má však i svá úskalí, které byly okrajově zmíněny již v předchozí kapitole. Celková časová náročnost je důsledkem mnohahodinových dílčích kroků především pak doba působení restrikčních enzymů a samotná hybridizace. Výsledná stanovená délka telomer může být ovlivněna několika faktory:

- (a) zda použité restrikční enzymy štípou DNA před nebo v subtelomerické oblasti,
- (b) jakou cestou jsou zpracovány fragmenty (např. Southernova hybridizace započítává i ITS).

I přes tyto nevýhody patří metoda založená na analýze TRF k hojně využívaným v oblasti výzkumu změny délky telomer. Další překážkou (především u drobných druhů) je nutnost relativně velkého vzorku DNA (více jak 3 µg).

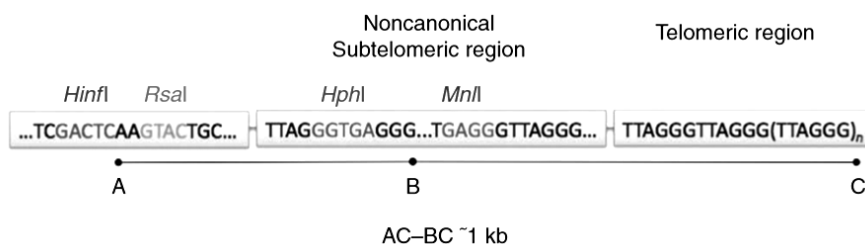
Metoda TRF se skládá z několika klíčových kroků, které zde budou zmíněny pouze ve zkratce a podrobněji budou rozebrány v následujících podkapitolách.

- (1) Pomocí restrikčního enzymu, který nezasahuje do telomerických sekvencí, je gDNA naštípána na jednotlivé fragmenty.
- (2) Získané telomerické fragmenty jsou separovány dle velikosti pomocí agarózové elektroforézy.
- (3) K detekci dochází za přítomnosti značené sondy buď cestou in-gel hybridizace, nebo Southernovou hybridizací.
- (4) Stanovení délky telomer je provedeno na základě obrazové analýzy skvrn ze získaných gelů (Nussey et al., 2014).

4.1.1 SOUTHERNOVA HYBRIDIZACE

Pro provedení rozboru TRF pomocí Southernovy hybridizace jsou potřeba minimálně 3 µl DNA, která je získána vyizolováním ze vzorku tkáně např. fenol-chloroformovou metodou (Kimura et al., 2010). Koncentraci a čistotu DNA lze zkontrolovat pomocí spektrofotometrie. Zda je získaný vzorek vhodný pro další postup, je ověřeno pomocí gelové elektroforézy, která dokáže odhalit případnou degradaci nukleových kyselin. Klíčovým krokem je naštípání DNA na fragmenty.

Metoda TRF využívá skutečnosti, že v telomerických oblastech se nenachází oblast, kde by použitá restrikční exonukleáza mohla DNA přerušit. Telomery tak i po působení restrikčních enzymů tvoří nefragmentované dlouhé úseky, zatímco zbytek genomu je fragmentován na malé kousky. Právě na základě odlišné velikosti fragmentu lze telomery odlišit od jiných fragmentů. Kombinace restrikčních enzymů *HinfI* a *RsaI* je nejobvyklejší. Další užívanou alternativou je kombinace *HphI* a *MnII*, která přestřihne DNA v subtelomerické oblasti, a proto při použití těchto restrikčních enzymů získáme fragmenty o něco kratší (cca 1 kb) (Kimura et al., 2010). Pro lepší představu je oblast působení restrikčních enzymů zobrazena na obr. č. 6. Dalším využívaným restrikčním enzymem je např. *HaeIII* (Cawthon, 2002, 2009)



Obr. 6 – Oblasti působení restrikčních enzymů při použití metody TRF pomocí Southernovy hybridizace; dle Kimura a kol. (2010)

Rozstříhaná gDNA je poté podrobena elektroforéze na agarózovém gelu. Pozornost je třeba také věnovat vytvoření vhodného souboru standardů, s jehož pomocí bude možné stanovit délku telomerických fragmentů. Tyto standardy se skládají z fragmentů o známé délce pokrývající rozsah o velikosti 3-20 kb. Po skončení elektroforézy, je DNA převedena z gelu na membránu a následně dochází k hybridizaci při teplotě 65 °C. K hybridizaci se využívá sonda sestávající se z (TTAGGG)₃/(CCCTAA)₃ a která je značena digoxigeninem. Sonda je po hybridizaci detekována pomocí protilátky a chemiluminiscencí. Někdy je navíc možné sondu označit i radioaktivním izotopem (např. ³²P). Vzhledem k množství zpracovávaných vzorků je třeba zvážit případné bezpečnostní otázky.

Vizualizace proběhne vyvoláním membrány na rentgenový film. Hotový film je skenován denzitometrem, který změří absorbanci (kolik světla zvládne pohltit daný vzorek). Z digitalizovaného snímku se spočítá délka telomerických fragmentů. Využívá se obraz zpracovávající software, který vytvoří graf každé TRF skvrny. Graf zaznamenává vztah mezi hodnotami optické denzity a vzdálenostmi, kterou DNA urazí. Pak je pomocí vzorce:
$$\text{Mean TRF Length} = \frac{\sum ODi}{\sum MWi}$$
 spočítána průměrná délka fragmentů (Kimura et al., 2010), kde *ODi* značí optickou densitu v bodě *i* a *MWi* je zkratkou pro délku TRF v pozici *i*. Další možností jak stanovit délku telomer je s pomocí standardu.

Jednoznačnou nevýhodou tohoto postupu je skutečnost, že výsledná délka obsahuje i délku ITS (Foote et al., 2013). Další nepříznivou skutečností této metody je její časová náročnost. Celkové provedení TRF cestou Southernovy hybridizace včetně extrakce DNA trvá sedm dní (Kimura et al., 2010).

4.1.2 IN-GEL HYBRIDIZACE

Na rozdíl od Southernovy hybridizace se pro nastříhání DNA na fragmenty obvykle používá kombinace více restrikčních enzymů, např. *HinfI*, *HindIII*, *MspI* nebo *HinfI*, *RsaI* a *HaeIII* (Atema et al., 2015; Foote et al., 2013).

Zásadní rozdíl oproti předchozímu způsobu analýzy TRF spočívá ve zpracování gelu po vyhotovení elektroforézy. Gel je vysušen a v tomto stavu při teplotě 37 °C dochází k hybridizaci (Criscuolo et al., 2009; Haussmann and Mauck, 2008). K té se využívá sonda (CCCTAA)₄ značená radioaktivním izotopem ³²P (Haussmann et al., 2003a). Získané signály jsou poté vizualizovány pomocí fosforového zobrazení. Délka telomerických sekvencí je stanovena ze získaných skvrn pomocí softwaru (např. Totallab) podobným způsobem jako u předchozí techniky (Criscuolo et al., 2009).

Zřejmě nejzásadnější výhodou této metody je, že výsledkem je stanovení délky telomerických sekvencí, které nezahrnují délku ITS (Foote et al., 2013). DNA totiž není v průběhu denaturovaná

(hybridizace probíhá při nízké teplotě) a sonda se tudíž chytí pouze 3' přesahu úplného konce chromozomu (Criscuolo, Haussmann ad Mauck 2008).

4.2 Q-FISH

Q-FISH je zkratka odvozená z anglického quantitative fluorescence in situ hybridization. Jedná se, jak již název napovídá, o cytogenetickou metodu vycházející z fluorescenční hybridizace in situ (FISH). Metoda byla původně vyvinuta pro zkoumání telomer obratlovců (Lansdorp et al., 1996). Q-FISH se v současnosti využívá především ke stanovení délky telomer. Kvantifikace signálu telomerických sekvencí je provedena s pomocí fluorescenčně značené PNA (peptide nucleic acid). Další možností, kde je možné Q-FISH aplikovat, je stanovení délky ITS u druhů, kde délka ITS převažuje nad délkou koncových telomerických sekvencí, např. křečík čínský – *Cricetus griseus* (Sanchez et al., 2009). Své uplatnění našla Q-FISH především v medicíně. Nedávno byla Q-FISH využita i v lidské medicíně při studiu telomer choriových klků v případech plodů trpících nitroděložní růstovou retardací (Toutain et al., 2016).

Typickým rysem Q-FISH je využití PNA (Ferlicot et al., 2003; Lansdorp et al., 1996; Poon et al., 1999; Toutain et al., 2016). Jedná se o fluorescenčně značenou oligonukleotidovou sonda (CCCATT)₃, jež detekuje telomerické sekvence. Sonda je značena s pomocí cyaninu Cy3 (Ferlicot et al., 2003; Poon et al., 1999; Samassekou et al., 2014; Wong and Slijepcevic, 2004) anebo je využito značení s FITC – fluorescein isothiocyanate (Lansdorp et al., 1996). Klasické nukleové kyseliny (DNA, RNA) jsou tvořeny nabitou cukr-fosfátovou kostrou. U DNA je cukr zastoupen deoxyribózou, u RNA je pentózou ribóza. Oproti tomu kostra PNA je nenabitá a skládá se z jednotek z N-(2-aminoethyl)-glycinu vazbou (Lansdorp et al., 1996). Použitím PNA oligonukleotidů je zajištěna účinnější hybridizace.

Pro aplikaci metody Q-FISH je třeba mít k dispozici tkáňové anebo častěji buněčné kultury (Ferlicot et al., 2003; Lansdorp et al., 1996; Toutain et al., 2016; Wong and Slijepcevic, 2004). Při využití tkáňových kultur pro metodu Q-FISH je dobré mít na paměti, že mezi jednotlivými buňkami v tkáni panuje značná heterogenita v délce telomerických sekvencí. Nižší účinnost proniknutí sondy do tkáňového vzorku je další důležitý aspekt, na který by měl být brán ohled (Ferlicot et al., 2003). Obvykle se využívají buňky, které byly zablokovány během metafáze (Lansdorp et al., 1996; Poon et al., 1999; Samassekou et al., 2014; Wong and Slijepcevic, 2004).

Postup při Q-FISH sestává z přípravy vzorku, pořízení a analýzy obrázku a nakonec ze stanovení a kalibrace délky telomer (Poon and Lansdorp, 2001). Základním předpokladem při vyhodnocování výsledků Q-FISH je, že délka telomer koreluje s intenzitou fluorescence vytvořené pomocí značené PNA, z čehož můžeme vyvodit délku telomery (Lansdorp et al., 1996; Poon et al., 1999). Výsledky měření mohou být vyjádřeny v jednotkách AUF - arbitrary units of fluorescence (Sanchez et al., 2009).

