

UNIVERZITA PALACKÉHO OLMOUC  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



2011

Pavla Šiková

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



**Globální epigenetické změny protoplastových kultur**

**Pavla Šiková**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie  
Forma studia: prezenční

**Olomouc 2011**

Vedoucí práce: **RNDr. Vladan Ondřej, Ph.D**

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci na téma globální epigenetické změny vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Vladana Ondřeje, Ph.D. jen s použitím uvedené literatury a informačních zdrojů.

V Olomouci, dne 20. 4. 2011

Podpis.....

## Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce RNDr. Vladanu Ondřejovi, PhD. za odborné vedení a cenné rady při tvorbě této práce.

Šiková, P.: Globální epigenetické změny protoplastových kultur. Bakalářská práce. Katedra botaniky PřF UP v Olomouci, 45 s., česky.

## ABSTRAKT

Protoplastové kultury se vyznačují tím, že mají schopnost obnovit pluripotenci během diferenciací. Během tohoto děje se mění organizace jaderného genomu na úrovni genetické i epigenetické. Regenerační potenciál protoplastů závisí především na druhu a genotypu rostliny a na použitém explantátu a jeho stáří.

Pomocí specifických protilátek byly pozorovány epigenetické změny (methylace DNA, fosforylace, acetylace, dimethylace histonů) jaderných genomů protoplastů okurky seté (*Cucumis sativus L.*) kultivovaných v 0 hodin, 24 hodin, 48 hodin a 72 hodin po izolaci a jaderného genomu izolovaného z listu téhož druhu. Naměřené hodnoty byly mezi sebou porovnávány.

**Klíčová slova:** Protoplasty, chromatin, nukleozom, DNA methylace, DNA hydroxymethylace, modifikace histonů, RNA interference

Šiková, P.: Global epigenetic changes in protoplast culture, Department of Botany , Faculty of Science, Palacky University of Olomouc, 45 pp., in Czech.

## **ABSTRACT**

Protoplast culture is characterized by having the ability to restore pluripotency during differentiation. During this process, protoplasts change the organization of the nuclear genome at the genetic and epigenetic level. Regeneration potential of protoplasts depends on the type and plant genotype and the use of explant and its age. Using specific antibodies were observed epigenetic changes (DNA methylation, histone phosphorylation, acetylation and dimetylation) of genomes of cucumber (*Cucumis sativus L.*) protoplasts cultivated at 0 hours, 24 hours, 48 hours and 72 hours after isolation and nuclear genome isolated from leaf of the same species. The measured values were compared among themselves.

**Key words:** Protoplasts, chromatin, nucleosome, DNA methylation, DNA hydroxymethylation, histone modification, RNA interference

## Obsah

1. Cíl práce .....	9
2. Úvod.....	10
2.1 Termín epigenetika.....	10
3. Struktura chromatinu .....	11
3.1 Euchromatin .....	11
3.2 Heterochromatin.....	11
3.3 Nukleozom .....	11
4. Metylace cytozinu.....	12
4.1 DNA metyltransferázy.....	14
4.2 Proteiny vázající se na metylované CpG .....	14
4.3 Inhibitory metylace cytozinu .....	15
4.4 Genomový imprinting .....	15
5. Hydroxymethylace .....	16
5.1 DNA hydroxymethyltransferázy .....	17
6. Modifikace jaderných histonů .....	17
6.1 Acetylace histonů .....	17
6.1.1 Histon acetylázy .....	18
6.1.2 Histon deacetylázy.....	18
6.1.3 Inhibitory histondeacetyláz.....	19
6.2 Fosforylace histonů.....	19
6.3 Metylace histonů.....	20
6.4 Ubiquitinace.....	21
6.5 Sumoylace .....	21
7. RNA interference .....	23
8. Materiál a metody .....	26
8.1 Biologický materiál.....	26
8.2 Seznam použitých roztoků a médií .....	26
8.3 Vybavení laboratoře.....	27
8.4 Izolace protoplastů .....	27
8.5 Izolace listové DNA.....	28
8.6 Izolace protoplastové DNA.....	28
8.7 Izolace jaderných proteinů (histonů).....	28
8.8 Metodika stanovení množství fosforylovaných histonu H3 serinu 10.....	29
8.9 Metodika stanovení množství acetylovaných histonů H4.....	30

<b>8.10 Metodika stanovení množství dimetylovaných histonů H3 lyzinu 4</b> .....	31
<b>8.11 Metodika stanovení množství metylované DNA</b> .....	31
<b>9. Výsledky</b> .....	33
<b>10. Diskuze</b> .....	38
<b>11. Závěr</b> .....	40
<b>12. Seznam literatury</b> .....	41



## 1. Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je shromáždit a zpracovat literaturu, která se zabývá tématem epigenetických změn a protoplastových kultur. Teoretická část se zabývá epigenetickými jadernými změnami DNA a histonů rostlinných i živočišných buněk.

Praktická část zahrnuje izolaci protoplastových kultur, jaderné DNA a jaderných histonů okurky seté (*Cucumis sativus L.*). Pomocí specifických protilátek proti metylované DNA, acetylovaným, fosforylovaným a dimetylovaným histonům zjistit kolorimetricky míru epigenetických změn protoplastů kultivovaných 0 hodin, 24 hodin, 48 hodin, 72 hodin po izolaci a jaderné DNA a histonů izolovaných z téhož rostlinného druhu.

## 2. Úvod

Protoplast je rostlinná buňka, které chybí celulózní obal (buněčná stěna). Ke ztrátě dochází pomocí lytických enzymů, které ho rozkládají. V dnešní době je protoplastizace jednou z hlavních metod využívaných ke studiu rostlinných buněk v oborech cytologie, fyziologie a molekulární biologie (Takebe et al., 1971). Z jednoho protoplastu lze vykultivovat v médiu, které obsahuje růstové hormony (auxin a cytokinin) různé rostlinné orgány (proces pluripotence) nebo celou rostlinu (proces totipotence). Než dojde k buněčné regeneraci, musí nejprve dojít k dediferenciaci, během které se diferenciovaná buňka vrací na stupeň zygoty, embryonální nebo meristematické buňky a dochází k obnově buněčného dělení (Grafí, 2004). Jedním z aspektů buněčné dediferenciace je dekondezace chromatinu. Dekondenzovaný chromatin si však zachovává své specifické epigenetické markery (Tessadori et al., 2007).

Ale pouze u některých druhů rostlin je vyvinuta schopnost nedělicí se buňky projevit plně svou totipotenci při regeneraci v *in vitro* podmínkách. Například protoplastové kultury *Cucumis sativus*, s kterými je v této práci prováděna testovací metoda na epigenetické změny, patří mezi špatně regenerující rostliny a jen v několika případech bylo dosaženo regenerace celých rostlin (Burza & Malepszy, 1995).

### 2.1 Termín epigenetika

Termín epigenetika - vědní podobor genetiky - byl vytvořen vývojovým biologem Conrad Waddingtonem v roce 1940 k popisu interakce genů s prostředím, které přinášejí změny ve fenotypu (genové expresi), které nejsou způsobeny změnou sekvence DNA (Tost, 2008). Tyto změny mohou být děděné mitózou (z buňky na buňku), ale i miózou (z generace na generaci) (Levenson & Sweatt, 2005).

Nezbytné změny v profilech genové exprese jsou často spojeny se změnami ve struktuře chromatinu. Konformace chromatinu je hluboce ovlivňována posttranslační modifikací bílkovinných histonů (Imhof, 2006).

### **3. Struktura chromatinu**

Chromatin se nachází v buněčném jádře a je tvořen vláknem DNA a proteiny. Je to dynamická molekula, která existuje v mnoha konfiguracích. Podle stupně kondenzace během interfáze dělíme chromatin na dekonenzovaný euchromatin a kondenzovaný heterochromatin.

#### **3.1 Euchromatin**

Euchromatin je dekonenzovaná část chromatinu, která představuje 10% z celkového chromatinu v typické diferencované eukaryotní buňce. Tato část je buď aktivně přepisována nebo je ve stavu snadno přístupném transkripci. Euchromatin je slabě barvitelný (Alberts et al., 2005).

#### **3.2 Heterochromatin**

Heterochromatin je kondenzovaná část chromatinu, která je transkripčně inaktivní a dobře barvitelná. Představuje více než 10% interfázního chromozomu a v savčích buňkách ho můžeme najít v okolí centromer a na koncích chromozomu. Pokud se dostane aktivní gen do heterochromatinové oblasti, stane se inaktivní, protože se stane součástí kondenzované DNA. (typickým příkladem může být inaktivovaný samičí chromozom X u savců). Tento heterochromatin se nazývá fakultativní (Alberts et al., 2005).

Heterochromatin konstitutivní obsahuje vysoký podíl repetitivních sekvencí DNA a vyšší obsah 5-metylcytosinu (Vyskot, 2010).

#### **3.3 Nukleozom**

Základní jednotkou chromatinu je nukleozom. Nukleozom je tvořen oktamerem histonů, které tvoří jádro a okolo něho je obtočeno 146 párů bází DNA (Morales et al., 2001). Oktamer je tvořen histony H2A, H2B, H3 a H4, z nichž každý je zastoupen ve dvou kopiích. Řetěz polypeptidů je strukturně polarizován a to tak, že konec mající  $-NH_2$  skupinu se označuje jako N-aminoterminální konec a druhý konec, který obsahuje  $-COO^-$  skupinu je označen jako C- konec.

V jádře se histony nacházejí v podobě dimerů H2A-H2B a tetrameru H3-H4, který je propojen C-aminoterminální doménou histonu H3. Na tento tetramer připojením dimerů H2-H3, každý z jedné strany, vznikne výsledný oktamer. Interakce mezi dimerem a tetramerem je zprostředkována pomocí C-aminoterminálních domén histonů H2B a H4 (Ramakrishnan, 1997).

Histon H1 jinak známý jako spojovací histon, se váže v oblasti mezi DNA a nukleozomy. Prostřednictvím tohoto vázání dochází k usnadnění organizace chromatinu do vyšších struktur. Na rozdíl od čtyř hlavních histonů obsahuje histon H1 konzervované centrální globulární domény lemované N- a C-terminálními doménami (Tost, 2008).

