

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2010

Iva Protivánková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Diferenciační procesy v protoplastových
kulturách *Cucumis sativus* L.**

Diplomová práce

Bc. Iva Protivánková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2010

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

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala sama a že uvádím veškerou
použitou literaturu.

Dne

Podpis.....

Děkuji všem,

kteří se mnou v průběhu zpracování diplomové práce spolupracovali a vycházeli mi vstříc. Především chci poděkovat panu RNDr. Vladanovi Ondřejovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady. Také bych chtěla poděkovat panu RNDr. Miloslavovi Kitnerovi, Ph.D. za provedení cDNA-AFLP metody při analýze expresního profilu buněk. Také děkuji své rodině za podporu a zázemí.

Souhrn

Některé plně diferencované rostlinné buňky jsou schopny obnovit pluripotenci (případně totipotenci) během dediferenciace, ke které dochází při protoplastizaci. Protoplasty kultivované ve vhodném kultivačním médiu s fytohormony mohou vstoupit do buněčného cyklu, proliferovat a regenerovat do různých orgánů případně jsou schopny vytvořit novou rostlinu. Regenerační potenciál protoplastů závisí především na druhu a genotypu rostliny a na použitém explantátu a jeho stáří.

Protoplasty jsou ideální modelový systém pro studium procesů buněčného reprogramování a nalezení mechanismů zajišťujících pluripotenci (případně totipotenci). Během protoplastizace se mění organizace jaderného genomu, což se projevuje dekondukcí chromatinu a vymizením chromocentru z jader dediferencovaných protoplastů. Diferencovaná nedělící se buňka má svůj specifický genový expresní program. Obecně se předpokládá, že změny v organizaci chromatinu v průběhu protoplastizace souvisí s přechodem z genového expresního programu řídicího specifické funkce diferencovaných buněk k programu řídicímu vstup do buněčného cyklu, proliferaci, rediferenciaci, případně buněčnou smrt.

Pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace bylo zjištěno, že dvě repetitivní sekvence lokalizované v chromocentrech (satelitní DNA typu I a 5S rDNA) jsou rozsáhle dekondukovány v jádrech čerstvě izolovaných protoplastů. Byla sledována rekondenzace těchto sekvencí ve vztahu k oxidativnímu stresu. Bylo zjištěno, že rekondenzace studovaných repetitivních sekvencí byla omezena úrovní oxidativního stresu, který byl regulován přídatkem kyseliny askorbové. Byla stanovena exprese dvou genů, jejichž produkty jsou důležitou součástí antioxidantního systému, u protoplastů a během kultivace buněk odvozených z protoplastů.

Summary

Some of fully differentiated plant cells are able to restore pluripotency (pertinently totipotency) during dedifferentiation process which occurs in the course of protoplastization. The plant protoplasts cultured in culture medium containing phytohormones can reentry into the cell cycle, and then proliferate or regenerate into the various organs and are able to produce new plant. A regenerative capacity of protoplasts depends on a species of plant, a genotype of plant, an explant type and an age of explant.

The protoplasts are ideal model system for studying cell reprogramming process and finding mechanisms of obtaining pluripotency (pertinently totipotency). The heterochromatin represented by chromocenters within the protoplast interphase nuclei undergoes large-scale decondensation during protoplastization. The differentiated non-dividing cell has its specific gene expression program. According to a general assumption changes chromatin organization during protoplastization are connected with a switch from a gene expression program that drives specific function of a differentiated cell to a new one directing either reentry into the cell cycle, and then proliferation and redifferentiation or cell death.

It was shown by fluorescent *in situ* hybridization assay large-scale decondensation of chromocenters represented by satellite type I repeats sequences and 5S rDNA repeats was observed in nuclei of freshly isolated protoplasts. The recondensation of these sequences was studied, moreover, in relation to the level of oxidative stress. It was clearly showed that recondensation of studied repetitive sequences was limited by level of oxidative stress regulated by adding of ascorbate acid. Also the expression of two important genes involved in antioxidative system was studied, showed their expression patterns during protoplast culture.

Obsah

1	CÍLE PRÁCE	7
2	ÚVOD	8
2.1	PROTOPLASTOVÉ KULTURY	8
3	GENOM OKURKY SETÉ (<i>CUCUMIS SATIVUS</i> L.)	11
4	ORGANIZACE EUKARYOTICKÉHO GENOMU	12
4.1	TŘI ÚROVNĚ ORGANIZACE CHROMATINU	13
4.2	EPIGENETICKÁ CHARAKTERISTIKA GENOMU	13
4.3	CHROMOZÓMOVÁ TERITORIA	15
5	ZMĚNY V USPOŘÁDÁNÍ CHROMATINU BĚHEM PROTOPLASTIZACE	17
6	REAKTIVNÍ KYSLÍKOVÉ RADIKÁLY A ANTIOXIDAČNÍ SYSTÉM BĚHEM PROTOPLASTIZACE	20
7	MATERIÁL A METODY	23
7.1	MATERIÁL	23
7.1.1	<i>Biologický materiál</i>	23
7.1.2	<i>Chemikálie a média</i>	23
7.1.3	<i>Vybavení</i>	25
7.2	METODY	26
7.2.1	<i>Izolace genomické DNA</i>	26
7.2.2	<i>Příprava prób</i>	26
7.2.3	<i>Izolace protoplastů a jejich kultivace</i>	28
7.2.4	<i>Stanovení životnosti protoplastů</i>	29
7.2.5	<i>Stanovení výtěžku protoplastů</i>	30
7.2.6	<i>Fixace, fluorescenční in situ hybridizace (FISH), pořízení fotodokumentace</i>	31
7.2.7	<i>Real-Time PCR askorbát peroxidázy a katalázy</i>	33
7.2.8	<i>cDNA-AFLP analýza</i>	34
7.2.9	<i>Klonování AFLP fragmentů</i>	35
8	VÝSLEDKY	37
8.1	STANOVENÍ ŽIVOTNOSTI A VÝTĚŽKU PROTOPLASTŮ, KULTIVACE PROTOPLASTŮ	37
8.2	DEKONDENZACE A REKONDENZACE CHROMATINU	38
8.3	REAL-TIME PCR ASKORBÁT PEROXIDÁZY A KATALÁZY	42
8.4	ANALÝZA EXPRESNÍHO PROFILU	44
9	DISKUZE	45
10	ZÁVĚR	48
11	ZKRATKY	49
12	SEZNAM POŽITÉ LITERATURY	51
13	PŘÍLOHY	56

1 Cíle práce

Pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace byl studován rozsah dekondezace a zpětné kondenzace subtelomerické satelitní DNA typu I a 5s rDNA u protoplastů *Cucumis sativus* L. okamžitě po izolaci a v průběhu prvních tří dnů kultivace buněk odvozených z protoplastů. Bylo zjišťováno zda přidavek kyseliny askorbové do kultivačního média ovlivní jejich kondenzaci. Pomocí Real-Time PCR byla stanovena expresní úroveň cytozolické askorbát peroxidázy a katalázy v buňkách listů a v buňkách odvozených z protoplastů kultivovaných 24, 48 a 72 hodin po izolaci protoplastů. Pomocí cDNA-AFLP metody, kterou provedl Dr. M. Kitner, byl analyzován expresní profil buněk odvozených z protoplastů kultivovaných 24 hodin po izolaci protoplastů.

2 Úvod

Některé diferencované rostlinné buňky neztrácí během svého vývoje pluripotenci (případně totipotenci). Pluripotence je schopnost plně diferencované rostlinné buňky regenerovat do různých orgánů, v případě totipotence dát vznik novému rostlinnému organizmu. Aby plně diferencovaná rostlinná buňka mohla projevit svoji pluripotenci (případně totipotenci), musí nejprve dojít k její dediferenciaci. Během dediferenciace dochází ke ztrátě typických morfologických znaků, diferencovaná buňka se vrací na úroveň zygoty, embryonální nebo meristemické buňky, obnovuje buněčné dělení. Ke studiu buněčné dediferenciace se používá rostlinný protoplastový systém (Grafi, 2004).

2.1 Protoplastové kultury

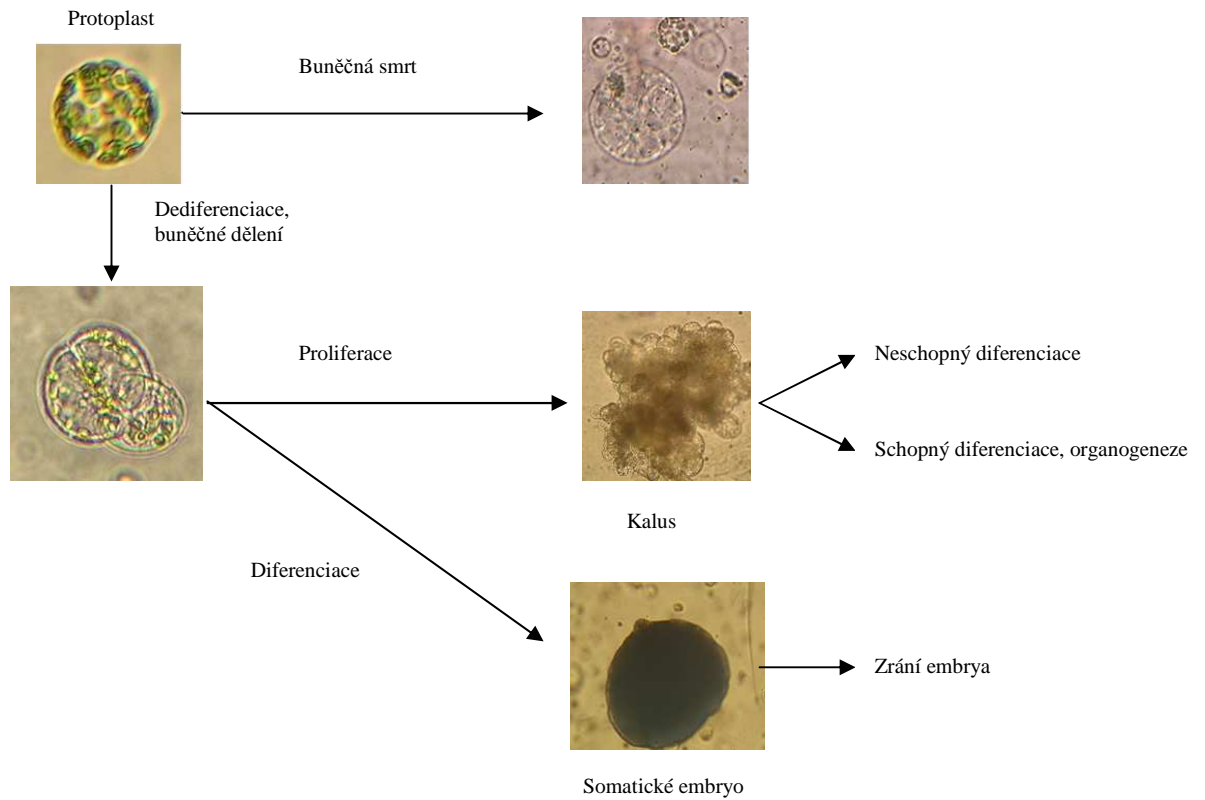
Protoplasty jsou rostlinné buňky zbavené buněčné stěny, obklopené pouze cytoplazmatickou membránou. Koncem 19. století byly poprvé izolovány protoplasty krájením cibule v hyperosmotickém médiu. Tento mechanický způsob izolace vedl k nízkému výtěžku protoplastů a byl omezen pouze na silně vakuolizované nemeristemické buňky. Cocking (1960) zjistil, že neporušené protoplasty mohou být získány inkubací rostlinného pletiva v roztoku celulózy. Komerční výroba enzymů štěpících buněčnou stěnu následně umožnila jednoduchou izolaci protoplastů z rostlinného pletiva. Hydrolytické enzymy jako celulózu, pektinázu nebo pektolyázu produkují různé houby (Nagata a Ishii, 1979; Annis a Goodwin, 1997). Pektináza štěpí střední lamelu a tím zajišťuje rozpad pletiva na jednotlivé buňky, celulóza rozrušuje vlastní buněčnou stěnu. Důležitou složkou roztoku používaného při odstranění buněčné stěny je osmotikum např. manitol, které způsobuje odčerpání vody z cytoplazmy buněk. Osmotikum tak zabraňuje prasknutí protoplastů a tím nahrazuje funkci buněčné stěny. Nejčastějším zdrojem protoplastů jsou nejmladší plně vyvinuté listy mladých rostlin kultivovaných ve sterilních podmínkách.

Po inkubaci rostlinného materiálu v enzymatickém roztoku jsou protoplasty odděleny od zbytků rostlinného pletiva centrifugací a umístěny do kultivačního média, které obsahuje makroelementy, mikroelementy, vitamíny, některé aminokyseliny, sacharidy a fytohormony. Životaschopné protoplasty regenerují buněčnou stěnu během dvou dnů po izolaci. Až po opětovném vytvoření buněčné stěny dochází k buněčnému dělení. Obnovení buněčné stěny není důležité pro jaderné dělení, ale je nezbytné pro cytokinezi. Yang a kol. (2008) zkoumali pomocí macroarray expresní profil protoplastů bavlníku během 48 hodin po izolaci. Rozsáhlou analýzou transkriptomu protoplastů

bavlníku odhalili expresi genů, jejichž produkty jsou vyžadovány v regeneraci buněčné stěny, v energetickém metabolismu, v odpovědi na stres a v regulaci transkripce. Dělicí se buňky vytváří mnohobuněčné kolonie, ze kterých se vyvíjí kalus (Obr. 1). Indukce kalusu závisí na druhu a genotypu rostliny, na zdrojovém pletivu a jeho stáří a na kultivačních podmínkách (Davey a kol., 2005; Gajdová a kol., 2007). Klíčovou roli při indukci kalusu hrají fytohormony auxiny a cytokininy. K regeneraci rostlin dochází cestou organogeneze méně často somatickou embryogenezí (Obr. 1).

Protoplasty mohou být využity ke zvýšení cytogenetické variability pomocí somatické hybridizace, genetické transformace nebo samoklonální variability. Jako samoklonální variabilita je označován zvýšený výskyt chromozomálních zlomů, který může vést k translokacím, inverzím, inzercím nebo delecím (Kaepler a kol., 2000). Nezbytným předpokladem pro produkci transgenních rostlin nebo somatických hybridů z protoplastů je jejich schopnost regenerovat v nové rostliny. Pouze u některých rostlinných druhů jsou schopny některé diferencované nedělicí se buňky svou totipotenci plně projevit při regeneraci v *in vitro* podmínkách. *Cucumis sativus* patří mezi špatně regenerující rostliny v *in vitro* podmínkách. Kultivací protoplastů *Cucumis sativus* bylo pouze v několika případech dosaženo regenerace celých rostlin (Orczyk a Malepsy, 1985; Colijn-Hooymans a kol., 1988; Burza a Malepsy, 1995). Není dosud známo co je příčinou špatné regenerace protoplastům během *in vitro* kultivace. Aby mohly protoplasty svou totipotenci projevit v průběhu *in vitro* kultivace, musí zabránit hromadění reaktivních kyslíkových radikálů, které by vedlo k programované buněčné smrti a zahájit buněčné dělení (Papadakis a Roubelakis-Angelakis, 2002).

Obr. 1: Znázornění možných vývojových cest rostlinných protoplastů. Izolované protoplasty jsou schopné prodělat dediferenciaci, pak proliferovat a diferencovat v závislosti na kultivačních podmínkách, hormonálním stimulu a rostlinném genotypu.



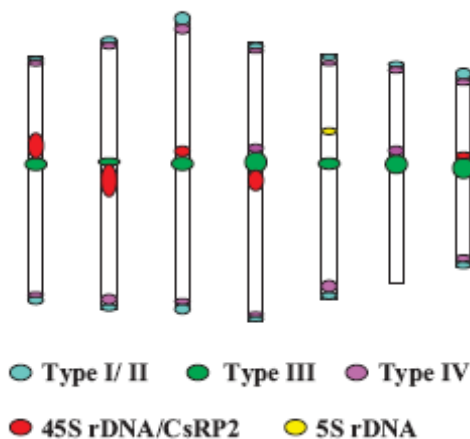
3 Genom Okurky seté (*Cucumis sativus* L.)