K zastavení buněčného cyklu v metafázi se zpravidla využívá kolcemid (Lansdorp et al., 1996; Samassekou et al., 2014; Toutain et al., 2016; Wong and Slijepcevic, 2004). Buňky, popřípadě tkáně jsou poté zafixovány. Následuje propláchnutí roztokem fosfátového pufru (PBS – Phosphate Buffer Saline). Fixace a proplachování fosfátovým pufrem se zpravidla opakuje vícekrát. Poté se přidává hybridizační směs obsahující fluorescenčně značenou sondu. Chromozomální DNA je denaturována za teploty 80 °C a poté dochází k hybridizaci DNA a PNA za teploty 30 °C (Poon and Lansdorp, 2001; Samassekou et al., 2014). Po ukončení hybridizace je vzorek promyt citrátovým pufrem (SSC), vysušen a po přidání antifade solution s obsahem DAPI je překryt krycím sklíčkem.

Snímky jsou obvykle pořízeny fluorescenčním mikroskopem s CCD kamerou (Charge Couple Device), jež na základě dopadajících fotonů vytvoří výsledný obraz (Samassekou et al., 2014). Výsledné snímky jsou analyzovány za pomoci image softwaru, např. TFL-Telo software (Wong and Slijepcevic, 2004). Kalibrace probíhá dle tzv. fluorescent beads (jedná se o objekty různých velikostí, které byly pořízeny ještě před snímky analyzovaných vzorků) a pomoci plazmidů nesoucí známý počet telomerických sekvencí (Poon et al., 1999; Wong and Slijepcevic, 2004).

Výhodou této metody je, že dokáže měřit délku telomer v jednotlivé buňce. To se týká, jak jednotlivých ramének chromozomů, tak každé ze čtyř přítomných telomer na chromozomu. Díky tomu můžeme porovnávat různé buňky i jednotlivé chromozomy v dané buňce (Lansdorp et al., 1996). Další předností Q-FISH je, že k jejímu provedení stačí pouze několik desítek buněk (Poon et al., 1999). Hlavním omezením pro používání této metody je potřeba buněčných kultur. To může být limitujícím faktorem, sbíráme-li vzorky v terénu. Navíc je nutné pracovat s buňkami v metafázi. Q-FISH je mimo to náročná i z technologického hlediska. Je třeba si uvědomit, že naměřené hodnoty fluorescence mohou kolísat v závislosti na různých faktorech, což se ukázalo v případech, kdy fluorescence byla měřena více dní po sobě (Poon et al., 1999). Rozdíly v intenzitě fluorescence mohou být artefaktem plynoucím z protokolu Q-FISH. Měříme-li intenzitu fluorescence na chromozomech v metafázi, odlišné hodnoty intenzity fluorescence totiž mohou odrážet rozdíly v míře chromozomální kondenzace (Wong and Slijepcevic, 2004).

4.3 FLOW-FISH

Flow-FISH je metoda založená na fluorescenční hybridizaci in-situ, která vznikla upravením stávající metody Q-FISH. Na rozdíl od Q-FISH je ke změření fluorescence využita průtoková cytometrie (Baerlocher et al., 2006). Pro provedení Flow-FISH není potřeba mít k dispozici buňky v metafázi, což je další věc odlišující tuto metodu od Q-FISH (Keyvanfar et al., 2012). Naopak shodným rysem s Q-FISH je použití PNA sondy. Ta je zpravidla značená fluorochromy: cyaninem Cy5 anebo fluoresceinem (Baerlocher et al., 2006; Carbonari et al., 2014).

Pokud jsou zkoumány např. DNA viry, lze použít i DNA sondu značenou digoxigeninem (Manaresi et al., 2015).

Klíčovým krokem je kalibrace průtokového cytometru, která se děje pomocí fluorescenčně obarvených kalibračních mikrokuliček o různých velikostech (Baerlocher et al., 2006). Kalibrace probíhá pro každý fluorescenční kanál – vynáší se vrchol intenzity fluorescence, kterého dosáhnou jednotlivé velikostní skupiny mikrokuliček, proti ekvivalentním MESF (Molecules of equivalent soluble fluorochrome) hodnotám dodaným od výrobce.

Z živých buněk, které chceme podrobit měření, je třeba vytvořit suspenzi. Buňky jsou nejprve fixovány. Dále je provedena permeabilizace membrány (Keyvanfar et al., 2012; Manaresi et al., 2015). Nukleové kyseliny jsou vázány příslušnými barvami a v případě potřeby mohou být buňky označeny i protilátkami. Fluorescenčně značená PNA sonda hybridizuje s telomerickými sekvencemi podobně jako u Q-FISH. Do suspenze lze také přidat kontrolní buňky (např. hovězí thymocyty, jejichž telomery jsou podstatně delší než ty lidské).

Suspenze buněk je poté analyzována s pomocí průtokové cytometrie (Baerlocher et al., 2006). Získaná data jsou poté zpracována patřičným softwarem (např. Cell Quest pro Software) (Manaresi et al., 2015). Zpracovaná data lze prezentovat ve formě dot-blotu. Výsledky měření se udávají v relativních hodnotách dle intenzity fluorescence (Kimura et al., 2010). Výsledky měření však lze převést i na jednotky kb. K tomu obvykle potřebujeme kontrolní buňky ve formě např. hojně využívaných hovězích thymocytů, jejichž délka telomer je známá (Baerlocher et al., 2006; Weidner et al., 2014).

Výhodou této metody je, že odpadá nutnost připravit buňky v metafázi. Flow-FISH je také citlivější a více specifická než qPCR, což je patrně důvodem, proč je tato metoda s oblibou využívána v medicíně (Gutierrez-Rodrigues et al., 2014). Jedním z příkladů je použití Flow-FISH pro identifikaci buněk s chromozomální abnormalitou (částečná ztráta na 7q) u pacientů s myelodysplastickým syndromem (Keyvanfar et al., 2012).

Další příhodnou vlastností Flow-FISH je, že umožňuje zkoumat najednou velké množství jednotlivých buněk. To například napomáhá při snaze objasnit replikační cyklus lidského parvoviru B19, pro který je složité nalézt buněčnou linii, již by ochotně infikoval (Manaresi et al., 2015). Využije-li se barvení buněk pomocí protilátek, můžeme studovat více různých buněčných typů naráz.

U pacientů trpících vrozeným selháním kostní dřeně nebo dyskeratosis congenita se pomocí Flow-FISH studovaly rozdíly v délkách telomer mezi jednotlivými druhy onemocněními. Metoda byla aplikována na šesti typech lymfocytů (Alter et al., 2015). Nutnost pracovat s živými buňkami představuje jedno z omezení této metody. Zároveň je i vysvětlením, proč je tato metoda používána především při výzkumu lidských chorob. Veškeré procedury nutné k přípravě buněk jsou jistým

omezením pro aplikaci metody pro výzkumy, u kterých byly vzorky získány v terénu. Je-li použita metoda Flow-FISH, je také nutné mít přístup průtokovému cytometru.

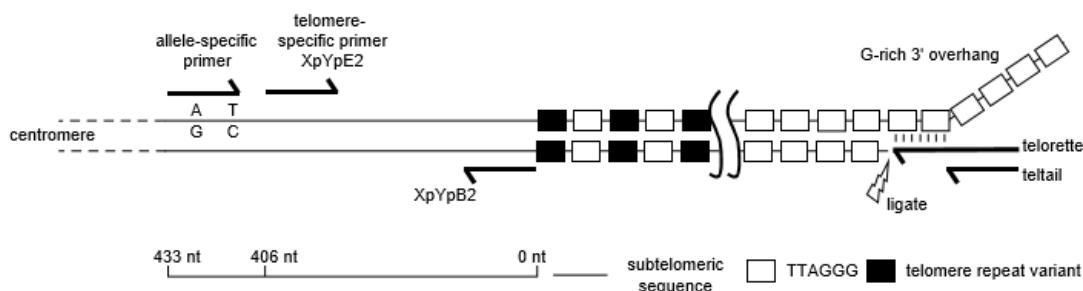
4.4 STELA

Single telomere length assay neboli STELA je metoda založená na PCR. Slouží k měření jednotlivých telomer na dílčích chromozomech. Zpočátku STELA sloužila k měření krátkých ramének lidských gonozomů (XpYp) ve fibroblastech (Baird et al., 2003). Posléze tato metoda umožnila i měření délky telomer na dalších lidských chromozomech, např. 17p (Baird et al., 2003; Lin et al., 2010).

Metoda našla využití i v klinické onkologii, protože dokáže měřit velice krátké či dysfunkční telomery, které se v maligní tkáni s postupujícím onkologickým onemocněním (např. chronická lymfocytární leukémie) stávají čtenějšími (Lin et al., 2010). S pomocí této metody lze též stanovit prognózu u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (Lin et al., 2014).

Upravením metody, především použitých teloret (jednořetězcový oligonukleotid částečně komplementární k telomerickým sekvencím, viz níže) a primerů, umožnilo posun ve výzkumu telomer u modelového organismu hádátka obecného (Cheung et al., 2004). Metoda byla adaptována na levé raménko chromozomu V. Použití jiných metod (TRF, Q-FISH) bylo komplikováno přítomností vmezeřených telomerických sekvencí.

STELA pro své fungování využívá jednořetězcového oligonuklotidu (tzv. „teloretta“). Zpravidla je prvních sedm bází teloretty komplementární k motivu sekvence telomer (zde TTAGGG). Následuje tzv. „ocásek“ – sekvence skládající se z dvaceti nukleotidů, které nejsou komplementární k oblasti bohaté na guanin na 3' přesahu (Baird, 2004). Princip metody spočívá v tom, že teloretta se naváže na 5' konec cytosin bohatého řetězce. Ligaci ke guanin bohaté oblasti na základě komplementarity zajistí 3' konec teloretty. K ocásku teloretty je komplementární primer pro PCR (tzv. „telotail“). Další primer, který je chromozomálně specifický, se nachází v subtelomerické oblasti. Tento primer může být v případě potřeby specifický i na úrovni jednotlivých alel. Pro názornost je tento princip zobrazen na obr. č. 7. Poté proběhne samotná PCR (obvykle 9-18 cyklů).



Obr. 7 – Princip metody STELA; převzato a upraveno z Baird a kol. (2003)

K detekci DNA fragmentů je použita Southernova hybridizace. DNA fragmenty jsou nejprve separovány pomocí elektroforézy na agarózovém gelu, a poté hybridizovány s pomocí radioaktivně značené sondy. Sondy (získané PCR mezi primery ze subtelomerické oblasti) jsou obvykle značeny radioaktivním izotopem fosforu ^{32}P . Dalším krokem je výpočet molekulové hmotnosti DNA fragmentů (Baird et al., 2003; Cheung et al., 2004; Lin et al., 2010).

Jednoznačnou výhodou této metody je, že dokáže měřit i velmi krátké telomery. Díky tomu můžeme studovat senescentní buňky. Navíc oproti jiným metodám (TRF, qPCR, Q-FISH) STELA elegantně řeší problém s intersticiálními telomerickými sekvencemi (ITS), neboť se zabývá konkrétními konci chromozomů, a tudíž výsledek měření délky telomerických sekvencí ITS neovlivní. K provedení analýzy stačí pouze malý vzorek DNA (obvykle méně než 20ng) (Baird et al., 2003; Lin et al., 2014; Sedivy et al., 2003).