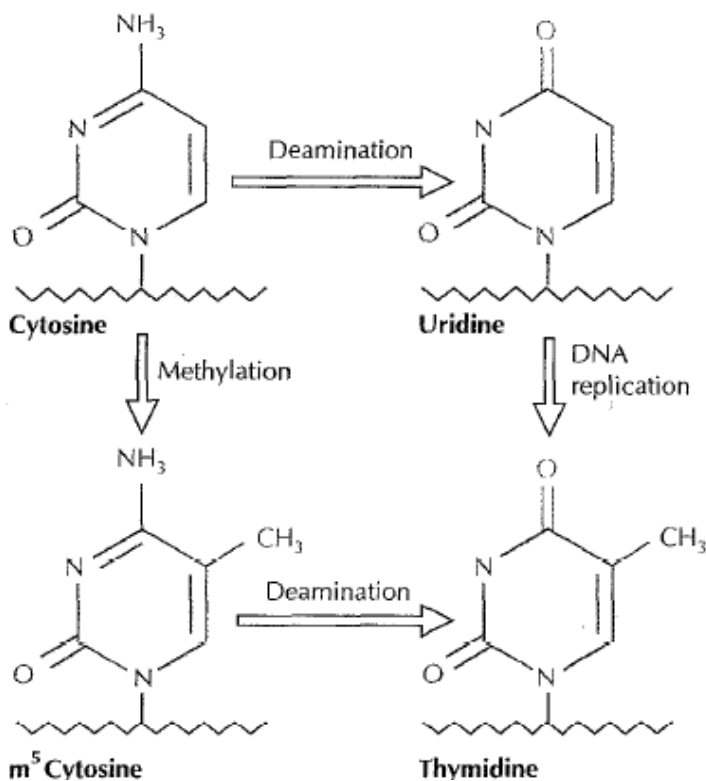
#### **4. Metylace cytozinu**

Metylace cytosinu v 5' pozici pyrimidinového kruhu (5-mC) je nejdůležitější epigenetická změna u eukaryot. U savců se metylcytozin vyskytuje převážně v cytosin-guanin (CpG) dinukleotidu, zatímco u rostlin se častěji nachází v cytosin-jakýkoliv nukleotid-guanin (CpNpG) trinukleotidové sekvenci (Fraga & Esteller, 2002).

U některých bezobratlých živočichů je hladina metylovaného cytozinu na úrovni detekčního minima, u savců nabývá metylační index [obsah mC/(mC + C) x 100 %] hodnoty přibližně 10%, u velkých genomů krytosemenných rostlin nabývá tento index vyšších hodnot i přes 30%. Nejvyšší hustoty 5-mC je v heterochromatinových oblastech chromozomů, jako jsou centromery či subtelomerické repetitivní sekvence DNA (Vyskot, 2010).

Metylace DNA je nezbytná pro vývoj savců, ale je také nejčastější mutací lidské DNA. Dochází k přechodu cytozinu v CpG dinukleotidu na thymin (Obr.č.1). Tato deaminace není vždy spontánní a je ireverzibilní, z epigenetické změny se tedy stává změna genetická. Některé z těchto mutací mohou zahrnovat aktivní proces a metylace cytozinu může být zapojena do jiných cest metagenese a genové inaktivace (Bestor & Coxon, 1993).

**Obrázek č.1:** Schéma zobrazující proces metylace cytozinu na metylcytozin. Deaminaci metylcytozinu na tymin a cytozinu na uracil a přepis uracilu během DNA replikace na tymin. (Bestor & Coxon, 1993)



Koexistence specifického genového promotoru hypermetylace a globální genomické DNA hypometylace je epigenetická charakteristika nádorových buněk. Mnohé z těchto ovlivnitelných genů jsou nádorové supresorové geny, které se podílejí na regulaci buněčného cyklu, reparace DNA, apoptózy, angiogeneze, invaze a přilnavosti. Je důležité zdůraznit odlišný profil hypermetylace CpG ostrovů organizace těchto genů v různých typech nádorů. Například nádory zažívacího traktu jsou více hypermetylovány než nádory vaječníků a zhoubné nádory jsou hypermetylovány nejméně. Sporadické a zděděné rakoviny mají podobné DNA metylace. Také histon posttranslační modifikace jsou spojovány s nádorovým bujením. Ztráta monoacetylovaného lyzinu 16 a trimetylovaného lyzinu 20 na histonu H4 se objevuje v rané fázi buněčné transformace a zvyšuje se progrese tumoru. Tyto změny mohou, ale nemusí být v souvislosti s hypermetylací (Mulero-Navarro & Esteller, 2008).

## 4.1 DNA metyltransferázy

Metyltransferázy zprostředkovávají přenos metylované skupiny z donoru S-adenozylmetioninu na substrát, kterým je cytozin (Bestor, 2000).

U savců je metylace cytozinu typická pro CpG sekvence repetitivní DNA (jak bylo uvedeno výše), oblasti imprintovaných genů a genů inaktivovaných na X chromozomu samic. Rozdělují se do 3 podrodin: Dnmt1 enzymy odpovídají za udržování metylce v CpG dinukleotidech po replikaci DNA. Druhá podrodina: Dnmt2 enzymů mají pouze slabou aktivitu v některých sekvencích CpG, a třetí podrodina Dnmt3 má *de novo* metyltransferázovou aktivitu (Vyskot, 2010).

Metylace cytozinu patří mezi základní mechanismy pro normální vývoj různých organismů včetně savců a rostlin. Například narušení některého ze tří hlavních Dnmt u myši vede k úmrtí buď před nebo během embryonálního vývoje a je spojován s globální demetylací. Inaktivace enzymu Dnmt1 v lidských nádorových buňkách vede k abnormální mitotické aktivitě a následné buněčné smrti. Kromě toho se zdají být enzymy Dnmt3a a Dnmt3b nezbytné pro nádorové transformace a progresi tumoru (Vaissie`re et al., 2008).

Podrodina chromometyláz je charakteristická pro rostlinnou říši. U některých eukaryotních organismů (zejména *Ceanorhabditis elegans* a *Sacharomyces cerevisiae*) chybí v genomu cytozinové metylace a nic nenasvědčuje tomu, že by cytosin methyltransferázovou kódující sekvenci obsahovaly. Jiné organismy, jako například *Arabidopsis thaliana*, mají 10 nebo více cytozin methyltransferázových homologů (Goll & Bestor, 2005).

## 4.2 Proteiny vázající se na metylované CpG

Je známo 5 proteinů, které se váží na metylované úseky DNA: MECP2 (methyl CpG-binding protein 2), MBD1 (methyl CpG-binding domain protein 1), MBD2, MBD4 a Kaiso (Levenson & Sweatt, 2005).

Mutace X-vázaného MECP2 genu jsou odpovědné za nejméně 80% všech případů Rettova syndromu. Rettův syndrom je extrémní neurologická porucha, která postihuje ženy v heterozygozním stavu, X<sup>+</sup>X<sup>-</sup>, ale mohou být pouze jenom přenašečkami. U Chlapců se choroba neprojevuje, protože vazebný gen je vázán na chromozom X. Mutace způsobuje, že MECP2 snižuje svoji vazebnost na metylovanou DNA. Mutace myšího MECP2 ukazují fenotypové podobnosti včetně příznaků k lidským mutacím. Malá velikost mozku, snížená dendrická arborizace, třes, netečnost, poruchy chůze a arytmiické dýchání. Pokud je ale gen

v myši aktivován, dochází k nápravě. Choroba je tedy reverzibilní a mohla by se nechat v budoucnosti léčit i u člověka (Jaenisch & Bird 2003).

### 4.3 Inhibitory metylace cytozinu

Třída methyltransferázových inhibitorů DNA je zastoupena azacitidinem (5-aza-2'-deoxycytinin) a decitabinem. Azacitidin byl schválen pro léčbu pacientů s myelodysplastickým syndromem (MDS), a decitabin je v současnosti předmětem přezkumu ze strany FDA (Food and Drug Administration). Klinická studie azacitidinu leukémie typu B ukazuje trvanlivé zlepšení klinických příznaků, zlepšení funkce kostní dřeně, snížení rizika leukemické transformace a významné zlepšení kvality života pacientů (Fenaux, 2005).

U rostlin *Arabidopsis thaliana*, *Thlaspi arvense* a *Nicotina plumbaginifolia* byly prováděny testy, zda-li má podání azacitidinu vliv na vernalizaci. Po podání azacitidinu nebo vystavení nízkým teplotám byl naměřen výrazný pokles metylace cytozinu. Methylace DNA zabráňuje předčasnému kvetení, demethylace uvolňuje tento blok a nastává proces kvetení. Na základě těchto údajů bylo zjištěno, že demethylace spouští transkripci genů, které se podílejí na biosyntéze rostlinného fytohormonu giberelinu (Burn et al., 1993).

### 4.4 Genomový imprinting

Methylace DNA je u savců zodpovědná také za neobvyklé případy, kdy je genová exprese řízena jeho rodičovským (parentálním) původem (Snustas & Simmnons, 2009).

V roce 1991 byl identifikován první imprintovaný gen Igf 2 (inzulin-like growth factor). Dechiara et al si všimli, že je metylován v samičí zárodečné linii, nikoli však v samčí. Během embryogeneze došlo k snížení velikosti novorozence o 40% u otcovských heterozygotů i homozygotů, z čehož byl vyvozen závěr, že metylovaný stav Igf2 od matky je tichý a za aktivitu genu může nemetylovaný stav Igf 2 od otce. Od té doby byly různými molekulárními metodami identifikovány imprintované geny u myši a člověka (Bartolomei & Tilghman, 1997).

Během embryogeneze se nemetylované a metylované stavy udržují při každé replikaci genů. Ale metylovaný gen, který byl zděděn od jednoho pohlaví, může být demetylován, když prochází přes potomka opačného pohlaví (Snustas & Simmnons, 2009).

Podobně je tomu také u rostlin. U *Arabidopsis thaliana* a kukuřice má narušení mateřského a otcovského příspěvku genů dramatický dopad na vývoj semene. Rodičovská nerovnováha

ovlivňuje vývoj endospermu tvořící extraembryonální terminální pletivo, které poskytuje živiny vyvíjejícímu se embryu uvnitř semene (Feil and Berger, 2007).

Nedávné studie modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* poukazují na gen *Mea* (Mea), který je exprimován maternálně (je paternálně imprintován). Jestliže dojde k samoopylení heterozygotní rostliny *Mea/mea*, 50% semen zastaví svůj vývoj. Tato 1:1 segregace je charakteristická pro mutaci, která zničí gen požadovaný v samičím gametofytu, protože polovina haploidních gametofytů by měla nést mutantní alelu. Jestliže byly standardní rostliny opyleny heterozygotní rostlinou *Mea/mea*, tvorba semen probíhala normálně, avšak 50% z nich neslo mutaci *mea*. Jaké jsou tedy vady způsobené *mea* (nefunkční materiální alela) mutacemi? Mutant embryo prochází raným vývojem normálně, zvrát nastává od pozdní fáze (zhruba 60 hodin po oplodnění), kdy se jeví větší než wild-type. Morfogeneze probíhá pomaleji než u normálního typu, když je normální typ embryo plně diferencován, *mea* embryo jsou stále v srdčité fázi, ale jsou asi 10 x větší a následně degenerují semena vysušením. U mutanta endospermu dochází ke zpožděné celularizaci a ke snížení jaderného dělení (Goodrich, 1998).

## 5. Hydroxymetylace

Nedávné studie ukázaly, že existují enzymy z rodiny TET, které jsou schopné převést 5-metylcytozin (5-mC) na 5-hydroxymetylcytozin (5-hmC). 5-hydroxy-metylcytozin je přítomen v savcích buňkách, konkrétně představuje 5% ze všech cytozinů přítomných na CpG ostrovech embryonálních kmenových buněk a 20% v mozečku buněk Purkyňových. Vzhledem k tomu, že buňky embryonální mají vysokou proliferační schopnost a Purkyňovy buňky jsou postmitotické, se biologické funkce 5-metylcytozinu mohou lišit v závislosti na typu buňky. Existuje několik možných scénářů, které se vzájemně nevylučují. Konverze 5-mC na 5-hmC by mohla vést k přesunu 5-metylcytozin vazebného proteinu (MECP2) z metlyované DNA, protože se neváže na 5-hmC. 5-hmC může podporovat demetylaci. Výměna 5-mC s 5-hmC může interferovat s údržbou metylace katalyzovanou Dnmt1 během buněčného dělení (Huang et al., 2010).



