

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Bakalářská práce

Olomouc 2011

Martina Korhoňová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**REGENERAČNÍ PROCESY V PROTOPLASTOVÝCH
KULTURÁCH RODU *BRASSICA***

Bakalářská práce

Martina Korhoňová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: prezenční

Olomouc 2011

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

Prohlášení:

Prohlašuji, že tuto práci na téma Regenerační procesy v protoplastových kulturách rodu *Brassica* jsem vypracovala samostatně, pouze za užití literatury uvedené v přehledu použité literatury.

V Olomouci dne

.....

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce Doc. RNDr. Vladanovi Ondřejovi, PhD. za jeho cenné rady a připomínky, bez nichž by tato práce zcela jistě nevznikla, stejně tak za jeho trpělivost. Také děkuji rodičům za psychickou a materiální podporu po celou dobu studia a rovněž mému příteli za podporu a trpělivost.

Souhrn

Rostlinné buňky si zachovávají určitou plasticitu, což jim po dediferenciačních pochodech nabízí možnosti regenerovat v různé orgány či dokonce v celou rostlinu. Tyto dediferenciační procesy probíhají při kultivaci rostlinných protoplastů. Protoplasty jsou buňky zbavené buněčné stěny, které můžeme snadno izolovat z rostlinného materiálu. Protoplasty v přítomnosti exogenních fytohormonů mohou vstoupit znovu do buněčného cyklu, proliferovat a podstoupit regenerační procesy.

Během dediferenciace protoplastů dochází k dekonenzaci a následné rekonzaci chromatinu, což umožňuje zapínání a vypínání určitých genů. V praktické části této práce byly sledovány dva geny, které se zapínají v určitém časovém období. Gen ribonukleotid reduktázy (RNR) je zodpovědný za replikaci DNA a gen proliferačního antigenu buněčného jádra (PCNA) za buněčné dělení. Proto mohou být tyto geny považovány za markery úspěšné kultivace, diferenciace a regenerace rostlinných protoplastů.

Summary

Plant cells retain some plasticity allowing them after dedifferential processes to regenerate in different organs or even in the entire plant. These dedifferential processes occur during the cultivation of plant protoplasts. Protoplasts are cells without cell walls. They can be readily isolated from plant material. In the presence of exogenous phytohormones, protoplasts can re-enter the cell cycle, proliferate and undergo regenerative processes.

Chromatin decondensation and subsequent recondensation during dedifferentiation of protoplasts enables switching on and off certain genes. The practical part of this work is focused on two genes that are expressed in a certain period of protoplast culture. Ribonucleotide reductase (RNR) gene is responsible for DNA replication and proliferating cell nucleus antigen (PCNA) gene is responsible for the cell division. Therefore, these genes can be considered as markers of successful cultivation, differentiation and regeneration of plant protoplasts.

Obsah

1 CÍLE PRÁCE	9
2 ÚVOD	10
3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	11
3.1 PROTOPLASTY	11
3.2 HISTORIE	12
3.3 IZOLACE PROTOPLASTŮ	13
3.3.1 <i>Faktory ovlivňující kultivaci protoplastů</i>	13
3.3.1.1 Zdrojový materiál protoplastů	13
3.3.1.2. Enzymy	14
3.3.1.3 Osmotické podmínky	16
3.3.1.3 Oxidativní stres	16
3.4 PURIFIKACE PROTOPLASTŮ	17
3.5 ŽIVOTNOST A HUSTOTA PROTOPLASTŮ	17
3.6 KULTIVACE PROTOPLASTŮ	18
3.6.1 <i>Typy kultivačních médií</i>	18
3.6.2 <i>Nutriční požadavky protoplastů</i>	19
3.6.3 <i>Vnější faktory kultivace</i>	20
3.7 REGENERACE ROSTLIN Z PROTOPLASTOVÝCH KULTUR	20
3.8 SOMATICKÁ VARIABILITA	21
3.9 VYUŽITÍ PROTOPLASTOVÝCH KULTUR	21
3.9.1 <i>Studium syntézy buněčné stěny</i>	21
3.9.2 <i>Somatická hybridizace</i>	22
3.9.2.1 Indukovaná fúze protoplastů	23
3.9.2.1.1 Chemicky indukovaná fúze protoplastů	24
3.9.2.1.2 Elektrofúze protoplastů	25
3.9.3 <i>Genetická transformace protoplastů</i>	25
3.10 RIBONUKLEOTID REDUKTÁZA	25
3.10.1 <i>Rozdělení RNR</i>	26
3.10.3 <i>Struktura RNR</i>	27
3.10.4 <i>Inhibice RNR</i>	27
3.11 PROLIFERAČNÍ ANTIGEN BUNĚČNÉHO JÁDRA	28
3.11.1 <i>Funkce PCNA</i>	28
3.11.2 <i>Struktura PCNA</i>	29
3.11.3 <i>Množství PCNA v buňkách</i>	29
3.11.4 <i>Interakce proteinového produktu genu PCNA s ostatními proteiny</i>	30
4 MATERIÁL A METODY	31
4.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL	31
4.2 SEZNAM POUŽITÝCH ROZTOKŮ A MÉDIÍ	31
4.3 VYBAVENÍ LABORATOŘE	33
4.4 PĚSTOVÁNÍ POKUSNÝCH ROSTLIN	33
4.5 IZOLACE PROTOPLASTŮ	34