Metoda STELA je však jen problematicky aplikovatelná na jiné než modelové druhy organismů. Abychom totiž mohli tuto metodu použít, musíme dobře znát genom organismu (nebo alespoň sekvence na koncích chromozomů), na který chceme metodu aplikovat. STELA vyžaduje znalost sekvence oblastí přilehlých k telomerám, aby bylo možné navrhnout potřebné specifické primery. Genom některých druhů ptáků obsahuje množství vmezeřených telomerických sekvencí (ITS), a proto by STELA mohla být vhodnou metodou ke stanovení délky telomer (Foote et al., 2013). Důvodem, proč se STELA ke stanovení délky telomer nepoužívá, by mohla být náročnost metody na množství potřebných primerů.

4.5 THE DOT BLOT TELOMERE ASSAY

Tato metoda byla vyvinuta v roce 2011 (Kimura and Aviv, 2011). Jako standard se využívá vzorek, jehož délka byla stanovena metodou TRF za využití Southernova blotu. Telomery jsou na vyizolované DNA hybridizovány sondou, která je značená digoxigeninem. Ten umožní pozdější detekci telomerických sekvencí. Následně je u všech vzorků stanovena koncentrace přítomné DNA pomocí spektrofotometrie. Připravené vzorky se převedou na membránu pomocí metody UV-crosslink. S membránou je poté dále manipulováno. Nejvýznamnějším krokem je použití fluorescenční barvy a detekce fluorescenčního signálu. S pomocí standardního vzorku stanovíme množství DNA ve vzorcích. Digoxigenin je detekován luminiscencí a exponován na rentgenový film. Množství TTAGGG opakování (sekvence telomer) spočítáme ze standardního vzorku.

Nespornou výhodou této metody je, že k jejímu provedení potřebujeme poměrně malé množství DNA (cca 20 ng/vzorek). Oproti jiným metodám je analýza telomer pomocí dot blotu finančně nenáročná a snadná na provedení (Kimura and Aviv, 2011). Přestože bývá tato metoda občas zmíněna jako možná alternativa, v praxi se patrně příliš nevyužívá. Také je třeba si uvědomit, že metoda dot blotu využívá standard získaný pomocí TRF cestou Southernova blotu, a tudíž ve výsledné délce telomer jsou obsaženy i sekvence ITS. V současné době jsou ke stanovení délky

telomer využívány ostatní metody. Vzhledem k nedostatku výsledků získaných analýzou telomer pomocí dot blotu, nelze v současnosti tuto metodu kriticky zhodnotit.

5 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ DYNAMIKU ZKRACOVÁNÍ TELOMER U PTÁKŮ

Zkracování telomer bylo dáno do souvislosti se stárnutím a jeho tempo patrně může být ovlivněno různými faktory (genetické dispozice, environmentální podmínky, stres, výběr zimoviště nebo třeba reprodukce). Díky tomu se nabízí mnoho podnětů pro další výzkum. Ačkoliv zpočátku měla schopnost stanovit délku telomer vést k odhadu věku jedince (Hausmann and Vleck, 2002), v současnosti vědci spíše zkoumají změny v délce telomer, jejich příčiny a také důsledky pro daný organismus.

Variabilita v délce telomer mezi jedinci stejného druhu může být způsobena různými faktory:

- (1) odlišnou počáteční délkou telomer,
- (2) různou mírou zkracování telomer během života a
- (3) procesy vedoucími k údržbě telomerických sekvencí v průběhu života (Bischoff et al., 2005).

Všechny tyto aspekty mohou být přitom ovlivněny jak geneticky, tak i environmentálními podmínkami (Monaghan et al., 2008). V následujících podkapitolách práce se budu věnovat nejvíce studovanými příčinami zkracování délky telomer u ptáků. Přestože se telomery volně žijících ptáků začaly ve velkém studovat poměrně nedávno, téma stárnutí je velmi přitažlivé, a proto je k dispozici dostatečný počet studií především z několika posledních let, kdy tento směr výzkumu zaznamenal velký rozmach.

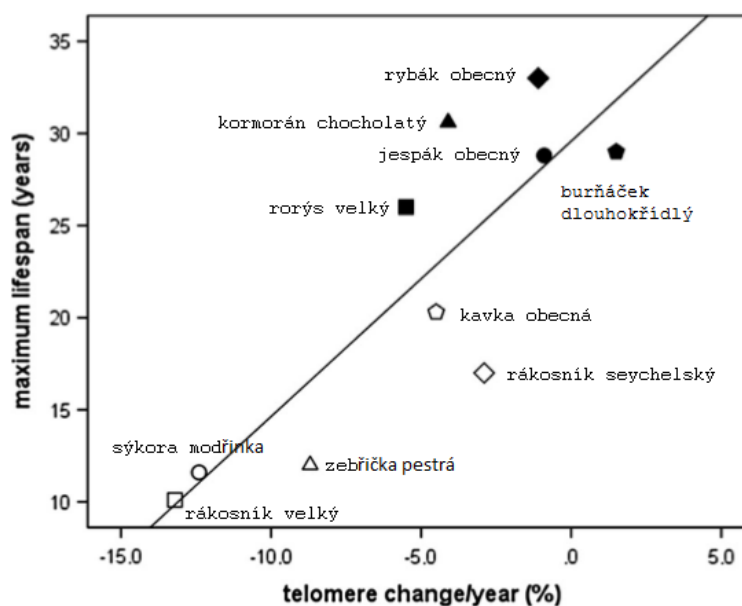
5.1 RYCHLOST DEGRADACE TELOMER V ZÁVISLOSTI NA MAXIMÁLNÍ DÉLCE ŽIVOTA DANÉHO DRUHU

Souvislost mezi rychlostí degradace telomer a délkou života daného druhu se zabývala průřezová studie kolektivu autorů kolem polské vědkyně J. Sudyky (Sudyka et al., 2016). Ve studii byla, kromě vlastních výsledků z výzkumu sýkory modřinky, použita i data z již existujících studií zabývajících se jinými druhy ptáků (celkově bylo do souhrnné studie zahrnuto 10 druhů). Mezi nimi se vyskytovali zástupci dlouho žijících ptáků (např. rybák obecný – *Sterna hirundo*, jenž se může dožít věku přes 25 let) ale i druhů, které nedosahují vysokého věku (např. rákosník velký dosahující maximálního věku kolem devíti let).

Nejvýraznější míra zkracování telomer za rok byla zjištěna právě u rákosníka velkého anebo např. u sýkory modřinky. Telomery rychleji degradovaly i u zebřičky pestré. Zmíněné druhy jsou

drobné a vyznačují se kratší maximální délkou života. Oproti tomu nejmenší ztráta telomer byla zjištěna u rybáka obecného a jespáka obecného (*Calidris alpina*), což jsou oba druhy robustnější a dlouho žijící. U burňáčka dlouhokřídlého výsledky z předchozí použité studie naznačovaly, že může docházet dokonce k prodlužování telomer (Hausmann et al., 2003b). Zda je tento výsledek relevantní není jisté, poněvadž věk studovaných ptáků nebyl přesně znám. Tyto výsledky přehledně zobrazuje obr. č. 8. Výsledky studie naznačují, že rychlost degradace telomer souvisí s maximální délkou života u jednotlivých druhů (Sudyka et al., 2016).

Ačkoliv autoři do průřezové studie zahrnuli pouze výzkumy, kde nebylo s ptáky experimentálně manipulováno, nebyla už brána v úvahu rozmanitost použitých metod. Některé dílčí studie byly provedeny s pomocí metody TRF (Salomons et al., 2009), na jiné (včetně vlastního výzkumu kolektivu vědců okolo J. Sudyky) byla aplikována metoda qPCR (Barrett et al., 2013). Je tedy pravděpodobné, že dílčí výsledky se liší v obsahu zahrnutých sekvencí, jako jsou vmezežené ITS nebo subtelomerické sekvence, které neleží na koncích chromozomů a nemají tedy žádný vliv na buněčné stárnutí.



Obr. 8 – Graf změny délky telomer za rok vs. maximální délky života pro jednotlivé druhy ptáků; převzato a upraveno dle Sudyka a kol. (2016)

Tyto závěry byly potvrzeny i další průřezovou studií, která kromě ptáků (Aves) rozšířila svůj zájem i na jiné taxony – mlže (Bivalvia), paprskoploutvé ryby (Actinopterygii), plazy (Reptilia) a savce (Mammalia) (Dantzer and Fletcher, 2015). Tato studie, narozdíl od té předešlé, rozlišovala použitou metodiku, tj. relativní hodnoty délky telomer (získané metodou qPCR) od těch absolutních (naměřených metodou TRF). Výsledky nasvědčují tomu, že druhy s menší mírou zkracování telomer se dožívají vyššího maximálního věku.

5.2 DÉLKA TELOMER JAKO DĚDIČNÁ ZÁLEŽITOST

Dědičnost délky telomer není příliš objasněnou záležitostí. Přesto je podstatná pro pochopení vlivu selekce na zkracování telomer, a tím i stárnutí organismů na buněčné úrovni. I proto se např. Els Atema s kolegy (2015) snažila přijít na to, jak velkou roli hraje dědičnost v délce a míře zkracování telomer u modelového druhu pěvce, zebříčky pestré (Atema et al., 2015). Ve zmíněné studii byli zkoumáni pouze jedinci žijící v chovech. Aby byl odfiltrován vliv prostředí na zkracování a délku telomer, byl u 75 % mláďat ve věku čtyř dnů proveden tzv. cross-fostering (přemístění do jiného hnízda). Dědičnost byla stanovena za pomoci tzv. animal modelu, který využívá rodokmenu jednotlivce k ustanovení dědičnosti. Další využitý model počítá vnitroskupinovou korelaci a dědičnosti u sourozenců (vlastních i nevlastních), aby mohl být zjištěn vliv efektu rodičů. Ačkoliv výsledky naznačují, že existuje podobnost v délce telomer u příbuzných jedinců, nelze jednoznačně říci, jestli je příčinou dědičnost nebo spíše vliv prostředí (environmentální faktory).

Další studie zabývající se dědičností délky telomer byla provedena u populace skorce vodního (*Cinclus cinclus*), kde vědci měli k dispozici dlouhodobá data, která posloužila k vytvoření rodokmenu pokrývajícího 15 generací (Becker et al., 2015). Cílem bylo studovat celé rodiny ptáků. Přestože výsledky naznačují existenci jisté souvislosti mezi relativní délkou telomer matky a jejich potomků, míra dědičnosti je nízká. Rozdílnost délky telomer se nedala uspokojivě vysvětlit ani maternálním nebo paternálním imprintingem, či pohlavně vázanou dědičností. Autoři se nakonec spíše přiklonili k názoru, že hlavní vliv na délku telomer má prostředí, nikoliv genetické vloh.