## 5.1 DNA hydroxymetyltransferázy

TET proteiny (TET1, TET2 a TET3) jsou oxygenázy závislé na 2-oxoglutarátu a železnatých iontech a katalyzují konverzi 5-metylcytosinu na 5-hydroxymetylcytosin v DNA. TET1 a TET2 se podílejí na vzniku lidské leukémie. (Huang et al., 2010).

## 6. Modifikace jaderných histonů

Histony jsou předmětem obrovského množství kovalentních posttranslačních modifikací jako je acetylace a metylace na lyzinových a argininových reziduích, fosforylace serinu a threoninu a ubikvitinace a sumoylation lyzinových reziduí. Většina těchto posttranslačních modifikací působí na amino-terminálním a karboxy-terminálním konci (Peterson & Laniel, 2004). Modifikace histonů je spojována s řadou procesů závislých na chromatinu jako je třeba replikace, oprava DNA, transkripce. Souvislost mezi histonovou modifikací a transkripcí byla intenzivně studována. Výsledek ukázal, že jednotlivé změny mohou být spojovány s transkripční aktivací nebo represí. Acetylace a fosforylace je obecně spojována s doprovodnou funkcí transkripce, sumoylace je součástí transkripčně tichých regionů a metylace a ubiquitinace mají za následek aktivaci i replikaci (Kalić et al., 2010).

### 6.1 Acetylace histonů

Acetylace je nejlépe popsána posttranslační histonová úprava. K acetylaci dochází na aminoterminálním konci lyzinového zbytku, tento N-terminální konec má za normálních okolností kladný náboj, ale navázáním acetylované skupiny dochází k jeho neutralizaci (Levenson & Sweatt, 2005). Acetylace histonu tudíž vede k oslabení přitažlivé síly mezi záporně nabitou kostrou DNA a N-koncovou doménou histonu a k uvolnění struktury nukleozomu (Loidl 1994). Acetylace lyzinů na histonech H3 a H4 má vždy aktivační charakter (Vyskot, 2010). Reakce je katalyzována histon acetyltransferázami (HAT), které přenášejí acetylovanou skupinu z acetylkoenzymu A na  $\epsilon$ -NH<sup>+</sup> skupinu lyzinového zbytku. Tento proces je reverzibilní a enzymy, které katalyzují deacetylaci jsou známy jako histon deacetylázy (HDACs) (Levenson & Sweatt, 2005).

### 6.1.1 Histon acetylázy

V současné době existuje několik rodin histon acetyláz ilustrovaných jako PCAF/GCN5, p300/CBP, TAF250, SRC1 a MOZ. Z těchto enzymů, dvě rodiny PCAF/GCN5 a p300/CBP jsou nejvíce popsány a jsou velmi silné. Zatímco enzym SRC1 má velmi slabou a často nezjistitelnou aktivitu vůči histonům. Jedním z vysvětlení nízké aktivity vůči histonům může být to, že skutečným cílem pro tento enzym jsou nonhistonové bílkoviny, které nebyly doposud identifikovány (Kouzarides, 2000).

Dvě histon acetyltransferázy GCN5 a p300 zodpovědné za acylaci lysinu jsou zapleteny do DDR (DNA damage response, odpověď na poškození DNA) indukované UV zářením. U kvasinek ozářením UV dochází k hyperacetylaci H3 (lyzinu 9 a 14) genu MFA2. Tato acetylace je doprovázena zvýšenou dostupností DNA templátu. Tato změna tedy umožňuje přístup bílkovin k poškozené DNA. Acetylaci histonu H3 zprostředkovává histon acetyltransferáza Gcn5 je u kvasinek zapojená do regulace genové exprese asi do 5% genomu. Jiný promotor RPB2 nevyžaduje pro acylaci histonu ani pro efektivnější odstranění škod Gcn5. Gcn5 upravuje podmnožinu genů, zatímco histon acetyltransferáza p300 je globulární regulátor transkripce. P300 je také zapojena do opravy poškozených genů UV zářením Ing1B, DDB1, PCNA, CSB a p53. To naznačuje, že kromě Gcn5, p300 má funkci v acylaci histonů před, během nebo po NER (nucleotide excision repair, oprava vyříznutím nukleotidu), i když zatím nebyly předloženy žádné přímé důkazy, že p300 je nutná pro efektivní činnost NER (Dinant et al., 2008).

### 6.1.2 Histon deacetylázy

Jako první histon deacetyláza identifikovaná jako pozitivní a negativní transkripční faktor byla objevena u kvasinky. Spojení mezi histon deacetylací a transkripční represí nebyla ustanovena dokud nebyla ukázána histon deacetylová aktivita savčího RPD3 homologu HD1. Třídy I, II, III se skládají z enzymových homologů ke kvasinkovému proteinu RPD3 (*reduced potassium dependency protein 3*), HDA1 (*histone deacetylase 1 protein*), a SIR2 (*silent information regulator protein 2*). Různé histon deacetylázy jsou zapojeny do různých biologických procesů, ale často se mohou funkce vzájemně překrývat. (Chen & Tian, 2007). Protein SIR2 byl zjištěn u všech eukaryotických organismů a specificky odstraňuje acetylovanou skupinu z lysinu v pozici 16 histonu H4 (Vyskot, 2010).

Bromodomény jsou evolučně konzervované proteiny nalezené původně v proteinech asociovaných s chromatinem a téměř ve všech jaderných acetyltransferázách. Nedávno bylo

zjištěno, že fungují jako acetyl-lysin vazebné oblasti, které mohou sloužit jako rozhodující mechanismus regulace interakce protein-protein, včetně remodelace chromatinu a transkripční aktivaci (Zeng & Zhou, 2002).

Byly prováděny pokusy na potkanech, zda-li má alkohol vliv na acetylaci jaderných histonů H3 v hepatocytech. Hepatocyty byly inkubovány v ethanolu o různých koncentracích (5 – 200 mM) po dobu 24 hodin. Poté byly prováděny testy na acetylaci konkrétních lyzinových zbytků 9 a 14. Tato studie došla k závěru, že ethanol má vliv na acetylaci lyzinu v pozici 9, ale v pozici 14 nikoli. Z toho vyplývá, že zvýšená hladina acetylace histonu H3 na lyzinu 9 může být považována za mechanismus, který může ovlivňovat expresi genů podílejících se na poškození jater (Park et al., 2003).

### 6.1.3 Inhibitory histondeacetyláz

Histon deacetylázy lze chemicky blokovat trichostatinem A, který je produktem bakterií rodu *Sacharomyces*, a n-butýrátem sodným (Yoshida et al., 1990). Inhibitory histondeacetyláz mají protinádorovou aktivitu a jsou dobře tolerovány, proto jsou zapojeny do výzkumů léčby rakoviny. Molekulární základ jejich selektivního protinádorového účinku však není znám. Byly zkoumány účinky inhibitorů histondeacetyláz na onkoproteinech PML-RAR a AML1-ETO, které zahajují leukomogenezi prostřednictvím deregulace histondeacetyláz. Inhibitory histon deacetyláz indukovaly apoptózu leukemických blastů (Insinga et al., 2004).

## 6.2 Fosforylace histonů

Fosforylace je známa u histonu H3 a H1. Fosforylace histonu H3 serinu 10 je spojena s kondenzací chromozomu a segregací během mitózy a meiózy. Od tohoto objevu bylo zjištěno, že mitoticky specifická místa fosforylace histonu H3 jsou také na serinu 28 a threoninu 11. Není prozkoumáno, zda tyto změny jsou propojeny. Fosforylace histonu H3 na serinu 10 začíná v průběhu profáze, nejvyšší úroveň dosahuje během metafáze, nakonec následuje pokles množství fosforylace během buněčného cyklu do telofáze. Podobný vztah může být pozorován v průběhu meiózy a nedostatek fosforylovaného serinu 10 histonu H3 inhibuje meiózu u *Tetrahymena thermophila* (Nowak & Corces, 2004).

Kináza aurora, mitogeny a stres jsou zodpovědné za fosforylaci serinu 10 histonu H3, která vede ke zhuštění chromatinu během mitózy (Misri et al., 2008).

Hyperfosforylace histonu H1 je časově spojená se vstupem do mitózy a předpokládá se, že plní funkci v mitotické kondenzaci chromatinu. Nicméně nedávné experimenty ukazují, že

ke kondenzaci chromatinu může dojít *in vivo* nebo *in vitro*, i když není přítomen H1. Kromě toho, i když je hyperfosforylovaný H1 přítomen, nedochází k předčasné kondenzaci chromatinu vyvolané fostriecinem nebo kyselinou okadaovou. Proto zůstává funkce hyperfosforylovaného H1 během mitózy nejasná ( Wei at al., 1998).

### 6.3 Metylace histonů

U savců se typicky objevuje metylace histonu H3 na argininových reziduích v pozici 2, 8, 17 a 26 a histonu H4 v pozici 3. Arginin metylace je katalyzována metyltransferázami třídy PRMT (protein argininmethyltransferázy) a vedou k aktivnímu i represivnímu účinku chromatinové funkce. Arginin se objevuje v mono- a dimetylovaném stavu, dimetylovaný stav může být symetrický a asymetrický. Symetrická dimetylace vzniká přidáním metylované skupiny ke každému dusíku guanidinu, zatímco asymetrická dimetylace se vyznačuje přidáním obou metylovaných skupin na jeden dusík guanidinu (Klose & Zhang, 2007). Na rozdíl od acetylace, methylace lyzinu zachovává kladný náboj histonového aminoterminálního konce (Levenson & Sweatt, 2005).

Podobně jako metylace argininu přispívá k aktivní i represivní funkci chromatinu metylace lyzinu. Zvláště metylace histonu H3 v pozicích lyzinu 4, 36, 79 je spojena s transkripčně aktivními oblastmi euchromatinu, zatímco metylace histonu H3 v pozicích 9 a 27 a histonu H4 v pozici 20 jsou obecně nalézány v umlčených regionech heterochromatinu (Klose & Zhang, 2007). Methylace lyzinu v pozici 9 histonu H3 se zdá být univerzálním markerem umlčování genů u všech modelových organismů od kvasinek po savce. Na tuto metylovanou skupinu se pak váže umlčovací protein HP1 (*heterochromatin protein 1*), který způsobuje heterochromatinizaci dané oblasti chromozomu. HP1 protein a řada podobných heterochromatinových proteinů (jako třeba supresor variegace u drozofily, Su(var)3-9) sdílejí evolučně konzervativní doménu - chromodoménu (chromatin organization modifier). Tyto proteiny jsou součástí represivních proteinových komplexů indukující a udržující umlčovaný epigenetický stav (Vyskot, 2010).

