

## Streszczenie

Telomery to znajdujące się na końcach chromosomów eukariotycznych konserwatywne regiony genomu składające się z krótkich i powtarzalnych sekwencji DNA (5'-TTAGGG-3') oraz białek (szelteryny). Telomery ulegają skracaniu podczas każdego podziału komórkowego, wykazując powiązanie z procesem starzenia się organizmu. Tempo skracania telomerowego DNA jest cechą osobniczą, na którą mają wpływ czynniki genetyczne oraz środowiskowe. Telomeraza jest rybonukleinoproteinowym enzymem, którego zadaniem jest synteza nici DNA w obszarze telomeru co spowalnia proces jego skracania się. Telomeraza składa się z dwóch kluczowych elementów: katalitycznej podjednostki *Tert* o charakterze odwrotnej transkryptazy (ang. *telomerase reverse transcriptase*), a także podjednostki TERC, która służy za wewnętrzną matrycę RNA. U większości organizmów stałocieplnych telomeraza nie wykazuje aktywności w komórkach somatycznych. Z kolei, u organizmów zmiennocieplnych, takich jak ryby aktywność telomerazy jest obserwowana w komórkach somatycznych przez cały okres trwania ich życia. Z tego względu telomerowy DNA u ryb nie zawsze skraca się wraz z wiekiem, a dynamika zmian długości telomerów może wyglądać inaczej u różnych gatunków. Ponadto, przypuszcza się, że stała ekspresja telomerazy u ryb jest związana między innymi z doskonałymi zdolnościami regeneracyjnymi tkanek oraz zwiększoną odpornością na choroby nowotworowe. Osobniki triploidalne ze względu na swoje unikalne cechy genetyczne i fizjologiczne: większe rozmiary komórek, wyższa heterozygotyczność, zahamowany rozwój gonad i ograniczona produkcja gamet, ciągły wzrost, a także obniżona odporność na niekorzystne warunki środowiskowe, są doskonałym modelem do badań dotyczących dynamiki zmian długości telomerowego DNA oraz aktywności telomerazy.

W niniejszej pracy zbadano zmiany długości telomerowego DNA, jak również ekspresję genu *Tert* oraz aktywność enzymu telomerazy w wybranych tkankach somatycznych i w gonadach u diploidalnych (2n) i triploidalnych (3n) pstrągów tęczowych (*Oncorhynchus mykiss*) w różnym wieku oraz u osobników charakteryzujących się odmiennym tempem wzrostu. Średnia długość sekwencji (TTAGGG)<sub>n</sub> jednorocznych pstrągów tęczowych wyniosła 20 000 par zasad. Różnice w długości telomerów u samic i samców były nieistotne. Badania wykazały, iż dynamika zmian długości telomerowego DNA u diploidalnych i triploidalnych ryb była podobna, co sugeruje, że dodatkowy zestaw chromosomów u ryb triploidalnych oraz wszelkie tego konsekwencje mają ograniczony

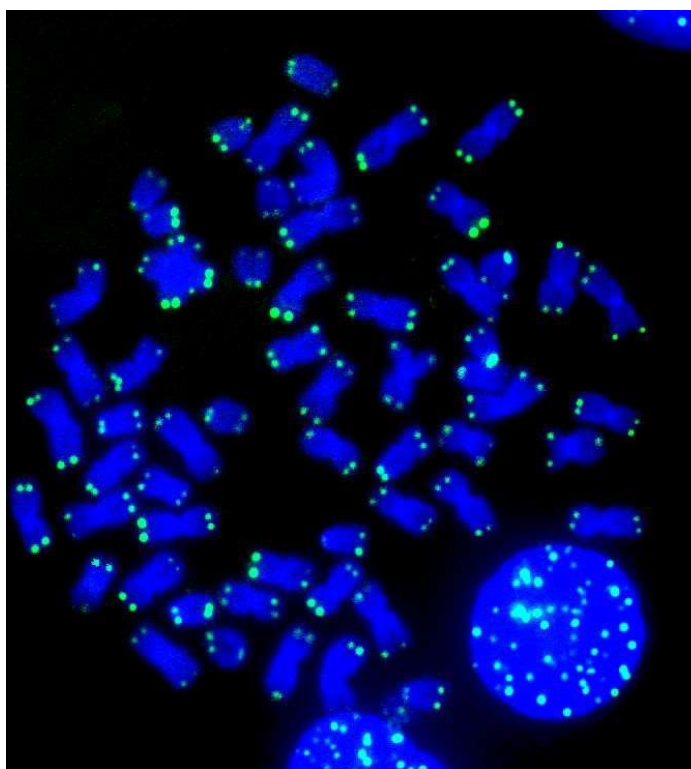
wpływ na długość telomerów u tego gatunku. W przypadku osobników z niedoborem wzrostu i prawidłowo rozwijających się nie wykazano istotnych różnic w długości telomerów. Aktywność telomerazy w wybranych tkankach osobników prawidłowo rozwijających się i karłowatych również nie różniła się zasadniczo, jedynie w skórze była niższa u ryb z niedoborem wzrostu. Podwyższony poziom ekspresji genu *Tert* stwierdzono w wątrobie, śledzionie, mięśniach oraz skrzelach osobników triploidalnych, co wydaje się mieć duże znaczenie w utrzymaniu homeostazy komórek u osobników, które w porównaniu do ryb diploidalnych są zdecydowanie bardziej wymagające środowiskowo. Natomiast w jajnikach ryb triploidalnych, ekspresja genu *Tert* była istotnie niższa w porównaniu do gonad diploidalnych samic. Jajniki triploidalnych pstrągów tęczowych były silnie zredukowane i zawierały nieliczne oocyty. Niewielka liczba komórek płciowych, które zazwyczaj charakteryzują się wysoką aktywnością telomerazy prawdopodobnie wpłynęła na obserwowaną w sterylnych jajnikach niską ekspresję genu *Tert*.

**Słowa kluczowe:** telomerowy DNA, telomeraza, pstrąg tęczowy, triploidyzaacja, niedobór wzrostu

## Wstęp

### Telomery i telomeraza

Telomery to niekodujące regiony genomu składające się z tandemowo powtórzonych sekwencji TTAGGG, które wraz z kompleksem białek ochronnych (*ang.* shelterin - POT1, TPP1, TRF1, TRF2, RAP1, TIN2) są zlokalizowane na końcach chromosomów eukariotycznych (Rysunek 1) [1]. Telomery stabilizują strukturę chromosomów oraz zabezpieczają ich wewnętrzne regiony przed uszkodzeniem zawartej w nich informacji genetycznej podczas zachodzących podziałów komórkowych. Ponadto, telomery regulują ekspresję genów leżących w pobliżu regionu telomerowego, umożliwiają systemom naprawczym rozpoznanie zarówno prawidłowych, jak i uszkodzonych zakończeń chromosomów, zapobiegają mutacjom chromosomowym (translokacje, duplikacje, delecje) oraz zapewniają prawidłowy przebieg procesu rekombinacji i umożliwiają przestrzenną organizację jądra komórkowego [2-5].



**Rysunek 1** Chromosomy pstrąga tęczowego poddane hybrydyzacji z sondą telomerową PNA znakowaną izotiocyanianiem fluoresceiny (FITC).