Celkově vzato víme o případné dědičnosti telomer velice málo. Existující studie se spíše zabývají analýzou RTL (relative telomere length) u příbuzných jedinců a nejčastěji jsou prováděny na lidech. Zde závěry naznačují, že jednovaječná dvojčata mají ve stáří podobnou délku telomer (Bischoff et al., 2005). Tento výsledek však může být do jisté míry ovlivněn skutečností, že dvojčata zpravidla vyrůstala v dětství ve stejném prostředí. Také byla objevena jistá podobnost v rodinách dosahujících vysokých věků, kde potomci takového rodiče měli delší telomery než jejich bratraci a sestřenice (Honig et al., 2015). Situaci navíc dále komplikuje to, jakým způsobem dochází ke zpracování dat (především výběr statistických metod). Další otázkou je zvolení metody pro stanovení RTL (zda jsou ve výsledku zahrnuty i ITS). Každopádně se jedná o téma, které by si zasloužilo větší osvětlení. Jednou z možností by bylo směřovat výzkum spíše směrem k otázkám dědičnosti evolučně výhodných znaků, popř. genů, jejichž produkty mohou dynamiku telomer ovlivnit.

5.3 VLIV VNĚJŠÍCH PODMÍNEK NA MÍRU ZKRACOVÁNÍ TELOMER

Předchozí kapitola naznačila, že vnější faktory (podmínky prostředí) mají na zkracování a délku nezanedbatelný telomer vliv. Právě vlivem vnějších podmínek na míru zkracování telomer u mládřat ptáků se zabývala studie provedená na burňáčkoví malém (*Hydrobates pelagicus*) (Watson et al., 2015). Ta zkoumala dvě kohorty mládřat ze dvou od sebe značně odlišných sezón, kdy lze předpokládat, že v sezóně poznamenané nepříznivým počasím byla ovlivněna řada dalších environmentálních faktorů (např. kvalita potravy). Vzorky byly odebírány mládřatům dvakrát (mediány odběrů byly 11. a 45. den stáří jedince).

Vědci se zaměřili na to, jestli vnější podmínky zažité v období bezprostředně po vylíhnutí mohou mít vliv na míru zkracování telomer. Výsledky naznačily, že rozdíl mezi jednotlivými skupinami mládřat v míře změny telomerické délky nastal. Mládřata vylíhla během hnízdní sezóny, která byla typická extrémními výkyvy počasí, zaznamenala výraznější ztrátu telomer právě během této rané ontogeneze. V této kohortě byla také pozorována vyšší úmrtnost mezi mládřaty. Oproti tomu, mládřata odchovaná v roce s příznivějšími vnějšími podmínkami, zaznamenala nevýznamné zkrácení telomer. Výzkum také poukázal na to, že pravděpodobnost přežití mládřete patrně stoupá s délkou telomer.

Dalším vnějším faktorem, který může ovlivnit délku telomer v rané ontogenezi kromě počasí, je asynchronní sezení na snůšce (Stier et al., 2015). Sýkora koňadra začíná na snůšce částečně sedět ještě před tím, než snese poslední vajíčko. Z toho vyplývá, že se mládřata většinou nevylíhnou úplně současně, ale s menším prodlením. To vede k výhodnějšímu postavení prvně vylíhlých mládřat (především v přístupu k potravě) oproti těm mladším. Studie se zaměřila na první dvě nejstarší a první dvě nejmladší mládřata a zkoumala případné rozdíly v délce telomer, odlišnosti v růstu a některé další fyziologické parametry (oxidativní stres, apod.). Výsledky ukázaly, že ačkoliv váha i velikost nejmladších mládřat je zpočátku menší, na konci růstové periody své starší sourozence doženou. Zároveň však v den finálního měření (tj. 16. den po vylíhnutí) měla nejpozději vylíhlá mládřata nižší kapacitu antioxidantů v plazmě a vyšší obsah ROS (reactive oxygene species) v krvi na rozdíl od dříve vylíhlých mládřat, což znamená, že jejich telomery jsou vystaveny ničivým účinkům ROS ve větší míře. Délka telomer se v 7. den života mládřat mezi oběma skupinami výrazně nelišila. To však neplatilo pro 16. den, kdy později vylíhlá mládřata vykazovala výraznější zkrácení telomer. Z výsledků lze usuzovat, že mohl nastat trade-off mezi investicí do růstu a údržbou organismu. Ačkoliv později vylíhlá mládřata dohnala, co se týče růstu své sourozence, doplatila na to vyšší mírou oxidativního stresu a v důsledku toho i větší ztrátou telomer.

5.4 VLIV STRESU NA MÍRU ZKRACOVÁNÍ TELOMER

Vliv stresu lze zkoumat např. sledováním hladiny určitých látek, které mohou negativně ovlivnit metabolismus a vést ke zvýšené produkci ROS způsobující poškození zejména telomerických sekvencí (Wang et al., 2010).

Jednou z těchto látek může být kortikosteron – primární ptačí glukokortikoid (Quirici et al., 2016). Studie zabývající se vlivem této látky na telomery proběhla v Chile na dvou geograficky odlišných populacích hrnčířika ostnoocasého (*Aphrastura spinicauda*). První zkoumaná populace byla vybrána z nejsevernější oblasti výskytu druhu (severní část Chile), druhá populace pocházela z jižního cípu jihoamerického kontinentu. Výzkum si dal za cíl objasnit případný vztah mezi hladinou kortikosteronu a délkou telomer u jedinců dvou geograficky odlišných populací stejného věku. Ukázalo se, že jedinci z populace žijící v okrajové zóně geografického rozšíření vykazují vyšší hladiny kortikosteronu a zároveň u nich byly naměřeny kratší telomery. Oproti tomu jedinci obývající Patagonii vykazovali nižší hladinu kortikosteronu a delší telomery. Populace sídlící na severu obývala les, který v semiaridním prostředí této části Chile existuje pouze díky přítomným mlhám. Tento habitat je typický nízkou primární produkcí. Presentovaná fakta vybízí k názoru, že zvýšení hladiny glukokortikoidů vlivem environmentálních stresorů může mít za následek zkrácení telomer vlivem oxidativního poškození způsobeného účinkem kortikosteronu. Každá ze zmíněných populací hrnčířika ostnoocasého je součástí odlišné subpopulace (Gonzalez and Wink, 2010). Tudíž by se dalo uvažovat o případném genetickém pozadí rozdílu.

Dalším významným stresorem může být onemocnění (způsobené např. parazitací) nebo limitované zdroje potravy, které se projeví především při reprodukci. V rámci studie provedené na populaci sýkory modřinky byli hnízdící jedinci rozděleni do čtyř skupin (Badas et al., 2015). První skupině rodičovských párů byla podávána antimalarika, druhé dodávali antioxidanty ve formě vitamínu E a methioninu, třetí skupina byla vystavena působení antimalarik i antioxidantů a poslední skupina posloužila jako kontrola.

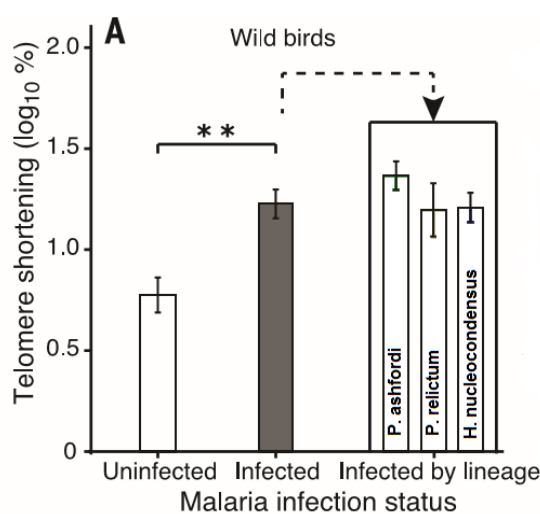
V této studii byla zkoumána především cena reprodukce a souvislost se zkracováním telomer, výživou a parazitací způsobenu obvykle zástupci způsobující ptačí malárii (např. *Haemoproteus majoris*, *Plasmodium* sp.). Změna délky telomer u dospělců byla stanovena na základě dvou měření, která proběhla po sobě následujících sezónách (tj. s ročním odstupem). Nejvýraznější zkrácení délky telomer bylo zaznamenáno u kontrolní skupiny a u sýkor, u kterých byly aplikovány antioxidanty i antimalarika. Skupina přeléčená antimalariky prodělala menší ztrátu telomer než předchozí zmíněné skupiny. Nejmenší ztráta telomerických sekvencí proběhla u skupiny, které byly podávány doplňky ve formě vitamínu E a methioninu. Tyto výsledky poukazují na to, že ačkoliv je s reprodukcí spjata velké množství stresu, projevy buněčného stárnutí mohou být zmírněny podáním látek, jež fungují jako antioxidanty.

Reprodukce je dalším faktorem, který může být vzhledem ke své náročnosti považován za stresor. Výsledky výzkumu rybáka obecného (*Sterna hirundo*) poukázaly na zajímavý fakt, že rodiče, kteří odchovali mláďata do 10. dne, ztratili více telomerických sekvencí než ptáci bez mláďat (Bauch et al., 2013).

5.5 VLIV NEMOCÍ ČI PARAZITACE NA DYNAMIKU TELOMER

Jak už jsem zmínila v předchozí podkapitole, tak na onemocnění lze nahlížet jako na jistý druh stresu. Onemocnění obvykle změní chování postiženého jedince, který přijímá méně potravy i vody a vyznačuje se celkovou apatií (Hart, 1988). To vede nejenom k vyššímu riziku predace nemocného jedince, ale také ke zvýšené produkci ROS v rámci imunitní odpovědi na přítomnost původce nemoci.

Jedním z onemocnění, které může ovlivňovat dynamiku délky telomer, je u ptáků velmi běžná a studovaná malárie. Ve studii Asghara a kolegů (Asghar et al., 2015) byla zkoumána populace rákosníka velkého hnízdící ve Švédsku. Přežijí-li ptáci akutní fázi nemoci, přejde onemocnění buď do chronické podoby, anebo dojde k vymizení infekce z těla. Rákosníci jsou nakaženi malárií v Africe, kde každý rok přezimují. Původcem ptačí malárie jsou rody *Plasmodium* nebo *Haemoproteus* spp. přenášené komáry. Výsledky naznačují, že jedinci trpící malárií žijí kratší dobu a mají méně mláďat. Navíc mají potomci nakažených matek v průměru kratší telomery. Nemocní ptáci vykazují výraznější ztrátu telomer oproti těm nenakaženým a zdá se, že s intenzitou infekce patrně koreluje i míra ztráty telomer. Míra zkracování telomer je pravděpodobně ovlivňována druhem původce nemoci, jak je znázorněno na obr. č. 9. Když byli v rámci studie experimentálně nakaženi jedinci chováni v zajetí, rozdíl v míře ztráty telomer u nakažených a zdravých jedinců byl ještě výraznější.