Spojení mezi metylací DNA a histonovou metylací bylo prozkoumáno na modelech *Arabidopsis* a *Neurospora*. Mutace histon metyltransferázového genu (DIM-5), specifického pro histon H3 lyzinu 9, vedla k úplné ztrátě metylace DNA u rodu *Neurospora*. Ke snížení genomická metylace DNA došlo také, když u standardního typu *Neurospora* lyzin 9 na histonu H3 byl nahrazen jinou aminokyselinou. Navíc k částečné ztrátě metylce DNA došlo, když související gen kryptonit (KYP) byl mutován u *Arabidopsis*. Dnmt chromomethyláza 3 (CMT3) u *Arabidopsis* zprostředkovává interakci s metyl-lyzin vázející protein HP1b, a tak

poskytuje elegantní mechanismus pro cílenou metylaci do oblastí genomu, kde jsou histony metylované. Tyto studie ukazují, že vytvoření a zachování metylace DNA je závislá na metylaci lyzinu 9 histonu H3 (Geiman & Robertson, 2002).

Změny v metylaci se objevují též v protoplastových kulturách jako reakce na nedostatek vody, osmotický stres, těžké kovy a zvýšenou teplotu v tkáňové kultuře. Některá místa jsou epigeneticky umlčena a některá naopak vykazují zvýšenou expresi (Smulders & Klerk, 2011).

## 6.4 Ubiquitinace

Ubiquitinace probíhá na C-karboxyterminálním konci histonů H2A a H2B. Jde o připojení malého globulárního proteinu ubiquitinu k lyzinovým reziduíům. I když se zcela přesně funkce ubiquitinace neví, je známo, že nemá stejný význam jako v cytoplazmě, kde slouží jako marker pro degradaci proteinů v proteozomu. Ubiquitínovaný histon H2A a zčásti i H2B se nachází bohatě hlavně v oblasti euchromatinu. Navázání ubiquitinu na histon H2A má jen malý dopad na strukturu nukleozomového jádra, ale pravděpodobně brání kondenzaci 30 nm chromatinového vlákna. To potvrzuje i skutečnost, že v metafázních chromosomech úplně chybí ubiquitínovaný H2A (Braddury, 1992).

V jiné publikaci je však uvedeno, že ubiquitinace histonů H2A a H3B vede k odlišným následkům: ubiquitínovaný histon H2A lyzinu 119 vede k transkripční aktivaci, zatímco H2B lyzinu 123 má za následek represi genu. I ubiquitinace patří mezi reverzibilní reakce, deubiquitinace vede k udržování umlčování heterochromatinu. (Vyskot, 2010).

## 6.5 Sumoylace

Sumo (small ubiquitin-related modifier) je jedna ze skupin polypeptidů podobných ubiquitinu. Sumoylace histonů hraje roli v transkripčním umlčování. V tomto případě je kovalentně vázán na konjugační enzym ubc9 histonu H4, přesný aminokyselinový zbytek není zatím známý. Tato modifikace se podílí na transkripční represi kvůli získávání histon deacetyláz a heterochromatinového proteinu HP1. Nedávno bylo zjištěno, že dochází k sumoylaci i na histonech H2A, H2B a H4 u kvasinky. Tyto výsledky jsou důkazem, že sumoylace na konkrétních lyzinech histonů zabráňuje transkripční aktivaci spojenou s acetylací nebo ubiquitinací, čímž blokuje změny v příslušných reziduíích (Tost, 2008).

Zatímco u bezobratlých živočichů a kvasinek existuje 1 forma proteinu SUMO, u člověka existují 4 izoformy (SUMO-1, velmi podobné SUMO-2 a SUMO-3 a nedávno byla objevena izoforma SUMO-4). Za fyziologických podmínek se k proteinům nejvíce připojuje SUMO-1.

Za stresových podmínek, např. vlivem působení zvýšené teploty, dochází k sumoylaci proteinů izoformami SUMO-2/3. Některé proteiny, např. topoizomeráza II, jsou však i za normálních podmínek sumoylovány, a tím stabilizovány izoformami SUMO-2/3. K expresi SUMO-4 dochází pouze v ledvinách, zatímco ostatní izoformy nacházíme ve všech tkáních. Poruchy sumoylace jsou spojeny s chorobami jako je Alzheimerova a Parkinsonova choroba a rakovina (Fuchs and Euwirtová, 2006).

Tabulka č. 1: Hlavní typy kovalentních modifikací histonů. Skupina 1 zobrazuje malé úpravy (acetylace, fosforylace a metylece), skupina 2 větší úpravy dané adicí peptidů (ubiquitinace a sumoylace). Každá změna způsobuje buď aktivaci či umlčení transkripce.

	Role in transcription	Histone-modified sites
<b>GROUP 1</b>		
Acetylation	activation	H3 (K9,K14,K18,K56) H4 (K5,K8,K12,K16) H2A H2B (K6,K7,K16,K17)
Phosphorylation	activation	H3 (S10)
Methylation	activation	H3 (K4,K36,K79)
	repression	H3 (K9,K27) H4 (K20)
<b>GROUP 2</b>		
Ubiquitylation	activation	H2B (K123)
	repression	H2A (K119)
Sumoylation	repression	H3 (?) H4 (K5,K8,K12,K16) H2A (K126) H2B (K6,K7,K16,K17)

## 7. RNA interference

RNA slouží jako přenašeč informace od DNA k proteinům. Od DNA se liší ve struktuře sacharidu, obsahuje ribozu (DNA - deoxyribozu) a dusíkatou bázi komplementární k adeninu – uracyl (DNA – thymín).

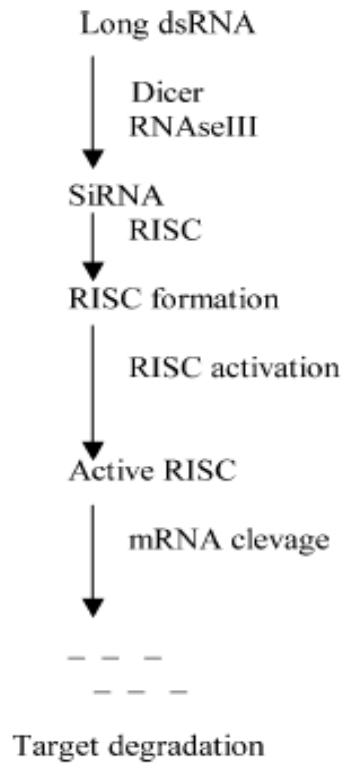
RNA interference (RNAi) byla poprvé uznána ve výzkumu Fireho et al. v roce 1998, který uvedl, že reakce na dvouvláknovou RNA (dsRNA) u hlístice *Caenorhabditis elegans* byla taková, že došlo ke genovému umlčení na posttranskripční úrovni. Použitím krátké RNA lze selektivně umlčet jakýkoliv gen v genomu. Tento mechanismus můžeme nalézt na různých modelech od kvasinek po savce a pravděpodobně hraje ústřední roli v řízení genové exprese u všech eukaryot (Jana et al., 2004). RNAi obsahuje malé molekuly RNA zvané krátké interferující RNA (*siRNA – short interfering RNA*) nebo mikroRNA (*miRNA, microRNA*). Tyto molekuly o délce 21 – 28 párů bází jsou tvořeny z větších, dvouřetězcových molekul enzymatickou činností proteinů, které jsou specifickými endonukleázami pro dvouřetězcové molekuly RNA. Protože tyto endonukleázy „krájí“ (angl. Dicer) velké molekuly RNA na malé úseky, nazývají se tyto enzymy Dicer. *Caenorhabditis elegans* vytváří pouze jediný druh enzymu dicer, drozofila produkuje 2 různé enzymy dicer a *Arabidopsis* nejméně 3. U *Caenorhabditis elegans* a drozofil působí tyto enzymy v cytoplazmě, ale u *Arabidopsis* působí s největší pravděpodobností v jádře (Snustas & Simmonds, 2009). V savčích buňkách je Dicer lokalizován v cytoplazmě. Protein Dicer byl charakterizován v extraktech připravených z hmyzích buněk, embryí *C.elegans* i kultivovaných savčích buněk. Obsahuje aminoterminální helikázovou doménu, PAZ doménu, která obsahuje proteiny Piwi, Argonaute a (Zwille/Pinhead) a dvě domény s RNázovou aktivitou III a karboxy-terminální částí a dsRNA-vazebné motivy (Chacraborty et al., 2004).

siRNA a miRNA, které vznikají činností diceru, jsou spárovány po celé své délce kromě 3'-konce, kde zůstávají 2 nukleotidy volné. V cytoplazmě se siRNA a miRNA začleňují do ribonukleoproteinových částic. Dvouvláknová siRNA či mRNA je v těchto částicích rozpletena a jedno z jejích vláken je přednostně odstraněno. Zbývající vlákno RNA je pak schopno integrovat se specifickými molekulami mediátorové RNA (mRNA). Tato interakce je zprostředkována párováním bází mezi jedním vláknem RNA v RNA-proteinovém komplexu a komplementární sekvencí v molekule mediátorové RNA. Protože tato interakce brání expesi genu produkujícího mRNA, nazývá se RNA-proteinová částice umlčovací komplex indukovaný RNA (*RNA-Induced Silencing Komplex*). Komplexy RICS z různých organismů se liší složením i velikostí, ale všechny obsahují jednu molekulu z rodiny proteinů výstředně zvané argonaut. Funkce těchto proteinů není zcela objasněna. Kdykoli je párování bází mezi RNA uvnitř komplexu RISC a cílovou sekvencí na mRNA zcela nebo téměř dokonalé, RISC

štěpí cílovou mRNA uprostřed spárované oblasti. Rozštěpená mRNA je pak rozložena. Po rozložení se může RISC znovu použít, aniž by ztratil schopnosti zacílit a rozštěpit mRNA. Chová se tedy stejně jako katalyzátor. Molekuly RNA asociované s RISC, které způsobují rozklad mRNA, se obvykle označují jako krátké interferující RNA (siRNA). Kdykoli se RNA uvnitř RISC páruje se svou cílovou sekvencí nedokonale, mRNA není zpravidla rozštěpena a namísto toho je zastavena translace mRNA. RNA asociované s RISC, které mají tento účinek se obvykle nazývají mikroRNA (Snustas & Simmnons, 2009). Proteiny Argonaut tvoří silně konzervované skupiny. Kromě RNA mechanismů ovlivňují vývoj a podílejí se na determinaci kmenových buněk. Argonaut proteiny obsahují 2 domény: PAZ a Piwi doménu. Paz doména se skládá z 130 aminokyselin a bylo zjištěno, že je součástí proteinu Argonaut i Diceru. Ačkoli nemá přesně definovanou funkci, předpokládá se, že by mohla být doménou zprostředkovávající protein – protein interakci, případně homo- a heterodimeraci. Funkce Piwi domény není zatím známá, ale je velmi konzervovaná. Bílkoviny skupiny Argonaut můžeme rozdělit do dvou podtříd podle sekvence: ty, které se podobají *Arabidopsis* AGO1 a ty, které se více podobají Piwi u *Drosophily* (Carmell et al., 2002).