Okurka setá (*Cucumis sativus* L.) patří mezi krytosemenné dvouděložné rostliny, do řádu: tykvotvaré (*Cucurbitales*) a čeledi: tykvovité (*Cucurbitaceae*). Genom *Cucumis sativus* (1C, 376 Mbp) je více než dvakrát větší než genom *Arabidopsis* (1C, 145 Mbp). V jádře *Cucumis sativus* se nachází 7 párů chromozómů, které dosud nebyly dobře cytogeneticky charakterizovány díky jejich malé velikosti a morfologické podobnosti. Koo a kol. (2005) provedli karyotypizaci mitotických metafázních a meiotických pachyteních chromozómů *Cucumis sativus*. U všech sedmi párů mitotických metafázních chromozómů byly pozorovány C-bandy odpovídající heterochromatinu v centromerických, pericentromerických a telomerických oblastech. Šestý chromozóm měl pouze jeden telomerický band na konci krátkého ramene. Silný C-band byl ještě nalezen na krátkém rameni chromozómu 2. Na mitotických metafázních i meiotických pachyteních chromozómech byla provedena fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) s 5S rDNA próbou, která specificky hybridizovala na chromozóm 5. Jako FISH próby byly také použity dva RAPD markery označené jako CsRP1 a CsRP2. CsRP1 próba hybridizovala na pericentromerický heterochromatin všech sedmi párů chromozómů, kromě prvního chromozómového páru. Signály CsRP2 byly detekovány na chromozómech 1, 2, 3, 4 a 7 (Koo a kol., 2005).

Podíl heterochromatinu v jaderném genomu *Cucumis sativus* je okolo 50% (Ramachandran a kol., 1985). Přibližně 30% jaderného genomu zaujímá satelitní DNA a 10% jaderného genomu tvoří geny kódující rRNA. U *Cucumis sativus* jsou popisovány 4 typy satelitní DNA (typ I, II, III, IV) (Ganal a kol., 1986; Ganal a Hemleben, 1988), které dohromady tvoří více než 90% satelitní DNA v genomu. Satelitní DNA typu I má délku jednotky repetice 182 bp a GC obsah 47%. Satelitní DNA typu II se od typu I liší jediným párem bází, proto jsou tyto satelitní DNA spojovány do jedné skupiny označované jako satelitní DNA typu I/II. U satelitní DNA typu III je délka jednotky repetice 177 bp a GC obsah 53%. Délka jednotky repetice u satelitní DNA typu IV byla stanovena na 360 bp a GC obsah na 47%. Han a kol. (2008) pomocí FISH lokalizovali tyto satelitní DNA na mitotických chromozómech. Typ I/II próba hybridizovala na oba konce všech chromozómů kromě šestého chromozómového páru, u kterého hybridizovala pouze na konec krátkého ramene. Typ IV próba byla lokalizována společně s typ I/II proubou, avšak typ IV signály byly ještě detekovány v pericentromerických oblastech krátkých ramen dvou chromozómálních

párů (Obrázek č. 2). Typ I/II signál byl lokalizován distálněji než typ IV signál. Pomocí fiber FISH bylo zjištěno, že satelitní DNA typu I/II a typu IV se neprolínají, ale sousedí spolu. Typ III próba hybridizovala do centromerických oblastí všech chromozómů (Obr. 2). Velikost a intenzita signálů této próby se lišila v různých centromerách, což naznačuje, že počet jednotek repeticce satelitní DNA typu III je vysoce variabilní. Silný typ III signál byl pozorován na chromozómech 4, 6 a 7, signály na chromozómech 1, 3 a 5 byly slabší. Nejslabší signál byl detekován na chromozómu 2 (Han a kol., 2008).

Obr. 2: Idiogram ukazující pozici a intenzitu typ I/II, typ III, typ IV, 45S rDNA/CsRP2 a 5S rDNA signálů na cucumber metafázních chromozómech. Převzato z Han a kol. (2008).



4 Organizace eukaryotického genomu

Molekuly DNA se v interfázním jádře eukaryotických buněk nachází v podobě chromatinu. Důležitou složkou chromatinu jsou bazické proteiny histony, které v chromatinu mají hlavní strukturní roli. Histony obsahují 20 až 30% argininu a lyzinu, jejichž nechráněné $-NH_3^+$ skupiny umožňují histonům vystupovat jako polykationty a jsou důležité při interakcích se záporně nabitými fosfátovými skupinami DNA. V chromatinu se ještě nachází skupina heterogenních nehistonových proteinů a malé množství RNA.

4.1 Tři úrovně organizace chromatinu

Základní strukturní jednotkou chromatinu je jádro nukleozomu tvořené čtyřmi páry histonů (H2A, H2B, H3, H4), kolem kterých je navinuto 1,65 otáčky DNA o délce 146 nukleotidových párů. Kladně nabitě N-koncové části histonů vyčnívají z jádra nukleozomů a jsou přístupné působení enzymů, které přidávají nebo odstraňují chemické skupiny. K chemickým modifikacím histonů patří acetylace lyzinu, metylace argininu a lyzinu, fosforylace serinu a lyzinu, ubiquitinizace lyzinu a ribozylace. Počet metylových skupin přidaných k lyzinovému nebo argininovému zbytku se může lišit. Lyzinové zbytky mohou být mono-, di-, nebo trimetylované a argininové zbytky mohou být monometylované a symetricky nebo asymetricky dimetylované. Chemické modifikace mohou např. neutralizací pozitivního náboje histonů přímo ovlivnit strukturu chromatinu a tak ovlivnit transkripční aktivitu genů (Kouzarides, 2007). Chemické modifikace histonů vytváří kód rozpoznávaný proteinovými komplexy, které mění chromatinovou strukturu.

Mezi jednotlivými nukleozomovými jádry se nachází spojovací DNA. Sbalením DNA do nukleozomů je vytvořeno chromatinové vlákno o průměru 11 nm. Stáčení 11nm chromatinového vlákna do struktury solenoidu s šesti nukleozomy na otáčku vzniká 30nm chromatinové vlákno. Seskupením smyček 30nm vlákna připevněných k nehistonovým proteinům může dojít ke kondenzaci až do struktury metafázního chromozómu.

4.2 Epigenetická charakteristika genomu

Genomy eukaryot se liší svou velikostí tzn. počtem a velikostí chromozómů a obsahem euchromatinu a heterochromatinu. Heitz (1928) jako první popsal organizaci chromatinu do vysoce kondenzovaného heterochromatinu a méně kondenzovaného euchromatinu. Euchromatin a heterochromatin se liší hustotou genů, obsahem repetitivní DNA, frekvencí meiotické rekombinace a časem replikace. Euchromatin je slabě barvitelný a dekonenzovaný. Heterochromatin je intenzivně barvitelný díky vysokému stupni kondenzace a je rozdělen na konstitutivní a fakultativní. Konstitutivní heterochromatin je trvale kondenzovaný ve všech buňkách organismu a je obvykle tvořený tandemovými repeticemi např. centromér a telomér. Fakultativní heterochromatin je kondenzovaný pouze v určitém buněčném typu, nejméně v embryonálních buňkách a nejvíce v diferencovaných buňkách (Aramova, 2002). Sekvence nacházející se v jaderném genomu můžeme rozlišit podle počtu kopií na

jedinečné a repetitivní. Jedinečné sekvence odpovídají genům a pseudogenům a jsou v jaderném genomu zastoupeny pouze v několika kopiích. Repetitivní sekvence se v jaderném genomu obvykle mnohokrát opakují a jsou sbaleny do heterochromatinu. U tandemových repetitiv jsou jednotky repetice upořádány těsně za sebou (satelitní DNA). U rozptýlených repetitiv se jednotky repetice vyskytují na různých místech jaderného genomu a obvykle mají charakter mobilních genetických elementů - transpozónů (Lamb a kol., 2007). I geny mohou tvořit tandemové repetice. Příkladem tandemové genové repetice je 5S rDNA a rostlinná 45S rDNA jednotka. Rostlinná 45S rDNA jednotka obsahuje geny pro 18S rRNA, 5,8S rRNA a 25S rRNA, což jsou jedny z nejkonzervovanějších a nejvíce transkribovaných genů, které vytváří v interfázním jádře jadérko nebo-li NOR (nucleolus organizer region). Přerušení transkripce během mitózy vede k vymizení jadérka v pozdní profázi. NOR lokus, který byl v interfázi aktivní, může být v metafázi vizualizován jako sekundární konstriktce, protože v něm zůstávají některé proteiny účastníci se transkripce rRNA genů. Schopnost těchto proteinů redukovat stříbro v kyselém prostředí umožňuje barvení jadérka v interfázním jádře a barvení mitotického NOR, které bylo transkribováno během předchozí interfáze. Většina eukaryot obsahuje v jádře nadbytečný počet rRNA genů a pouze malá část rDNA jednotek je transkribována v závislosti na aktuální syntéze proteinů. Většina rDNA jednotek zůstává transkripčně neaktivní a nese epigenetické znaky heterochromatinu (Neves a kol., 2005).

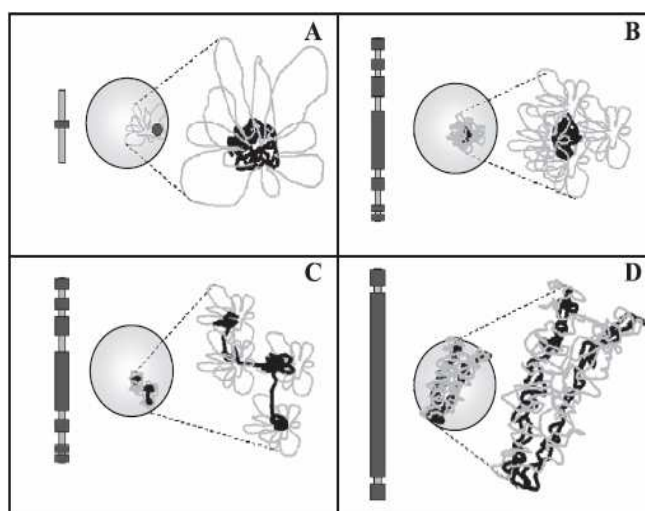
Mezi epigenetické znaky heterochromatinu patří metylovaná DNA, hypoacetylované histony a dimetylovaný lyzin 9 na histonu H3 (Soppe a kol., 2002; Johnson a kol., 2002). Na dimetylovaný lyzin 9 histonu H3 se specificky váže heterochromatin protein 1 (HP1), který je nezbytnou strukturální složkou kondenzovaného transkripčně neaktivního chromatinu. HP1 interaguje s enzymem, který metyluje lyzin 9 na histonu H3, což může umožnit šíření heterochromatinu na sousedící chromatin (Bannister a kol., 2001). Aktivně transkribovaný euchromatin obsahuje mono-, di-, trimetylovaný lyzin 4 na histonu H3 (H3/K4), trimetylovaný lyzin 36 na histonu H3 (H3/K36), monometylovaný lyzin 27 na histonu H3 (H3/K27) a monometylovaný lyzin 20 na histonu H4 (H4/K20). Trimetylace H3/K4 se nachází zejména na 5' konci transkribované oblasti a může sloužit jako označení počátku transkripce. Trimetylace H3/K36 se vyskytuje zejména na 3' konci transkribované oblasti a může souviset se zpracováním transkriptu (Barski a kol., 2007). Některé

aktivační markery nejsou nalézány pouze na transkribovaných genech, ale také na genech připravených k transkripci.

4.3 Chromozómová teritoria

V interfázním jádře chromatin jednotlivých chromozómů zaujímají odlišné oblasti označované jako chromozómová teritoria. Mezi chromozómovými teritorii se nachází interchromatinové domény, které jsou místem transkripce a sestřihu RNA (Cremer a Cremer, 2001). Chromozómová teritoria s vysokým obsahem genů jsou lokalizována ve vnitřní části jádra a chromozómová teritoria s nízkým obsahem genů na jaderné periférii (Croft a kol., 1999). Chromatinová vlákna z periferie chromozómových teritorií jsou promíchána tzn. chromozómová teritoria nejsou striktně oddělena (Branco a Pombo, 2006). U rostlin s malým genomem, jejichž chromozómy jsou menší a obsahují méně heterochromatinu (*Arabidopsis* a *Cucumis sativus*), jsou organizačními elementy chromozómových teritorií chromocentra skládající se především z centromerického a pericentromerického heterochromatinu (Obr. 3) (van Driel a Fransz, 2004; Tessadori a kol., 2004). Chromocentra u *Arabidopsis* nesou epigenetické markery umlčeného chromatinu: dimetylovaný lyzin 9 na histonu H3 a metylovanou DNA (Soppe a kol., 2002). Na geny bohatý transkripčně aktivní euchromatin vytváří růžici podobnou strukturu smyček vycházejících ven z chromocenter, což naznačuje, že chromatin obsahuje lokusy připevňující smyčky k chromocentru (van Driel and Fransz, 2004). Interfázní jádra mladých listových mezofylových buněk *Cucumis sativus* obsahují několik chromocenter podobné velikosti (Ondřej a kol., 2009a). Pro rostliny s velkým genomem, jejichž chromozómy jsou větší a obsahují velké bloky heterochromatinu (pšenice, ječmen), je typická Rablova konfigurace uvnitř interfázního jádra. Při Rablově konfiguraci jsou centromery a telomery umístěny na opačných pólech interfázního jádra (Leitch, 2000) a ramena chromozómů vytváří podélná teritoria. Na geny bohatý transkripčně aktivní euchromatin vytváří smyčky po celé délce chromozómů (Obr. 3).

Obr. 3: Znárodnění vztahu mezi strukturou chromozómového teritoria, velikostí chromozómu a distribucí heterochromatinu a euchromatinu. (A) Malý genom (*Arabidopsis*) tvořený chromozómy s jedinou hlavní heterochromatinovou doménou, která je v interfázním jádře viditelná jako chromocentrum. Euchromatin vytváří dekondenzované smyčky kolem chromocentra. (B) a (C) Středně velký genom (myš, člověk) tvořený chromozómy s mnoha heterochromatinovými doménami. Jednotlivé heterochromatinové domény mohou vytvářet v chromozómovém teritoriu buď jediné chromocentrum (B) nebo zůstávají odděleny a vytváří mnoho heterochromatinových domén (C). V obou případech euchromatin vytváří dekondenzované smyčky kolem heterochromatinových domén. (D) Velký genom (pšenice) tvořený chromozómy, které obsahují velké množství heterochromatinu (především transpozóny a satelitní repetice). Pro tyto genomy je typická Rablova konfigurace uvnitř interfázního jádra. Euchromatinové smyčky jsou po celé délce chromozómu. Převzato z van Driel a Fransz, 2004.



Obecně se předpokládá, že transkripční aktivace určitého lokusu vede k jeho přemístění dále od heterochromatinu ven z chromozómového teritoria do interchromatinové domény směrem k transkripční továrně (Lanctot a kol., 2007; Schneider a Grosschedl, 2007). Každá transkripční továrna obsahuje pouze jeden typ RNA polymerázy a specifické transkripční faktory nezbytné pro transkripci specifických skupin genů (Bartlett a kol., 2006). Společně s transkripčně aktivovaným lokusem se mohou přemístit i sousední oblasti obsahující transkripčně neaktivní geny (Williams a kol., 2006). Existuje obecný model struktury chromozómových teritorií, podle kterého jsou inaktivní geny lokalizovány uvnitř chromozómových teritorií a aktivní geny na periferii. Aktivní geny byly nedávno objeveny i uvnitř chromozómových teritorií, v takovém případě se předpokládá, že transkripční továrna se k nim přesouvá kanálem v chromozómovém teritoriu (Schneider a Grosschedl, 2007). Inaktivace určitého lokusu vede k jeho přemístění blíže k heterochromatinu (Brown a kol., 1999). Inaktivované lokusy pravděpodobně vytváří stabilní a trvalé interakce

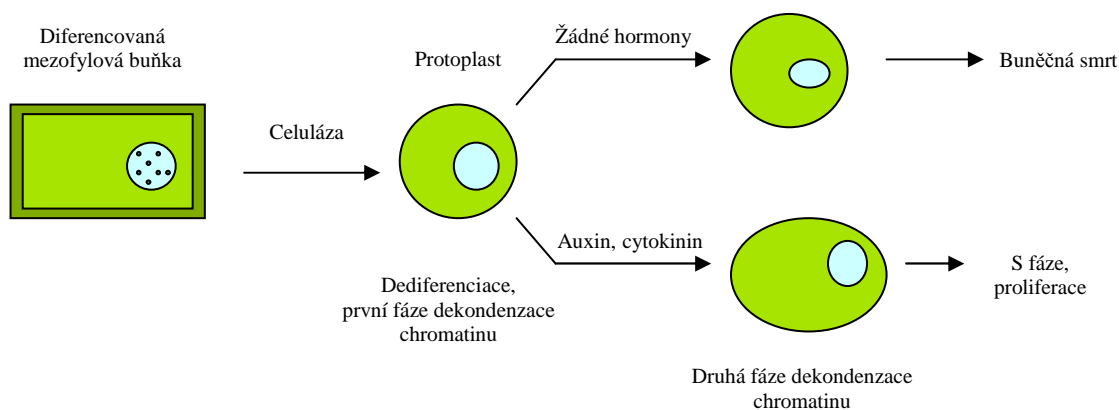
s heterochromatinem. Zatím není jasné, ve které fázi diferenciaci jsou interakce s heterochromatinem vytvořeny. Lokusy se mohou značně pohybovat jak během proliferační fáze tak během konečné fáze diferenciačního procesu. Pohyby lokusů jsou důležité nejen pro přemístění vzhledem k heterochromatinu, ale také pro setkání specifických oblastí genomu v jádře (Lanctot a kol., 2007).