Obr. 9 – Vliv malárie na zkracování telomer u rákosníka velkého; převzato a upraveno dle Asghar et al. (2015)

Tyto výsledky byly podpořeny další studií, která zkoumala vliv infekce malárií (zde *Plasmodium ashfordi*) na míru zkracování telomer nejenom v krevních buňkách, ale i ve vybraných tkáních, tj. mozku, srdce, plic, jater, ledvin a sleziny (Asghar et al., 2016). Zde experimentálně nakažení juvenilové čížka lesního po odeznění akutní fáze infekce prodělali výraznější zkrácení telomer než kontrolní skupina. Kratší telomery byly zjištěny nejenom v erytrocytech, ale i ve zkoumaných vzorcích tkání.

Závěry této studie potvrdila i další práce, kde podání antimalarik mláďatům sýkory modřinky mělo za následek menší ztrátu telomer oproti kontrolní skupině (Badas et al., 2015).

5.6 STUDIE ZKOUMAJÍCÍ DYNAMIKU TELOMER U MLÁĎAT

Mnoho studií se zabývá změnou relativní délky telomer u mláďat, protože raná ontogeneze je pro rychle rostoucí organismus velice náročná a jedinec tak neustále řeší dilema, kam alokovat omezené zdroje, jestli do růstu nebo do samoudržovacích mechanismů. V této fázi života jedince tudíž dochází k největší ztrátě telomer a je pravděpodobné, že podmínky zažité v tomto období mohou ovlivnit délku života.

Jedna ze studií zkoumající dynamiku telomer byla provedena na mláďatech i dospělých kavky obecné, *Corvus monedula* (Salomons et al., 2009). Závěry studie poukazují na to, že míra zkracování telomer je největší na začátku a také na konci života. Výsledky dále naznačují, že delší telomery jsou vystaveny intenzivnějšímu zkracování než telomery krátké. Autoři také zaznamenali, že u jedinců s kratšími telomery klesá pravděpodobnost, že budou odchyceni i následující rok.

Ve studii, jejímž předmětem zájmu byli samci lesňáčka lejskovitého (*Setophaga ruticilla*), se autoři zaměřili na to, jakým způsobem mohou podmínky rané ontogeneze (nejsou specifikovány, neboť vědci neměli přístup k ptákům v této fázi života) ovlivnit velikost dospělého (respektive některých jeho částí) a zda je tomu úměrná délka telomer (Angelier et al., 2015).

Kromě odebrání vzorku krve pro analýzu telomer, byla ptákům změřena délka tarsu, délka, šířka a hloubka zobáku. Samci byli rozděleni do dvou skupin – jedinci vylíhnutí danou sezónou anebo starší. Výsledky poukázaly na souvislost mezi velikostí zobáku a délkou telomer u obou skupin. Ptáci s delšími telomery měli výraznější zobáky. Je možné, že velký zobák poskytuje jedinci výhodu v obstarání potravy. U délky tarsu vědci nezjistili souvislost s délkou telomer. Přestože coby mláďatům nebyla měřena hladina glukokortikoidů indikující stres, autoři předpokládají, že délka telomer a velikost zobáku je odrazem podmínek, které jako mláďata zaznamenají během raného vývoje.

6 ZÁVĚR

Výzkum telomer zaznamenal v posledních letech velký rozmach a to hlavně z důvodu, že jsou vhodným ukazatelem buněčného stárnutí, tzv. senescence. Telomery jsou tak předmětem zájmu vědeckých disciplín jako je např. gerontologie, onkologie nebo genetika. Výsledek studií však může být závislý na zvolené metodě. Těch existuje celá řada, včetně dnes asi nejpoužívanější qPCR. Ve své práci jsem se zaměřila na studie, které zkoumají změny v délce telomer u ptáků a s tím související faktory jako jsou vnější podmínky, dědičnost, stres či nemoci. Podrobně jsem také sledovala metodické pozadí jednotlivých studií a konkrétněji jsem se věnovala výhodám a nevýhodám jednotlivých metod, včetně qPCR.

Vědecké práce zkoumající změnu délky telomer dle očekávání naznačují, že telomery většiny ptáků se skutečně zkracují se zvyšujícím věkem (Salomons et al., 2009; Stier et al., 2015). Naopak vliv pohlaví na míru zkracování telomer u ptáků nebyl až na výjimky prokázán (Stier et al., 2015). Mnoho studií potvrdilo, že stres hraje důležitou roli v rychlosti zkracování telomer (Quirici et al., 2016). Se stresem úzce souvisí i to, že k rychlejšímu zkracování telomer dochází vlivem reprodukce (Bauch et al., 2013), či nemocí (Asghar et al., 2015, 2016).

Mnoho studií se zabývalo i vnějšími faktory, které ovlivňují dynamiku zkracování telomer (Angelier et al., 2013). Obecně lze konstatovat, že pro organismus neoptimální podmínky patrně vedou ke zvýšenému zkracování telomer. Vědci studovali i případnou souvislost mezi mírou zkracování telomer a maximální délkou života. Zde se ukázalo, že druhy s kratší maximální délkou života vykazují vyšší míru ztráty telomer (Sudyka et al., 2016).

Zatím ne zcela objasněná je otázka dědičnosti. Ačkoliv dostupné studie naznačují jistou souvislost v délce telomer mezi potomky a rodiči, není přesně objasněno, na kolik je za tento vztah zodpovědná dědičnost. Osobně si myslím, že jde spíše o vliv jiných faktorů. Zdá se logické, že horší rodiče svým potomkům neposkytnou tak dobré zázemí. Vyšší námaha pro rodiče a méně kvalitní výživa pro mláďata může vést ke zvýšenému stresu, který povede k rychlejšímu zkracování telomer. Každopádně se jedná o zajímavý směr případného budoucího výzkumu. Ohledně dynamiky zkracování telomer v závislosti na věku, se zdá, že zásadní pro délku telomery je období časně ontogenze a poté fáze před smrtí, kdy dochází k nejradikálnějšímu zkracování telomer. V případě rané ontogeneze se jedná o období, které zásadně ovlivní zbytek života jedince (Salomons et al., 2009).

Výsledky studií zabývajících se buněčným stárnutím a zkracováním telomer může zásadně ovlivnit výběr metody. Proto jsem se rozhodla pojmut svou bakalářskou práci spíše metodicky, shrnout nejdůležitější metody, které se momentálně používají a zároveň vyzdvihnout jejich výhody, ale poukázat i na jejich možná úskalí.

V současnosti nejužívanější metoda pro stanovení délky telomer u ptáků je qPCR, a to především díky zásadním výhodám oproti jiným metodám jakými jsou rychlost, časová i finanční nenáročnost

a relativně snadná proveditelnost. I přes nesporné výhody qPCR, je třeba si uvědomovat její limitace. Za jednu z nevýhod by mohl být považován výsledek poskytnutý pouze v relativní, nikoliv v absolutní hodnotě. To ovšem není problém, zajímá-li nás změna délky telomer u jedinců v čase.

Mezi nejdůležitější faktory, které mohou ovlivnit výsledky měření délky telomer pomocí qPCR, je množství ITS, které nelze pomocí qPCR odlišit od sekvencí vlastních telomer. Tyto telomerické sekvence nemají s délkou koncových sekvencí nic společného. Navíc se jejich množství liší nejen mezidruhově, ale i mezi jedinci, a tudíž mohou při vyšší koncentraci znepráchnit výsledky studií zkoumající celé populace. Další často opomíjený a neméně důležitý faktor je výběr vhodného referenčního markeru a následné navržení vysoce specifických primerů, aby byla efektivita qPCR blízka 100 %. Je totiž vhodné, aby byl výsledek co nejpřesnější a s co největší pravděpodobností opakovatelný. Vědci by se měli vyvarovat automatického přebírání primerů pro referenční geny z předchozích studií bez ověření, jak tomu nastalo u primerů pro gen GAPDH ze studie Criscuolo a kol. (2009).

I přes tyto klíčové faktory, které mohou ovlivnit výsledky získané pomocí qPCR, si myslím, že je tato metoda vhodná pro relativně rychlé a levné stanovení relativní délky telomer u velkého množství vzorků zvláště u nemodelových druhů organismů.

Další metoda, která se při výzkumu dynamiky telomer u ptáků používá, je analýza TRF. Při použití této metody je potřeba především zvážit, jaké restrikční enzymy budou použity, protože místa na chromozomu, kde enzymy působí, se mohou lišit. Vliv na dosažené výsledky má i způsob zpracování TRF: In-gel hybridizace započítává pouze koncové telomerické sekvence, kdežto Southernova hybridizace ve výsledcích obsahuje i délku ITS, a proto neřeší problém qPCR. Metody založené na FISH jsou využívány především v lidské medicíně. Ani Q-FISH ani Flow FISH nebývají využity pro výzkum volně žijících organismů, natož ptáků, a to především kvůli náročnému zpracování získaných vzorků.

Metoda STELA je citlivou a velice přesnou metodou vyžadující pouze malé množství vzorku. Přesto však rozšíření této metody i mezi ekology a evoluční biology brání její značná náročnost. Především navržení chromozomálně (a někdy i alelicky) specifických primerů omezuje použití této metody na člověka, popř. některé z modelových organismů.

The dot blot telomere assay patří mezi nově navržené metody pro stanovení délky telomer. Bohužel však nelze ověřit její spolehlivost, protože ve výzkumu zatím nebyla použita.

Jak již bylo několikrát naznačeno, výběr metody je pro správné stanovení a vyhodnocení změny délky telomer zcela zásadní. I přes některé limitace, zůstává qPCR jednou z nejvhodnějších metod pro výzkum dynamiky v délce telomer u volně žijících druhů, včetně ptáků. Pokud neznáme množství ITS daného druhu, je dobré nejprve délku telomer stanovit metodou nezapočítávající

délku ITS do výsledku (např. analýza TRF pomocí In-gel hybridizace). S pomocí takto dosažených výsledků můžeme ověřit množství ITS u daného druhu i jeho variabilitu mezi jedinci.

Na tuto bakalářskou práci bych ráda navázala i svou prací diplomovou, která se pravděpodobně bude zabývat dynamikou v délce telomer u volně žijící populace sýkory koňadry a faktory, jež ji ovlivňují především v rané ontogenezi.