4.6 ŽIVOTNOST PROTOPLASTŮ	34
4.7 STANOVENÍ VÝTĚŽKU PROTOPLASTŮ	34
4.8 KULTIVACE PROTOPLASTŮ	35
4.9 IZOLACE DNA	35
4.10 IZOLACE RNA	36
4.11 ODSTRANĚNÍ DNA Z RNA	37
4.12 REVERZNÍ TRANSKRIPCE RNA	37
4.13 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)	37
4.14 GELOVÁ ELEKTROFORÉZA V AGARÓZOVÉM GELU	38
4.15 REAL-TIME PCR RIBONUKLEOTID REDUKTÁZY A PROLIFERAČNÍHO ANTIGENU BUNĚČNÉHO JÁDRA	39
5 VÝSLEDKY	40
5.1 STANOVENÍ VÝTĚŽKU PROTOPLASTŮ	40
5.2 STANOVENÍ ŽIVOTNOSTI PROTOPLASTŮ	41
5.3 KULTIVACE PROTOPLASTŮ	42
5.4 EXPRESE GENŮ RNR A PCNA	44
6 DISKUZE	47
7 ZÁVĚR	49
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	50
9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	51
10 PŘÍLOHY	57
10.1 SEKvence PCNA A VYZNAČENÍ POUŽITÝCH PRIMERŮ	57
10.2 SEKvence RNR A VYZNAČENÍ POUŽITÝCH PRIMERŮ	58

1 Cíle práce

Cílem práce je shromáždění a zpracování literatury na téma protoplastové kultury. Rešerše se zabývá donorovým materiálem protoplastů, samotné izolace a kultivace protoplastů včetně faktorů, které je ovlivňují, a využitím protoplastových kultur v biotechnologiích.

Praktická část zahrnuje izolaci a kultivaci protoplastů květáku (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), dále ověření funkce genů ribonukleotid reduktázy (RNR) a proliferačního antigenu buněčného jádra (PCNA) jako markerů úspěšné kultivace protoplastů, jejich diferenciaci a regenerace pomocí izolace DNA a RNA z protoplastů bezprostředně po izolaci a v dalších časových intervalech a následné PCR a Real-Time PCR.

2 Úvod

Dlouho se věřilo, že diferencované buňky patřící do určité linie nemohou již nikdy změnit svůj osud. Současné poznatky však prokázaly, že některé rostlinné buňky si zachovávají plasticitu, což umožňuje zpětnou dediferenciaci a nabízí tak buňkám nové možnosti. Po dediferenciačních procesech se projeví schopnost pluripotence (regenerace různých orgánů) či totipotence (regenerace celé rostliny). Významným příkladem pluripotence rostlinných buněk je dediferenciace protoplastů izolovaných z různých pletiv. Protoplasty v přítomnosti fytohormonů (auxiny, cytokininy) mohou vstoupit znovu do buněčného cyklu, proliferovat a podstoupit regenerační procesy, jejichž výsledkem jsou kalusy (hmoty dělicích se buněk), ze kterých mohou vyrůst kořeny či prýty a následně celá rostlina. Dediferenciace protoplastů je charakterizována ustanovením nové rovnováhy mezi euchromatinem (část genomu, která je přepisována) a heterochromatinem (kondenzovaná část genomu, jejíž transkripce je potlačována). Rostlinný protoplastový systém je tedy mimo jiné využíván zejména pro studii dediferenciačních procesů (Grafi, 2004; Ondřej *et al.*, 2009).