U ludzi, jak i znacznej większości ssaków telomery skracają się wraz z wiekiem, co jest naturalną konsekwencją zachodzących podziałów komórkowych [6, 7]. Liniowe chromosomy eukariotyczne skracają się podczas replikacji, a zjawisko to nosi nazwę „problemu replikacji końca”. Ponieważ polimeraza DNA wymaga startera RNA do rozpoczęcia syntezy w kierunku 5' → 3', jedynie nić wiodąca DNA może być syntetyzowana do samego końca. W przypadku nici opóźnionej, której synteza odbywa się z wielu małych fragmentów DNA, nazywanych odcinkami Okazaki, nie może ona zostać w pełni zsyntetyzowana gdyż nie ma sposobu na syntezę ostatniego fragmentu Okazaki dlatego, że starter musiałby znajdować się poza końcem chromosomu. Przy tym przyłączony starter ostatniego odcinka Okazaki nie może zostać zastąpiony przez polimerazę DNA jak w przypadku pozostałych. W efekcie część sekwencji zlokalizowana na końcu replikowanego DNA pozostaje nieskopiowana, tworząc jednoniciową strukturę nazywaną z angielskiego *overhang* [8]. W wyniku tego procesu, z każdym cyklem komórkowym telomery ulegają stopniowemu skracaniu w tempie od 50 do 200 nukleotydów [9]. Trwa to, aż do momentu, gdy osiągną długość krytyczną, co jest komunikatem do zatrzymania podziałów komórkowych i rozpoczęcia procesu programowanej śmierci komórki (apoptozy). Skracanie się telomerowego DNA jest związane z procesem starzenia się, a także z rozwojem między innymi chorób nowotworowych, chorób układu krążenia, cukrzycy, chorób neurodegeneracyjnych (choroba Alzheimera) czy też chorób genetycznych (Zespół Wernera, Zespół Blooma) [10-12]. Postępująca utrata sekwencji telomerowej w komórkach somatycznych człowieka uważana jest za mechanizm supresji nowotworowej, natomiast niektóre komórki posiadają wadliwą odpowiedź na uszkodzenia DNA i kontynuują wzrost pomimo obecności dysfunkcyjnych telomerów [13]. Wyniki licznych badań wskazują, że stres oksydacyjny jest ważnym czynnikiem przyspieszającym tempo skracania się telomerów [14, 15]. Stres oksydacyjny definiuje się jako dysproporcję pomiędzy tempem wytwarzania reaktywnych form tlenu (RFT, ang. ROS – *reactive oxygen species*), a ich neutralizację przez systemy antyoksydacyjne [16]. Telomerowy DNA jest bogaty w nukleotydy guaninowe, które są szczególnie podatne na uszkodzenia powodowane oddziaływaniem reaktywnych form tlenu [14]. W przypadku zaburzenia homeostazy komórkowej, spowodowanej nadmierną produkcją RFT oraz upośledzeniem mechanizmów odpowiedzi na stres oksydacyjny, tempo skracania się telomerów może zostać zwiększone, co również przekłada się na tempo procesu starzenia się organizmu [15]. Reaktywne formy tlenu są produkowane podczas procesów metabolicznych, ale ich poziom może wzrosnąć w wyniku narażenia na czynniki takie jak: wysoko przetworzona dieta uboga w antyoksydanty, stres, promieniowanie UV czy

zanieczyszczenie środowiska [15, 17, 18]. Wszystkie z wymienionych czynników mają negatywny wpływ na utrzymanie odpowiedniej długości telomerów. Średnia długość sekwencji telomerowej jest cechą charakterystyczną dla gatunku, jednak różnice w długości telomerów i tempie ich skracania się zaobserwowano także między osobnikami tego samego gatunku. Dodatkowo, długość telomerowego DNA może być różna w komórkach poszczególnych tkanek/narządów tego samego organizmu. Na przykład u ludzi długość sekwencji (TTAGGG)<sub>n</sub> mieści się w zakresie od około 5 000 to 15 000 nukleotydów [19]. Zauważono, że długość telomerowego DNA jest inna w zależności od płci, przy czym kobiety mają zazwyczaj dłuższe telomery niż mężczyźni [20, 21]. Być może jest to spowodowane występowaniem u kobiet wyższych poziomów estrogenów, które wykazują działania przeciwzapalne i antyoksydacyjne.

Badania dotyczące chromosomowej lokalizacji sekwencji telomerowej wykonano u około 80 gatunków ryb. Długość telomerowego DNA u ryb mieści się w zakresie od około 3 000 par zasad (dętwa pawik (*Torpedo ocellata*)) do nawet 25 000 par zasad (danio pręgowany (*Danio rerio*)) [22, 23]. Telomery u ryb podobnie jak u ludzi mogą skracać się wraz z wiekiem, co zaobserwowano u zagrzebki (*Nothobranchius furzeri*), jesiotra syberyjskiego (*Acipenser baeri*) lub gambuzji (*Gambusia affinis*) [24-26]. Z drugiej strony, długość telomerów buffalo czarnego (*Ictiobus cyprinellus*) nie zmienia się w ciągu życia [27]. Jeszcze inaczej wygląda to u danio pręgowanego, w komórkach którego telomery DNA wydłuża się i skraca w zależności od etapu rozwoju na jakim w danym momencie znajduje się ryba [28]. Badania przeprowadzone na cierniczku (*Pungitius pungitius*) wykazały, że u samic tego gatunku skracanie się telomerów postępuje wraz z osiągnięciem dojrzałości płciowej, co sugeruje, że procesy dojrzewania płciowego wymagające większych nakładów energetycznych u samic mogą prowadzić do wystąpienia stresu oksydacyjnego, a w konsekwencji przyspieszenia skracania się telomerowego DNA. Takich zmian nie zaobserwowano u samców tego gatunku [29].

Telomeraza jest rybonukleinoproteinowym enzymem, który odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu długości i integralności telomerów. Enzym ten jest odpowiedzialny za syntezę sekwencji telomerowego DNA, spowalniając lub zapobiegając skracaniu się telomerów. Telomeraza składa się z podjednostki katalitycznej *Tert* o charakterze odwrotnej transkryptazy (ang. *telomerase reverse transcriptase*), podjednostki TERC złożonej z cząsteczki RNA będącej matrycą podczas syntezy telomerowego DNA oraz niezbędnego do

zachowania przestrzennej struktury telomerów białka dyskeryny [1, 30]. Oprócz utrzymania odpowiedniej długości telomerów, telomeraza odgrywa znaczącą rolę między innymi podczas regeneracji uszkodzonych tkanek, w procesie nowotworzenia, ochronie antyoksydacyjnej czy też mechanizmie starzenia się organizmu [31, 32]. U większości organizmów stałocieplnych aktywność telomerazy została potwierdzona jedynie w komórkach linii płciowej, komórkach macierzystych oraz komórkach nowotworowych [31]. Badania pokazują jednak, że ekspresja telomerazy może zostać indukowana podczas regeneracji tkanek lub gojenia ran [33]. Co ciekawe, u myszy z wyłączonym genem *Tert* dochodzi do utraty zdolności regeneracji tkanek, w tym skóry, co objawia się wypadaniem i siwieniem włosów oraz zmniejszoną zdolnością gojenia się ran [34, 35]. W przeciwieństwie do ssaków, u których aktywność telomerazy jest w znacznej mierze ograniczona, telomeraza u ryb jest aktywna w komórkach wszystkich tkanek bez względu na wiek badanych osobników, co opisano u kilkunastu gatunków [23, 24, 28, 36-40]. Badania na modelowych gatunkach ryb pokazują wysoką korelację pomiędzy ekspresją genu *Tert*, a aktywnością telomerazy, co sugeruje, że regulacja transkrypcji tego genu jest jednym z podstawowych mechanizmów regulujących aktywność enzymu [40]. Pierwszym gatunkiem ryb, u którego potwierdzono tak powszechną aktywność telomerazy, także u starszych osobników był pstrąg tęczowy [36]. U pozbawionych aktywności telomerazy danio pręgowanych (*Tert*<sup>-/-</sup>) zaobserwowano przedwczesną bezpłodność, atrofię tkanek, utratę masy ciała oraz nasilenie stanów zapalnych [41]. Zagrzebki z wyłączonym przy pomocy techniki CRISPR/Cas9 genem *Tert* charakteryzowały się obniżoną płodnością oraz występowaniem atroficznych jąder i jajników [42]. Wydaje się zatem, że wysoka aktywność telomerazy u ryb oprócz oczywistych funkcji związanych z kontrolą długości telomerów, zapewnia także rybom utrzymanie homeostazy organów i tkanek.