7 SEZNAM ZKRATEK

ACD	<i>acid citrate dextrose</i>	Q-FISH	<i>quantitative fluorescence in situ hybridization</i>
AUF	<i>arbitrary units of fluorescence</i>	qPCR	<i>quantitative PCR; kvantitativní PCR</i>
CCD	<i>charge couple device</i>	RAP1	<i>Represor / Activator Protein 1</i>
cDNA	<i>complementary DNA;</i> <i>komplementární DNA</i>	ROS	<i>reactive oxygen species;</i> <i>reaktivní formy kyslíku</i>
Cy3	<i>cyanin 3</i>	RTEL1	<i>regulator of telomere length 1</i>
Cy5	<i>cyanin 5</i>	RTL	<i>relative telomere length;</i> <i>relativní délka telomery</i>
dNTP	<i>deoxyribonukleotid</i>	RT-qPCR	<i>reverse transcription quantitative PCR</i>
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid;</i> <i>kyselina ethylendiamintetraoctová</i>	SSC	<i>saline-sodium citrate buffer;</i> <i>citrátový pufr</i>
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>	STELA	<i>Single Telomere Length Analysis</i>
gDNA	<i>genomic DNA; genomická DNA</i>	STORM	<i>stochastic optical reconstuction Microscopy</i>
HEK	<i>human embryonic kidney cells</i>	TER	<i>telomerase RNA</i>
ITS	<i>interstitial telomeric sequences;</i> <i>intersticiální telomerické sekvence</i>	TERT	<i>telomerase reverse transcriptase</i>
nM	<i>nanomol</i>	TIN2	<i>TRF1- and TRF2-Interacting Nuclear Protein 2</i>
PBS	<i>phosphate buffer saline;</i> <i>fosfátový pufr</i>	TPP1	<i>Tripeptidyl Peptidase 1</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction;</i> <i>polymerázová řetězová reakce</i>	TRF1	<i>telomeric repeat binding-factor 1</i>
PNA	<i>peptide nucleic acid;</i> <i>peptidová nukleová kyselina</i>	TRF2	<i>telomeric repeat binding-factor 2</i>
POT1	<i>Protection od Telomers-1</i>	TRF	<i>terminal restriction fragment;</i> <i>terminální restrikční fragment</i>

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Allsopp, R., and Harley, C. (1995). Evidence for a Critical Telomere Length in Senescent Human Fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 219, 130–136.
- Allsopp, R., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E., Futcher, A., Greider, C., and Harley, C. (1992). Telomere Length Predicts Replicative Capacity of Human Fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 10114–10118.
- Alter, B.P., Giri, N., Savage, S.A., and Rosenberg, P.S. (2015). Telomere length in inherited bone marrow failure syndromes. *Haematologica* 100, 49–54.
- Angelier, F., Vleck, C.M., Holberton, R.L., and Marra, P.P. (2013). Telomere length, non-breeding habitat and return rate in male American redstarts. *Funct. Ecol.* 27, 342–350.
- Angelier, F., Vleck, C.M., Holberton, R.L., and Marra, P.P. (2015). Bill size correlates with telomere length in male American Redstarts. *J. Ornithol.* 156, 525–531.
- Asghar, M., Hasselquist, D., Hansson, B., Zehindjiev, P., Westerdahl, H., and Bensch, S. (2015). Hidden costs of infection: Chronic malaria accelerates telomere degradation and senescence in wild birds. *Science* 347, 436–438.
- Asghar, M., Palinauskas, V., Zaghdoudi-Allan, N., Valkiūnas, G., Mukhin, A., Platonova, E., Färnert, A., Bensch, S., and Hasselquist, D. (2016). Parallel telomere shortening in multiple body tissues owing to malaria infection. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 283.
- Atema, E., van Oers, K., and Verhulst, S. (2013). GAPDH as a control gene to estimate genome copy number in Great Tits, with cross-amplification in Blue Tits. *ARDEA* 101, 49–54.
- Atema, E., Mulder, E., Dugdale, H.L., Briga, M., van Noordwijk, A.J., and Verhulst, S. (2015). Heritability of telomere length in the Zebra Finch. *J. Ornithol.* 156, 1113–1123.
- Aubert, G., Hills, M., and Lansdorp, P.M. (2012). Telomere length measurement-Caveats and a critical assessment of the available technologies and tools. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 730, 59–67.
- Badas, E.P., Martinez, J., de Aguilar Cachafeiro, J.R., Miranda, F., Figuerola, J., and Merino, S. (2015). Ageing and reproduction: antioxidant supplementation alleviates telomere loss in wild birds. *J. Evol. Biol.* 28, 896–905.
- Baerlocher, G.M., Vulto, I., de Jong, G., and Lansdorp, P.M. (2006). Flow cytometry and FISH to measure the average length of telomeres (flow FISH). *Nat. Protoc.* 1, 2365–2376.
- Baird, D. (2004). Method for determination of telomere length.
- Baird, D.M., Rowson, J., Wynford-Thomas, D., and Kipling, D. (2003). Extensive allelic variation and ultrashort telomeres in senescent human cells. *Nat. Genet.* 33, 203–207.
- Bandaria, J.N., Qin, P., Berk, V., Chu, S., and Yildiz, A. (2016). Shelterin Protects Chromosome Ends by Compacting Telomeric Chromatin. *Cell* 164, 735–746.
- Barrett, E.L.B., Boner, W., Mulder, E., Monaghan, P., Verhulst, S., and Richardson, D.S. (2012). Absolute standards as a useful addition to the avian quantitative PCR telomere assay. *J. Avian Biol.* 43, 571–576.
- Barrett, E.L.B., Burke, T.A., Hammers, M., Komdeur, J., and Richardson, D.S. (2013). Telomere length and dynamics predict mortality in a wild longitudinal study. *Mol. Ecol.* 22, 249–259.
- Bauch, C., Becker, P.H., and Verhulst, S. (2013). Telomere length reflects phenotypic quality and costs of reproduction in a long-lived seabird. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* 280, 20122540.
- Beaulieu, M., Reichert, S., Le Maho, Y., Ancel, A., and Criscuolo, F. (2011). Oxidative status and telomere length in a long-lived bird facing a costly reproductive event. *Funct. Ecol.* 25, 577–585.
- Becker, P.J.J., Reichert, S., Zahn, S., Hegelbach, J., Massemin, S., Keller, L.F., Postma, E., Criscuolo, F., and Criscuolo, O. (2015). Mother - offspring and nest-mate resemblance but no heritability in early-life telomere length in white-throated dippers. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* 282, 20142924.
- Bejerano, G., Pheasant, M., Makunin, I., Stephen, S., Kent, W.J., Mattick, J.S., and Haussler, D. (2004). Ultraconserved Elements in the Human Genome. *Science* 304, 1321–1325.

- Bischoff, C., Graakjaer, J., Petersen, H.C., Vaupel, J.W., Bohr, V.A., Koelvraa, S., Christensen, K., and Hjelmborg, J. v. B. (2005). The heritability of telomere length among the elderly and oldest-old. *TWIN Res. Hum. Genet.* 8, 433–439.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., et al. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622.
- Callicott, R.J., and Womack, J.E. (2006). Real-time PCR assay for measurement of mouse telomeres. *Comp. Med.* 56, 17–22.
- Carbonari, M., Tedesco, T., and Fiorilli, M. (2014). Correlation between terminal restriction fragments and flow-FISH measures in samples over wide range telomere lengths. *Cell Prolif.* 47, 20–27.
- Cawthon, R.M. (2002). Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* 30, e47.
- Cawthon, R.M. (2009). Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *NUCLEIC ACIDS Res.* 37, 7.
- Cheung, I., Schertzer, M., Baross, A., Rose, A.M., Lansdorp, P.M., and Baird, D.M. (2004). Strain-specific telomere length revealed by single telomere length analysis in *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Res.* 32, 3383–3391.
- Counter, C., Avilion, A., Lefevre, C., Stewart, N., Greider, C., Harley, C., and Bacchetti, S. (1992). Telomere Shortening Associated with Chromosome Instability Is Arrested. *Embo J.* 11, 1921–1929.
- Coussens, M., Yamazaki, Y., Moisyadi, S., Suganuma, R., Yanagimachi, R., and Allsopp, R. (2006). Regulation and effects of modulation of telomerase reverse transcriptase expression in primordial germ cells during development. *Biol. Reprod.* 75, 785–791.
- Criscuolo, F., Bize, P., Nasir, L., Metcalfe, N.B., Foote, C.G., Griffiths, K., Gault, E.A., and Monaghan, P. (2009). Real-time quantitative PCR assay for measurement of avian telomeres. *J. Avian Biol.* 40, 342–347.
- Dantzer, B., and Fletcher, Q.E. (2015). Telomeres shorten more slowly in slow-aging wild animals than in fast-aging ones. *Exp. Gerontol.* 71, 38–47.
- Doksani, Y., Wu, J.Y., de Lange, T., and Zhuang, X. (2013). Super-Resolution Fluorescence Imaging of Telomeres Reveals TRF2-Dependent T-loop Formation. *Cell* 155, 345–356.
- Fajkus, P., Peska, V., Sitova, Z., Fulneckova, J., Dvorackova, M., Gogela, R., Sykorova, E., Hapala, J., and Fajkus, J. (2016). Allium telomeres unmasked: the unusual telomeric sequence (CTCGGTTATGGG)(n) is synthesized by telomerase. *Plant J.* 85, 337–347.
- Feng, J.L., Funk, W.D., Weinrich, S.L., Avilion, A.A., Chiu, C.P., Adams, R.R., Chang, E., Allsopp, R.C., Yu, J.H., Le, S.Y., et al. (1995). The RNA Component of Human Telomerase. *Science* 269, 1236–1241.
- Ferlicot, S., Youssef, N., Feneux, D., Delhommeau, F., Paradis, V., and Bedossa, P. (2003). Measurement of telomere length on tissue sections using quantitative fluorescence in situ hybridization (Q-FISH). *J. Pathol.* 200, 661–666.
- Foote, C.G., Vleck, D., and Vleck, C.M. (2013). Extent and variability of interstitial telomeric sequences and their effects on estimates of telomere length. *Mol. Ecol. Resour.* 13, 417–428.
- Fuchs, J., Brandes, A., and Schubert, I. (1995). Telomere Sequence Localization and Karyotype Evolution in Higher-Plants. *Plant Syst. Evol.* 196, 227–241.
- Fumagalli, M., Rosiello, F., Clerici, M., Barozzi, S., Cittaro, D., Kaplunov, J.M., Bucci, G., Dobrev, M., Matti, V., Beausejour, C.M., et al. (2012). Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nat. Cell Biol.* 14, 355–367.
- Ghani, M., Sato, C., and Rogaeva, E. (2013). Segmental duplications in genome-wide significant loci and housekeeping genes; warning for GAPDH and ACTB. *Neurobiol. AGING* 34, 1710.e1-1710.e4.
- Goehring, J., Fulcher, N., Jacak, J., and Riha, K. (2014). TeloTool: a new tool for telomere length measurement from terminal restriction fragment analysis with improved probe intensity correction. *Nucleic Acids Res.* 42, e21.