Brassica je ekonomicky nejdůležitějším rodem v čeledi Brassicaceae. Několik jejich druhů a typů můžeme zařadit mezi významné olejniny, zeleninu, pícniny nebo jsou používány při výrobě koření (např. hořčice). Některé druhy jsou široce používány v kuchyni mnoha kultur a jsou uznávány jako cenný zdroj vlákniny. Košťálová zelenina obsahuje málo tuku a je zdrojem vitamínů a minerálů. Obsahují také velké množství fytochemikálií, z nichž některé chrání proti karcinogenezi (Steinmetz *et Potter*, 1996). Mezi plodinami rodu *Brassica* mají nejvyšší ekonomickou hodnotu olejnatá semena rostlin. Patří mezi ně *Brassica juncea*, *B. carinata*, *B. rapa* (syn. *B. campestris*) a *B. napus*. Rostliny rodu *Brassica* jsou důležitou a vysoce diverzifikovanou skupinou plodin pěstovaných na celém světě, které patří především k druhům *Brassica oleracea*, *B. rapa* a *B. napus*. Do této skupiny patří zelenina jako je brokolice, růžičková kapusta, zelí, květák, kapusta, kedlubna a tuřín (Stewart Jr. *et Cardoza*, 2004).

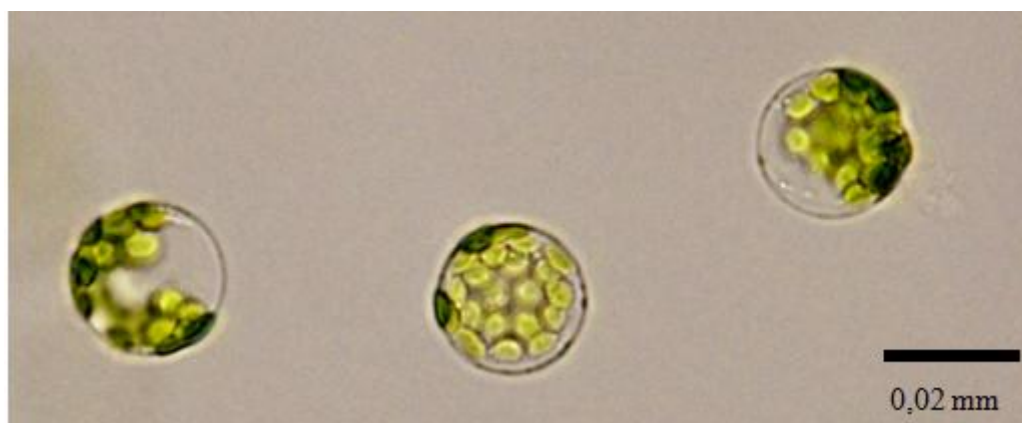
Tato práce se zabývá donorovým materiálem protoplastů a faktory ovlivňujícími izolaci a kultivaci protoplastů rodu *Brassica*. Popisuje také využití protoplastových kultur v biotechnologiích a molekulárních disciplínách. Praktická část se zaměřuje na využití markerů, které napoví více o budoucím vývoji buněčné kultury, zda se budou buňky diferencovat a regenerovat v rostlinu či nikoliv.

3 Současný stav řešené problematiky

3.1 Protoplasty

Buňky primárních rostlinných tkání mají celulózové stěny s bohatou pektinovou výplní a střední lamelou spojující sousední buňky. Živá cytoplazma každé buňky ohraničená pouze plazmatickou membránou tvoří protoplast (Obr. 1). Jelikož se plazmatická membrána podílí na syntéze buněčné stěny, existuje za normálních podmínek mezi buněčnou stěnou a plazmatickou membránou vzájemný kontakt. Nicméně v hypertonickém roztoku se plazmatická membrána buňky stahuje od stěny a následné odstranění stěny umožňuje získat velké populace kulovitých, osmoticky křehkých protoplastů, u kterých je plazmatická membrána jedinou překážkou mezi cytoplazmou a vnějším prostředím (Davey *et al.*, 2005a).