**Obrázek č.2:** Schéma RNA interference. Dvouvláknová DNA je štěpena endoribonukleázou Dicer na krátké molekuly siRNA, které tvoří aktivní komplex s RISC štěpící mRNA molekuly nebo inhibují jejich translaci (Chacraborty et al., 2004).



## 8. Materiál a metody

### 8.1 Biologický materiál

Rostliny *Cucumis sativus* L. (odřůda Marketer, SEMO Ltd., Smržice, Česká republika).

### 8.2 Seznam použitých roztoků a médií

**CTAB:** 20 g cetyltrimethylammonium bromidu; 10 g polyvinylpyrrolidonu; 1 litr destilované vody.

**PGly:** 0,0272 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,101 g KNO<sub>3</sub>; 1,1176 g CaCl<sub>2</sub>; 0,246 g MgSO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O; 0,00016 g KI; 0,000025 g CuSO<sub>4</sub> \* 5 H<sub>2</sub>O; 11,15 g glycinu; 18,016 g glukózy; 0,5857 g MES; 65,58 g manitolu; 1 litr destilované vody; pH 5,8; sterilizováno filtrací.

**20% sacharóza:** 200 g sacharózy; 1 litr destilované vody; pH 5,8; sterilizováno autoklávováním.

**Enzymatický roztok PGly:** 0,2 g celulózy Onozuka (Duchefa Biochemie); 0,05 g macerozymu R-10 (Duchefa Biochemie); 10 ml PGly; pH 5,8; sterilizováno filtrací.

**5x TBE:** 54 g Tris-HCl; 27,5 g HBO<sub>2</sub>; 20 ml 0,5 M EDTA (disodná sůl ethylendiaminteraoctové kyseliny); 1 litr destilované vody; pH 8.

**Ostatní chemikálie:** chloroform : izoamylalkohol (poměr 24:1); izopropanol; octan sodný; 2-merkптоethanol; agaróza (elektroforetická); 70% ethanol; 4',6-diamidino-2-fenylindole (DAPI); ethidium bromid.

**Komerční kity:** EpiQuick™ Global Histone H3 Phosphorylation (Ser 10) Assay Kit (Colorimetric) (Epigentek), EpiQuik™ Global Di-Methyl Histone H3-K4 Quantification Kit (Colorimetric) (Epigentek), EpiQuik™ Global Histone H4 Acetylation Assay Kit (Epigentek), MethylFlash Methylated DNA Quantification Kit (Colorimetric) (Epigentek), CelLytic™ PN Isolation/Extraction Kit (Sigma).

**LCM1 médium:** Gamborg B5 médium (Duchefa); 0,9 g inositolu; 0,002 g kyseliny askorbové; 0,008 g glycinu; 0,02 g glutaminu; 0,1 g kasein hydrolyzátu; 0,586 g morfolinethansulfonové kyseliny (MES); 70 g manitolu; 10 g sacharózy; 5 g glukózy; 0,001 g NAA; 0,0005 g 2,4-D; 0,0005 g BAP; 0,004 g alaninu; 0,02 g prolinu; 1 litr destilované vody; pH 5,8; sterilizováno filtrací (Debeaujon a Branchard, 1992).

### 8.3 Vybavení laboratoře

Chlazená centrifuga 5804 R (Eppendorf), centrifuga 5415 D (Eppendorf), cytologická centrifuga, trasluminátor UVT-20M (Herolab) s digitální fotoaparátem Kodak 290, fluorescenční mikroskop (Olympus BX 60) s CCD kamerou (Cool S Nap, Photometrics), světelný mikroskop, biologický termostat BT120, autokláv, laminární box, digestoř, elektroforetická aparatura, spektrofotometr Nanodrop (Thermo fischer Scientific), multifunkční modulární reader Infinite M200 (Tecan), mikrovlnná trouba, vodní lázeň, mraznička, lednička, analytické váhy, váhy, magnetické míchadlo, pH metr, Pasteurovy pipety, Petriho misky, parafilm M, mikrozkušavky, dávkovací mikropipety, sterilní špičky, ochranné rukavice, kahan, skalpel, pinzeta, podložní a krycí skla.

### 8.4 Izolace protoplastů

Sterilním skalpelem byly mladé apikální lístky odříznuty od mateřské rostliny, nasekány na 1 mm fragmenty a umístěny do enzymatického roztoku obsahující 2 % roztoku celulózy Onozuka R-10 a 0.5% roztoku macerozymu R-10 v Petriho misce. Petriho miska byla s obsahem inkubována ve tmě po dobu 18 hodin při teplotě 25°C. Tato hrubá protoplastová suspenze byla přefiltrována přes uheltonové sítko 72  $\mu\text{m}$ , následně promyta 2 ml roztoku PGly a centrifugována při 80g (= 800ot/min) po dobu 5 minut. Supernatan byl odstraněn, sediment resuspendován ve 4 ml 20% sacharózy a opatrně převrstven 2 ml PGly tak, aby nedošlo k promíchání obou vrstev. Zkušavka byla vložena do centrifugy a stočena při 80g na 5 minut. Flotující protoplasty (zelený proužek) na rozhraní obou kapalin byly odebrány pasturovou pipetou do čisté centrifugační zkušavky a resuspendovány ve 4 ml PGly. Po pětiminutové centrifugaci při 80g byl odstraněn supernatan a protoplasty v sedimentu resuspendovány v 1 ml LCM1 média

Po izolaci byla stanovena životnost protoplastů pomocí fluorescein diacetátu, který proniká do buněk a v živých buňkách je pomocí buněčných esteráz přeměněn na zeleně fluoreskující produkt, který již neproniká přes cytoplazmatickou membránu ven z buňky. Kapka LCM1 média s resuspendovanými protoplasty byla přenesena na podložní sklíčko, k ní bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku s fluorescein diacetátem a byla překryta krycím sklíčkem. Stanovení životnosti bylo provedeno pomocí fluorescenčního mikroskopu (Olympus BX 60). Nejprve byly pozorovány protoplasty v procházejícím světle a poté byly pozorovány fluoreskující protoplasty v excitačním světle.

## 8.5 Izolace listové DNA

Ve třecí misce obsahující tekutý dusík bylo pomocí tloučku rozetřeno 200 mg listů *Cucumis sativus L.* Do třecí misky byl připipetován 1 ml CTAB obohacený o 2 µl 2-merkptoethanolu, který byl předeřán ve vodní lázni na 65°C. Vzniklá směs byla napipetována do 2 ml zkumavky a inkubována 1,5 hodiny při 65 °C ve vodní lázni. Po inkubaci bylo připipetováno 600 µl směsi, která obsahovala chloroform a izoamylalkohol v poměru 24 : 1. Po promíchání byl roztok centrifugován 15 minut v chlazené centrifuze (4 °C) při 11 000 otáčkách/min. Po centrifugaci byla horní fáze odsána do nové eppendorfky společně s 60 µl octanu sodného a 500 µl izopropanolu a dala se mrazit na 30 minut do mrazáku. Po zmražení byl roztok centrifugován 30 minut v chlazené centrifuze (4 °C) při 11 000 otáčkách/min. Roztok byl slit a eppendorfka se nechala vysušit. Ke sraženině DNA bylo přidáno 300 µl 70 % ethanolu a roztok byl znovu centrifugován 15 minut při stejných podmínkách. Roztok ethanolu byl opět slit a sražená DNA se nechala vysušit. V posledním kroku bylo ve sterilních podmínkách připipetováno 50 µl destilované vody. Koncentrace DNA byla stanovena pomocí přístroje Nanodrop a vzorek ve zkumavce zmražen na -20 °C.

## 8.6 Izolace protoplastové DNA

Izolace byla prováděna stejným postupem jako u listové DNA s rozdílem výchozího materiálu.

## 8.7 Izolace jaderných proteinů (histonů)

Roztoky, které byly připraveny před nebo během izolace histonů:

I. roztok NIB (Nuclei Isolation Buffer): 3 ml...nezředěného NIB

9 ml...destilované vody

10 µl...DTT (dithiothreitol)

II. roztok NIBA (100:1): 12 ml...zředěného roztoku NIB (bez DTT)

120 µl...Protease Inhibitor Coctail

III. roztok o 2 ml zředěného NIB a 6 ml destilované vody

IV. roztok WEB (Working Extraction Buffer): 1ml...WEB

50 µl... NIB + DTT

10 µl...Protease Inhibitor Cocktail

Ve třetí misce obsahující tekutý dusík bylo pomocí tloučku rozetřeno 200 mg listů *Cucumis sativus L.* a přesypáno do eppendorfků. Do každé eppendorfky (list, protoplast 0 hodin, 24 hodin, 48 hodin a 72 hodin) bylo napipetováno po 1,5 ml I. roztoku. Vše se centrifugovalo 10 minut při 12600 ot/min. Po stočení byl supernatan odstraněn a napipetovány 2 ml II. roztoku. Eppendorfky byly opět vloženy do centrifugy a stočeny při 12 000g po dobu 10 minut. Supernatan byl znovu odstraněn, eppendorfky naplněny připraveným III. roztokem a byly centrifugovány 5 minut. Po stočení byl roztok odstraněn a při pipetování IV. roztoku byly eppendorfky ledovány, dále byly 20 minut vortexovány a 10 minut centrifugovány. Vytvořily se 2 fáze, horní byla odsána do nové eppendorfky a nechala se zamrazit na teplotu -80 °C.

### **8.8 Metodika stanovení množství fosforylovaných histonu H3 serinu 10**

Nejprve byl připraven promývací roztok tak, že byl naředěn C1 (Wash Buffer) s destilovanou vodou v poměru 1:9 (1 ml C1 + 9 ml vody).

Do 7 jamek, které byly označeny čísly, bylo napipetováno 50 µl C2 (Antibody Buffer) Přípravený vyizolovaný extrakt histonů (listové histony, histony protoplastů izolovaných v 0 hodin, 24 h, 48 h a 72h) byl přidán v množství 2 µg do 5 jamek (**Tab.č.1**). Do dalších 2 jamek byl napipetován 1 µl standardní kontroly a negativní kontrola destilovaná voda. Jamky byly zalepeny parafilmem M a inkubovány po dobu 1,5 hodiny při pokojové teplotě. Mezitím byl připraven do eppendorfky roztok C3 (Detection Antibody) z 0,25 µl C3 a 350 µl zředěného promývacího roztoku (poměr 1:1000). Po dvou hodinách byl obsah vyklepán, jamky promyty 3x 150 µl naředěného promývacího roztoku C1 a do jamek napipetován připravený zředěný roztok C3, který byl před napipetováním protřepán. Jamky byly zalepeny parafilmem M a inkubovány 1 hodinu při pokojové teplotě. Po hodině byly jamky vyklepány a promyty 6x 150 µl promývacího roztoku C1. Dále bylo do jamek napipetováno 100 µl C4 (Color Developer), soustava jamek byla zakryta alobalem a nechala se odstát 10 minut ve tmě. Poté bylo přidáno 50 µl C5 (Stop Solution), který zastavil enzymatickou reakci. Jamky obsahující fosforylované histony se zbarvily modře a poté zežloutly. V posledním kroku byl proveden kolorimetrický test v programu Tecan i-control při vlnové délce 450 nm.