Je důležité pochopit, jak jsou změny v organizaci chromatinu spojeny s vytvořením a udržením specifického genového expresního programu jednotlivých buněčných typů.

5 Změny v uspořádání chromatinu během protoplastizace

Plně diferencované nedělící se listové mezofylové buňky odpovídají na odstranění buněčné stěny dekonduzací svého chromatinu, která se projeví vymizením chromocenter z jádra (Ondřej a kol., 2009a; Ondřej a kol., 2009b; Tessadori a kol., 2007). Pomocí průtokové cytometrie byly pozorovány dvě fáze dekonduzace chromatinu během protoplastizace (Zhao a kol., 2001; Ondřej a kol., 2009b). K první fázi došlo v průběhu izolace protoplastů po působení enzymů štěpících buněčnou stěnu. Pokud se na takto získané protoplasty nechaly působit fytohormony typu auxinů a cytokininů ve správném množství a poměru, došlo k druhé fázi dekonduzace chromatinu, po které následoval vstup do S fáze, proliferace a rediferenciaci (Obr. 4). Vstup protoplastů do buněčného cyklu je spojen s částečným znovuvytvořením chromocenter obvykle 48 hodin po izolaci protoplastů (Ondřej a kol., 2009b). Předpokládá se, že při buněčné dediferenciaci dochází ke změnám genové exprese, které jsou nezbytné pro přechod z programu řídicího specifické funkce diferencovaných buněk k programu řídicímu vstup do S fáze, proliferaci a rediferenciaci. První fáze chromatinové dekonduzace je pravděpodobně nezbytná pro aktivaci genů, jejichž proteinové produkty jsou schopny měnit buněčný osud (Zhao a kol., 2001).

Obr. 4: Znárodnění dvou fází dekonzenzace chromatinu při studiu dediferenciace rostlinných protoplastů. Diferencované rostlinné buňky odpovídají na odstranění buněčné stěny dekonzenzací svého chromatinu (první fáze dekonzenzace). Tato fáze dekonzenzace chromatinu se zdá být nezbytná, ale není dostatečná pro vstup buněk do S fáze. V tomto stádiu rozhodují další signály o osudu buněk: auxin a cytokinin indukují druhou fázi dekonzenzace chromatinu, následuje vstup do S fáze a proliferace. Absence hormonů způsobuje buněčnou smrt.



Pomocí próby komplementární k satelitní DNA typu I bylo zjištěno, že v interfázních jádrech mezofylových buněk *Cucumis sativus* je subtelomerický heterochromatin zcela lokalizován v chromocentrech. V jádrech protoplastů fixovaných okamžitě po izolaci byl subtelomerický heterochromatin dekonzenzován. Za 48 hodin po izolaci protoplastů byl sice subtelomerický heterochromatin kondenzovanější a spojený s nově vytvořenými chromocentry, ale značná část subtelomerického heterochromatinu zůstávala ještě dekonzenzovaná v době mezi 48 a 72 hodinami po izolaci. Toto pozorování naznačuje pomalejší znovuvytvoření chromocenter pomocí subtelomerického heterochromatinu a že částečné přeuspořádání chromocenter je nezbytné pro vstup do buněčného cyklu a postup S fází a pravděpodobně souvisí s dediferenciací (Ondřej a kol., 2009b).

Williams a kol. (2003) studovali u protoplastů tabáku vztah mezi reorganizací chromatinu, ke které dochází v průběhu protoplastizace a aktivací genů regulovaných transkripčními faktory E2F rodiny. Tito autoři zjistili, že studované cílové geny transkripčních faktorů E2F rodiny jsou méně kondenzované a transkripčně aktivní v buňkách odvozených z protoplastů před vstupem do S fáze. V diferencovaných mezofylových buňkách byly tyto geny kondenzovanější a transkripčně neaktivní. V buňkách odvozených z protoplastů před vstupem do S fáze detekovali fosforylovaný protein retinoblastomu (pRb) na rozdíl od diferencovaných mezofylových buněk, ve

kterých se nacházel nefosforylovaný pRb. Protein retinoblastomu reguluje pozdní G1 fázi, v nefosforylovaném stavu se váže na transkripční faktory E2F rodiny a brání tak aktivaci genů nutných pro vstup do S fáze. Po mitogenní stimulaci v G1 fázi CDK4 a CDK6 fosforylují pRB vázaný na E2F transkripční faktory, dojde k rozvolnění komplexu pRb-E2F a k expresi genů nutných pro přechod z G1 fáze do S fáze (Giacinti and Giordano, 2006). V průběhu protoplastizace byla také pozorována redistribuce HP1. U diferencovaných buněk byl HP1 lokalizován pouze v jádře, v protoplastech se HP1 nacházel jak v jádře, tak v cytoplazmě. Uvolnění HP1 z jádra do cytoplazmy u protoplastů pravděpodobně souviselo se zvýšenou acetylací lyzinu 9 a 14 na histonu H3 a se změnami v metylaci lyzinu 9 na histonu H3, které byly detekovány pomocí změn v elektroforetické mobilitě (Williams a kol., 2003).

Tessadori a kol. (2007) sledovali dediferenciaci u protoplastů získaných z mezofylových buněk *Arabidopsis*. Dediferenciace mezofylových buněk *Arabidopsis* byla doprovázena rozsáhlou přechodnou dekonduzací zejména pericentromerického a méně centromerického heterochromatinu, která souvisela s vymizením chromocenter z jader buněk. Tito autoři také sledovali zda dekonduzace heterochromatinu je doprovázena změnami v metylaci lyzinu 9 na histonu H3. V chromocentrech se nachází velké množství dimetylovaného lyzinu 9 na histonu H3 (H3/K9). Po dekonduzaci heterochromatinu byla úroveň metylace DNA a H3/K9 dimetylace stálá tzn., že nedošlo k demetylaci a transkripční aktivaci. Toto pozorování bylo potvrzeno sledováním dekonduzace a transkripční aktivity *HPT* lokusu obsahujícího mnoho umlčených kopií transgenů *hpt*. Dekonduzace *HPT* lokusu není dostatečná pro obnovení transkripce umlčených kopií transgenů *hpt*. Je pravděpodobné, že přetrvání H3/K9 dimetylace po dekonduzaci chromatinu inhibuje transkripci. I když se v chromocentrech nachází na geny chudé oblasti genomu, účastní se dočasná dekonduzace chromocenter v protoplastech přepnutí vývojového programu. 45S rDNA repetic zůstaly po celou dobu kultivace kondenzované. 180 bp repetic a 5S rDNA geny rekondenzovaly do odlišných domén, které později splynuly navzájem a s 45S rDNA doménami. Většina rozptýlených repetit např. transpozómy zůstala dekonduzovaná dokonce ještě po pěti dnech kultivace. Není jasné, jaký molekulární mechanismus je zodpovědný za postupné uspořádání repetit do chromocenter, nebo proč delší tandemové repetic jsou kondenzovanější než kratší rozptýlené repetic. Vysvětlení by mohl přinést vztah mezi mechanismem RNAi a vytvářením heterochromatinu. Přepisem tandemových repetit

vzniká transkript aktivující RdRP, která vytváří dsRNA, která je následně štěpena na siRNA. Na siRNA se pak váží transkript specifické heterochromatinové proteiny, které jsou zodpovědné za kondenzaci heterochromatinu (Tessadori a kol., 2007).

Ondřej a kol. (2009b) studovali změny v transkriptomu protoplastů pomocí cDNA-AFLP techniky. Analýza expresního profilu mezofylových buněk, čerstvě izolovaných protoplastů a proliferačních buněk odvozených z protoplastů ukázala jen několik transkriptů se změněnou expresí.

6 Reaktivní kyslíkové radikály a antioxidační systém během protoplastizace

U rostlin existuje několik známých zdrojů reaktivních kyslíkových radikálů. Reaktivní kyslíkové radikály (peroxid vodíku, H_2O_2 ; superoxidový radikál, $O_2^{\cdot-}$) mohou být vytvářeny v elektron transportním řetězci chloroplastů a mitochondrií, v průběhu fotorespirace, v peroxizomech a nebo pomocí oxidáz a peroxidáz v buněčné stěně (Dat a kol., 2000). Produkce reaktivních kyslíkových radikálů se zvyšuje v reakci na abiotický stres jakým je sucho (Sharma a Dubey, 2005), zasolení (Koca a kol., 2006) nebo vysoká teplota (Ali a kol., 2005) a biotický stres jakým je napadení rostliny patogenem (Peng a Kuc, 1992). Reaktivní kyslíkové radikály mohou omezit šíření patogena rostlinou zesílením buněčné stěny, přímým usmrcením patogena nebo indukci programované buněčné smrti (Danon a kol., 2000). Reaktivní kyslíkové radikály slouží jako substráty při obnově buněčné stěny, při oslabení buněčné stěny v průběhu prodlužování buněk a také fungují jako signální molekuly při aktivaci antioxidačního systému. Tyto procesy jsou nezbytné pro postup buněčným cyklem, proliferaci buněk a regeneraci rostlin. Bylo zjištěno, že produkce reaktivních kyslíkových radikálů během izolace protoplastů a jejich hromadění během následné kultivace buněk odvozených z protoplastů ovlivňuje regenerační potenciál buněk (Papadakis a Roubelakis-Angelakis, 2001).

Rozsah škodlivých účinků reaktivních kyslíkových radikálů závisí na účinnosti antioxidačního systému, který je tvořen nízkomolekulárními antioxidanty (askorbát, glutation) a několika antioxidačními enzymy (superoxid dismutáza, askorbát peroxidáza, kataláza). Superoxid dismutáza (SOD) je první enzym účastnící se odstraňování reaktivních kyslíkových radikálů. Katalyzuje přeměnu $O_2^{\cdot-}$ na H_2O_2 , který

je redukován na vodu pomocí katalázy (CAT) v peroxizomech a pomocí askorbát peroxidázy (APX) v chloroplastech a cytozolu. Vznikající oxidovaný askorbát je redukován pomocí monodehydroaskorbát reduktázy (MDHAR) a dehydroaskorbát reduktázy (DHAR) v reakcích, které využívají NADPH a glutation. Glutation reduktáza (GR) dokončuje cyklus přeměnou oxidovaného glutationu (GSSG) na jeho redukovanou formu (GSH). Kataláza nevyžaduje redukční látku, má vysokou reakční rychlost, ale nízkou afinitu k H_2O_2 , odstraňuje vysoké koncentrace H_2O_2 . Askorbát peroxidáza vyžaduje redukční látku (askorbát), má vyšší afinitu k H_2O_2 , což jí dovoluje odstraňovat i malé množství H_2O_2 (Dat a kol., 2000).

Papadakis a Roubelakis-Angelakis (1999) srovnávali produkci reaktivních kyslíkových radikálů během izolace protoplastů tabáku a vinné révy. Tabák na rozdíl od vinné révy patří mezi dobře regenerující rostliny v *in vitro* podmínkách. Hromadění $\text{O}_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 v protoplastech tabáku a vinné révy nebylo ovlivněno N,N-diethylthiokarbamátem, který váže Cu^{2+} kationty a inhibuje SOD tzn., že na produkci H_2O_2 se v průběhu protoplastizace SOD nepodílí. U tabákových protoplastů inhibitory NADPH oxidázy inhibovaly produkci $\text{O}_2^{\cdot-}$ a inhibitory peroxidázy snížily hromadění $\text{O}_2^{\cdot-}$ a inhibovaly produkci H_2O_2 . U protoplastů vinné révy produkce reaktivních kyslíkových radikálů byla silně snížena pomocí inhibitorů peroxidázy, inhibitory NADPH oxidázy neovlivnily jejich produkci. Tyto výsledky naznačují, že za produkci reaktivních kyslíkových radikálů během izolace protoplastů tabáku a vinné révy jsou odpovědné rozdílné enzymy u obou rostlinných druhů.

Papadakis a Roubelakis-Angelakis (2001) porovnali aktivitu antioxidantního systému u protoplastů tabáku a vinné révy. Sledovali intracelulární a extracelulární hromadění reaktivních kyslíkových radikálů během osmidenní kultivace protoplastů. U neregenerujících tabákových protoplastů bylo množství reaktivních kyslíkových radikálů několikrát vyšší ve srovnání s regenerujícími tabákovými protoplasty. U protoplastů vinné révy bylo také detekováno zvýšené množství reaktivních kyslíkových radikálů. U regenerujících tabákových protoplastů se celkové množství reaktivních kyslíkových radikálů snížilo během osmidenní kultivace a bylo vždy nižší než u neregenerujících tabákových protoplastů. U neregenerujících tabákových protoplastů se množství extracelulárního $\text{O}_2^{\cdot-}$ a intracelulárního H_2O_2 snížilo druhý den kultivace a pak opět zvýšilo osmý den kultivace. U protoplastů vinné révy se množství $\text{O}_2^{\cdot-}$ snížilo během osmidenní kultivace, ale množství extracelulárního H_2O_2 se snížilo

čtvrtý den kultivace a pak opět zvýšilo osmý den kultivace. Aktivita cytozolické SOD byla zvýšena u regenerujících tabákových protoplastů, ale ne u protoplastů vinné révy. Aktivita CAT byla zvýšena u protoplastů vinné révy, ale ne u protoplastů tabáku. U regenerujících tabákových protoplastů se během buněčného dělení zvýšila aktivita enzymů askorbát-glutathionového cyklu a došlo ke zvýšení množství redukovaného askorbátu a glutathionu. U neregenerujících protoplastů tabáku a vinné révy nízká aktivita enzymů askorbát-glutathionového cyklu odpovídala vysokému množství oxidovaného askorbátu a glutathionu a nízké mitotické aktivitě. U protoplastů vinné révy nedošlo k dostatečné aktivaci antioxidantních enzymů, což vedlo ke změně redoxní homeostázy a to mohlo potlačit vyjádření totipotence, zastavit buněčný cyklus a navodit buněčnou smrt (Papadakis a Roubelakis-Angelakis, 2001).

7 Materiál a metody

7.1 Materiál

7.1.1 Biologický materiál

Semena *Cucumis sativus* L. (odrůda Marketer; SEMO a.s., Česká republika).

Kompetentní buňky *Escherichia coli* kmen JM109 (Promega, USA).

7.1.2 Chemikálie a média

Citrátový pufr: 40 ml 0,1M kyseliny citrónové; 60 ml 0,1M citronanu sodného; pH 4,8.

CTAB: 20 g cetyltrimethylamonium bromidu (CTAB); 10 g polyvinylpyrolidonu (PVP); 1 litr destilované vody.

Enzymatický PGly roztok: 0,5 g celulózy Onozuka R-10 (Duchefa, Nizozemí); 0,15 g macerozemu R-10 (Duchefa, Nizozemí); 50 ml PGly; pH 5,8; sterilizováno filtrací.

5%FBS: 5 ml fetal bovine serum; 10 ml 10x PBS; 1 ml 1% (w/v) azidu sodného; 85 ml destilované vody.

FDA zásobní roztok: 5 mg fluorescein diacetátu (FDA); 1 ml acetonu; uchován v -20°C; před použitím připravit pracovní roztok napipetováním 20 µl zásobního roztoku FDA do 1 ml 4% roztoku sacharózy v destilované vodě.

50% formamid: 35 ml formamidu; 7 ml 20x SSC; 28 ml destilované vody; pH 7.

IPTG: 400 mg isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosidu (IPTG) rozpuštěno ve 2 ml destilované vody; sterilizováno filtrací.

LB médium: 10 g Bacto Tryptone; 5 g Bacto East Extrakt; 5 g NaCl; 18 g agaru; 1 litr destilované vody; pH 7; sterilizováno autoklávováním; po sterilizaci a zchladnutí média byl přidán Ampicilin o konečné koncentraci 100 µg/1ml kultivačního média.

LCM1 médium: Gamborg B5 médium (Duchefa, Nizozemí); 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; 0,00075 g BAP; 0,004 g alaninu; 0,02 g prolinu; 1 litr destilované vody; pH 5,8; sterilizováno filtrací (Debeaujon a Branchard, 1992).

Macerující enzymatický roztok: 0,01 M citrátový pufr s 1% (w/v) pektinázy (Serva, Německo) a s 2% (w/v) celulázy Onozuka R-10 (Duchefa, Nizozemí).

Mastermix: 0,4 g dextransulfátu; 0,8 ml destilované vody → přefiltrovat; přidat 200 µl 20x SSC a doplnit destilovanou vodou do 2 ml.

MS médium: 4,405 g Murashige a Skoog média (Duchefa, Nizozemí); 20 g sacharózy; 8 g agaru; 0,1 mg IBA; 0,1 mg BAP; 1 litr destilované vody; pH 5,8; sterilizováno autoklávováním.