Zależność między długością telomerów oraz aktywnością telomerazy, a masą ciała ryb jest złożoną kwestią. Długość telomerowego DNA jest cechą genetycznie determinowaną, ale dynamika zmian długości sekwencji (TTAGGG)<sub>n</sub> jest wypadkową tempa wzrostu, liczby podziałów komórkowych, narażenia na stres oksydacyjny i aktywności telomerazy, która w przypadku organizmów zmiennocieplnych jest obecna w komórkach somatycznych [43]. Podstawową funkcją telomerazy jest dobudowywanie nukleotydów do sekwencji telomerowej w każdym cyklu podziału komórkowego, co może wyjaśniać brak korelacji między długością telomerów, a wiekiem u ogrodowca zwyczajnego (*Thamnophis sirtalis*), żółwia skórzastego (*Dermodochelys coriacea*) [44, 45] czy kilku gatunków ryb, gdzie długość telomerów u dorosłych osobników jest porównywalna do tych zaobserwowanych u młodych ryb [27].

Ale nie jest to regułą. W przypadku ryb, gwałtowne tempo wzrostu od wyklucia do osiągnięcia dojrzałości płciowej może prowadzić do skracania się telomerów, co obserwuje się w komórkach kilku badanych pod tym kątem gatunków [37, 46]. Szybko rosnące transgeniczne łosie pacyficzne (*Oncorhynchus kisutch*) z dodatkowymi kopiami genu hormonu wzrostu cechują się krótszymi telomerami w porównaniu do nietransgenicznych ryb z grupy kontrolnej. Co więcej, w okresie gwałtownego wzrostu, tempo skracania się telomerowego DNA u transgenicznych osobników było zdecydowanie szybsze [47]. Wzmoczona produkcja wolnych rodników towarzysząca intensywnemu wzrostowi ryb może powodować wystąpienie stresu oksydacyjnego, który z kolei przyczynia się do zwiększenia tempa „erozji” telomerów. Wydaje się zatem, że telomeraza nie zawsze jest w stanie zrekompensować stratę telomerowego DNA będącą konsekwencją intensywnej proliferacji komórek podczas szybkiego wzrostu somatycznego. Trudno też szukać jednego modelu zależności między długością telomerów, a wielkością czy masą ciała u zwierząt zmiennocieplnych. U aligatora amerykańskiego (*Alligator mississippiensis*) osobniki o większej długości ciała posiadały krótsze telomery [48]. Z kolei u karpia, długość telomerowego DNA zwiększała się wraz z długością ciała ryb [49]. Aktywność telomerazy w komórkach mięśniowych może być relatywnie niska u dorosłych ryb, które siłą rzeczy mają większą masę ciała niż młode osobniki, co obserwuje się u pstrąga tęczowego i dorsza [36, 39]. Z drugiej strony, ekspresja genu *Tert* w mięśniach morszczuka (*Merluccius merluccius*) rosła wraz z długością ciała osobników [39]. Mimo, że ryby rosną przez całe swoje życie, to zdarzają się przypadki osobników, których tempo wzrostu zdecydowanie odbiega od średniej w populacji [50]. Niedobór wzrostu prowadzący do karłowatości u ryb jest stanem, który obserwuje się w populacjach dziko-żyjących osobników, a także wśród ryb hodowlanych, szczególnie z linii charakteryzujących się dużą wsobnością, np. ryby androgenetyczne czy gynogenetyczne [51, 52]. Dostatecznie gwałtowne zatrzymanie proliferacji komórek prowadzące do zahamowania wzrostu somatycznego może powodować, że tempo skracania się sekwencji telomerowej u takich ryb będzie wolniejsze. Z drugiej strony, u tego rodzaju ryb obserwuje się często współistnienie wad rozwojowych związanych z deformacjami kręgosłupa utrudniającymi w znacznym stopniu pływanie. Wydatek energetyczny jaki ponoszą takie ryby jest znacząco wyższy niż w przypadku ryb prawidłowo rozwijających się, co opisano u karłowatych siei (*Coregonus clupeaformis*) [53]. Co więcej, sieje z niedoborem wzrostu charakteryzowały się większym udziałem mięśni szkieletowych oraz stosunkowo większą wątrobą [54]. Wyższe tempo przemiany materii może mieć swoje konsekwencje w postaci wystąpienia stresu oksydacyjnego prowadzącego do szybszego skracania się telomerowego DNA.

Porównanie długości telomerów i aktywności telomerazy u ryb z niedoborem wzrostu oraz ich prawidłowo rozwijającego się rodzeństwa wydaje się intrygującym pomysłem mogącym przynieść nowe informacje dotyczące roli telomerazy podczas wzrostu somatycznego ryb oraz konsekwencji tejże aktywności dla długości telomerowego DNA.

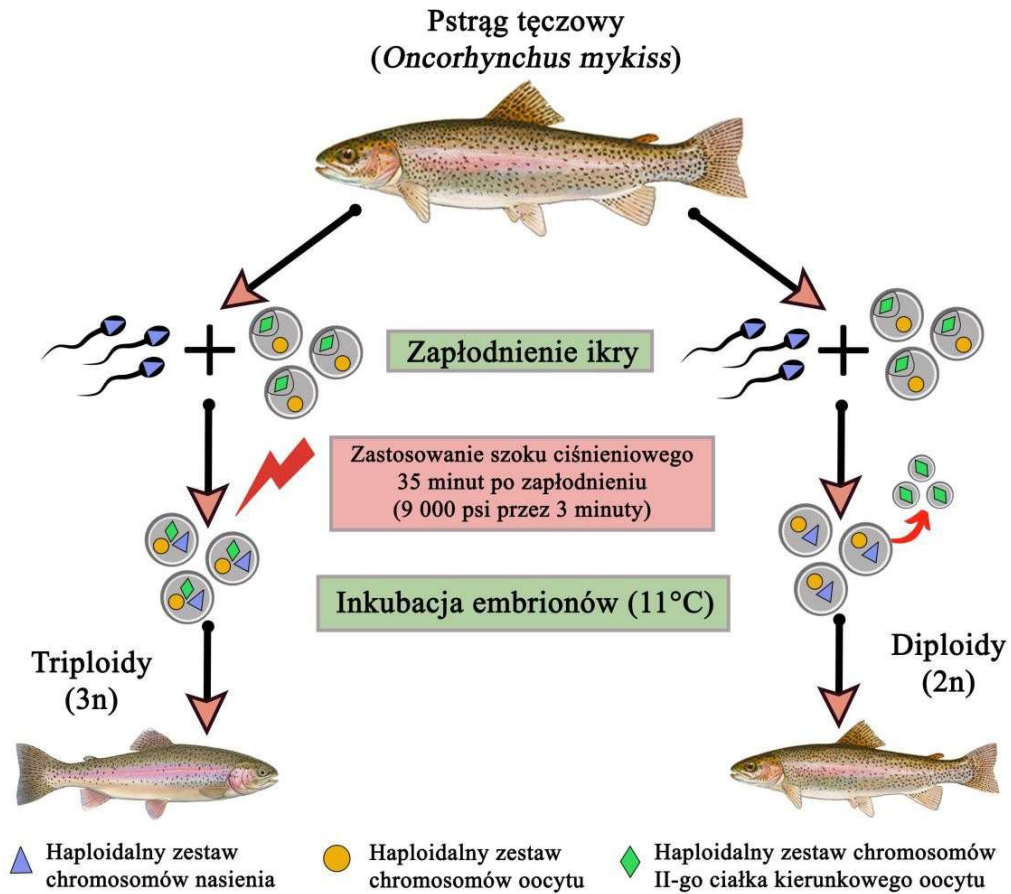
### **Spontaniczna i indukowana triploidyzacja ryb**