Izolace protoplastů je dnes běžná u celé řady druhů rostlin. Životoschopné protoplasty jsou potenciálně totipotentní. Proto s ohledem na správné chemické a fyzikální podněty je každý protoplast teoreticky schopen regenerace nové stěny a podstupuje opakované mitotické dělení, aby produkoval dceřiné buňky, ze kterých mohou být regenerovány celé rostliny prostřednictvím metod tkáňové kultury (Davey *et al.*, 2005a). Izolované protoplasty jsou unikátním systémem pro studium struktury a funkce buněčných organel, transportu přes cytoplazmatickou membránu u rostlin a tvorby buněčné stěny (Navrátilová, 2004).



Obr. 1: Protoplasty čerstvě izolované z mezofylu *Brassica oleracea* var. *botrytis*

3.2 Historie

Buněčná stěna může být odstraněna mechanickou nebo enzymatickou cestou. Klercker (1892) poprvé mechanicky izoloval protoplasty z tkáně řezanu pilolistého (*Stratiotes aloides*). Avšak kvůli velmi malé hustotě izolovaných protoplastů byl tento způsob izolace považován za nevhodný až do doby chemického štěpení buněčné stěny specifickými enzymy (pektináza, hemicelulóza a celulóza) izolovanými z hub *Trichoderma viride* a *Rhizopus* sp. Cocking (1960) poprvé izoloval vysoký počet protoplastů ze špiček kořene rajčete (*Lycopersicon esculentum*) pomocí aplikace enzymů s celulázovou aktivitou z houby *Myrothecium verrucaria*. Technologie izolace protoplastů byla výrazně podpořena použitím nového média (Murashige *et* Skoog, 1962). MS médium se tak stalo standardem pro experimenty spojené s regenerací rostlin. Stejně tak byla přínosem formulace B5 media (Gamborg *et al.*, 1968).

První rostliny regenerované z protoplastů byly zaznamenány u tabáku (Nagata *et* Takebe, 1971). Dalším pokrokem ve vědě se stal interspecifický hybrid vzniklý fúzí protoplastů *Nicotiana glauca* a *N. langsdorfii* (Carlson *et al.*, 1972). Tento hybrid však mohl být taktéž produkován pohlavním křížením. Objev spočíval v tom, že hybridi byli charakterističtí spontánním vývojem tumorů bez přidavku růstových regulátorů v médiu.

Dalším rozvojem v oblasti technologie fúze protoplastů je zavedení polyethylenglykol (PEG) indukované fúze (Kao *et al.*, 1974). Silný roztok PEG byl přidán k populaci protoplastů. Protoplasty se zdeformovaly, ale zřejmě se neporušily. Poté Kao postupně PEG ředil a protoplasty znovu získaly svůj tvar. Když byl postup opakován se směsí protoplastů z buněčné kultury a z listů bylo jasné, že k fúzi protoplastů došlo. Od té doby se PEG metoda upravila a používá se pro fúzi dokonce také u kvasinek a savčích buněk.

V roce 1978 nastal opravdový zlom v oblasti fúze protoplastů. Melchers *et al.* (1978) vyprodukovali fúzi protoplastů brambory (*Solanum tuberosum*) a rajčete (*S. lycopersium*) hybridní buňky, ze kterých byly regenerovány celé rostliny. V tomto případě nemohly být produktem pohlavního křížení. Byly objeveny dva typy hybridů – první hybrid s chloroplasty z bramboru a druhý s chloroplasty z rajčete. Ty měly stonky podobné bramboru, avšak nekvetly.

V dalších letech se výzkum zabýval například elektrostimulací protoplastů, čímž se zvýšilo mitotické dělení (Zimmermann *et* Scheurich, 1981) či zavedením povrchově aktivních látek a umělých nosičů plynů, které podporují růst protoplastů (Lowe *et al.*, 1998). Od roku 1990 byly technologie protoplastů pro přenos genů zastíněny *Agrobacteriem* a biolistickými metodami přenosu genů. Dnes však je o využití protoplastových kultur v oblasti introgrese genů do zemědělských rostlin opět zvýšený zájem.