**Tabulka č. 1:** Přepočítání koncentrace histonů na 2 µg.

Histonový extrakt	Koncentrace histonů (µg/µl)	Objem vzorku µl / 2 ng
1 (List)	3,66	0,55
2 (Protoplast 0 h)	2,35	0,85
3 (Protoplast 24 h)	2,03	0,99
4 (Protoplast 48 h)	7,13	0,28
4 (Protoplast 72 h)	1,05	1,90

### 8.9 Metodika stanovení množství acetylovaných histonů H4

Byl připraven promývací roztok GE3 tak, že byl naředěn GE3 (Wash Buffer) s destilovanou vodou v poměru 1:10 (1 ml GE3 + 10 ml destilované vody). Do 5 jamek byly napipetovány 2 µg (**Tab.č. 1**) histonového extraktu. Do další jamky byly přidány 2 µl standardní kontroly a jamka s negativní kontrolou zůstala prázdná. Ke vzorkům byl připipetován GE4 (Histone Buffer) tak, aby byl celkový obsah jamky 5 µl. Obsah jamek byl promíchán pomocí pipety. Soustava se nechala inkubovat 1 hodinu při 37 °C. Do vysušených jamek byl přidán GE5 (Blocking Buffer) a opět se inkubovaly při 37 °C 30 minut. Po 30 minutách byl zbývající obsah jamek vyklepán a poté byly 3x promyty 150 µl připraveným roztokem GE3. Byl naředěn GE7 (Capture Antibody) s GE6 (Antibody Buffer) v poměru 1:100 (3,5 µl GE7 + 350 µl GE6). Do každé jamky bylo napipetováno 50 µl připraveného naředěného roztoku GE7 a inkubováno 1 hodinu při pokojové teplotě. Mezitím byl připraven roztok GE8 (Detection Antibody), který byl zředěn s GE6 v poměru 1:1000 (0,35 µl + 350 µl). Po hodině byly jamky vyklepány a promyty 4x 150 µl roztokem GE3, do každé jamky přidáno 50 µl předem připraveného roztoku GE8 a inkubováno 30 min při pokojové teplotě. Poté byl obsah jamek vyklepán a naposledy 4x promyt 150 µl roztoku GE3. Soustava se nechala vysušit 3 minuty při pokojové teplotě, do jamek bylo přidáno po 100 µl GE9 (Developing Solution), poté byla soustava jamek zakryta alobalem a nechala se odstát 10 minut ve tmě. Dále bylo přidáno 50 µl GE10 (Stop Solution), který zastavil enzymatickou

reakci. Jamky obsahující acetylované histony se zbarvily modře a poté zežloutly. V posledním kroku byl proveden kolorimetrický test v programu Tecan i-control při vlnové délce 450 nm.

#### **8.10 Metodika stanovení množství dimetylovaných histonů H3 lyzinu 4**

Byl připraven promývací roztok C1 (Wash Buffer), tak že byl naředěn koncentrovaný C1 s destilovanou vodou v poměru 1:9 ( 1ml C1 + 9ml destilované vody). Do 7 jamek bylo napipetováno po 50  $\mu$ l C2 (Antibody Buffer), do pěti z nich po 2  $\mu$ g histonového extraktu (**Tab.č.1**), do jedné 1  $\mu$ l standardní kontroly do další 1  $\mu$ l destilované vody (negativní kontrola). Obsah jamek byl pomocí pipety promíchán, zalepen parafilmem a inkubován 1,5 hodiny při pokojové teplotě. Mezitím naředěn C3 (Detection Antibody) s C2 (Antibody Buffer) v poměru 1:1000 (0,35  $\mu$ l C3 + 350  $\mu$ l C2) Po uplynutí inkubační doby byl obsah jamek vyklepán a jamky promyty 3x 150  $\mu$ l zředěného roztoku C1. Bylo přidáno 50  $\mu$ l připraveného roztoku C3 a soustava jamek byla inkubována 1 hodinu při pokojové teplotě. Poté byl obsah jamek opět vyklepán a jamky promyty 6x 150  $\mu$ l zředěného roztoku C1. Do každé jamky bylo napipetováno 100  $\mu$ l C4 (Color Developer) a soustava jamek byla inkubována 10 min ve tmě. Po zpozorování barevné změny (obsah jamek zmodral) bylo přidáno 50  $\mu$ l C5 (Stop Solution) k zastavení enzymatické reakce. V posledním kroku byla změřena absorbance jednotlivých vzorků pomocí kolorimetru v programu Tecan i-control při vlnové délce 450 nm.

#### **8.11 Metodika stanovení množství metylované DNA**

Byl připraven promývací roztok ME1 (Wash Buffer) tak, že byly zředěny 2 ml koncentrovaného ME1 s 18 ml destilované vody (1:9). Poté byla připravena standardní kontrola o koncentraci 2  $\mu$ g/ $\mu$ l. Do 7 jamek bylo napipetováno 80  $\mu$ l ME2 (Binding Solution), do 5 z nich po 100  $\mu$ g extrahované DNA, do další 1 $\mu$ l připravené standardní kontroly a do poslední 1  $\mu$ l ME3 (Negative Control). jamky byly zalepeny parafilmem M a inkubovány 90 minut při 37 °C. Byl vyklepán ME2, jamky promyty 3x 150  $\mu$ l zředěného ME1. Byl připraven roztok ME5 (Capture Antibody) zředěním s naředěným roztokem ME1 v poměru 1:1000 (0,35  $\mu$ l ME5 + 350  $\mu$ l ME1). Do každé jamky bylo přidáno 50  $\mu$ l zředěného ME5 a celé se to dalo inkubovalo 1 hodinu při pokojové teplotě. Mezitím byl připraven ME6 (Detection Antibody) zředěním s naředěným roztokem ME1 v poměru 1:2000 (0,25  $\mu$ l ME6 + 500  $\mu$ l ME1). Po uplynutí inkubační doby byly jamky vyklepány a promyty 3x 150  $\mu$ l zředěného roztoku ME1. Poté bylo do jamek napipetováno po 50  $\mu$ l roztoku ME6. Souprava byla 30

minut inkubována při pokojové teplotě. Během inkubace byl připraven roztok ME7 (Enhancer Solution) zředěním s naředěným roztokem ME1 v poměru 1:5000 (0,2  $\mu$ l ME7 + 1 ml ME1). Jamky byly po 30 minutách vyklepány, promyty 4x 150  $\mu$ l ME1 a do každé bylo přidáno po 50  $\mu$ l ME7. Naposledy se nechalo vše inkubovat 30 minut při pokojové teplotě. Poté byl vyklepán roztok ME7, jamky promyty 5x 150  $\mu$ l roztoku ME1. Do každé jamky bylo přidáno 100  $\mu$ l ME8 (Developer Solution) a nechalo se to inkubovat 10 minut při pokojové teplotě ve tmě. Roztok ME8 zmodral pokud bylo přítomné dostatečné množství metylované DNA. Dále bylo připipetováno 50  $\mu$ l roztoku ME9 (Stop Solution), který zastavil enzymatickou reakci a stávající žlutý obsah jamek zežloutl. Od každého vzorku bylo napipetováno 50  $\mu$ l na mikrodestičku a byla změřena absorbance jednotlivých vzorků pomocí spektrofotometru v programu Tecan i-control při vlnové délce 450 nm.

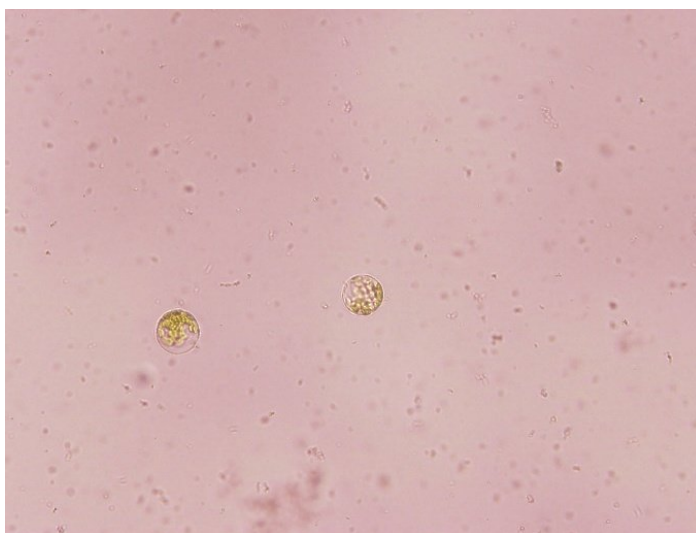


## 9. Výsledky

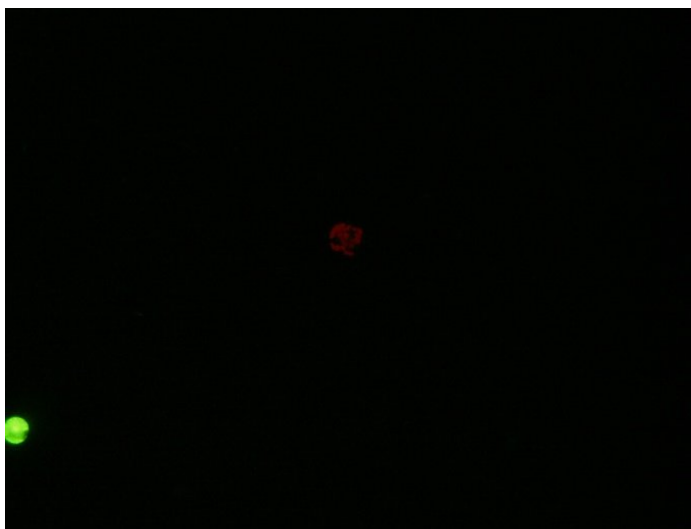
Po izolaci byly protoplasty pozorovány pomocí fluorescenčního mikroskopu (Olympus BX 60) nejprve v procházejícím světle a poté byl pozorován zeleně fluoreskující produkt vzniklý rozkladem fluorescein diacetátu v excitačním světle (**Obr. č. 1**).

**Obrázek.č.1:** A) Protoplasty *Cucumis sativus* L. pozorované v procházejícím světle. B) Protoplasty *Cucumis sativus* L. mikroskopované v excitačním světle: Živé protoplasty jsou zeleně fluoreskující, přeměnily fluorescein diacetát na zeleně fluoreskující produkt. Mrtvé protoplasty jsou červené z důvodu autofluorescence.

A)



B)



Pomocí specifických protilátek byly kvantifikovány epigenetické změny v protoplastových kulturách (**Tab.č.2–5**). Během kultivace a vývoje populace protoplastů byly pozorovány epigenetické změny, ale ne na signifikantní úrovni. Největší míra fosforylace byla zaznamenána u buněk odvozených z protoplastů kultivovaných 24 hodin po izolaci (**Graf č.1**). Buňky odvozené z protoplastů ve všech kultivovaných časech nevykazovaly tendenci acetylace ani dimetylace (**Graf č.2**). Největší míra metylace DNA byla detekována u buněk odvozených z protoplastů kultivovaných 0 hodin po izolaci (**Graf č. 1**).