W przypadku niewielkiej liczby gatunków ryb zaobserwowano spontaniczne występowanie w środowisku naturalnym osobników triploidalnych. U piskorza amurskiego (*Misgurnus anguillicaudatus*) opisano linie ryb rozmnażających się gynogenetycznie, które produkują diploidalne gamety oraz linie ryb, które produkują gamety haploidalne. Osobniki z obu linii mogą się ze sobą krzyżować dając triploidalne potomstwo [55-57]. Triploidalne samice tego gatunku z linii klonalnej składają haploidalną ikrę, w której po zapłodnieniu przez haploidalne plemniki rozwinęło się diploidalne potomstwo [56]. U ryb z rodzaju *Cobitis* występujących również w Polsce obserwuje się triploidalne osobniki hybrydowe powstałe w wyniku krzyżowania się ryb należących do gatunków: koza dunajska (*C. elongatoides*), koza (*C. taenia*) oraz *C. tanaitica* [58]. Spontanicznie pojawiające się i nieliczne triploidalne osobniki opisano w przypadku dziko-żyjących populacji i linii hodowlanych kilku gatunków ryb łososiowatych w tym także w przypadku pstrąga tęczowego [59-61]. Wśród ponad 4 000 łososi atlantyckich pochodzących z 55 norweskich farm około 2% osobników okazało się być spontanicznymi triploidami. Pojawienie się spontanicznych triploidów może być spowodowane wykorzystaniem do zapłodnienia tak zwanej przejrzałej ikry, czyli ikry która zbyt długo po owulacji przebywała w jamie ciała samicy. W takich przypadkach, po zapłodnieniu dochodzi do zatrzymania drugiego ciała kierunkowego w komórce jajowej.

Badania opisane w niniejszej pracy i dotyczące dynamiki zmian długości telomerowego DNA oraz aktywności telomerazy przeprowadzono na komórkach diploidalnych i triploidalnych pstrągów tęczowych. Pstrąg tęczowy pełni ważną rolę ekologiczną, jest jednym z dominujących gatunków w światowej akwakulturze, jak również jest organizmem modelowym w badaniach dotyczących powstawania nowotworów, fizjologii, genetyki czy też żywienia [62, 63]. Osobniki z dodatkowym zestawem chromosomów uzyskano w warunkach kontrolowanych eksponując zapłodnione ziarna ikry na działanie udaru środowiskowego, w tym przypadku szoku ciśnieniowego, który destabilizując działanie mikrotubul wrzeczona kariokinetycznego zapobiega wyrzuceniu drugiego ciała kierunkowego. W konsekwencji takiego działania, w jądrze zygoty znajdują się trzy haploidalne zestawy chromosomów; dwa komplety chromosomów dziedziczonych po



matce pochodzące z przedjądrza żeńskiego (1n) i ciała kierunkowego (1n) oraz jeden komplet dziedziczony po ojcu pochodzący z przedjądrza męskiego (1n) (Rysunek 2) [64]. Dodatkowy zestaw chromosomów u triploidalnych ryb powoduje poważne zakłócenia podczas rozwoju gonad i produkcji gamet. W przypadku ryb łososiowatych, triploidalne samice są funkcjonalnie sterylne, ich jajniki są silnie zredukowane, a produkowane przez nie nieliczne oocyty są aneuploidalne i niezdolne do aktywacji i prawidłowego rozwoju. Triploidalne osobniki nie dojrzewają i inwestują niemal całą energię z pokarmu w rozwój somatyczny, dzięki czemu charakteryzują się ciągłym wzrostem, podczas gdy u ryb diploidalnych w okresie dojrzewania płciowego dochodzi do znaczącego ograniczenia tempa wzrostu, a nawet zmniejszenia masy ciała [64]. Ryby triploidalne ze względu na swoje charakterystyczne cechy takie jak większy rozmiar komórek, zwiększona heterozygotyczność (dodatkowe kopie genów), sterylność, ciągły wzrost czy też większa podatność na czynniki zewnętrzne w porównaniu do diploidalnych osobników, są dobrym modelem do badań długości telomerów oraz aktywności telomerazy. Dodatkowy zestaw chromosomów powoduje, że regulacja ekspresji genów u triploidów jest niezwykle ciekawym zjawiskiem, o którym wciąż niewiele wiemy zwłaszcza w kontekście genu *Tert*. Badania pokazują, iż osobniki triploidalne mogą charakteryzować się zmniejszoną, zwiększoną lub podobną ekspresją niektórych genów [65-68]. Ekspresja genu *Tert* jest kluczowa dla utrzymania homeostazy tkanek ryb, co jest szczególnie istotne dla osobników triploidalnych, które są bardziej wymagające w kontekście odpowiednich warunków środowiskowych w porównaniu do diploidalnych ryb.



**Rysunek 2** Graficzne przedstawienie procesu triploidyzacji pstrąga tęczowego.

## **Cele badań**

1. Charakterystyka zmian długości telomerowego DNA w trakcie rozwoju osobniczego w komórkach diploidalnych i triploidalnych pstrągów tęczowych.
2. Określenie długości telomerowego DNA i aktywności telomerazy u pstrągów tęczowych charakteryzujących się niedoborem wzrostu.
3. Określenie aktywności telomerazy w tkankach somatycznych i w jajnikach u diploidalnych i triploidalnych pstrągów tęczowych.

## **Hipotezy badawcze**

1. Długość telomerowego DNA u diploidalnych i triploidalnych pstrągów tęczowych zmienia się wraz z wiekiem w różnym tempie, zależnie od ploidalności.
2. Pstrągi tęczowe charakteryzujące się zaburzeniem wzrostu posiadają krótsze telomery oraz niższą aktywność telomerazy w swoich komórkach niż prawidłowo rozwinięte osobniki.
3. Aktywność telomerazy w niedorozwiniętych jajnikach triploidalnych pstrągów tęczowych jest niższa, niż w jajnikach osobników diploidalnych, natomiast aktywność telomerazy w organach somatycznych triploidalnych pstrągów tęczowych jest wyższa niż u diploidalnych osobników.

Weryfikacji hipotez podporządkowano następujące zadania badawcze:

Zadanie 1. Oszacowanie zmian długości telomerowego DNA w komórkach diploidalnych i triploidalnych pstrągów tęczowych w różnym wieku.