10x PBS: 80 g NaCl; 2 g KCl; 7,6 g Na₂HPO₄ * 2 H₂O; 2 g KH₂PO₄; 1 litr destilované vody; pH 7,5; na FISH ředěno destilovanou vodou na výslednou koncentraci 1x.

5x TBE pufr: 54 g Tris-HCl; 27,5 g kyseliny borité; 20 ml 0,5M disodné soli ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA); 1 litr destilované vody; pH 8; na agarózovou elektroforézu ředěno destilovanou vodou na výslednou koncentraci 0,5x.

PGly: 0,0272 g KH₂PO₄; 0,101 g KNO₃; 1,1176 g CaCl₂; 0,246 g MgSO₄ * 7 H₂O; 0,00016 g KI; 0,000025 g CuSO₄ * 5 H₂O; 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.

SOC médium: 20 g Bacto Tryptone; 5 g Bacto East Extrakt; 2 ml 5M NaCl; 2,5 ml 1M KCl; 10 ml 1M MgCl₂; 10 ml 1M MgSO₄; 20 ml 1M glukózy; 1 litr destilované vody; pH 7; sterilizováno autoklávováním.

20x SSC: 175,3 g NaCl; 88,2 g citrátu sodného * 2H₂O; 1 litr destilované vody; pH 7; na FISH ředěno destilovanou vodou na výslednou koncentraci 2x.

Triton: 0,25 ml TritonX-100; 0,25 g saponinu; 50 ml 1x PBS, pH 7.

X-Gal: 20 mg 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosidu (X-GAL) rozpuštěno v 1 ml dimethylformamidu.

Ostatní chemikálie:

HCl, chloroform, octan sodný, izopropanol, ethanol, 2-merkptoethanol, izoamylalkohol, kyselina octová, glycerol, kyselina askorbová (Sigma, USA), 4',6-diamidino-2-fenylindol (DAPI), Vectashield (Vector Laboratories, USA), agaróza, ethidium bromide (Serva, Německo), loading day, DNasa bez RNasy (Promega, USA), standart molekulové váhy 19-1114 bp (Roche, Německo), myší anti-digoxin protilátka konjugovaná s Rhodamin redTM-X a extravidin konjugovaný s fluorescein-5-isothiokyanátem (FITC) (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., USA).

Komerční kity: FastStart PCR Master (Roche, Německo), PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche, Německo), GenEluteTM PCR Clean-Up Kit (Sigma, USA), Biotin-Nick Translation Mix (Roche, Německo), SpektrumTM Total RNA Isolation Kit (Sigma, USA), Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Sample Kit (Roche, Německo), LightCycler[®] FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I (Roche, Německo), GenEluteTM Gel Extraction Kit (Sigma, USA), pGEM[®]-T and pGEM[®]-T Easy Vector Systems (Promega, USA), QuickLyse[®] Miniprep Kit (100) (Quiagen, Německo).

7.1.3 Vybavení

Chlazená centrifuga 5804 R (Eppendorf), centrifuga 5415D (Eppendorf), cytologická centrifuga Rotofix 32 (Hettich Zentrifugen), XP cycler (Bioer), Transluminátor UVT-20M (Herolab) s digitálním fotoaparátem (Codak 290), fluorescenční mikroskop (Olympus BX 60) s CCD kamerou (Cool Snap, Photometrics), světelný mikroskop (Olympus CK 40), LightCycler 2.0 (Roche), biologický termostat, autokláv, laminární box, digestoř, elektroforetická aparatura, mikrovlnná trouba, vodní lázeň, termoblok, třepačka, mraznička, lednička, analytické váhy, váhy, magnetické míchadlo, pH metr, Pasteurovy pipety, Petriho misky, uhelonové sítko o průměru 72 µm, parafilm, centrifugační zkumavky, mikrozkumavky, PCR mikrozkumavky, dávkovací mikropipety, sterilní špičky, ochranné rukavice, kahan, skalpel, pinzeta, podložní a krycí skla.

7.2 Metody

7.2.1 Izolace genomické DNA

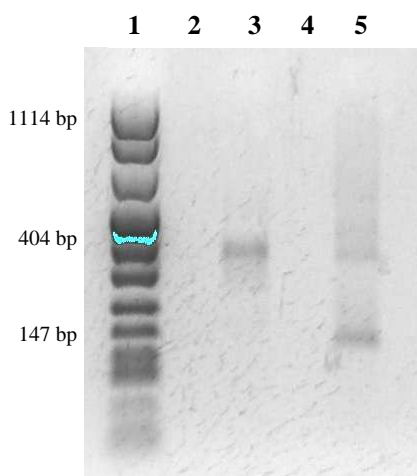
Ve třecí misce bylo v tekutém dusíku pomocí tloučku rozetřeno 100 mg listu *Cucumis sativus*. Třecí miska byla vypláchnuta 1 ml CTAB doplněným 2 μ l 2-merkaptoethanolu zahřátým na 65°C. Roztok z třecí misky byl napipetován do 2ml mikrozkuhavky a inkubován 1,5 hodiny při 65°C na termobloku. Po inkubaci bylo k roztoku přidáno 600 μ l směsi chloroform : izoamylalkohol (poměr 24:1) a po promíchání byl roztok centrifugován 15 min v chlazené centrifuze při 4°C a 11 000 otáčkách/min (tento krok byl ještě jednou zopakován se supernatantem). Po centrifugaci bylo k supernatantu přidáno 60 μ l 3M octanu sodného a 500 μ l izopropanolu. Po promíchání byl roztok inkubován při -20°C v mrazničce přes noc. Druhý den ráno byl roztok centrifugován 30 min v chlazené centrifuze při 4°C a 11 000 otáčkách/min. Po centrifugaci se slil supernatant a ke sraženině DNA bylo přidáno 200 μ l 70% ethanolu a roztok byl opět centrifugován 15 min v chlazené centrifuze při 4°C a 11 000 otáčkách/min. Po centrifugaci se ethanol slil. K DNA bylo přidáno 200 μ l sterilní vody a po stanovení koncentrace DNA se roztok v mikrozkuhavce zamrazil při -20°C.

7.2.2 Příprava prób

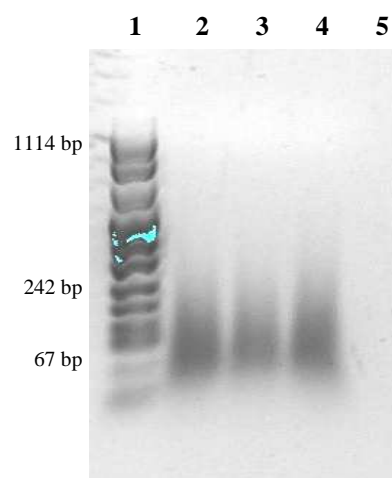
Byly použity dvě próby, jedna hybridizovala do blízkosti telomer na satelitní repetice typu I (GenBank access. no. X03769) a druhá na 5S rDNA. Próba hybridizující na satelitní repetice typu I byla připravena PCR amplifikací genomické DNA *Cucumis sativus* pomocí primerů: forward 5'-CTGGGTGGCCTCATTTTG-3' a reverse 5'-GACCTTTGGCACCGTTGT-3'. PCR produkt byl identifikován elektroforeticky na 1,5% agarózovém gelu (Obr. 5), pomocí GenElute™ PCR Clean-Up kitu (Sigma, USA) byl PCR produkt přečištěn a značen pomocí Biotin-Nick Translation Mix kitu (Roche, Německo). Biotin-nick translace byla ověřena na 1,5% agarózovém gelu (Obr. 6). Próba hybridizující na 5S rDNA byla připravena PCR amplifikací genomické DNA *Cucumis sativus* s DIG-značenými nukleotidy (PCR DIG Probe Synthesis Kit; Roche, Německo) pomocí primerů: forward 5'-GATCCCATCAGAACTCC-3' a reverse 5'-GGTGCTTTAGTGCTGGTAT-3' (Koo a kol., 2002). PCR produkt byl identifikován

elektroforeticky na 1,5% agarózovém gelu (Obr. 5). Složení PCR mixů a časové a teplotní profily PCR reakcí jsou uvedeny v tabulkách I - IV.

Obr. 5: Ověření PCR amplifikace 5S rDNA a satelitní repetice typu I na 1,5% agarózovém gelu. Dráha 1 - standard molekulové váhy, dráha 2 - kontrolní PCR s vodou a primery amplifikujícími 5S rDNA, dráha 3 - PCR produkt amplifikace 5S rDNA, dráha 4 - kontrolní PCR s vodou a primery amplifikujícími satelitní repetici typu I, dráha 5 - PCR produkt amplifikace satelitní repetice typu I.



Obr. 6: Ověření biotin-nick translace satelitní repetice typu I na 1,5% agarózovém gelu. Dráha 1 - standard molekulové váhy, dráhy 2 - 4 značené fragmenty satelitní repetice typu I, dráha 5 - kontrolní biotin-nick translace s vodou.



Tabulka I: Složení PCR mixu při přípravě próby hybridizující na satelitní repetice typu I.

Reakční složky	Objemy
FastStart PCR master mix	25 μ l
Forward primer o koncentraci 0,3 μ M	0,5 μ l
Reverse primer o koncentraci 0,3 μ M	0,5 μ l
Destilovaná sterilní voda	23,5 μ l
Genomická DNA o koncentraci 200 ng/ μ l	0,5 μ l
Celkový reakční objem	50 μ l

Tabulka II: Časový a teplotní profil PCR reakce při přípravě próby hybridizující na satelitní repetice typu I.

1 cyklus	Počáteční denaturace	95°C	4 min
35 cyklů	Denaturace	95°C	30 s
	Hybridizace primerů	55°C	45 s
	Prodlužování primerů	72°C	45 s
1 cyklus	Konečné prodloužení primerů	72°C	7 min

Tabulka III: Složení PCR mixu při přípravě próby hybridizující na 5S rDNA.

Reakční složky	Objemy
PCR DIG Probe Synthesis Mix	5 μ l
Forward primer o koncentraci 0,3 μ M	0,5 μ l
Reverse primer o koncentraci 0,3 μ M	0,5 μ l
10x PCR reakční pufr	5 μ l
Emzymový mix	0,75 μ l
Destilovaná sterilní voda	37,75 μ l
Genomická DNA o koncentraci 200 ng/ μ l	0,5 μ l
Celkový reakční objem	50 μ l

Tabulka IV: Časový a teplotní profil PCR reakce při přípravě próby hybridizující na 5S rDNA.

1 cyklus	Počáteční denaturace	95°C	4 min
35 cyklů	Denaturace	95°C	30 s
	Hybridizace primerů	55°C	1 min
	Prodlužování primerů	72°C	45 s
1 cyklus	Konečné prodloužení primerů	72°C	10 min

7.2.3 Izolace protoplastů a jejich kultivace

Semena *Cucumis sativus* (odrůda Marketer; SEMO a.s., Česká republika) byla v injekční stříkačce opláchnuta 70% ethanolem a sterilizována 20 min 8% chloraminem s kapkou Tweenu. Po sterilizaci byla semena třikrát omyta sterilní vodou a nechala se naklíčit na mokřém filtračním papíru v Petriho miskách. Po pěti dnech byly vyklíčené rostliny zasazeny do MS média v umělohmotných krabicích. Rostliny byly kultivovány v kultivační místnosti se světelnými podmínkami 8 hodin tma/16 hodin světlo o intenzitě 32 - 36 μ mol/m²s a teplotou 22 \pm 2°C.

Po osmi dnech od vysazení rostlin na MS médium byly ve sterilních podmínkách odebrány mladé listy, které byly nařezány v Petriho miskách ve 2 ml enzymatického PGly roztoku. Rozřezané listy byly inkubovány v enzymatickém PGly roztoku 16 - 17 hodin ve tmě při 25°C. Po inkubaci byla hrubá protoplastová suspenze přefiltrována přes uheltonové sítko o průměru 72 μ m. Přefiltrovaná suspenze byla pomocí Pasteurovy pipety přenesena do centrifugační zkumavky a centrifugována 5 min při 800 otáčkách/min. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a sediment byl resuspendován ve 2 ml 20% sacharózy. Roztok sacharózy byl opatrně převrstven promývacím roztokem PGly. Po 10min centrifugaci při 800 otáčkách/min se vytvořil na

rozhraní sacharózy a PGly kroužek flotujících protoplastů. Flotující protoplasty byly odebrány Pasteurovou pipetou do čisté centrifugační zkumavky a resuspendovány v promývacím roztoku PGly. Po pětiminutové centrifugaci při 800 otáčkách/min byl odstraněn supernatant a protoplasty v sedimentu byly resuspendovány v LCM1 kultivačním médiu. LCM1 kultivační médium s resuspendovanými protoplasty bylo přeneseno po 1 ml do 60mm Petriho misek. K resuspendovaným protoplastům byla přidána kyselina askorbová ve výsledné koncentraci 0, 100, 200 mg/l. Kultivace protoplastů probíhala 24, 48 a 72 hodin ve tmě při teplotě 25°C v termostatu. Po každém inkubačním intervalu byla u buněk kultivovaných s různými koncentracemi kyseliny askorbové provedena fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) a Real-Time PCR cytozolické askorbát peroxidázy a katalázy. Práce se semeny, rostlinami a protoplasty probíhala ve sterilním prostředí v boxu.

7.2.4 Stanovení životnosti protoplastů

Pomocí fluorescein diacetátu byla po každé izolaci protoplastů stanovena jejich životnost. Fluorescein diacetát proniká do buněk a v živých buňkách je pomocí buněčných esteráz přeměněn na zeleně fluoreskující produkt, který již nemůže proniknout přes cytoplazmatickou membránu ven z buněk.

Kapka LCM1 kultivačního média s resuspendovanými protoplasty byla přenesena na podložní sklo, bylo k ní přidáno 10 µl pracovního roztoku fluorescein diacetátu a byla překryta krycím sklem. Stanovení životnosti bylo provedeno pomocí fluorescenčního mikroskopu (Olympus BX 60). Nejprve byly v procházejícím světle spočítány všechny protoplasty v zorném poli a pak byly v excitačním světle spočítány zeleně fluoreskující protoplasty, tzn. živé protoplasty, které přeměnily fluorescein diacetát na zeleně fluoreskující produkt (Tabulka V).

Tabulka V: Stanovení životnosti protoplastů.

	Počet buněk v jednotlivých zorných polích										Celkový počet buněk
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Počet všech buněk	30	48	59	74	25	45	29	32	51	34	427
Počet živých buněk	17	36	51	62	19	34	22	25	46	27	339 79,4%

7.2.5 Stanovení výtěžku protoplastů

Po osmi dnech od vysazení rostlin na MS médium byly ve sterilních podmínkách odebrány mladé listy, které byly nařezány v Petriho miskách ve 2 ml enzymatického PGly roztoku. Abychom zjistili hmotnost rostlinného materiálu zvážíli jsme Petriho misky bez rostlinného materiálu s 2 ml enzymatického PGly roztoku a parafilmem a pak s přidaným rostlinným materiálem.

Ke stanovení výtěžku protoplastů byla použita Bürkerova počítací komůrka, na které jsou vytvořena dvě počítací pole. Překrytím obou polí krycím sklem vznikají dva počítací prostory, které mají výšku 0,1 mm. Na spodní ploše počítacích prostorů je jemnými vrypy vytvořena přesná mřížka známých rozměrů. Počítací mřížka je trojitými čarami rozdělena na 9 velkých čtverců, dvojitými čarami na 144 středních a 169 malých čtverců, mezi dvojitými čarami vznikají obdelníky.

Bürkerova komůrka byla naplněna LCM1 kultivačním médiem s resuspendovanými protoplasty. Protoplasty byly počítány v deseti středních čtvercích Bürkerovy komůrky v procházejícím světle mikroskopu (Olympus CK 40). Při počítání bylo dodrženo pravidlo dvou počítacích stran, tzn. byly počítány všechny protoplasty dotýkající se těchto stran i z vnějšku, protoplasty dotýkající se zbylých dvou stran počítány nebyly.

Výpočet objemu deseti středních čtverců:

- výška čtverce $v = 0,1$ mm,
- stěna středního čtverce $a = 0,2$ mm,
- objem nad jedním středním čtvercem $V_1 = a * a * v = 0,2 * 0,2 * 0,1 = 0,004 \text{ mm}^3 = 0,004 \text{ } \mu\text{l}$,
- objem nad deseti středními čtverci $V_{10} = V_1 * 10 = 0,004 * 10 = 0,04 \text{ } \mu\text{l}$.

Ukázka výpočtu výtěžku protoplastů:

V deseti středních čtvercích (0,04 μl) nacházelo 83 protoplastů.