**Tabulka č.2:** Hodnoty absorbancí dílčích měření acetylovaných histonů H4, jejich průměr a směrodatná odchylka.

Extrakt histonů	1.měření	2.měření	3.měření	Průměr	Směrodatná odchylka
Pozitivní k.	0,1734	0,1658	0,1704	0,1699	0,0038
List	0,1674	0,1654	0,1632	0,1653	0,0021
0 hodin	0,1693	0,1491	0,1503	0,1562	0,0113
24 hodin	0,1577	0,1543	0,1525	0,1548	0,0026
48 hodin	0,1661	0,1459	0,1509	0,1543	0,0105
72 hodin	0,1582	0,1449	0,1593	0,1541	0,0080
Negativní k.	0,1188	0,1444	0,1213	0,1282	0,0141

**Tabulka č.3:** Hodnoty absorbancí dílčích měření dimetylovaných histonů H3 lyzinu 4, jejich průměr a směrodatná odchylka.

Extrakt histonů	1.měření	2.měření	3.měření	Průměr	Směrodatná odchylka
Pozitivní k.	0,2906	0,2928	0,2948	0,2927	0,0021
List	0,1622	0,2782	0,2636	0,2347	0,0632
0 hodin	0,1818	0,2596	0,1965	0,2126	0,0413
24 hodin	0,1790	0,2180	0,1859	0,1943	0,0208
48 hodin	0,1782	0,2719	0,2046	0,2182	0,0483
72 hodin	0,1868	0,2659	0,2084	0,2204	0,0409
Negativní k.	0,1312	0,1718	0,1680	0,1570	0,0224

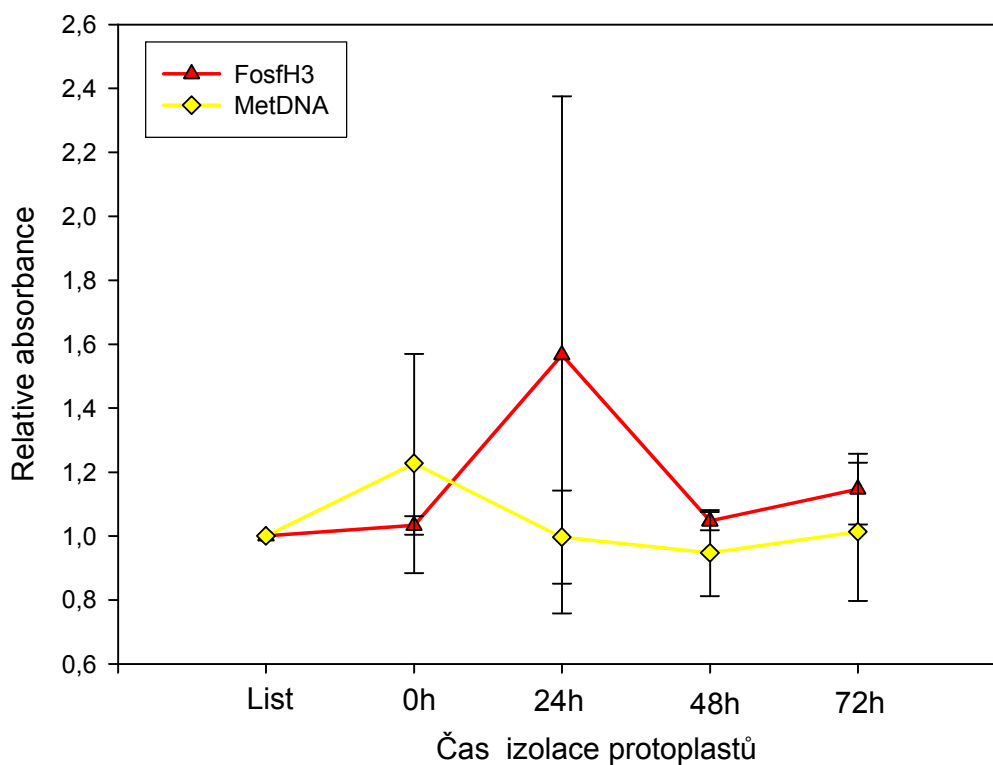
**Tabulka č.4:** Hodnoty absorbancí dílčích měření fosforylovaných histonů H3 serinu 10, jejich průměr a směrodatná odchylka.

Extrakt histonů	1.měření	2.měření	3.měření	Průměr	Směrodatná odchylka
Pozitivní k.	0,5093	0,6128	0,5631	0,5617	0,0518
List	0,1340	0,1485	0,1380	0,1402	0,0075
0 hodin	0,1400	0,1483	0,1449	0,1444	0,0042
24 hodin	0,1460	0,3701	0,1525	0,2229	0,1276
48 hodin	0,1377	0,1531	0,1492	0,1467	0,0080
72 hodin	0,1674	0,1536	0,1602	0,1604	0,0069
Negativní k.	0,1250	0,1126	0,1204	0,1193	0,0063

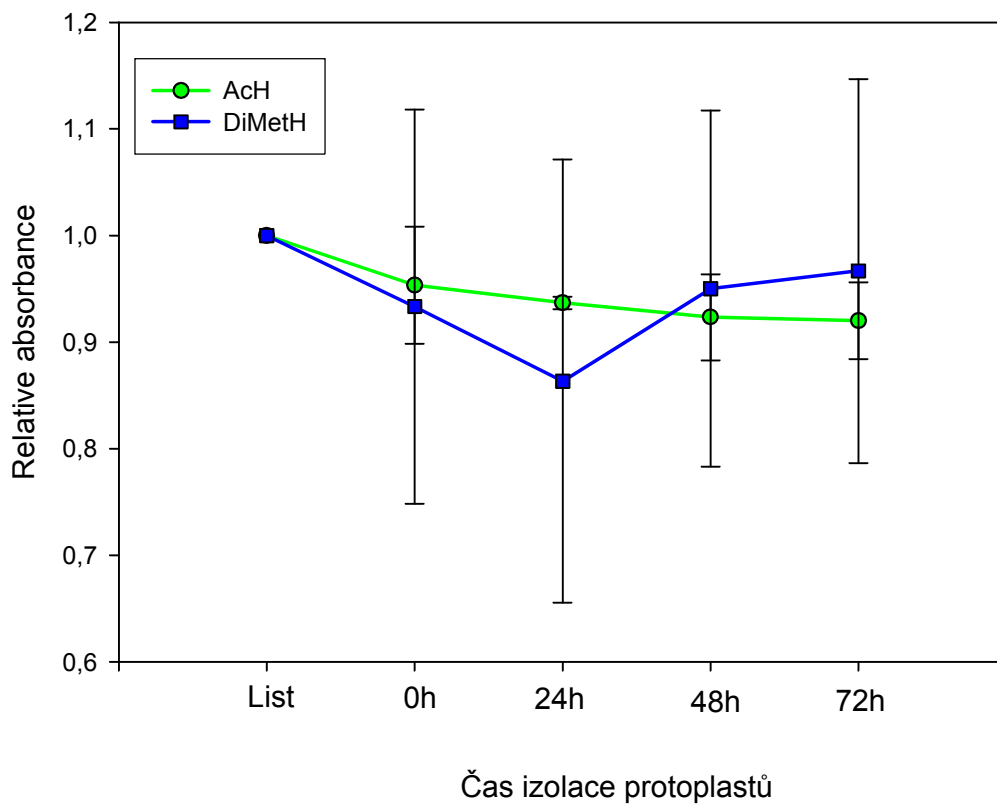
**Tabulka č.5:** Hodnoty absorbancí dílčích měření metylované DNA, jejich průměr a směrodatná odchylka.

Extrakt DNA	1.měření	2.měření	3.měření	Průměr	Směrodatná odchylka
Pozitivní k.	0,7488	0,6251	0,7132	0,6957	0,0637
List	0,1481	0,1721	0,1808	0,1670	0,0169
0 hodin	0,2378	0,1919	0,1712	0,2003	0,0341
24 hodin	0,1713	0,1631	0,1599	0,1648	0,0059
48 hodin	0,1628	0,1537	0,1543	0,1569	0,0051
72 hodin	0,1843	0,1702	0,1456	0,1667	0,0196
Negativní k.	0,1308	0,1414	0,149	0,1404	0,0091

**Graf č.1.:** Zobrazuje relativní hodnoty absorbance fosforylace histonu H3 a metylace DNA protoplastů izolovaných v časech 0 hodin, 24 hodin, 48 hodin a 72 hodin vztažené k listu se směrodatnou odchylkou.



**Graf č.2.:** Zobrazuje relativní hodnoty absorpance acetylace histonu H4 a metylace DNA protoplastů vztažené k listu se směrodatnou odchylkou.



## 10. Diskuze

Výsledky nejsou statisticky průkazné, protože struktura populace byla nehomogenní. V počátečních fázích kultivace obvykle dochází k buněčné smrti části populace protoplastů. V následné fázi buňky odvozené z protoplastů vstupují nesynchronně do buněčného cyklu. Přesto ale byla zaznamenána tendence změn ve fosforylaci histonu H3 a metylace DNA v populaci buněk.

Acetylace histonů je obecně spojována s transkripcí a replikací DNA. U ječmene a bobu souvisí acetylace histonů H4 na lyzinových reziduích 5 a 16 spíše s replikací DNA než s transkripcí, podobně jako je tomu u savců na lyzinech v pozicích 5 a 12. Ale u rostliny *Arabidopsis* je acetylace histonů ve stejných pozicích pozorována v genově hustém euchromatinu. To ukazuje, že acetylace histonů na stejných reziduích má různé účinky u různých organismů a histonový kód může být specifický pro druh (Tessadori et al., 2004). Naměřené výsledné hodnoty acetylovaných histonů u protoplastových kultur *Cucumis sativus* byly ve všech kultivovaných časech stejné, protilátka nemusela být specifická nebo mohlo dojít k aktivaci histon deacetyláz stálým zmrazováním a odmrazováním vzorků (skladování histonových extraktů při -20 °C).

Pozorováním savčích buněk bylo prokázáno, že míra fosforylace histonu H3 je minimální v interfázi a zvyšuje se během mitózy. S vývojem specifických protilátek fosforylovaného histonu H3 serinu 10 Henzel a jeho kolegové byly schopni prokázat *in vitro* podmínkách přesné prostorové a časové struktury. Zjistili, že fosforylace H3 je zahájena v pozdní fázi G2, šíří se po celém chromatinu během kondenzace a je přítomná až do konce mitózy. Stejný buněčný cyklus závislý na modifikaci histonů byl později prokázán i na rostlinných buňkách. Je pozoruhodné, že ačkoli je proces fosforylace histonu H3 velmi konzervovaný, jeho význam a distribuce se do jisté míry liší u různých druhů. V buněčném cyklu savčích buněk je fosforylace serinu v pozicích 10 a 28, který vznikne v pericentromerické oblasti chromozomu a šíří se po celém chromozomu, s největší pravděpodobností spojeny se zahájením kondenzace chromozomu. Na druhé straně u kvasinkových buněk není fosforylace histonu H3 serinu 10 nutná pro průběh buněčného cyklu, funkci fosforylace histonu H3 může nahradit fosforylace histonu H2B. Podobně je tomu u mitotických buněk embrya mutantu *Drosophily borrr*, které ukazují mírnou kondenzaci i přes podstatný pokles fosforylace histonu H3 serinu 10 (Tessadori et al., 2004). Největší míra fosforylace byla naměřena u protoplastů kultivovaných 24 hodin po izolaci. Dle Ondřeje et al. (2010) podléhají protoplastové kultury během prvních 24 hodin největší míře oxidativního stresu způsobeného nahromaděním reaktivního kyslíku. Reaktivní formy kyslíku způsobují poškození DNA. Fosforylace histonu H3 je spojována nejen s kondenzací chromozomu během mitózy, ale také s apoptózou a

opravou DNA (Houben et al., 2007). Ve 24 hodinách mohlo tedy dojít k výraznému úbytku živých protoplastů vlivem buněčné smrti. Poté míra fosforylace klesla a v 72 hodinách opět mírně stoupla. To souvisí s počínajícím dělením buněk odvozených z protoplastů..