Zadanie 2. Analiza długości telomerowego DNA oraz aktywności telomerazy u karłowatych i prawidłowo rozwijających się diploidalnych pstrągów tęczowych.

Zadanie 3. Ocena aktywności ekspresji genu *Tert* w wątrobie, śledzionie, mięśniach, skrzelach i jajnikach diploidalnych i triploidalnych pstrągów tęczowych.

*Długość telomerowego DNA u diploidalnych i triploidalnych pstrągów tęczowych zmienia się wraz z wiekiem w różnym tempie, zależnie od ploidalności.*

Telomery u większości ssaków skracają się wraz z wiekiem, co jest uważane za jeden z mechanizmów starzenia replikacyjnego [69]. Wiedza dotycząca dynamiki zmian długości telomerowego DNA u ryb odnosi się do bardzo ograniczonej liczby gatunków, z których większość przebadanych pod tym kątem to gatunki uznane za modelowe. Dotychczas uzyskane wyniki pozwoliły opisać trzy warianty tego fenomenu u ryb: telomerowy DNA skraca się wraz z wiekiem (1), długość sekwencji (TTAGGG)<sub>n</sub> jest taka sama u ryb w różnym wieku (2) lub skraca się i wydłuża w zależności od etapu rozwoju osobniczego (3). Związany z wiekiem spadek długości telomerów został zaobserwowany w przypadku niektórych szczepów ryżanki japońskiej oraz zagrzebki, natomiast nie wykazano takiej zależności w przypadku *Menidia menidia* czy okonia morskiego (*Dicentrarchus labrax*), w komórkach których długość telomerowego DNA u osobników młodocianych i dorosłych jest podobna [37, 24, 70, 71]. Z kolei u danio przegowanego telomery najpierw wydłużają się osiągając maksymalną długość obserwowaną w komórkach dorosłych osobników i dopiero potem stopniowo zaczynają się skracać [28].

Celem badań opisanych w pierwszej publikacji składającej się na niniejszą pracę doktorską było zbadanie jak zmienia się długość telomerów w komórkach pstrągów tęczowych z diploidalnych i triploidalnych linii na różnych etapach rozwoju osobniczego. Triploidalne samice pstrąga tęczowego posiadają silnie zredukowane jajniki i nie inwestują energii w proces gametogenezy. Z tego też powodu ryby te nie dojrzewają płciowo, a co za tym idzie w przeciwieństwie do płodnych diploidalnych osobników tempo wzrostu takich ryb nie spada w sezonie tarłowym co jest powszechnie obserwowane w przypadku płodnych samic. Biorąc pod uwagę fizjologiczne różnice między pstrągami tęczowymi wynikające z posiadania dodatkowego haploidalnego zestawu chromosomów oczekiwano, że ewentualne tempo skracania się telomerowego DNA wraz z wiekiem także będzie różne.

Długość sekwencji (TTAGGG)<sub>n</sub> u diploidalnych i triploidalnych pstrągów tęczowych analizowano w komórkach zarodków, larw, osobników jednorocznych, dwuletnich oraz trzyletnich. Chromosomy interfazowe poddano hybrydyzacji z sondą telomerową PNA (ang. *peptide nucleic acid probe*) znakowaną izotiocyanianiem fluoresceiny (FITC) używając zestawu Telomere PNA FISH Kit/FITC (DAKO, Glostrup, Dania). Następnie z

wykorzystaniem kamery (5 M CMOS) pobrano obraz mikroskopowy jąder interfazowych po hybrydyzacji i przeanalizowano intensywność sygnałów fluorescencyjnych wykorzystując technikę Q-FISH (ang. *Quantitative Fluorescence In Situ Hybridization*) i program HiFISH ASI (Applied Spectral Imaging, Yokne'am Illit, Israel).

Wyniki analizy Q-FISH wykazały, że ryby diploidalne i triploidalne charakteryzują się podobną dynamiką zmian długości telomerowego DNA w trakcie ontogenezy. Długość telomerów w komórkach zarodków, larw i jednorocznych ryb nie zmieniała się istotnie. Znacząco krótszymi telomerami charakteryzowały się dwuletnie ryby. Co ciekawe, niespodziewanie w komórkach trzyletnich osobników stwierdzono znaczny wzrost długości telomerowego DNA. Ponadto zaobserwowano, że wraz ze wzrostem masy oraz długości ciała triploidalnych pstrągów tęczowych istotnie spada długość telomerowego DNA w ich komórkach. Takiej korelacji nie potwierdzono u ryb diploidalnych.

Spadek długości telomerów obserwowany u pstrągów tęczowych w drugim roku życia może być wynikiem szybkiego wzrostu występującego u ryb od wyklucia do etapu dojrzewania. Wyniki badań przeprowadzonych na wielu gatunkach zwierząt, w tym także na rybach, potwierdzają, że tempo skracania się telomerów jest skorelowane z okresem szybkiego wzrostu charakterystycznego dla początkowych faz życia kręgowców [43]. Model dynamiki zmian telomerowego DNA u pstrąga tęczowego wydaje się być podobny do tego zaobserwowanego u ryżanki japońskiej. U obu gatunków ryb telomery skracają się i wydłużają w trakcie życia w zależności od tempa wzrostu. Pomimo różnic fizjologicznych i genetycznych tempo wzrostu ryb diploidalnych i triploidalnych do pewnego momentu jest podobne [65], dopiero w okresie dojrzewania i samego tarła to tempo u płodnych osobników wyraźnie spada. Z tego też powodu dynamika zmian długości telomerowego DNA u ryb z obu grup jest podobna. Podczas gwałtownego wzrostu, któremu towarzyszy wzmożona proliferacja komórek, a tym samym zwiększa się poziom wolnych rodników, telomeraza nie była w stanie zrekompenzować ubytków telomerowego DNA. Wydłużenie telomerów u ryb trzyletnich może być związane ze spowolnieniem tempa wzrostu w tym okresie, co pozwoliło telomerazie na zwiększenie długości telomerów u trzylatków. Obserwowana w komórkach triploidalnych ryb zależność większa masa/długość ciała – krótsze telomery potwierdza wyniki badań pokazujących podobne powiązanie u aligatora amerykańskiego [48]. Osobniki triploidalne, które badano w tym przypadku były istotnie większe od ryb diploidalnych i być może stąd jedynie w przypadku tych pierwszych taka zależność się pojawiła.

Uzyskane wyniki pozwoliły na pozytywną weryfikację pierwszej części hipotezy, wskazując, że u diploidalnych oraz triploidalnych pstrągów tęczowych długość telomerowego DNA zmienia się w trakcie trwania ontogenezy, jednak ploidalność nie miała wpływu na dynamikę tych zmian.