↑	0,04 μl	83 protoplastů	↑
↑	2000 μl (0,13 g rostlinného materiálu	x protoplastů	↑

$$x = \frac{83 * 2000}{0,04} = 4,15 * 10^6 \text{ v } 0,13 \text{ g rostlinného materiálu}$$

↑	0,13 g rostlinného materiálu	4,15 * 10 ⁶ protoplastů	↑
	1 g rostlinného materiálu	x protoplastů	

$$x = \frac{4,15 * 10^6 * 1}{0,13} = 3,19 * 10^7 \text{ protoplastů v 1 g rostlinného materiálu}$$

7.2.6 Fixace, fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), pořízení fotodokumentace

Protoplasty okamžitě po izolaci a buňky odvozené z protoplastů kultivované 24, 48 a 72 hodin po izolaci protoplastů a mladé listy byly fixovány roztokem ethanol : kyselina octová (3 : 1) po dobu 10 min. Po fixaci byly listy propláchnuty 70% ethanolem a 0,01 M citrátovým pufrem 3x po 5 min. Následně byly listy přeneseny do macerujícího enzymatického roztoku v mikrozkuřavce a inkubovány 1 hodinu při 37°C v termostatu. Po inkubaci byly listy propláchnuty 0,01 M citrátovým pufrem 3x po 5 min. Poté byly listy jemně roztláčeny v kapce 45% kyseliny octové na podložní sklíčku, zamrazeny a následně vysušeny. Protoplasty okamžitě po izolaci a buňky odvozené z protoplastů byly po fixaci nakapány na vymražené podložní sklo a vysušeny. Podložní sklíčka byla v digestoři inkubována v:

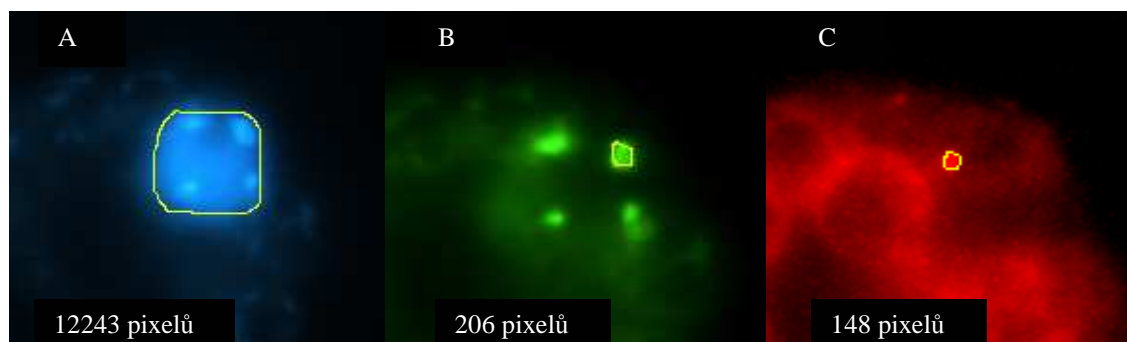
- 0,1 M HCl 1 min,
- Triton 8 min,
- 3x PBS 1x 5 min,
- 50% formamid ... 30 min.

Do mikrozkuřavky byly napipetovány próby, formamid (pipetovaná množství závisela na koncentraci prób a počtu podložních skel) a mastermix. Na jedno podložní sklo se nanášelo 50 - 100 ng prób a 5 µl mastermixu. Próba byla denaturována při 80°C 10 min na termobloku a po denaturaci okamžitě umístěna na led. Na jedno podložní sklo se pipetovalo 10 µl denaturované próby, která se překryla krycím sklem a inkubovala při 78°C 1,5 minutu na termocykléru. Po inkubaci bylo krycí sklo oblepeno lepidlem a následovala inkubace při 37°C přes noc v termostatu. Druhý den ráno byla podložní skla inkubována při 45°C v:

- a. 50% formamid ... 15 min
- b. 2x SSC 5 min
- c. 2x SSC 5 min

Na každé podložní sklo bylo napipetováno 200 - 300 μ l 5% FBS a podložní skla byla inkubována 30 min při pokojové teplotě. Do mikroskopické kůlavy bylo napipetováno 5% FBS a protilátky (pipetovaná množství závisela na počtu podložních skl). Na jedno podložní sklo se nanášelo 100 μ l 5% FBS s 0,5 μ l každé protilátky. Hybridizované próby byly detekovány pomocí myší anti-digoxin protilátky konjugované s Rhodamin redTM-X a extravidinem konjugovaným s FITC (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., USA). Rostok 5% FBS s protilátkami byl uchováván před nanesením na podložní skla na ledu ve tmě. Podložní skla převrstvená 5% FBS s protilátkami byla inkubována 1 hodinu ve tmě při pokojové teplotě. Po inkubaci byla podložní skla 3x propláchnuta v 2x SSC po 5 minutách. K redukci photobleachingu bylo na podložní skla napipetováno 1,5 μ l DAPI rozpuštěného ve Vectashieldu (Vector Laboratories, USA). Snímky byly získány pomocí fluorescenčního mikroskopu (Olympus BX 60) s CCD kamerou (Cool Snap, Photometrics) a analyzovány pomocí ImageJ freeware (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>) (Obr. 7). Relativní velikost signálů byla spočítána jako poměr velikosti plochy zeleného (satelitní DNA typu I) nebo červeného (5S rDNA) signálu k velikosti plochy modrého signálu (celé jádro obarvené DAPI) násobený 100 (Tabulka VI). Z takto získaných dat byl spočítán průměr, rozptyl a směrodatná odchylka pro každý inkubační interval s různými koncentracemi kyseliny askorbové. Data byla analyzována pomocí statistické metody nazývané one-way ANOVA test (Daniel's XL Toolbox version 2.57; <http://xltoolbox.sourceforge.net>).

Obr. 7: Ukázka analýzy velikosti signálů pomocí ImageJ freeware. Tento software stanoví velikost celé fotografie a velikost uživatelem ohraničených částí fotografie v pixelech. (A) Modrý signál odpovídá celému buněčnému jádru obarvenému DAPI a velikost jeho plochy je 12243 pixelů. (B) Zelený signál odpovídá satelitní DNA typu I, velikost plochy žlutě ohraničeného zeleného signálu je 206 pixelů. (C) Žlutě ohraničený červený signál odpovídá 5S rDNA a velikost jeho plochy je 148 pixelů.



Tabulka VI: Ukázka stanovení relativní velikosti signálů. Relativní velikost signálů byla spočítána jako poměr velikosti plochy zeleného (satelitní DNA typu I) nebo červeného (5S rDNA) signálu k velikosti plochy modrého signálu (celé jádro obarvené DAPI) násobený 100.

	Velikost plochy modrého signálu	Celková velikost ploch všech zelených signálů	Velikost plochy červeného signálu
	12243 pixelů	703 pixelů	148 pixelů
Relativní velikost signálů		5,7%	1,2%

7.2.7 Real-Time PCR askorbát peroxidázy a katalázy

Byla vyizolována celková RNA z mladých listů rostlin kultivovaných ve sterilních podmínkách, z protoplastů okamžitě po izolaci a z buněk odvozených z protoplastů kultivovaných 24, 48 a 72 hodin po izolaci protoplastů. RNA byla izolována pomocí Spektrum™ Total RNA Isolation kitu (Sigma, USA) a ošetřena DNasou bez RNasy (Promega, USA). RNA byla reverzní transkripcí přepsána do cDNA pomocí oligo dT(18) primerů a Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Sample kitu (Roche, Německo). Ke zjištění expresní úrovně cytozolické askorbát peroxidázy (APX, GenBank access. no. D88649) a katalázy (CAT, GenBank access. no. D63385) v buňkách listu, v protoplastech okamžitě po izolaci, v buňkách odvozených z protoplastů kultivovaných s různými koncentracemi kyseliny askorbové v každém inkubačním intervalu byl použit LightCycler 2.0 (Roche, Německo). Real-time PCR APX a CAT byla provedena několikanásobnou amplifikací cDNA za účasti SYBR Green I pomocí primerů: APX forward 5'-CTCTGGTGGTCACACATTGG-3' a reverse 5'-CCTCATCGGCAGCATATTTT-3'; CAT forward 5'-TTGACGATATTGGCATCC-3' a reverse 5'-TAGCATCTTCCTCCAGCA-3'. Složení PCR mixu a časový a teplotní profil PCR reakcí jsou uvedeny v tabulkách VII a VIII. Získaná data (Cp amplifikačních křivek, melting křivky) byla vyhodnocena pomocí LightCycler Software 4.1. K relativní kvantifikaci byl jako standart použit Cp amplifikačních křivek APX a CAT v listech.

Tabulka VII: Složení PCR mixu Real-Time PCR askorbát peroxidázy a katalázy.

Reakční složky	Objemy
Master mix	4 μ l
Forward primer o koncentraci 0,25 μ M	1 μ l
Reverse primer o koncentraci 0,25 μ M	1 μ l
Destilovaná sterilní voda	9 μ l
cDNA/genomická DNA o koncentraci 40 ng/ μ l	5 μ l
Celkový reakční objem	20 μ l

Tabulka VII: Časový a teplotní profil Real-Time PCR askorbát peroxidázy a katalázy.

1 cyklus	Preinkubace	95°C	10 min
45 cyklů	Denaturace	95°C	10 s
	Hybridizace primerů	50°C	30 s
	Prodlužování primerů	72°C	20 s
1 cyklus	Melting křivka	95°C→65°C	1 min

7.2.8 cDNA-AFLP analýza

Byla vyizolována celková RNA z mladých listů rostlin kultivovaných ve sterilních podmínkách a z buněk odvozených z protoplastů kultivovaných 24 hodin po izolaci protoplastů. RNA byla izolována pomocí Spektrum Total RNA Isolation kitu (Sigma, USA) a ošetřena DNasou bez RNasy (Promega, USA). RNA byla reverzní transkripcí přepsána do cDNA pomocí oligo dT(18) primerů a Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Sample kitu (Roche, Německo). Na přečištěné cDNA provedl Dr. M. Kitner AFLP analýzu (Vos a kol., 1995; Kitner a kol., 2008). cDNA (100 ng) byla rozštěpena vzácně štěpící restrikční endonukleázou *EcoRI* a často štěpící restrikční endonukleázou *MseI*, k vzniklým DNA fragmentům byly následně ligovány *EcoRI* a *MseI* adaptory. DNA fragmenty s navázanými adaptory byly pre-amplifikovány pomocí *goTag* polymerázy (Promega, USA), amplifikovaná DNA byla použita jako templát pro selektivní amplifikaci s pěti primerovými kombinacemi. Po denuraci amplifikovaných fragmentů byly vzorky nanášeny na 2% agarózový gel. Po elektroforetické separaci byly rozdělené DNA fragmenty vizualizovány pomocí ethidium bromidu.

7.2.9 Klonování AFLP fragmentů

Pomocí cDNA-AFLP analýzy expresního profilu byly po elektroforetické separaci v 2% agarózovém gelu detekovány tři výrazné AFLP fragmenty specifické pro buňky odvozené z protoplastů kultivované 24 hodin po izolaci. Tyto specifické AFLP fragmenty byly pomocí skalpelu vyřezány z gelu a přečištěny pomocí GenElute™ Gel Extraction kitu (Sigma, USA). Po přečištění byly AFLP fragmenty ligovány do pGEM®-T vektoru. Ligační směsi byly transformovány kompetentní buňky *E. coli* JM109. Složení ligační směsi je uvedeno v tabulce IX.

Tabulka IX: Složení ligační směsi

Reakční složky	Objemy
Ligační pufr	5 µl
pGEM®-T vektor (50 ng)	0,5 µl
AFLP fragment o koncentraci	2 µl
T4 DNA ligáza	1 µl
Destilovaná sterilní voda	1,5 µl
Celkový reakční objem	10 µl

Po smíchání 2 µl ligační směsi s 50 µl kompetentních buněk byly kompetentní buňky inkubovány 20 min na ledu. Po inkubaci byla provedena transformace teplotním šokem, při které byly kompetentní buňky s ligační směsí inkubovány 45 s při 42°C na termobloku a poté okamžitě umístěny na led a inkubovány 2 min na ledu. Po inkubaci bylo ke kompetentním buňkám přidáno 850 µl SOC média o pokojové teplotě a kompetentní buňky byly inkubovány 1,5 hodiny při 37°C na třepačce při 150 rpm. Na povrch LB média bylo napipetováno 40 µl X-Gal a 4 µl IPTG a pomocí umělohmotné sterilní tyčinky zahnuté do tvaru písmene L rovnoměrně rozetřeno po povrchu média. Po inkubaci byla suspenzní kultura transformovaných kompetentních buněk zakoncentrována centrifugací po dobu 2 min při 5000 g. Po centrifugaci byl odpipetován supernatant a sediment byl resuspendován v 50 µl SOC média. Resuspendované kompetentní buňky byly přepipetovány na povrch LB/Amp/IPTG/X-Gal média a rovnoměrně rozetřeny tyčinkou. Petriho misky obrácené dnem vzhůru byly inkubovány přes noc při teplotě 37°C v termostatu. Následující den byla provedena modro-bílá selekce. Pozitivní bílé kolonie byly dvakrát přeočkovány na LB/Amp/IPTG/X-Gal médium a pak přeneseny do 5 ml tekutého LB média s Ampicilinem a inkubovány při 37°C na třepačce při 150 rpm do optické hustoty 500.

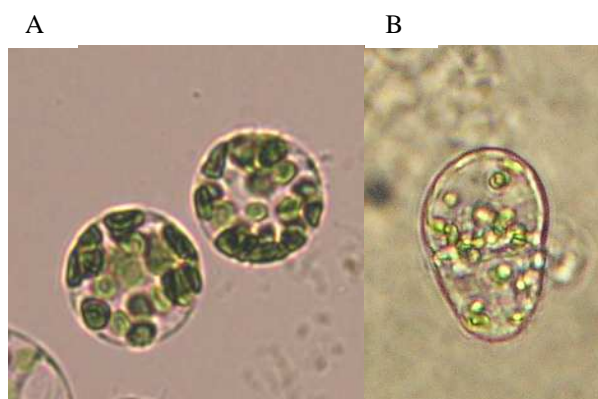
Z bakterií byl vyizolován plazmid pomocí QuickLyse[®] Miniprep kitu (Quiagen, Německo). Vyizolované plazmidy byly poslány na sekvenaci na pracoviště: Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Olomouc.

8 Výsledky

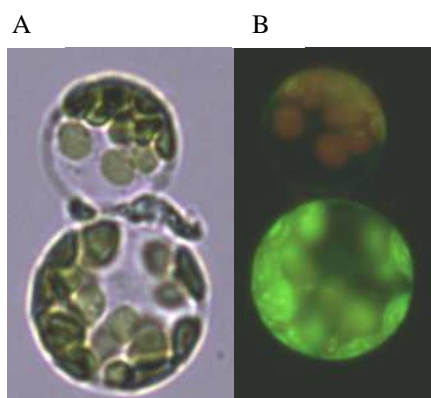
8.1 Stanovení životnosti a výtěžku protoplastů, kultivace protoplastů

Pro studium chromatinových změn během dediferenciace protoplastů jsme použili zavedený izolační a kultivační systém pro *Cucumis sativus* (Gajdová a kol., 2007). Protoplasty byly izolovány z mezofylového pletiva mladých listů rostlin *Cucumis sativus* kultivovaných ve sterilních *in vitro* podmínkách. Protoplasty normální velikosti a sférického tvaru (Obr. 8) byly získávány s výtěžkem $2 - 4 \cdot 10^7$ buněk/g donorového pletiva. Životnost izolovaných protoplastů (Obr. 9) stanovená pomocí fluorescein diacetátu byla po každé izolaci okolo 80%. Buňky odvozené z protoplastů se začaly dělit třetí až pátý den po izolaci (Obr. 8). Za dva týdny po izolaci vytvořily buňky odvozené z protoplastů kultivované v LCM1 kultivačním médiu mikrokalusy.

Obr. 8: Diferenciace protoplastů v LCM1 kultivačním médiu. (A) Izolované protoplasty *Cucumis sativus* L. (B) Třetí až pátý den po izolaci se buňky odvozené z protoplastů začaly dělit.



Obr. 9: Stanovení životnosti izolovaných protoplastů pomocí fluorescein diacetátu. (A) Protoplasty *Cucumis sativus* L. pozorované v procházejícím světle. (B) Stejně protoplasty pozorované po excitaci; zeleně fluoreskující protoplasty jsou živé tzn., přeměnily fluorescein diacetát na zeleně fluoreskující produkt.