U druhů *B. rapa*, *eleracea*, *napus* rodu *Brassica* byly dimetylované histony H3K4 detekovány v euchromationových regionech interfázního jádra. Nebyly detekovány v heterochromatinových oblastech ani v jadérku. Tyto výsledky naznačují, že u těchto druhů rodu *Brassica* jsou dimetylované histony specifickým buněčným markerem euchromatinu (Braszewska-Zalewska et al., 2010). U vyizolovaných histonových extraktů byly sice naměřeny nějaké hodnoty dimetylace, ty ale nevykazovaly žádnou tendenci. Buď byla nespecifická protilátka nebo mohlo dojít k aktivaci histon demetyláz stálým odmrazováním a zmrazováním histonových extraktů ( skladování při -20 °C).

Metylace DNA patří mezi epigenetické markery heterochromatinu (Soppe et al., 2002). Je specifická pro každý rostlinný druh, tkáň, organelu, záleží i na stáří rostliny. Metylace DNA řídí růst a vývoje, zejména má účast na regulaci genové exprese a replikace DNA (Vanyushin, 2006). Největší míra metylace byla zaznamenána v 0 hodin. Tento výsledek by mohl korelovat s apoptózou stejně jako během fosforylace. V časech 24 a 48 hodin došlo k demetylaci DNA.

## **11. Závěr**

Výsledky nejsou statisticky průkazné, protože struktura populace byla nehomogenní. Buňky vstupují nesynchronně do buněčného cyklu a část populace odumírá. Přesto ale byla zaznamenány výraznější změny ve fosforylaci histonu H3 a metylaci DNA. Změny fosforylace H3 a metylace DNA během protoplastizace a kultivace protoplastů a následné kultivace pravděpodobně souvisí s oxidativním stresem, vstupem do buněčného cyklu a reprogramováním buněčné exprese.



## 12. Seznam literatury

Alberts, B., Bray, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2005): Základy buněčné biologie – Úvod do molekulární biologie buňky. Espero Publishing. Ústí nad Labem.

Bartolomei, M.S. & Tilghman S.M. (1997): Genomic imprinting in mammals. *Annual Review Genetics* 31: 493 – 525.

Bestor, T.H. (2000): The DNA methyltransferases of mammals. *Human Molecular Genetics* 9 (15): 2395-2402.

Bestor, T.H. & Coxon, A. (1993): The pros and cons of DNA methylation. *Current Biology* 3 (6): 384 – 386.

Braszewska-Zalewska, A., Bernas, T. & Maluszynska J. (2010): Epigenetic chromatin modifications in Brassica. *Genome* 53: 203 – 210.

Burn, J.E., Bagnall, D.J., Metzger, J.D., Dennis, E.S. & Peacock, W.J. (1993): DNA methylation, vernalization, and the initiation of flowering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 287 – 291.

Carmell, M.A., Xuan, Z., Zhang, M.Q. & Hannon, G.J. (2002): The Argonaute family: tentacles that reach into RNA, developmental control, stem cell maintenance and tumorigenesis. *Genes & Development* 16: 2733 – 2742.

Dinant, Ch., Houtsmuller, A.B. & Vermeulen, W. (2008): Chromatin structure and DNA damage repair. *Epigenetics & chromatin* 1: 1 – 13.

Feil, R. & Berger, F. (2007): Convergent evolution of genomic imprinting in plants and mammals. *Trends in Genetics* 23 (4): 192 – 199.

Fenaux, P. (2005): Inhibitors of DNA methylation: betone myelodysplastic syndromes. *Nature Clinical Practice Oncology* 2: 36 – 44.

Fraga, M.F. & Esteller, M. (2002): DNA Methylation: A Profile of Methods and Application. *BioTechniques* 33: 632 – 646.

Fuchs, O. & Neuwirtová, R. (2006): Ubikvitiny, proteazomy, sumoylace a použití dnes a zítra v terapii nádorů a jiných chorob II. Sumoylace a neddylace jako posttranslační modifikace proteinů podobné ubikvitinylaci a jejich význam. *Vnitřní lékařství* 52 (6): 619 – 627.

Geiman, T.M. & Robertson, K.D. (2002): Chromatin Remodeling Histone Modification, and DNA Methylation – How Does it All Fit Together? *Journal of Cellular Biochemistry* 87: 117 – 125.

Goll, M.G. & Bestor, T.H. (2005): Eukaryotic Cytosine Methyltransferases. *Annual Review of Biochemistry* 74: 481 – 514.

Goodrich, J. (1998): Plant development: Medea's maternal instinct. *Current Biology* 8: 480 – 484.

Houben, A., Demidov, D., Caperta, A.D., Karimi, F.A. & Vlasenko, L. (2007): Phosphorylation of histone H3 in plants—A dynamic affair. *Biochimica et Biophysica Acta* 1769 (5-6): 308 – 315.

Huang, Y., Pastor, W.A., Shen, Y., Tahiliani, M., Liu, D.R. & Rao, A. (2010): The Behavior of 5-Hydroxymethylcytosine in Bisulfite Sequencing. *PLoS ONE* 5 (1): 1 – 9.

Chen, Z.J. & Tian, L. (2007): Role of dynamic and reversible histone acetylation in plant development and polyploidy. *Biochem Biophys Acta* 1769(5-6): 295–307.

Imhof, A. (2006): Epigenetic regulators and histone modification. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 5 (3): 222 – 227.

Insinga, A., Monestiroli, S., Ronzoni, S., Gelmetti, V., Marchesi, F., Viale, A., Altucci, L., Nervi, C., Minucci, S. & Pelicci, P.G. (2004): Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. *Nature Medicine* 11: 71 – 76.

Jaenisch, R., Bird, A. (2003): Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics* 33: 245 – 254.

Jana, S., Chakraborty, C., Naidi, S. & Deb, J.K. (2004): RNA interference: potential therapeutic targets. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65: 649 – 657.

Kalić, R., Chunga, H., Lasserrea, J., Vlahoviček, K. & Vingron, M. (2010): Histone modification levels are predictive for gene expression. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 107 (7): 2926 – 2931.

Klose, R.J. & Zhang, Y. (2007): Regulation of histone methylation by demethylination and demethylation. *Reviews Molecular Cell Biology* 8: 307 – 318.

Kouzarides, T. (2000): Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *The EMBO Journal* 19 (6): 1176 – 1179.

Levenson, J.M. & Sweatt, J.D. (2005): Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nature Reviews Neuroscience* 6: 108 – 118.

Loid, P. (1994): Histone acetylation: Facts and question. *Chromosoma* 103: 441 – 449.

Lusser, A., Kölle, D. & Loid, P. (2001): Histone acetylation: lessons from the plant kingdom. *Trends in Plant Science* 6 (2): 59 – 65.

Misri, S., Pandita, S., Kumar, R., Pandita, T.K. (2008): Telomers, histone code, and DNA damage response. *Cytogenet Geonome Res* 122: 297 – 307.

Morales, V., Giamarchi, C., Chailleux, C., Moro, F., Marsauda, V., Ricousse, S. & Richard-Foy, H. (2001): Chromatin structure and dynamics: Functional implications. *Biochimie* 83: 1029 – 1039.

Mulero-Navarro, S. & Esteller M. (2008): Epigenetic biomarkers for human cancer: The time is now. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 68: 1 – 11.

- Nowak, S.J. & Corces, V.G. (2004): Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends in Genetics* 20 (4): 214 – 220.
- Ondřej, V., Navrátilová, B., Protivánková, I., Piterková, J., Sedlářová, M., Luhová, L. & Lebeda, A. (2010): Recondensation level of repetitive sequences in the plant protoplast nucleus is limited by oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 61 (9): 2395 – 2401.
- Park, P., Miller, R. & Shukla, S.D. (2003): Acetylation of histone H3 at lysine 9 by ethanol in rat hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 306: 501- 504.
- Peterson, C.L. & Laniel, M.A. (2004): Histones and histone modification. *Current Biology* 14 (14): 546 – 551.
- Ramakrishnan, V. (1997): Histone structure and the organization of the nucleosome. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26: 83 – 112.
- Smulders, M.J.M. & Klerk, G.J. (2011): Epigenetics in plant tissue culture. *Plant Growth Regul* 63: 137 – 146.
- Snustad, D.P. & Simmons, M.J. (2009): *Genetika*. Nakladatelství Masarykovy univerzity. Brno.
- Soppe, W. J., Jasencakova, Z., Houben, A., Kakutani, T., Meister, A., Huang, M. S., Jacobsen, S. E., Schubert, I., Fransz, P. F. (2002): DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal* 21: 6549-6559.
- Struhl, K. (1998): Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev.* 12: 599 – 606.
- Tessadori, F., Driel, van Driel & Fransz, P. (2004): Cytogenetics as a tool to study gene regulation. *Trends in Plant Science* 9 (3): 147 – 153.

Tessadori, F., Chupeau, M. C., Chupeau, Y., Knip, M., Germann, S., van Driel, R., Fransz, P., Gaudin, V. (2007): Large-scale dissociation and sequential reassembly of pericentric heterochromatin in dedifferentiated *Arabidopsis* cells. *Journal of Cell Science* 120: 1200-1208.

Tost, J. (2008): *Epigenetics*. Caister Academic Press. Hethersett

Vaisiere, T., Sawan, C. & Herceg, Z. (2008): Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutation Research* 659: 40 – 48.

Vanyushin, B. (2006): DNA Methylation in Plants. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 301: 67 – 122.

Vyskot, B. (2010): *Epigenetika*. Univerzita Palackého v Olomouci. Olomouc.

Wei, Y., Mizzen, G.A., Cook, R.G., Gorovsky, M.A. & Allis, C.D. (1998): Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in *Tetrahymena*. *PNAS* 95: 7480 – 7484.

Yoshida, M., Minima, M., Akita, M. & Beppu, T. (1990): Potent and Specific Inhibition of Mammalian Histone Deacetylase Both in Vivo and Vitro by Trichostatin A. *The Journal of Biological Chemistry* 265 (28): 17174 – 17179.

Zeng, L., Zhou, M. (2002): Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Letters* 513: 124 – 128.