## Weryfikacja hipotezy 2

*Pstrągi tęczowe charakteryzujące się zaburzeniem wzrostu posiadają krótsze telomery oraz niższą aktywność telomerazy w swoich komórkach niż prawidłowo rozwinięte osobniki.*

Tempo skracania telomerowego DNA jest największe w trakcie najszybszego wzrostu charakterystycznego dla wczesnych etapów życia kręgowców [73-75]. W przeciwieństwie do organizmów stałocieplnych, gatunki ektotermiczne (zmiennocieplne) charakteryzują się nieograniczonym wzrostem co oznacza, że rosną szybko w młodym wieku i kontynuują wzrost po osiągnięciu dojrzałości płciowej, lecz w wolniejszym tempie. Ponadto w komórkach tkanek somatycznych gadów, płazów oraz ryb wykazano wysoki poziom ekspresji telomerazy, podczas gdy u ssaków i ptaków aktywność telomerazy jest wyraźnie ograniczona w takich komórkach [76, 77]. Korelację między masą ciała i aktywnością telomerazy w wątrobie, śledzionie oraz w nerkach potwierdzono analizując kilkanaście gatunków gryzoni. U gatunków, których masa dorosłego osobnika jest niższa niż jeden kilogram, aktywność telomerazy była wysoka w badanych tkankach [78]. Poziom aktywności telomerazy u ryb cechuje duża międzygatunkowa, wewnątrzgatunkowa, a także osobnicza zmienność [28, 36, 37, 79, 80]. Najwyższą aktywnością telomerazy zazwyczaj charakteryzują się komórki młodych i szybko rosnących osobników [39, 40]. Wśród organów wewnętrznych wysoki poziom telomerazy opisano w komórkach jąder, jajników i wątroby u danio, ryżanki japońskiej, zagrzebki, zmienniaków plamistych (*Xiphophorus maculatus*) oraz u pstrąga tęczowego [23, 24, 28, 36, 38, 80]. Co więcej, w przypadku ryżanki japońskiej i morszczuka, wyższą aktywnością telomerazy charakteryzowały się komórki samców [38, 39]. W tkance mięśniowej i w skórze morszczuka wyższy poziom ekspresji genu *Tert* zaobserwowano u osobników o większej masie. Z kolei u dorosłych osobników pstrąga tęczowego wraz ze wzrostem masy ciała spadała aktywność telomerazy w mięśniach. [36, 39]. Biorąc pod uwagę, że u niektórych gatunków ryb takich jak morszczuk, pstrąg tęczowy oraz *Oryzias melastigma* zaobserwowano związek między wzrostem somatycznym i długością telomerów lub ekspresją telomerazy [39, 40, 46] interesującym wydawało się zbadanie aktywności telomerazy oraz określenie długości telomerów w komórkach osobników z niedoborem wzrostu (karłowatość) i tych charakteryzujących się prawidłowym tempem wzrostu. Karłowatość to przypadłość, która występuje dosyć często w populacjach wielu gatunków zwierząt kręgowych włączając w to ryby. Niedobór wzrostu u osobników karłowatych może mieć podłoże genetyczne lub być konsekwencją zbyt niskiego poziomu hormonu wzrostu oraz niedożywienia [81, 82]. Osobniki charakteryzujące się zredukowanym wzrostem i



deformacjami ciała opisano w populacjach wielu gatunków ryb dziko żyjących jak również tych pochodzących z hodowli (pstrąg tęczowy, łosoś atlantycki, okoń morski) [83]. W przypadku pstrąga tęczowego, w liniach składających się z w pełni homozygotycznych ryb androgenetycznych dosyć często obserwuje się osobniki karłowate, w przypadku których to zaburzenie jest efektem ekspresji recesywnych alleli [51, 52]. Porównanie aktywności telomerazy oraz długości telomerowego DNA w komórkach osobników z niedoborem wzrostu i ryb charakteryzujących się prawidłowym wzrostem było celem badań, w kolejnych dwóch artykułach wchodzących w skład niniejszej pracy doktorskiej.

Długość telomerowego DNA i aktywność telomerazy zbadano w komórkach jednorocznych prawidłowo rozwiniętych ryb androgenetycznych ( $n$ DH), karłowatych androgenotów ( $d$ DH) oraz prawidłowo rozwiniętych heterozygotycznych ryb z linii Rutki. Indukowana androgeneza jest zabiegiem pozwalającym otrzymać osobniki dziedziczące jedynie ojcowskie chromosomy [84]. Proces ten polega na inaktywacji ikry poprzez naświetlenie wysokimi dawkami promieniowania jonizującego lub UV, które niszczą jądro DNA. Następnie komórki jajowe poddane są inseminacji w wyniku czego uzyskuje się androgenetyczne haploidalne zarodki. Kolejnym etapem jest poddanie zygoty na działanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego w celu zatrzymania pierwszego podziału jądra komórkowego i zduplikowania ojcowskiego materiału genetycznego. W rezultacie otrzymuje się tak zwane podwojone haploidy (ang. *Doubled Haploids*) [84]. Niektóre androgenoty charakteryzują się niedoborem wzrostu, czy też deformacjami ciała [51], co czyni je dobrymi kandydatami do badań nad wpływem zaburzeń wzrostu na długość telomerowego DNA oraz aktywności telomerazy u ryb. Długość sekwencji telomerowej badano w komórkach pobranych z nerki główowej stosując wcześniej opisaną metodę Q-FISH. W celu oszacowania długości telomerowego DNA porównano intensywność fluorescencji sygnałów hybrydyzacji w komórkach pstrąga tęczowego i w mysich komórkach chłoniaka z linii *L5178Y-R* o znanej długości telomerów (79 700 par zasad) [85]. Natomiast aktywność telomerazy w komórkach wątroby, w mięśniach i skórze zbadano posługując się testem ELISA TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Niemcy). Jest to test przeznaczony do wysoce czułego wykrywania aktywności telomerazy z próbek biologicznych.

Porównanie długości sekwencji telomerowej w komórkach pstrągów tęczowych i komórkach *L5178Y-R* wskazuje, że średnia długość telomerów badanych ryb wynosi około 20 000 par zasad, co jest zgodne z obserwacjami innych naukowców wykorzystujących do

badań długości telomerowego DNA metodę hybrydyzacji typu Southern blot (ang. *Southern blot hybridisation*) [86]. Na długość sekwencji telomerowej nie miała wpływu płeć ryb. I co najistotniejsze w kontekście weryfikacji hipotezy, nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w długości telomerowego DNA u pstrągów tęczowych z trzech badanych grup. Najwyższą aktywność telomerazy zaobserwowano w komórkach wątroby u wszystkich badanych ryb. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w aktywności telomerazy w tym organie u ryb znacząco różniących się długością i masą. W mięśniach aktywność telomerazy była najniższa u osobników heterozygotycznych. U prawidłowo rozwiniętych osobników androgenetycznych w porównaniu do ryb karłowatych i ryb heterozygotycznych zaobserwowano podwyższoną aktywność telomerazy w skórze.

Podobna długość telomerów u pstrągów tęczowych z zaburzeniem wzrostu jak i normalnie rozwiniętych osobników sugeruje, że mechanizmy związane z niedoborem wzrostu nie wpływają na długość telomerowego DNA. Z drugiej strony, przeprowadzone analizy pokazały znaczącą międzyosobniczą zmienność długości telomerowego DNA u pstrągów tęczowych będących w tym samym wieku. Równie dużą różnorodność długości telomerów zaobserwowano w komórkach ryżanki japońskiej (od 6000 par zasad do 12000 par zasad) [38]. Badania z udziałem ssaków, ale też różnych gatunków ryb takich jak ryżanka japońska lub zagrzebka pokazują że samice posiadają dłuższe telomery niż samce [87, 88]. Podczas gdy wyniki drugiej publikacji wskazały porównywalną długości telomerów u pstrągów tęczowych obu płci, co jest z kolei zgodne z wynikami badań komórek karpia (*Cyprinus carpio*) [49]. Biorąc pod uwagę, że głównym zadaniem telomerazy jest ograniczenie nadmiernego skracania się telomerów, porównywalna aktywność telomerazy w tkankach pstrągów tęczowych o ograniczonym wzroście i normalnie rozwiniętych osobników koresponduje z wynikami opisanymi w drugiej publikacji, które pokazały brak różnic w długości telomerów między rybami karłowatymi, a tymi o niezakłóconym wzroście. Brak istotnych różnic w aktywności telomerazy w mięśniach u pstrągów tęczowych z deficytem wzrostu i osobników o prawidłowej budowie potwierdza, że aktywności telomerazy nie jest hamowana u osobników karłowatych lub, że karłowatość nie jest konsekwencją niskiej aktywności telomerazy. Z drugiej strony, obniżony poziom telomerazy obserwowany w skórze ryb z niedoborem wzrostu w porównaniu do normalnych androgenotów sugeruje, że telomeraza może być zaangażowana w procesy związane ze wzrostem przynajmniej w tej tkance. Stała i wysoka aktywność telomerazy w tkankach ryb może być kluczowa w utrzymaniu homeostazy telomerów podczas procesu regeneracji [23]. Badania