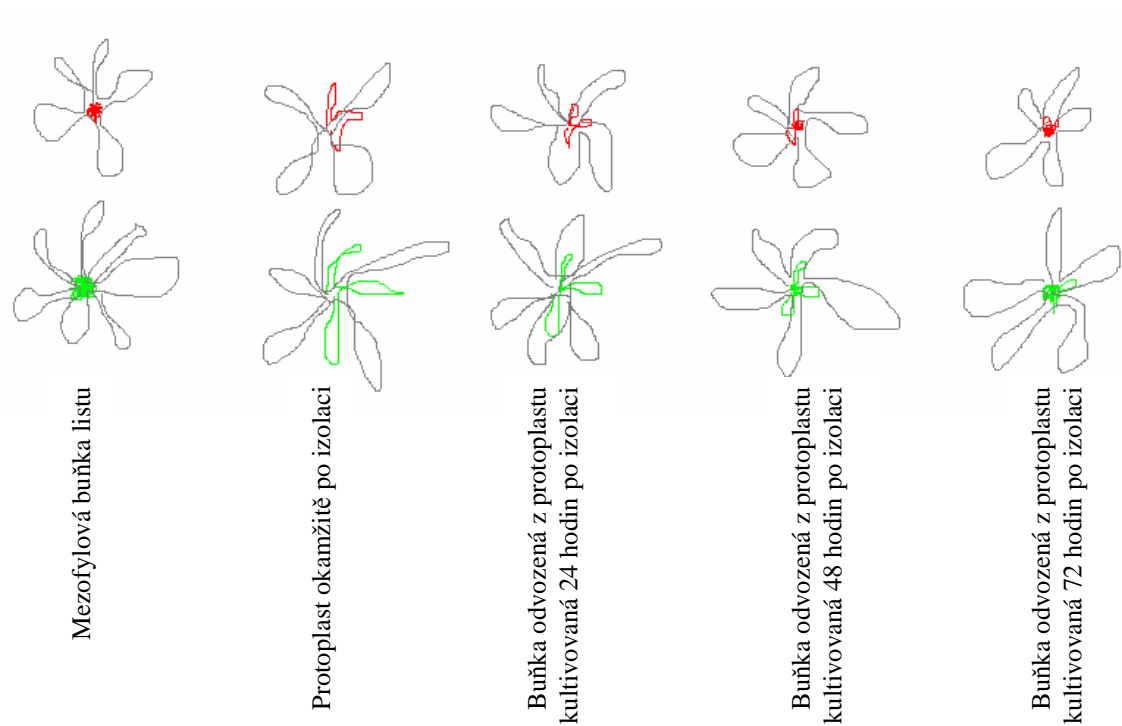
8.2 Dekondenzace a rekondenzace chromatinu

Protoplasty byly izolovány z mezofylového pletiva mladých listů rostlin *Cucumis sativus* kultivovaných ve sterilních *in vitro* podmínkách. Okamžitě po izolaci protoplastů byla do kultivačního média přidána kyselina askorbová ve výsledné koncentraci 0, 100, 200 mg/l. Kultivace buněk odvozených z protoplastů probíhala 24, 48 a 72 hodin ve tmě při teplotě 25°C v termostatu. U protoplastů okamžitě po izolaci a u buněk odvozených z protoplastů kultivovaných s různými koncentracemi kyseliny askorbové byla po každém inkubačním intervalu provedena fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) s próbami hybridizujícími na satelitní DNA typu I a 5S rDNA.

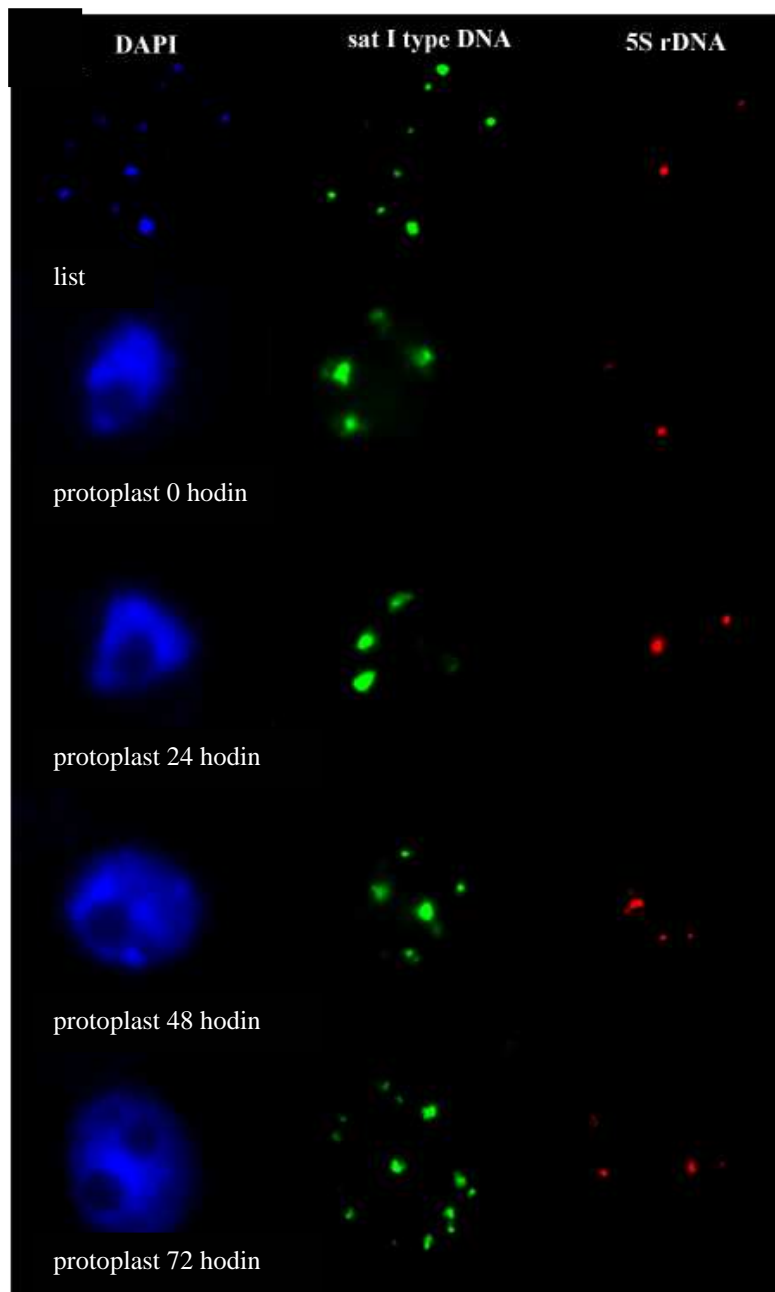
U protoplastů okamžitě po izolaci byla pozorována největší úroveň dekondenzace satelitní DNA typu I a 5S rDNA (Obr. 10 a 11). V jádrech těchto buněk vytvářela satelitní DNA typu I obvykle čtyři velké signály ve srovnání s jádry mezofylových buněk listů. Tyto signály se zmenšovaly a fragmentovaly během následné kultivace. 5S rDNA obvykle vytvářela v jádrech mezofylových buněk listů, protoplastů okamžitě po izolaci a buněk odvozených z protoplastů kultivovaných 24 hodin po izolaci dva signály. V jádrech buněk odvozených z protoplastů kultivovaných 48 a 72 hodin po izolaci vytvářela 5S rDNA čtyři signály („double dots“). Největší úroveň rekondenzace 5S rDNA a satelitní DNA typu I byla pozorována v jádrech buněk odvozených z protoplastů kultivovaných 72 hodin po izolaci (Obr. 10 a 11). Přídavek kyseliny askorbové do kultivačního média ve výsledné koncentraci 100 mg/l podpořil rekondenzaci obou typů repetitivních sekvencí (statisticky významně v jádrech buněk odvozených z protoplastů kultivovaných 72 hodin po izolaci). V jádrech většiny buněk kultivovaných v médiu s výslednou koncentrací kyseliny askorbové 200 mg/l byla pozorována větší úroveň dekondenzace chromatinu než v jádrech buněk kultivovaných v médiu s výslednou koncentrací kyseliny askorbové 100 mg/l (Obr. 12 část A).

V kultivačním období 24 a 48 hodin po izolaci byla pozorována vysoká variabilita rekondenzace chromatinu v buněčných populacích. Buněčné populace byly rozděleny do pěti skupin podle úrovně kondenzace satelitní DNA typu I a 5S rDNA (Obr. 12 část B). Největší podíl buněk s více kondenzovaným chromatinem byl zjištěn v buněčných populacích kultivovaných v médiu se 100 mg/l kyseliny askorbové a nejmenší podíl buněk s více kondenzovaným chromatinem v buněčných populacích kultivovaných v médiu bez přídavku kyseliny askorbové.

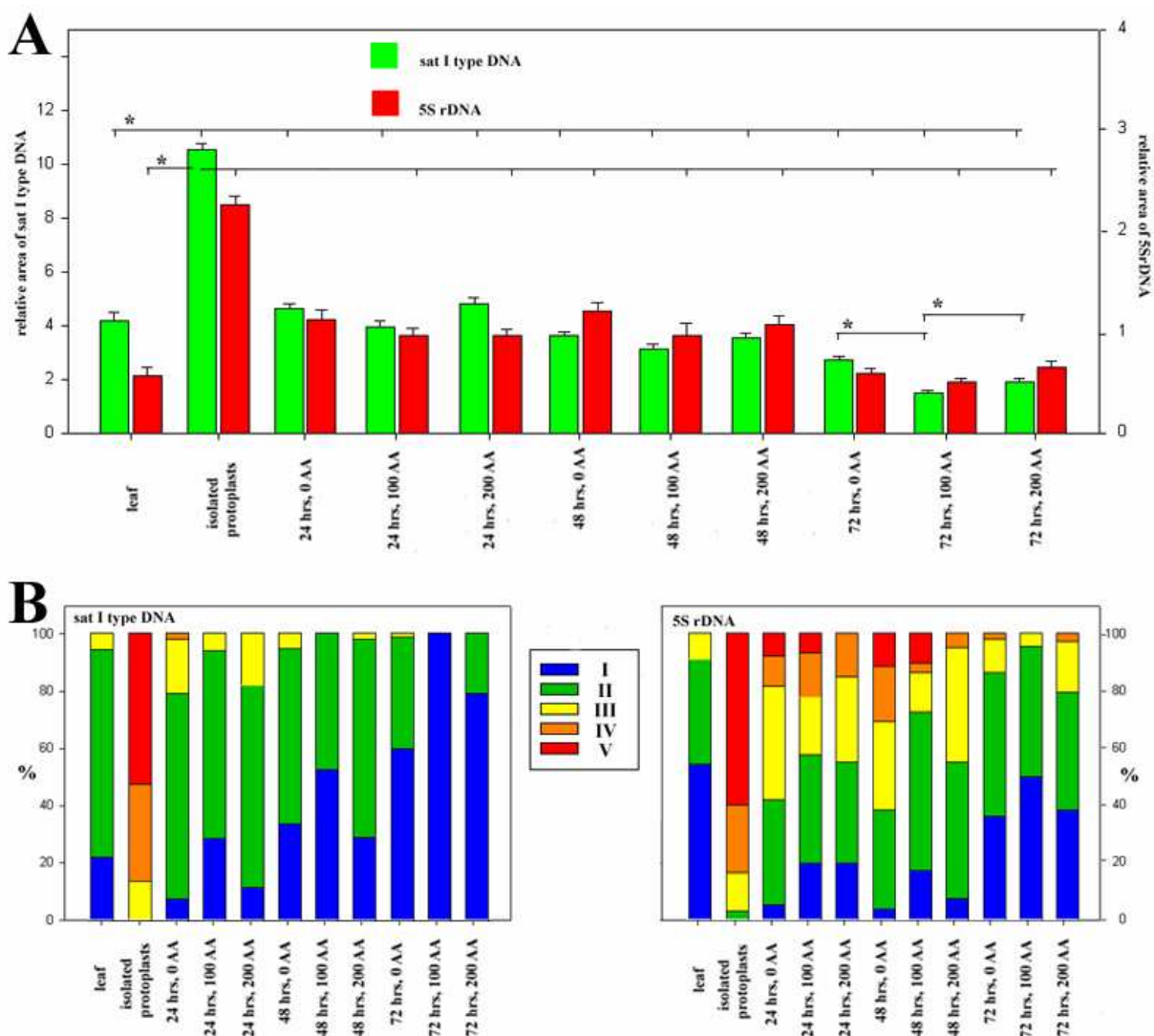
Obr. 10: Schématický obrázek dynamiky chromatinu v průběhu protoplastizace a následné kultivace buněk odvozených z protoplastů (satelitní DNA typu I znázorněna zelenou barvou, 5S rDNA znázorněna červenou barvou a euchromatin bohatý na geny znázorněn šedou barvou). Největší úroveň dekondenzace satelitní DNA typu I a 5S rDNA byla pozorována u protoplastů okamžitě po izolaci. Studované sekvence postupně rekondenzovaly během následné kultivace. Největší úroveň rekondenzace 5S rDNA a satelitní DNA typu I byla pozorována v jádrech buněk kultivovaných 72 hodin po izolaci.



Obr. 11: Dekondenzace a rekondenzace satelitní DNA typu I (zelený signál) a 5S rDNA (červený signál) v jádrech buněk (modrý signál) během 72 hodin po izolaci ve srovnání s jádry buněk listu. Největší dekondezace satelitní DNA typu I a 5S rDNA byla pozorována v jádrech protoplastů okamžitě po izolaci a v jádrech buněk kultivovaných 24 hodin po izolaci. V jádrech těchto buněk vytvářela satelitní DNA typu I obvykle čtyři velké signály, tyto signály se zmenšily a fragmentovaly během následné kultivace. V jádrech buněk kultivovaných 48 a 72 hodin po izolaci vytvářela 5S rDNA čtyři signály („double dots“), což souvisí s replikací DNA během S fáze, kterou protoplasty prošly.



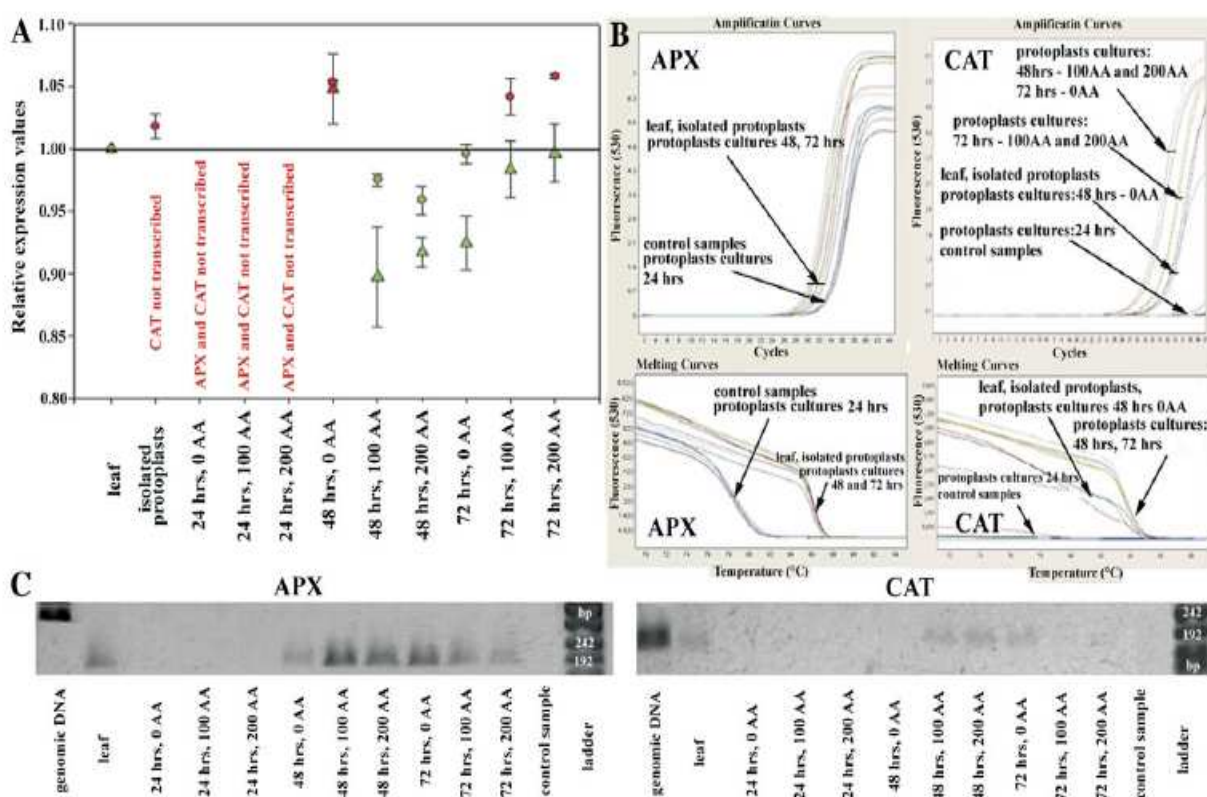
Obř. 12: Část **A** ukazuje vypočítané rozdíly v úrovni kondenzace satelitní DNA typu I a 5S rDNA v souvislosti s jednotlivými časovými intervaly a s různými koncentracemi kyseliny askorbové (0, 100 a 200 mg/l). Statisticky byla analyzována sloučená data z několika experimentů pomocí one-way ANOVA testu. Statisticky významné rozdíly v kondenzační úrovni obou studovaných sekvencí (na hladině významnosti 0,05) byly zjiřšeny u všech časových intervalů ve srovnání s úrovní kondenzace studovaných sekvencí v protoplastech okamžitě po izolaci. Kondenzační úroveň satelitní DNA typu I v souvislosti s koncentrací kyseliny askorbové se významně liřila v období 72 hodin po izolaci. Část **B** ukazuje variabilitu v rekondenzaci chromatinu v buněčných populacích v souvislosti s jednotlivými časovými intervaly a s různými koncentracemi kyseliny askorbové (0, 100 a 200 mg/l). Buněčné populace byly rozděleny do pěti skupin podle úrovně kondenzace satelitní DNA typu I (skupiny: I - $0 > 3,00$; II - $3,01 - 6,00$; III - $6,01 - 8,00$; IV - $8,01 - 10,00$; V - $10,01 <$) a 5S rDNA (skupiny: I - $0 > 0,50$; II - $0,51 - 1,00$; III - $1,01 - 1,50$; IV - $1,51 - 2,00$; V - $2,01 <$).