- Gonzalez, J., and Wink, M. (2010). Genetic differentiation of the Thorn-tailed Rayadito *Aphrastura spinicauda* (Furnariidae: Passeriformes) revealed by ISSR profiles suggests multiple palaeorefugia and high recurrent gene flow. *Int. J. Avian Sci.* 152, 761–774.
- Greider, C., and Blackburn, E. (1985). Identification of a Specific Telomere Terminal Transferase-Activity in *Tetrahymena* Extracts. *Cell* 43, 405–413.
- Griffith, J.D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R.M., Bianchi, A., Moss, H., and de Lange, T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97, 503–514.
- Gutierrez-Rodrigues, F., Santana-Lemos, B.A., Scheucher, P.S., Alves-Paiva, R.M., and Calado, R.T. (2014). Direct Comparison of Flow-FISH and qPCR as Diagnostic Tests for Telomere Length Measurement in Humans. *Plos One* 9, e113747.
- Hart, B. (1988). Biological basis of the behavior of sick animals. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 12, 123–137.
- Hatase, H., Sudo, R., Watanabe, K.K., Kasugai, T., Saito, T., Okamoto, H., Uchida, I., and Tsukamoto, K. (2008). Shorter telomere length with age in the loggerhead turtle: a new hope for live sea turtle age estimation. *Genes Genet. Syst.* 83, 423–426.
- Hausmann, M.F., and Mauck, R.A. (2008). New strategies for telomere-based age estimation. *Mol. Ecol. Resour.* 8, 264–274.
- Hausmann, M.F., and Vleck, C.M. (2002). Telomere length provides a new technique for aging animals. *Oecologia* 130, 325–328.
- Hausmann, M.F., Vleck, C.M., and Nisbet, I.C.T. (2003a). Calibrating the telomere clock in common terns, *Sterna hirundo*. *Exp. Gerontol.* 38, 787–789.
- Hausmann, M.F., Winkler, D.W., O'Reilly, K.M., Huntington, C.E., Nisbet, I.C.T., and Vleck, C.M. (2003b). Telomeres shorten more slowly in long-lived birds and mammals than in short-lived ones. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* 270, 1387–1392.
- Hausmann, M.F., Winkler, D.W., Huntington, C.E., Nisbet, I.C.T., and Vleck, C.M. (2007). Telomerase activity is maintained throughout the lifespan of long-lived birds. *Exp. Gerontol.* 42, 610–618.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., and Williams, P.M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6, 986–994.
- Henderson, E., and Blackburn, E. (1989). An Overhanging 3' Terminus Is a Conserved Feature of Telomeres. *Mol. Cell. Biol.* 9, 345–348.
- Honig, L.S., Kang, M.S., Cheng, R., Eckfeldt, J.H., Thyagarajan, B., Leiendecker-Foster, C., Province, M.A., Sanders, J.L., Perls, T., Christensen, K., et al. (2015). Heritability of telomere length in a study of long-lived families. *Neurobiol. Aging* 36, 2785–2790.
- Hughes, K.A., Alipaz, J.A., Drnevich, J.M., and Rynolds, R.M. (2002). A test of evolutionary theories of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 14286–14291.
- Keyvanfar, K., Weed, J., Swamy, P., Kajigaya, S., Calado, R.T., and Young, N.S. (2012). Interphase Chromosome Flow-FISH. *Blood* 120, E54–E59.
- Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L.C., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L., and Shay, J.W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 2011–2015.
- Kimura, M., and Aviv, A. (2011). Measurement of telomere DNA content by dot blot analysis. *Nucleic Acids Res.* 39, e84.
- Kimura, M., Stone, R.C., Hunt, S.C., Skurnick, J., Lu, X., Cao, X., Harley, C.B., and Aviv, A. (2010). Measurement of telomere length by the Southern blot analysis of terminal restriction fragment lengths. *Nat. Protoc.* 5, 1596–1607.
- Kirkwood, T., and Rose, M. (1991). Evolution of Senescence - Late Survival Sacrificed for Reproduction. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci.* 332, 15–24.
- Kuznetsova, V.G., Grozeva, S.M., Hartung, V., and Anokhin, B.A. (2015). First evidence for (TTAGG)_n telomeric sequence and sex chromosome post-reduction in Coleorrhyncha (Insecta, Hemiptera). *Comp. Cytogenet.* 9, 523–532.

- de Lange, T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* 19, 2100–2110.
- Lansdorp, P.M., Verwoerd, N.P., vandeRijke, F.M., Dragowska, V., Little, M.T., Dirks, R.W., Raap, A.L., and Tanke, H.J. (1996). Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum. Mol. Genet.* 5, 685–691.
- Levy, M., Allsopp, R., Futcher, A., Greider, C., and Harley, C. (1992). Telomere End-Replication Problem and Cell Aging. *J. Mol. Biol.* 225, 951–960.
- Lin, K.W., and Yan, J. (2008). Endings in the middle: Current knowledge of interstitial telomeric sequences. *Mutat. Res.-Rev. Mutat. Res.* 658, 95–110.
- Lin, T.T., Letsolo, B.T., Jones, R.E., Rowson, J., Pratt, G., Hewamana, S., Fegan, C., Pepper, C., and Baird, D.M. (2010). Telomere dysfunction and fusion during the progression of chronic lymphocytic leukemia: evidence for a telomere crisis. *Blood* 116, 1899–1907.
- Lin, T.T., Norris, K., Heppel, N.H., Pratt, G., Allan, J.M., Allsup, D.J., Bailey, J., Cawkwell, L., Hills, R., Grimstead, J.W., et al. (2014). Telomere dysfunction accurately predicts clinical outcome in chronic lymphocytic leukaemia, even in patients with early stage disease. *Br. J. Haematol.* 167, 214–223.
- Long, K.D., and Salbaum, J.M. (1998). Evolutionary conservation of the immediate-early gene ZENK. *Mol. Biol. Evol.* 15, 284–292.
- Lucas, A.M., and Jamroz, C. (1961). *Atlas of avian hematology* (Washington, D.C.: U.S. Dept. of Agriculture).
- Manaresi, E., Bua, G., Bonvicini, F., and Gallinella, G. (2015). A flow-FISH assay for the quantitative analysis of parvovirus B19 infected cells. *J. Virol. Methods* 223, 50–54.
- Martens, U.M., Chavez, E.A., Poon, S.S.S., Schmoor, C., and Lansdorp, P.M. (2000). Accumulation of short telomeres in human fibroblasts prior to replicative senescence. *Exp. Cell Res.* 256, 291–299.
- Masutomi, K., Yu, E.Y., Khurts, S., Ben-Porath, I., Currier, J.L., Metz, G.B., Brooks, M.W., Kaneko, S., Murakami, S., DeCaprio, J.A., et al. (2003). Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *CELL* 114, 241–253.
- Mello, C.V., and Ribeiro, S. (1998). ZENK protein regulation by song in the brain of songbirds. *J. Comp. Neurol.* 393, 426–438.
- Metcalfe, C., Eldridge, M., McQuade, L., and Johnston, P. (1997). Mapping the distribution of the telomeric sequence (T(2)AG(3))(n) in rock-wallabies, *Petrogale* (Marsupialia: Macropodidae), by fluorescence in situ hybridization .1. The penicillata complex. *Cytogenet. CELL Genet.* 78, 74–80.
- Meyne, J., Ratliff, R., and Moyzis, R. (1989). Conservation of the Human Telomere Sequence (ttagg)n Among Vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 7049–7053.
- Monaghan, P. (2010). Telomeres and life histories. the long and the short of it. In *Year in Evolutionary Biology*, C.D. Schlichting, and T.A. Mousseau, eds. (Malden: Wiley-Blackwell), pp. 130–142.
- Monaghan, P., Charmantier, A., Nussey, D.H., and Ricklefs, R.E. (2008). The evolutionary ecology of senescence. *Funct. Ecol.* 22, 371–378.
- Moyzis, R., Buckingham, J., Cram, L., Dani, M., Deaven, L., Jones, M., Meyne, J., Ratliff, R., and Wu, J. (1988). A Highly Conserved Repetitive Dna-Sequence, (ttagg)n, Present at the Telomeres of Human-Chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 6622–6626.
- Nanda, I., Schrama, D., Feichtinger, W., Haaf, T., Scharl, M., and Schmid, M. (2002). Distribution of telomeric (TTAGGG)(n) sequences in avian chromosomes. *Chromosoma* 111, 215–227.
- Nussey, D.H., Froy, H., Lemaitre, J.-F., Gaillard, J.-M., and Austad, S.N. (2013). Senescence in natural populations of animals: Widespread evidence and its implications for bio-gerontology. *Ageing Res. Rev.* 12, 214–225.
- Nussey, D.H., Baird, D., Barrett, E., Boner, W., Fairlie, J., Gemmell, N., Hartmann, N., Horn, T., Haussmann, M., Olsson, M., et al. (2014). Measuring telomere length and telomere dynamics in evolutionary biology and ecology. *Methods Ecol. Evol.* 5, 299–310.