przeprowadzone na danio pręgowanym, ryżance japońskiej oraz przydence żebrowatej (*Fundulus heteroclitus*) udowodniły, że aktywność telomerazy u ryb jest powiązana z ich imponującymi możliwościami regeneracyjnymi uszkodzonych tkanek [79, 89-91]. Aktywność telomerazy pomaga zapobiegać skracaniu telomerów podczas szybkiego podziału komórek, które zachodzą w trakcie regeneracji narządów. U kilku gatunków ryb w tym także u pstrąga tęczowego, wątroba jest organem o stosunkowo wysokiej aktywności telomerazy, co może być powiązane ze zdolnościami do pełnego przywrócenia funkcji po jej uszkodzeniu [36, 38, 92].

Reasumując, telomery pstrągów tęczowych z zaburzeniami wzrostu nie były krótsze od telomerów ryb prawidłowo rozwijających się, a aktywność telomerazy w obu grupach ryb była podobna co pozwoliło odrzucić hipotezę mówiącą o tym, że pstrągi tęczowe charakteryzujące się zaburzeniem wzrostu, posiadają krótsze telomery oraz niższą aktywność telomerazy w swoich komórkach niż prawidłowo rozwinięte osobniki.

### **Weryfikacja hipotezy 3**

*Aktywność telomerazy w niedorozwiniętych jajnikach triploidalnych pstrągów tęczowych jest niższa, niż w jajnikach osobników diploidalnych, natomiast aktywność telomerazy w organach somatycznych triploidalnych pstrągów tęczowych jest znacząco wyższa niż u diploidalnych osobników.*

Dodatkowy zestaw chromosomów, a co za tym idzie zwiększona liczba alleli u triploidalnych ryb powoduje, że takie osobniki coraz częściej są obiektem badań w zakresie regulacji ekspresji genów [93, 94]. Ze względu na swoje unikalne cechy takie jak: zwiększona wielkość komórek i ich mniejsza liczba w organizmie, zakłócony proces rozwoju gonad i gametogenezy, ciągły wzrost, ale także większa wrażliwość na odbiegające od optymalnych warunki środowiskowe w porównaniu do osobników diploidalnych, triploidalne pstrągi tęczowe są ciekawym modelem w doświadczeniach dotyczących aktywności telomerazy [64]. Dodatkowy zestaw chromosomów u triploidalnych ryb łososiowatych powoduje nieprawidłowy rozwój gonad oraz zakłóca proces oogenezy. W rezultacie samice triploidalnych pstrągów tęczowych zazwyczaj mają niedorozwinięte jajniki z niewielką liczbą oocytów, co uniemożliwia im produkcję jaj i powoduje, że ryby te nie dojrzewają płciowo [95]. Ta funkcjonalna sterylność ma swoje zalety doceniane coraz częściej przez sektor akwakultury; tempo wzrostu triploidalnych samic nie jest zakłócone przez procesy związane z rozrodczością, a jakość tkanki mięśniowej nie spada w sezonie rozrodczym, co często obserwuje się u osobników diploidalnych w trakcie dojrzewania płciowego i tarła. Organami charakteryzującymi się zazwyczaj bardzo wysoką aktywnością telomerazy u ryb są gonady [24, 28, 80]. Ryby z wyłączonym genem *Tert* cechują się przedwczesną bezpłodnością, atrofią przewodu pokarmowego, a także utratą masy mięśniowej (sarkopenia) [41]. Biorąc pod uwagę, że triploidalne samice ryb łososiowatych posiadają zwiększoną liczbę alleli, co może mieć wpływ na ekspresję genów, a przy tym są rybami sterylnymi, analiza ekspresji genu *Tert* w tkankach takich ryb wydaje się z naukowego punktu widzenia niezwykle ciekawa. W związku z tym, celem badań przedstawionych w czwartej publikacji było oszacowanie ekspresji genu *Tert* w tkankach somatycznych oraz w jajnikach diploidalnych i triploidalnych samic pstrąga tęczowego.

Ekspresja genu *Tert* została zbadana w wątrobie, śledzionie, mięśniach, skrzelach oraz jajnikach dwuletnich i trzyletnich diploidalnych oraz triploidalnych samic pstrąga tęczowego. RNA z wymienionych tkanek zostało wyizolowane przy użyciu zestawu Bead-Beat Total RNA Mini kit (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska) i w dalszych etapach wykorzystane do

syntezy cDNA stosując RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA). Następnie przeprowadzono analizę real-time PCR dla genu *Tert* oraz genu referencyjnego *Actb* ( $\beta$ -aktyna). Jajniki diploidalnych i triploidalnych samic badano makroskopowo oraz sporządzono z nich preparaty histologiczne, które następnie badano pod mikroskopem. Wyniki analizy real-time PCR wykazały, że osobniki triploidalne charakteryzowały się znacząco wyższą ekspresją genu *Tert* w tkankach somatycznych w porównaniu do osobników diploidalnych. Natomiast w przypadku jajników, zdecydowanie wyższy poziom ekspresji genu *Tert* zaobserwowano u ryb diploidalnych. Ekspresja genu *Tert* w mięśniach była większa u ryb dwuletnich tylko w przypadku diploidalnych osobników. W skrzelach nie odnotowano istotnych różnic w aktywności genu *Tert* między grupami wiekowymi zarówno u diploidalnych jak i u triploidalnych pstrągów tęczowych. Trzyletnie ryby triploidalne charakteryzowały się wyższą ekspresją *Tert* w wątrobie w porównaniu do ryb dwuletnich. Podobnych różnic nie wykazano u pstrągów tęczowych diploidalnych. W śledzionie istotny wzrost aktywności genu *Tert* wystąpił tylko u trzyletnich osobników triploidalnych w porównaniu do diploidów (bez względu na wiek) oraz dwuletnich ryb triploidalnych. Jajniki osobników triploidalnych były silnie zredukowane oraz zbudowane głównie z komórek tkanki łącznej, najczęściej fibrocytów i zawierały nieliczne oocyty. Gonady ryb diploidalnych były prawidłowo rozwinięte, wypełnione oocytami na różnym stopniu dojrzałości.