8.3 Real-Time PCR askorbát peroxidázy a katalázy

Pomocí Real-Time PCR byly kvantifikovány transkripty cytozolické askorbát peroxidázy (APX) a katalázy (CAT). Výsledky ukazují, že množství transkriptů APX v protoplastech okamžitě po izolaci se zmenšilo ve srovnání s listy. Expres APX nebyla detekována v buňkách odvozených z protoplastů kultivovaných 24 hodin po izolaci ve všech koncentračních sériích askorbátu. Expres CAT nebyla detekována jak v protoplastech okamžitě po izolaci tak v buňkách odvozených z protoplastů kultivovaných 24 hodin po izolaci ve všech koncentračních sériích askorbátu. U buněk odvozených z protoplastů kultivovaných 48 a 72 hodin po izolaci byl zjištěn rozdíl v expresní úrovni a tendenci obou enzymů u buněčných kultur s přídavkem a bez přídavku kyseliny askorbové. Buňky odvozené z protoplastů kultivované v médiu bez přídavku kyseliny askorbové pomalu aktivovaly transkripci APX a CAT za 48 hodin po izolaci a dosáhly expresní úrovně listů za 72 hodin po izolaci. Buňky odvozené z protoplastů kultivované v médiu s přídavkem kyseliny askorbové přesáhly expresní úroveň APX a CAT listů za 48 hodin po izolaci. Pravděpodobně nízká úroveň reaktivních kyslíkových radikálů v těchto buňkách vedla ke snížení transkripce APX a CAT za 72 hodin po izolaci. Výsledky Real-Time PCR cytozolické askorbát peroxidázy (APX) a katalázy (CAT) znázorňuje Obr. 13.

Obř. 13: Expresní profil cytozolické APX a CAT v buňkách listu, v protoplastech okamžitě po izolaci, v buňkách kultivovaných s různými koncentracemi kyseliny askorbové (0, 100, 200 mg/l) v každém inkubačním intervalu. Část **A** ukazuje relativní kvantifikaci transkripce APX (kolečka) a CAT (trojúhelníky) pomocí Real-Time PCR. Transkripční úroveň byla vztažena k expresi zjištěné v listech. Červená kolečka a trojúhelníky ukazují sníženou transkripci ve srovnání s listy, zelená kolečka a trojúhelníky znamenají zvýšenou transkripci ve srovnání s listy. Část **B** znázorňuje amplifikační a melting křivky z Real-Time PCR. Část **C** znázorňuje velikosti RT-PCR produktů APX a CAT.



8.4 Analýza expresního profilu

Pokusili jsme se pomocí cDNA-AFLP metody, kterou provedl Dr. M. Kitner, analyzovat expresní profil listových buněk a buněk odvozených z protoplastů kultivovaných 24 hodin po izolaci protoplastů. Po elektroforetické separaci byly v 2% agarózovém gelu detekovány tři výrazné AFLP fragmenty specifické pro buňky odvozené z protoplastů, fragmenty byly označeny jako P03, P13, P33. Tyto specifické genové fragmenty byly pomocí skalpelu vyřezány z gelu, vklonovány do plazmidu a sekvenovány. Po osekvenování byly ze sekvencí odstraněny části odpovídající sekvencím vektoru. Ke zjištění sekvenční homologie genových fragmentů byl použit NCBI-BLAST2 Nucleotide program (www.ebi.ac.uk/embl), pomocí kterého byly hledány homologní sekvence v The EMBL Nucleotide Sequence Database. Sekvence tří specifických AFLP fragmentů jsou uvedeny v přílohách jako Obr. 14 - 16.

Tabulka X: Sekvenční homologie tří genových fragmentů specifických pro buňky odvozené z protoplastů kultivované 24 hodin po izolaci protoplastů zjištěná pomocí NCBI-BLAST2 Nucleotide program (www.ebi.ac.uk/embl).

Fragment	Homologie	Velikost fragmentu (bp)	E value	Score
P03	EL580363	330	0,002	58
P13	GS861302	540	0,0	1000
P33	AC090523	83	2,5	44

Hodnoty Score a E value uvedené v Tabulce X u sekvencí P03 a P33 ukazují na velmi nízkou míru shody mezi těmito sekvencemi a v databázi vybranými homologními sekvencemi (EMBL-Bank access. no. EL580363, AC090523). Pravděpodobnost, že sekvence P03 a P33 funkčně odpovídají v databázi vybraným homologním sekvencím, je velmi nízká. S větší pravděpodobností můžeme říci, že k těmto dvěma sekvencím nebyly v databázi nalezeny skutečně homologní sekvence, které by jim funkčně odpovídaly. Sekvence P03 a P33 proto můžeme označit jako neznámé. U sekvence P13 především vysoká hodnota Score naznačuje vysokou míru shody mezi touto sekvencí a v databázi vybranou homologní sekvencí (EMBL-Bank access. no. GS861302). V databázi vybraná homologní sekvence (EMBL-Bank access. no. GS861302) odpovídá CsB10STC Bam 62H18R 747 konci BAC knihovny linie B10 *Cucumis sativus* L. a její funkce je neznámá.

9 Diskuze

Struktura chromatinu v eukaryotickém jádře ovlivňuje transkripci. Pro aktivaci transkripce je nezbytné vytvoření více dekonduzované chromatinové struktury a naopak při potlačení transkripce se chromatin stává kondenzovanější. Za reorganizaci chromatinu jsou zodpovědné epigenetické modifikace DNA a histonů a je zprostředkována specializovanými proteinovými komplexy (Kouzarides, 2007).

V této diplomové práci byly při studiu organizace chromatinu v průběhu dediferenciace protoplastů *Cucumis sativus* pomocí FISH analýzy použity próby hybridizující na satelitní DNA typu I a 5S rDNA. Satelitní DNA typu I poprvé popsal Ganai a kol. (1986). Han a kol. (2008) pomocí FISH lokalizovali satelitní DNA typu I na obou koncích všech mitotických chromozómů *Cucumis sativus*, kromě šestého chromozómového páru, u kterého hybridizovala pouze na konec krátkého ramene. 5S rDNA tito autoři lokalizovali na pátém chromozómovém páru. Uvnitř interfázního jádra je satelitní DNA typu I a 5S rDNA lokalizována v chromocentrech (Ondřej a kol., 2009b; Tessadori a kol., 2007).

Po izolaci protoplastů byla pozorována rozsáhlá přechodná dekonduzace heterochromatinu, která se projevila vymizením chromocenter z jader buněk (Ondřej a kol., 2009a; Ondřej a kol., 2009b; Tessadori a kol., 2007). Pomocí průtokové cytometrie byly popsány dvě fáze dekonduzace chromatinu před vstupem buněk odvozených z protoplastů do S fáze (Zhao a kol., 2001; Ondřej a kol., 2009b). První fáze dekonduzace chromatinu byla pozorována během izolace protoplastů po aplikaci enzymů degradujících buněčnou stěnu. Po aplikaci fytohormonů auxinu a cytokininu došlo před vstupem buněk odvozených z protoplastů do S fáze k druhé fázi dekonduzace chromatinu. Zhao a kol. (2001) navrhli, že první fáze dekonduzace chromatinu je pravděpodobně nezbytná pro aktivaci genů, jejichž produkty jsou schopny měnit buněčný osud. Druhá fáze dekonduzace chromatinu byla charakterizována pomocí supra-G1 píku, který se objevil u buněk odvozených z protoplastů kultivovaných 24 hodin (Ondřej a kol., 2009b) nebo 72 hodin (Zhao a kol., 2001) po izolaci protoplastů a přidání fytohormonů. Intenzita supra-G1 se snížila v době částečného znovuvytvoření chromocenter a částečné kondenzace satelitní DNA typu I. Buňky pravděpodobně mohou vstoupit do S fáze až po částečném znovuvytvoření chromocenter, která jsou základními organizačními elementy

chromozómových teritorií v interfázním jádře. Euchromatin se replikuje na začátku S fáze a heterochromatin na konci S fáze. Toto uspořádání replikačních ohnisek je pravděpodobně narušeno dočasnou dekondenzací chromatinu (Ondřej a kol., 2009b).

U protoplastů okamžitě po izolaci byla pozorována největší úroveň dekondenzace satelitní DNA typu I a 5S rDNA spojená s vymizením chromocenter z buněčných jader. Během kultivace buněk odvozených z protoplastů satelitní DNA typu I a 5S rDNA postupně rekondenzovaly. V jádrech buněk odvozených z protoplastů kultivovaných 48 a 72 hodin po izolaci protoplastů se začaly objevovat chromocentra. Největší úroveň rekondenzace 5S rDNA a satelitní DNA typu I byla pozorována v jádrech buněk odvozených z protoplastů kultivovaných 72 hodin po izolaci protoplastů. 5S rDNA vytvářela v jádrech mezofylových buněk listů, protoplastů okamžitě po izolaci a buněk odvozených z protoplastů kultivovaných 24 hodin po izolaci dva signály. V jádrech buněk odvozených z protoplastů kultivovaných 48 a 72 hodin po izolaci vytvářela 5S rDNA čtyři signály („double dots“). Zvětšený relativní obsah 5S rDNA signálů v jádrech buněk odvozených z protoplastů kultivovaných 48 a 72 hodin po izolaci pravděpodobně souvisí s replikací DNA během S fáze, kterou buňky odvozené z protoplastů prošly. 5S rDNA je replikována dříve než satelitní DNA typu I, v době, kdy objem jádra ještě není plně zvětšen. Zvětšené relativní množství 5S rDNA signálů v jádrech buněk odvozených z protoplastů kultivovaných 48 hodin po izolaci by mohlo zkreslit obsah 5S rDNA v tomto čase.

Tessadori a kol. (2007) zjistili, že dekondenzace heterochromatinu během protoplastizace není doprovázena demethylací DNA ani změnami v dimethylaci lyzinu 9 a 4 na histonu H3 tzn., že nedochází k demethylaci a transkripční aktivaci. V chromocentrech se nachází velké množství dimetylovaného histonu H3/K9. Dekondenzace chromatinu v průběhu protoplastizace nevedla k aktivaci umlčených transgenů. Je pravděpodobné, že přetrvání H3/K9 dimethylace po dekondenzaci heterochromatinu inhibuje transkripci. I když je dekondenzace chromatinu obecně spojována s transkripční aktivací, tyto výsledky naznačují, že během dediferenciace protoplastů nedochází k velkým změnám v transkripční aktivitě (Tessadori a kol., 2007). Celková dekondenzace chromatinu v jádrech protoplastů má pravděpodobně jiný funkční význam než je podpora transkripce během dediferenciace protoplastů (Ondřej a kol., 2009b).

Během protoplastizace dochází ke zvýšené produkci a hromadění reaktivních kyslíkových radikálů (Papadakis a Roubelakis-Angelakis, 1999; Papadakis a Roubelakis-Angelakis, 2001). Rozsah škodlivých účinků reaktivních kyslíkových radikálů závisí na aktivitě antioxidantního systému. Buňky odvozené z protoplastů aktivovaly během kultivace transkripci APX a CAT. Rozdíly v intenzitě transkripce obou enzymů byly pozorovány mezi buněčnými kulturami s přídavkem a bez přídavku kyseliny askorbové do kultivačního média. Rozsáhlá úroveň dekondezace obou typů repetitivních sekvencí byla pozorována v jádrech protoplastů okamžitě po izolaci a v jádrech buněk odvozených z protoplastů kultivovaných 24 hodin po izolaci. V tomto období byla v buňkách stanovena nejvyšší koncentrace reaktivních kyslíkových radikálů a nejnižší úroveň exprese APX a CAT (koncentraci reaktivních kyslíkových radikálů v buňkách stanovila Mgr. J. Piterková na Katedře biochemie, PřF UP). Tato zjištění by mohla vytvořit souvislost mezi dekondezací chromatinu a oxidativním stresem v buňkách (Ondřej a kol., 2010). APX a CAT omezují poškození rostlinných buněk reaktivními kyslíkovými radikály v průběhu obranné reakce proti patogenům (Torres a kol., 2006).

10 Závěr

Bylo zjištěno, že dvě repetitivní sekvence lokalizované v chromocentrech (satelitní DNA typu I a 5S rDNA) jsou méně dekondezované v jádrech buněk odvozených z protoplastů kultivovaných v médiu s přídavkem kyseliny askorbové. Přídavek kyseliny askorbové do kultivačního média snížil úroveň oxidativního stresu, stimuloval expresi askorbát peroxidázy a katalázy, podpořil rekondenzaci chromatinu a znovu vytvoření chromocenter. Úroveň dekondezace a rekondenzace chromatinu během protoplastizace a následné kultivace buněk odvozených z protoplastů pravděpodobně souvisí s úrovní oxidativního stresu a aktivací antioxidantního systému. Dekondezace chromatinu v průběhu protoplastizace pravděpodobně více souvisí s oxidativním stresem než s velkými změnami v expresi genů. Výsledky této diplomové práce jsou součástí publikace Ondřej a kol., 2010, které se nachází v přílohách na CD 1.

Patogenní houby napadající rostlinné buňky produkují enzymy štěpící buněčnou stěnu (Annis a Goodwin, 1997). Podobné enzymy jsou používány při izolaci protoplastů. V průběhu obranné reakce rostlin proti patogenům dochází k produkci reaktivních kyslíkových radikálů (Torres a kol., 2006; Blilou a kol., 2000). Výsledky naznačují, že dekondezace chromatinu pozorovaná během protoplastizace může souviset s oxidativním stresem, který je součástí obranné reakce rostlin proti patogenům, ale i procesu štěpení buněčné stěny. Funkční význam celkových změn v uspořádání chromatinu v průběhu protoplastizace zůstává zatím stále nejasný.

11 Zkratky

AA - kyselina askorbová (ascorbate acid)

AFLP - délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů (amplified fragment length polymorphism)

APX - askorbát peroxidáza

BAP - 6-benzylaminopurin

BLAST - basic local alignment search tool

CDK4(6) - Ser/Thr proteinkináza (cyclin-dependent kinase)

CAT - kataláza

cDNA - komplementární DNA (complementary DNA)

CTAB - cetyltrimethylamonium bromid

2,4 - D - kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenylindol

DHAR - dehydroaskorbát reduktáza

DIG-značené nukleotidy - digoxigeninem značené nukleotidy

DNA - deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)

dsRNA - dvouvláknová RNA (double strand RNA)

EDTA - kyselina ethylendiamintetraoctová

E2F - transkripční faktor rodiny E2F

EMBL - Evropská laboratoř molekulární biologie (European Molecular Biology Laboratory)

E value - expectation value

FBS - fetal bovine serum

FDA - fluorescein diacetát

FISH - fluorescenční *in situ* hybridizace

FITC - fluorescein-5-isothiokyanát

GR - glutation reduktáza

GSH - redukovaný glutation

GSSG - oxidovaný glutation

HP1 - heterochromatin protein 1

hpt - gen kódující hygromycin fosfotransferázu

HPT lokus - lokus obsahující gen kódující hygromycin fosfotransferázu

IBA - kyselina indolyl-3-máselná

IPTG - isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid

MDHAR - monodehydroaskorbát reduktáza

MES - kyselina morfolinethansulfonová

NAA - kyselina α -naftyloctová

NADPH - redukovaná forma nikotinamidadeninukleotidfosfátu

NCBI - national center for biotechnology information

PCR - polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

pRB - protein retinoblastomu

PVP - polyvinylpyrolidon

RAPD - náhodná amplifikace polymorfní DNA

rDNA - DNA kódující ribozomální RNA

RdRP - RNA-dependentní RNA polymeráza (RNA-dependent RNA polymerase)

RNA - ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)

RNAi - mechanismus RNA interference

RT-PCR - zpětná PCR (reverse transcriptase PCR)

siRNA - malá interferující RNA (small interfering RNA)

SOD - superoxid dismutáza

X-GAL - 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosidu

12 Seznam požitých literatury

- Ali, B. M., Hahn, E.-J., Peak, K.-Y. (2005): Effect of temperature on oxidative stress defence systems, lipid peroxidation and lipoxygenase activity in *Phalaenopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry* 43: 213-223.
- Annis, S. L., Goodwin, P. H. (1997): Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. *European Journal of Plant Pathology* 103: 1-14.
- Avramova, Z. V. (2002): Heterochromatin in Animals and Plants. Similarities and Differences. *Plant Physiology* 129: 40-49.
- Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C., Kouzarides, T. (2001): Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410: 120-124.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T. Y., Schones, D. E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., Zhao, K. (2007): High-resolution profile of histone methylations in the human genome. *Cell* 129: 823-837.
- Bartlett, J., Blagojevic, J., Carter, D., Eskiw, Ch., Fromaget, M., Job, Ch., Shamsher, M., Trindade, I. F., Xu, M., Cook P. R. (2006): Specialized transcription factories. *Biochemical Society Symposia* 73: 67-75.
- Blilou, I., Bueno, P., Ocampo, J. A., García-Garrido, J. M. (2000): Induction of catalase and ascorbate peroxidase activities in tobacco roots inoculated with the arbuscular mycorrhizal *Glomus mosseae*. *Mycological Research* 104: 722-725.
- Branco, M. R., Pombo, A. (2006): Intermingling of chromosome territories in interphase suggests role in translocations and transcription-dependent associations. *PLoS Biology* 4: e138. doi:10.1371/journal.pbio.0040138
- Brown, K. E., Baxter, J., Graf, D., Merckenschlager, M., Fisher, A. G. (1999): Dynamic repositioning of genes in the nucleus of lymphocytes preparing for cell division. *Molecular Cell* 3: 207-217.
- Burza, W., Malepszy, S. (1995): *In vitro* culture of *Cucumis sativus* L. XVIII. Plants from protoplast through direct somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 41: 259-266.
- Cocking, E. C. (1960): A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature* 187: 962-963.