- O'Callaghan, N.J., Dhillon, V.S., Thomas, P., and Fenech, M. (2008). A quantitative real-time PCR method for absolute telomere length. *Biotechniques* 44, 807–809.
- Okazaki, S., Tsuchida, K., Maekawa, H., Ishikawa, H., and Fujiwara, H. (1993). Identification of a Pentanucleotide Telomeric Sequence, (ttagg)_n, in the Silkworm *Bombyx-Mori* and in Other Insects. *Mol. Cell. Biol.* 13, 1424–1432.
- Olovnikov, A.M. (1973). Theory of Marginotomy - Incomplete Copying of Template Margin in Enzymic-Synthesis of Polynucleotides and Biological Significance of Phenomenon. *J. Theor. Biol.* 41, 181–190.
- Ozturk, S. (2015). Telomerase Activity and Telomere Length in Male Germ Cells. *Biol. Reprod.* 92, 53.
- Palacios, M.G., Winkler, D.W., Klasing, K.C., Hasselquist, D., and Vleck, C.M. (2011). Consequences of immune system aging in nature: a study of immunosenescence costs in free-living Tree Swallows. *Ecology* 92, 952–966.
- Plohl, M., Prats, E., Martinez-Lage, A., Gonzalez-Tizon, A., Mendez, J., and Cornudella, L. (2002). Telomeric localization of the vertebrate-type hexamer repeat, (TTAGGG)_n, in the wedgeshell clam *Donax trunculus* and other marine invertebrate genomes. *J. Biol. Chem.* 277, 19839–19846.
- Pomianowski, K., Jankun, M., and Ocalewicz, K. (2012). Detection of interstitial telomeric sequences in the Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) (Teleostei: Salmonidae). *Genome* 55, 26–32.
- Poon, S.S.S., and Lansdorp, P.M. (2001). Quantitative Fluorescence In Situ Hybridization (Q-FISH). *Curr. Protoc. Cell Biol.* 18.4.1–18.4.21.
- Poon, S.S.S., Martens, U.M., Ward, R.K., and Lansdorp, P.M. (1999). Telomere length measurements using digital fluorescence microscopy. *Cytometry* 36, 267–278.
- Quirici, V., Jimena Guerrero, C., Krause, J.S., Wingfield, J.C., and Vasquez, R.A. (2016). The relationship of telomere length to baseline corticosterone levels in nestlings of an altricial passerine bird in natural populations. *Front. Zool.* 13, 1.
- Rao, Y., Xiong, W., Liu, H., Jia, C., Zhang, H., Cui, Z., Zhang, Y., and Cui, J. (2016). Inhibition of telomerase activity by dominant-negative hTERT retards the growth of breast cancer cells. *Breast Cancer* 23, 216–223.
- Reichert, S., Criscuolo, F., Verinaud, E., Zahn, S., and Massemmin, S. (2013). Telomere Length Correlations among Somatic Tissues in Adult Zebra Finches. *PLOS ONE* 8, e81496.
- Reichert, S., Stier, A., Zahn, S., Arrivé, M., Bize, P., Massemmin, S., and Criscuolo, F. (2014). Increased brood size leads to persistent eroded telomeres. *Front. Ecol. Evol.* 2, 9.
- Roos, G., Kroeber, A., Grabowski, P., Kienle, D., Buehler, A., Doehner, H., Rosenquist, R., and Stilgenbauer, S. (2008). Short telomeres are associated with genetic complexity, high-risk genomic aberrations, and short survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 111, 2246–2252.
- Rudolph, K.L. (2008). Telomeres and Telomerase in Aging, Disease, and Cancer; Molecular Mechanisms of Adult Stem Cell Ageing (Springer-Verlag Berlin Heidelberg).
- Salomons, H.M., Mulder, G.A., van de Zande, L., Haussmann, M.F., Linskens, M.H.K., and Verhulst, S. (2009). Telomere shortening and survival in free-living corvids. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* 276, 3157–3165.
- Samassekou, O., Gadj, M., Drouin, R., and Yan, J. (2010). Sizing the ends. Normal length of human telomeres. *Ann. Anat.-Anat. Anz.* 192, 284–291.
- Samassekou, O., Bastien, N., Lichtensztejn, D., Yan, J., Mai, S., and Drouin, R. (2014). Different TP53 Mutations are Associated with Specific Chromosomal Rearrangements, Telomere Length Changes, and Remodeling of the Nuclear Architecture of Telomeres. *Genes. Chromosomes Cancer* 53, 934–950.
- Sanchez, J., Bianchi, M.S., and Bolzan, A.D. (2009). Effect of bleomycin on interstitial telomeric sequences of immortalized Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 669, 139–146.
- Sarek, G., Vannier, J.-B., Panier, S., Petrini, J.H.J., and Boulton, S.J. (2015). TRF2 Recruits RTEL1 to Telomeres in S Phase to Promote T-Loop Unwinding. *Mol. Cell* 57, 622–635.
- Sedivy, J.M., Shippen, D.E., and Shakirov, E.V. (2003). Surprise ending. *Nat. Genet.* 33, 114–116.
- Shippenlentz, D., and Blackburn, E. (1990). Functional Evidence for an Rna Template in Telomerase. *Science* 247, 546–552.

- Snustad, D.P., Simmons, M.J., and Relichová, J. (2009). *Genetika* (Brno: Masarykova Univerzita).
- Speakman, J.R., and Selman, C. (2011). The free-radical damage theory: Accumulating evidence against a simple link of oxidative stress to ageing and lifespan. *Bioessays* 33, 255–259.
- Stier, A., Massemin, S., Zahn, S., Tissier, M.L., and Criscuolo, F. (2015). Starting with a handicap: effects of asynchronous hatching on growth rate, oxidative stress and telomere dynamics in free-living great tits. *Oecologia* 179, 999–1010.
- Sudyka, J., Arct, A., Drobniak, S., Gustafsson, L., and Cichoan, M. (2016). Longitudinal studies confirm faster telomere erosion in short-lived bird species. *J. Ornithol.* 157, 373–375.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872.
- Terali, K., and Yilmazer, A. (2016). New surprises from an old favourite: The emergence of telomerase as a key player in the regulation of cancer stemness. *Biochimie* 121, 170–178.
- Toutain, J., Prochazkova-Carlotti, M., Horovitz, J., Saura, R., Merlio, J.-P., and Chevret, E. (2016). Evaluation of Quantitative Fluorescence in situ Hybridization for Relative Measurement of Telomere Length in Placental Mesenchymal Core Cells. *Gynecol. Obstet. Invest.* 81, 54–60.
- Vaillant, M.L., Viblanc, V.A., Saraux, C., Bohec, C.L., Maho, Y.L., Kato, A., Criscuolo, F., and Ropert-Coudert, Y. (2015). Telomere length reflects individual quality in free-living adult king penguins. *Polar Biol.* 38, 2059–2067.
- Vaziri, H., and Benchimol, S. (1998). Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr. Biol.* 8, 279–282.
- Vleck, C.M., Haussmann, M.F., and Vleck, D. (2003). The natural history of telomeres: tools for aging animals and exploring the aging process. *Exp. Gerontol.* 38, 791–795.
- Vleck, C.M., Haussmann, M.F., and Vleck, D. (2007). Avian senescence: underlying mechanisms. *J. Ornithol.* 148, S611–S624.
- Voropaeva, E.N., Maksimov, V.N., Malyutina, S.K., Bobak, M., and Voevoda, M.I. (2015). Effects of DNA quality on the measurement of telomere length. *Mol. Biol.* 49, 508–512.
- Waga, S., and Stillman, B. (1998). The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 721–751.
- Wang, Z., Rhee, D.B., Lu, J., Bohr, C.T., Zhou, F., Vallabhaneni, H., de Souza-Pinto, N.C., and Liu, Y. (2010). Characterization of Oxidative Guanine Damage and Repair in Mammalian Telomeres. *PLOS Genet.* 6, e1000951.
- Watson, H., Bolton, M., and Monaghan, P. (2015). Variation in early-life telomere dynamics in a long-lived bird: links to environmental conditions and survival. *J. Exp. Biol.* 218, 668–674.
- Weidner, C.I., Lin, Q., Koch, C.M., Eisele, L., Beier, F., Ziegler, P., Bauerschlag, D.O., Joeckel, K.-H., Erbel, R., Muehleisen, T.W., et al. (2014). Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome Biol.* 15, R24.
- Wenz, C., Enenkel, B., Amacker, M., Kelleher, C., Damm, K., and Lingner, J. (2001). Human telomerase contains two cooperating telomerase RNA molecules. *EMBO J.* 20, 3526–3534.
- Williams, G. (1957). Pleiotropy, Natural-Selection, and the Evolution of Senescence. *Evolution* 11, 398–411.
- Wong, H.P., and Slijepcevic, P. (2004). Telomere length measurement in mouse chromosomes by a modified Q-FISH method. *Cytogenet. Genome Res.* 105, 464–470.
- Yuan, J.S., Reed, A., Chen, F., and Stewart, N.C. (2006). Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 7, 1–12.
- Zanet, D.L., Saberi, S., Oliveira, L., Sathia, B., Gadawski, I., and Cote, H.C.F. (2013). Blood and Dried Blood Spot Telomere Length Measurement by qPCR: Assay Considerations. *Plos One* 8, e57787.

9 PŘÍLOHY

Studie	TELOMERY		Název	REFERENČNÍ GEN (SINGLE COPY GENE)			DNA	Izolace DNA (kit,...)
	Primer F	Primer R		Primer F (5'-3')		Primer R (5'-3')		
Stier et al. (2014)	tel/1b	tel/2b	zinc finger protein (ZENK)	TACATGTGCCATGGTTTTCG		AAGTGCTGCTCCCAAGAAG	krev	Machery–Nagel Nucleospin Blood QuickPure extraction kit
Badás et al. (2015)	tel/1b	tel/2b	GAPDH gen	AACCAGCCAAAGTACGATGACAT		CCATCAGCAGCAGCCTTCA	krev	extrakce pomocí octanu amonného
Angelier et al. (2015)	tel/1b	tel/2b	GAPDH gen	TGACCACTGTCCATGCCATCAC		TCCAGACGGCAGGTCAGGTC	krev	DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen)
Watson et al. (2015)	tel/1b	tel/2b	ornithine decarboxylasa (OCD)	GACCTTGCCATCATTGGAGTTAG		AAGGCATCCCTATTGTTAGGTAGA	krev	Machery–Nagel NucleoSpin Blood kit
Asghar et al. (2015)	tel/1b	tel/2b	sfsr/3	ACTAGCCCTTTACGCGTCATGT		CATGCTCGGGAACCAAGG	krev	extrakce fenol-chloroformovou metodou
Quirici et al. (2016)	tel/1b	tel/2b	GAPDH gen	TGACCACTGTCCATGCCATCAC		TCCAGACGGCAGGTCAGGTC	krev	QIAGEN Inc., Valencia, CA
Becker et al. (2015)	tel/1b	tel/2b	GAPDH gen	AACCAGCCAAAGTACGATGACAT		CCATCAGCAGCAGCCTTCA	krev	QIAmp DNA mini kit (BioSprint96, Qiagen)
Angelier et al. (2013)	tel/1b	tel/2b	GAPDH gen	TGACCACTGTCCATGCCATCAC		TCCAGACGGCAGGTCAGGTC	krev	DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen)
Atema et al. (2013)	?	?	GAPDH gen	TGTGATTTCAATGGTGACAGC		AGCTTGACAAAAATGGTCGTTC	krev	innuPREP Blood DNA Mini Kit (Analytik Jena)
Criscuolo et al. (2009)	tel/1b	tel/2b	GAPDH gen	AACCAGCCAAAGTACGATGACAT		CCATCAGCAGCAGCCTTCA	krev	DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen)
Asghar et al. (2016)	tel/1b	tel/2b	sfsr/3	ACTAGCCCTTTACGCGTCATGT		CATGCTCGGGAACCAAGG	krev, tkáně	fenol-chloroformová metoda
Beaulieu et al. (2011)	tel/1b	tel/2b	ZENK	CAACTGCCGTTTAAGTTTCC		AATATGGCCCTGCAAAATCC	krev	DNeasy® Blood and Tissue kit, Qiagen, Germany
Reichert et al. (2013)	tel/1b	tel/2b	GAPDH gen	AACCAGCCAAAGTACGATGACAT		CCATCAGCAGCAGCCTTCA	krev, tkáně	DNeasy Blood and Tissue kit, Qiagen
Reichert et al. (2014)	tel/1b	tel/2b	GAPDH gen	AACCAGCCAAAGTACGATGACAT		CCATCAGCAGCAGCCTTCA	krev	DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen)
Vaillant et al. (2015)	tel/1b	tel/2b	Zinc finger protein	TACATGTGCCATGGTTTTCG		AAGTGCTGCTCCCAAGAAG	krev	DNeasy Blood and Tissue kit, Qiagen

Tabulka č. 1 – Tabulka studií používajících qPCR