Wpływ triploidyacji na ekspresję genów był badany między innymi u takich gatunków jak łośoś atlantycki, karaś chiński (*Carassius auratus*) czy *Clarias macrocephalus* [96-98]. W przypadku większości badanych w tych pracach genów poziom ich ekspresji w tkankach ryb diploidalnych i triploidalnych był zbliżony. Natomiast w wyniku kompensacji dawki genów (ang. *dosage compensation*) niektóre geny (na przykład geny regulujące przemiany metaboliczne lub odpowiedź na stres) mogą wykazywać inny poziom ekspresji u osobników triploidalnych w porównaniu do diploidów [68]. W niniejszej pracy triploidalne pstrągi tęczowe w porównaniu do diploidów charakteryzowały się wyższym poziomem ekspresji genu *Tert* we wszystkich badanych tkankach somatycznych. Wskazuje to, że *Tert* podlega mechanizmowi kompensacji dawki genów związanemu z podwyższoną ploidalnością. Biorąc pod uwagę wspomniane w pierwszym akapicie różnice między diploidalnymi, a triploidalnymi pstrągami tęczowymi, osobniki triploidalne mogą wymagać zwiększonej aktywności telomerazy w celu utrzymania właściwej homeostazy tkanek. Wątroba, skrzela, śledziona i mięśnie wykazują istotnie wyższą ekspresję telomerazy u

triploidalnych pstrągów tęczowych, co może być związane z ich fizjologią, jak również przyczyniać się do ich zdolności regeneracyjnych oraz odporności na stres oksydacyjny [64, 99]. Najwyższa ekspresja genu *Tert* obserwowana w wątrobie może mieć związek z jej kluczową rolą w metabolizmie, a co za tym idzie większym narażeniem komórek tego organu na reaktywne formy tlenu i działanie toksyn [100]. Telomeraza poza swoją podstawową funkcją jaką jest utrzymanie odpowiedniej długości telomerów, pełni też rolę związaną z eliminacją wolnych rodników [32]. Telomeraza ma również duże znaczenie w rozwoju jajników i produkcji oraz dojrzewaniu oocytów u ryb. Danio przegowane z wyłączonym genem *Tert* charakteryzują się atrofią gonad, zmniejszoną produkcją jaj, a także przedwczesną niepłodnością [41]. Obecność niewielu oocytów, które zazwyczaj charakteryzują się wysoką aktywnością telomerazy, może mieć związek z obserwowanym zmniejszeniem ekspresji *Tert* w gonadach triploidalnych pstrągów tęczowych. Poza tym, telomeraza jest aktywowana przez estrogeny poprzez stymulację ekspresji genu *Tert*, dlatego też niedobór estradiolu obserwowany w jajnikach triploidalnych samic może również być odpowiedzialny za obniżoną ekspresję *Tert* [43].

Wyniki badań zamieszczone w czwartej publikacji potwierdziły hipotezę trzecią, wykazując że w niedorozwiniętych jajnikach triploidalnych pstrągów tęczowych ekspresja genu *Tert* jest niższa niż w jajnikach osobników diploidalnych, natomiast aktywność telomerazy w organach somatycznych triploidalnych pstrągów tęczowych jest wyższa niż u diploidalnych osobników.

Metodologia badawcza obejmowała między innymi:

- Przeprowadzenie procesu triploidyzacji (Rysunek 2).
- Wykonanie preparatów płytek interfazowych komórek pochodzących z nerki głowowej diploidalnych, triploidalnych oraz androgenetycznych pstrągów tęczowych.
- Przeprowadzenie analizy Q-FISH oraz analizy mikroskopowej.
- Hodowla linii komórkowej *L5178Y-R*.
- Wykonanie testu ELISA na wybranych tkankach (wątroba, mięśnie, skóra) pochodzących od androgenetycznych i diploidalnych pstrągów tęczowych.
- Izolacja całkowitego RNA z wątroby, śledziony, mięśni, skrzelii oraz jajników diploidalnych oraz triploidalnych pstrągów tęczowych w wieku dwóch i trzech lat.
- Synteza matrycowego DNA z RNA.
- Określenie poziomu ekspresji genu *Tert* przy zastosowaniu techniki real-time PCR.

Średnia długość telomerowego DNA u pstrąga tęczowego wynosi około 20 000 par zasad, a samice oraz samce cechowały się zbliżoną długością telomerów. Długość sekwencji telomerowej w komórkach zarodków, larw i jednorocznych ryb nie zmieniała się istotnie. Znacząco krótszymi telomerami charakteryzowały się dwuletnie pstrągi tęczowe. W komórkach trzyletnich osobników stwierdzono znaczny wzrost długości telomerowego DNA. Diploidalne i triploidalne pstrągi tęczowe charakteryzowały się podobną dynamiką zmian długości telomerowego DNA, co sugeruje, że różnice na poziomie molekularnym i fizjologicznym będące konsekwencją dodatkowego zestawu chromosomów nie wpływają znacząco na długość telomerów u tego gatunku.

Wyniki badań zamieszczone w drugiej i trzeciej publikacji dotyczyły długości telomerów oraz aktywności telomerazy u osobników z niedoborem wzrostu. Karłowate pstrągi tęczowe i ryby z prawidłowym wzrostem posiadają porównywalną długość telomerowego DNA oraz podobny poziom aktywności telomerazy w wątrobie i mięśniach. W przypadku skóry ryb karłowatych aktywność telomerazy była mniejsza w porównaniu z normalnie rozwiniętymi osobnikami androgenetycznymi. Zbliżona długość telomerów u pstrągów tęczowych z zaburzeniem wzrostu jak i prawidłowo rozwiniętych osobników sugeruje, że mechanizmy związane z niedoborem wzrostu nie wpływają na długość telomerowego DNA.

Celem badań przedstawionych w ostatniej publikacji było określenie ekspresji genu *Tert* u diploidalnych oraz triploidalnych pstrągów tęczowych w różnych tkankach. Osobniki triploidalne charakteryzowały się podwyższoną ekspresją *Tert* w tkankach somatycznych w porównaniu do ryb diploidalnych, co sugeruje, że aktywność telomerazy jest kluczowa dla utrzymania homeostazy tkanek u ryb posiadających dodatkowy zestaw chromosomów czego konsekwencją jest między innymi wyższa wrażliwość na odbiegające od optymalnych warunki środowiskowe. Inaczej sytuacja przedstawia się w jajnikach; niedorozwinięte gonady triploidalnych samic zbudowane z tkanki łącznej (głównie fibrocytów), które zawierały nieliczne oocyty charakteryzowały się zdecydowanie obniżonym poziomem ekspresji genu *Tert*. Gonady ryb diploidalnych były prawidłowo rozwinięte, wypełnione oocytami na różnym stopniu dojrzałości. Niewielka liczba komórek płciowych, które zazwyczaj charakteryzują się wysoką aktywnością telomerazy prawdopodobnie wpłynęła na obserwowaną w sterylnych jajnikach niską ekspresję genu *Tert*.



1. Proces triploidyzacji nie wpłynął znacząco na dynamikę zmian długości telomerowego DNA w trakcie rozwoju osobniczego pstrągów tęczowych.
2. Gwałtowne zahamowanie wzrostu somatycznego u pstrągów tęczowych nie ma swojego odzwierciedlenia w długości telomerowego DNA i aktywności telomerazy.
3. Podwyższona ekspresja genu *Tert* w komórkach somatycznych u triploidalnych pstrągów tęczowych wskazuje na ważną funkcję telomerazy w utrzymaniu prawidłowego funkcjonowania tkanek.
4. Obniżony poziom ekspresji genu *Tert* w niedorozwiniętych jajnikach triploidalnych samic potwierdza istotną rolę telomerazy w procesach związanych z rozwojem gonad i płodnością u ryb.