- Colijn-Hooymans, C. M., Bouwer, R., Orczyk, W., Dons, J. J. M. (1988): Plant regeneration from cucumber (*Cucumis sativus*) protoplast. *Plant Science* 57: 63-71.
- Cremer, T., Cremer, C. (2001): Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature Reviews Genetics* 2: 292-301.
- Croft, J. A., Bridger, J. M., Boyle, S., Perry, P., Teague, P., Bickmore, W. A. (1999): Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *The Journal of Cell Biology* 145: 1119-1131.
- Danon, A., Delorme, V., Mailhac, N., Gallois, P. (2000): Plant programmed cell death: a common way to die. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 647-655.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vránová, E., van Montanu, M., Inzé, D., van Breusegem, F. (2000): Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Science* 57: 779-795.
- Davey, M. R., Antony, P., Power, J. B., Lowe, K. C. (2005): Plant protoplast technology: Current status. *Acta Physiologiae Plantarum* 27: 117-129.
- Debeaujon, I., Branchard, M. (1992): Induction of somatic embryogenesis and caulogenesis from cotyledon and leaf protoplast-derived colonies of melon (*Cucumis melo* L.). *Plant Cell Report* 12: 37 - 40.
- Gajdová, J., Navrátilová, B., Smolná, J., Lebeda, A. (2007): Factor affecting protoplast isolation and cultivation of *Cucumis* spp. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 8: 1 – 6.
- Ganal, M., Hemleben, V. (1988): Insertion and amplification of a DNA sequence in satellite DNA of *Cucumis sativus* L. (cucumber). *Theoretical and applied genetics* 75: 357-361.
- Ganal, M., Riede, I., Hemleben, V. (1986): Organization and sequence analysis of two related satellite DNAs in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Journal of Molecular Evolution* 23: 23-30.
- Giacinti, C., Giordano, A. (2006): RB and cell cycle progression. *Oncogene* 25: 5220-5227.
- Grafi, G. (2004): How cells dedifferentiate: a lesson from plants. *Developmental Biology* 268: 1-6.
- Han, Y. H., Zhang, Z. H., Liu, J. H., Lu, J. Y., Huang, S. W., Jin, W. W. (2008): Distribution of the tandem repeat sequences and karyotyping in cucumber

- (*Cucumis sativus* L.) by fluorescence *in situ* hybridization. Cytogenetic and Genome Research 122: 80-88.
- Johnson, L., Cao, X., Jacobsen, S. (2002): Interplay between two epigenetic marks: DNA methylation and histone H3 lysine 9 methylation. Current Biology 12: 1360-1367.
- Heitz, E. (1928): Das Heterochromatin der Moose. I Jahrb Wiss Botanik 69: 762-818.
- Kitner, M., Lebeda, A., Doležalová, I., Maras, M., Křístková, E., Nevo, E., Pavlíček, T., Meglic, V., Beharav, A. (2008): AFLP analysis of *Lactuca saligna* germplasm collections from four European and three Middle Eastern countries. Israel Journal of Plant Sciences 56: 185-193.
- Kaeppler, S. M. (2000): Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. Plant Molecular Biology 43: 179-188.
- Koca, H., Ozdemir, F., Turkan, I. (2006): Effect of salt stress on lipid peroxidation and superoxide dismutase and peroxidase activities of *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii*. Biologia Plantarum 50: 745-748.
- Koo, D.-H., Hur, Y., Jin, D.-Ch., Bang, J.-W. (2002): Karyotype analysis of a Korean cucumber cultivar (*Cucumis sativus* L. cv. Winter Long) using C-banding and bicolour fluorescence *in situ* hybridization. Molecules and cells 13: 413-418.
- Koo, D.-H., Choi, H.-W., Cho, J., Hur, Y., Bang, J.-W. (2005): A high-resolution karyotype of cucumber (*Cucumis sativus* L. "Winter Long") revealed by C-banding, pachytene analysis, and RAPD-aided fluorescence *in situ* hybridization. Genome 48: 534 - 540.
- Kouzarides, T. (2007): Chromatin modifications and their function. Cell 128: 693-705.
- Lamb, J. C., Yu, W., Han, F., Birchler, J. A. (2007): Plant chromosomes from end to end: telomeres, heterochromatin and centromeres. Current Opinion in Plant Biology 10: 116-122.
- Lanctot, Ch., Cheutin, T., Cremer, M., Cavalli, G., Cremer, T. (2007): Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. Nature Reviews Genetics 8: 104-115.
- Leitch, A. R. (2000): Higher levels of organization in the interphase nucleus of cycling and differentiated cells. Microbiology and Molecular Biology Reviews 64: 138-152.
- Nagata, T., Ishii, S. (1979): A rapid method for isolation of mesophyll protoplasts. Canadian Journal of Botany 57: 1820-1823.

- Neves, N., Delgado, M., Silva, M., Caperta, A., Morais-Cecílio, L., Viegas, W. (2005): Ribosomal DNA heterochromatin in plants. *Cytogenetic and Genome Research* 109: 104-111.
- Ondřej, V., Kitner, M., Doležalová, I., Nádvorník, P., Navrátilová, B., Labada, A. (2009b): Chromatin structural rearrangement during dedifferentiation of protoplasts of *Cucumis sativus* L. *Molecules and Cells* 27: 443-447.
- Ondřej, V., Navrátilová, B., Lebeda, A. (2009a): The heterochromatin as a marker for protoplast differentiation of *Cucumis sativus*. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 96: 229-234.
- 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*: doi:10.1093/jxb/erq067.
- Orczyk, W., Malepszy, S. (1985): In vitro culture of *Cucumis sativus* L. V. Stabilizing effect of glycine on leaf protoplast. *Plant Cell Reports* 4:269-273.
- Papadakis, A. K., Roubelakis-Angelakis, K. A. (1999): The generation of active oxygen species differs in tobacco and grapevine mesophyll protoplasts. *Plant Physiology* 121: 197-205.
- Papadakis, A. K., Siminis, Ch. I., Roubelakis-Angelakis, K. A. (2001): Reduced activity of antioxidant machinery is correlated with suppression of totipotency in plant protoplasts. *Plant Physiology* 126: 434-444.
- Papadakis, A. K., Roubelakis-Angelakis, K. A. (2002): Oxidative stress could be responsible for the recalcitrance of plant protoplasts. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 549-559.
- Peng, M., Kuc, J. (1992): Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity *in vitro* and on tobacco leaf disks. *Phytopathology* 82: 696-699.
- Ramachandran, C., Brandenburg W. A., den Nijs A. P. M. (1985): Intraspecific variation in C-banded karyotype and chiasma frequency in *Cucumis sativus* (*Cucurbitaceae*). *Plant Systematics and Evolution* 151: 31-41.
- Sharma, P., Dubey, R. S. (2005): Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Growth Regulation* 46: 209-221.

- Schneider, R., Grosschedl, R. (2007): Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Genes and Development* 21: 3027-3043.
- Soppe, W. J., Jasencakova, Z., Houben, A., Kakutani, T., Meister, A., Huang, M. S., Jacobsen, S. E., Schubert, I., Franz, P. F. (2002): DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal* 21: 6549-6559.
- Tessadori, F., Chupeau, M. Ch., Chupeau, Y., Knip, M., Germann, S., van Driel, R., Franz, P., Gaudin, V. (2007): Large-scale dissociation and sequential reassembly of pericentric heterochromatin in dedifferentiated *Arabidopsis* cells. *Journal of Cell Science* 120: 1200–1208.
- Tessadori, F., van Driel, R., Franz, P. (2004): Cytogenetics as a tool to study gene regulation. *Trends in Plant Science* 9: 147-153.
- Torres, M. A., Jones, J. D. G., Dangl, J. L. (2006): Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology* 141: 373-378.
- van Driel, R., Franz, P. (2004): Nuclear architecture and genome functioning in plants and animals: what can we learn from both? *Experimental Cell Research* 296: 86-90.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Pelema, P., Kuiper, M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23 (21): 4407 - 4414.
- Williams, R. R. E., Azuara, V., Perry, P., Sauer, S., Dvorkina, M., Jorgensen, H., Roix, J., McQueen, P., Misteli, T., Merckenschlager, M., Fischer, A. G. (2006): Neural induction promotes large-scale chromatin reorganisation of the *Mash1* locus. *Journal of Cell Science* 119: 132-140.
- Yang, X., Tu, L., Zhu, L., Fu, L., Min, L., Zhang, X. (2008): Expression profile analysis of genes involved in cell wall regeneration during protoplast culture in cotton by suppression subtractive hybridization and macroarray. *Journal of Experimental Botany* 59: 3661-3674.
- Zhao, J., Morozova, N., Williams, L., Libs, L., Avivi, Y., Grafi, G. (2001): Two phases of chromatin decondensation of plant cells: distinction between competence for cell fate switch and a commitment for S phase. *Journal of Biological Chemistry* 276: 22772-22778.

13 Přílohy

Obr. 14: Sekvence AFLP fragmentu označeného jako P03. K analýze sekvenční homologie byla poříta sekvence o délce 330 bp (od 431 nukleotidu do 760 nukleotidu, zbylá část sekvence odpovídala sekvenci vektoru).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
P03  CCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAAGAAAGCGAAAAGGAGCGGGCGCTAGGGC
      110     120     130     140     150     160     170     180     190
P03  CAAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCAACCACACCAGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCATTGCGCATTGAGGCTGCGCAACT
      210     220     230     240     250     260     270     280     290
P03  GAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGTAAACGCCAGGGTTTTC
      310     320     330     340     350     360     370     380     390
P03  CACGACGTTGTA AAAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCATGGCGGG
      410     420     430     440     450     460     470     480     490
P03  GAATTGCGATTGACTGCGTACCAATTACCCACATCGCCCTCAGCCGGATAGACTTCGATCGCACGGGCCCTCTTCGCCCCAGACCTCATTCTTTATG
      510     520     530     540     550     560     570     580     590
P03  AAGCTGGTCCCATGTGACCTTGCCATCATGGATCACCCAGAGATGGCTGATCGATTGTCAACATGGACATCATAGCCGTGACGCTCGCCCCACC
      610     620     630     640     650     660     670     680     690
P03  TCATCATCATATGCCATCAGCCAAAACCCATGATCTCGCGCGCCTTCTCAGCGGGCGCACGGTCGATCTCGCCGGAGGCCACCGCCTGATCGAGG
      710     720     730     740     750     760     770     780     790
P03  GGATTGGGCGGTGCGCTCGGCCCTCAGGATGCCGTGCGCGAGACTGGTAGAACGGATCAGGTTGTTACTCAGGACTCATCAATCACTAGTGAATI
      810     820     830     840     850     860     870     880     890
P03  CCGCCTGACGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCAI
      910     920     930     940     950     960     970     980     990
P03  TAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCTAATGAGI
      1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080    1090
P03  AACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGG
      1110    1120    1130    1140    1150    1160
P03  TTGCGTATTGGGCGCTCTTCGCTTCTCGCTCACTGACTGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGG

```

Obr. 15: Sekvence AFLP fragmentu označeného jako P13. K analýze sekvenční homologie byla použita sekvence o délce 540 bp (od 1 nukleotidu do 540 nukleotidu, zbylá část sekvence odpovídala sekvenci vektoru).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
P13  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      GGGCGCCGCGGGAATTCGATTGACTGCGTACCAATTACCAAGTTTGGATTGTTCACCACATAATAGGGAACGTGAGCTGGGCTTAGACCGTTCG

      110     120     130     140     150     160     170     180     190
P13  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      CAGGTTAGTTTTACCTACTGATGACAGTGTGCAATAGTAATTCAACCTAGTACGAGAGGAACCGTTGATTGCGACAATTGGTCATTGCGCTTG

      210     220     230     240     250     260     270     280     290
P13  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      AAAGCCAGTGGCGCGAAGCTACCGTGGCTGGATTATGACTGAACGCCTCTAAGTCAGAATCCGGGCTAGAAGCGACGCATGCGCCTATGCTCTG

      310     320     330     340     350     360     370     380     390
P13  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      CGACCAGCAGTAGGGGCCTTTTGGCCCCAAAGGCACGTGTCGTTGGCAAAGCCCTCGTGACGGATGAGTCGCGGGGGTCGCCTTGTAACGTAAI

      410     420     430     440     450     460     470     480     490
P13  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      CGGAGCGATTGGTAGAATCCTTTCAGACGACTTAAATACGCGACAGGGTATTGTAAGTGGCAGAGTGGCCCTGCTGCCACGATCCACTGAGATC

      510     520     530     540     550     560     570     580     590
P13  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      CTTTCGTGCTCCGATTTCGACCCCTCCCCACACAACTCGTTTGTACTCAGGACTCATCAATCACTAGTGAATTGCGGGCCGCTGCAGGTCGAC

      610     620     630     640     650     660     670     680     690
P13  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      GGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGT

      710     720     730     740     750     760
P13  .....|.....|.....|.....|.....|.....|
      TGTATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTG

```

Obr. 16: Sekvence AFLP fragmentu označeného jako P33. K analýze sekvenční homologie byla použita sekvence o délce 83 bp (od 562 nukleotidu do 644 nukleotidu, zbylá část sekvence odpovídala sekvenci vektoru).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
P33  CACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTTT
      110     120     130     140     150     160     170     180     190
P33  GTCGAGGTGCCGTAAGCACTAAATCGGAACCCCTAAGGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAAG
      210     220     230     240     250     260     270     280     290
P33  AAAGCGAAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCAACCCCGCCGCGTTAATGCGCCGCTACAGGG
      310     320     330     340     350     360     370     380     390
P33  CCATTGCCATTGAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAAGGGGGATGTGCTGCAA
      410     420     430     440     450     460     470     480     490
P33  TTAAGTTGGGTAAACGCCAGGGTTTTCCAGTCAAGCGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCC
      510     520     530     540     550     560     570     580     590
P33  CGCATGCTCCGGCCGCATGGCGGCGCGGGAATTGATTGACTGCGTACCAATTACCAAAGTCAACTAGCAACAAAACCTTTCAAAGTCAA
      610     620     630     640     650     660     670     680     690
P33  CACACCAGACCTTTATGCAAAATTCAAAATAGTCTCAGATCTTTGTTGTTACTCAGGACTCATCAATCACTAGTGAATTGCGGGCCGCTGCAAG
      710     720     730     740     750     760     770     780     790
P33  CATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCC
      810     820     830     840     850     860     870     880     890
P33  GAAATTTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTA
      910     920     930     940     950     960     970     980     990
P33  GTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTGTCGCAAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGGCGTTTGCCTATTG
      1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080    1090
P33  TCTTCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGTTGCGCTGCGGGGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCAC
      1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190
P33  CAGGGGATAACGCGAAGAACATGTGAGCAAAAAGCCAGCAAAAAGCCAGGAAACCGTAAAAAGGCCGCTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTC
      1210    1220    1230    1240    1250    1260
P33  CCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAA

```

CD 1 obsahuje publikaci:

Ondřej, V., Navratilová, 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*: doi:10.1093/jxb/erq067.