3.3 Izolace protoplastů

Protoplasty můžeme izolovat mechanickým narušením nebo enzymatickou degradací buněčné stěny. Enzymatická izolace je používanější, jelikož získáme velké množství protoplastů, které nejsou poničené. Jedná se o aplikaci enzymatických preparátů s celulázovou a pektinázovou aktivitou, které odstraní celulózovou buněčnou stěnu rostlinných buněk. Enzymatickou izolaci tedy můžeme použít u parenchymatických buněk s nelignifikovanou buněčnou stěnou, která je k enzymům rezistentní (Navrátilová, 2004). Tyto hydrolytické enzymy jsou komerčně vyráběné a liší se převážně čistotou. Degradace buněčné stěny kombinací těchto enzymů se obecně používá při pH 5,5 – 5,8 po dobu 3 – 18 hodin (Veilleux *et al.*, 2005). U většiny případů však musí být optimální podmínky a enzymatické zpracování definováno empiricky pro kombinaci genotyp/explantát (Blackhall *et al.*, 1994).

Enzymatická izolace může být provedená jedním krokem nebo může být dvoustupňová. Prvním krokem dvoustupňové izolace je uvolnění jednotlivých buněk pomocí komerčních enzymatických preparátů (macerozym, maceráza). Buňky jsou uvolněny degradací středních lamel a rozkladem tkání jednotlivých buněk. Druhým krokem je rozpuštění buněčné stěny jednotlivých buněk aplikací komerční celulázy (celuláza Onozuka R-10). U jednostupňové izolace jsou mechanicky uvolněné tkáně (např. nakrájením) umístěny do směsi enzymů (pektináza a celuláza). Jednostupňová izolace se používá častěji, přestože jsou buňky vystaveny enzymům po delší dobu než u dvoustupňové izolace (Navrátilová, 2004).

3.3.1 Faktory ovlivňující kultivaci protoplastů

Uvolnění protoplastů ovlivňuje několik faktorů. Mezi nejdůležitější z nich patří zdrojový materiál, rostlinný druh, teplota, doba inkubace enzymu a jeho složení včetně optimálního pH a v neposlední řadě povaha osmotika.

3.3.1.1 Zdrojový materiál protoplastů

Tkáňová fyziologie ovlivňuje uvolnění životaschopných protoplastů vyžadujících přísnou pozornost zdrojového materiálu. Sezónní variace fyzikálních faktorů, které ovlivňují reprodukovatelnost protoplastů izolovaných rostlin pěstovaných ve skleníku, je obecně vyloučena pomocí *in vitro* vypěstovaných výhonků, sazenic a embryogenních suspenzí buněk. Sazenice mají tu výhodu, že protoplasty mohou být izolovány z kořínku (radikula), stonkového podděložního článku (hypokotyl), děložního lístku (kotyledon), kořenů

a kořenových vlásků během několika dní klíčení semen (Davey *et al.*, 2005b). Dále mohou být protoplasty izolovány z listů, embryí, pylových zrn, kalusů a buněčných suspenzí.

Dovzhenko *et al.* (2003) dokázali, že pro modelovou rostlinu *Arabidopsis thaliana* je nejlépe reprodukovatelný a rychlý systém protoplastů izolovaných z kotyledonů. Podobně Sinha *et al.* (2003) zjistili, že protoplasty izolované z děložních lístků bílého vlčího bobu (*Lupinus albus*) měly vyšší výnosy v porovnání s listy, hypokotyly a kořeny. Přestože výnos protoplastů z děloh se zvyšuje s věkem sazenice, životaschopnost klesá. U rodu *Brassica* jsou naopak nejlepší pro izolaci buňky listového mezofylu. Listy jsou dobrým zdrojem protoplastů, umožňují izolaci ve velkém počtu relativně uniformních buněk a je známo, že mladé listy produkují nejvíce životaschopných buněk (Navrátilová, 2004). Embryogenní suspenze buněk se naproti tomu často používají pro izolaci protoplastů obilovin a trav (Blackhall *et al.*, 1994).

3.3.1.2. Enzymy

Hustota a životnost izolovaných protoplastů závisí na koncentraci a kombinaci použitých enzymů, délce jejich působnosti, pH enzymatického roztoku, teplotě a poměru enzymatického roztoku k objemu rostlinné tkáně. Existují dva druhy enzymů, které se při izolaci rostlinných protoplastů převážně používají. Prvním druhem je pektináza, která rozpouští střední lamely a separuje tak jednotlivé buňky. Odlišně působí celulóza a hemicelulóza, které degradují buněčnou stěnu a uvolňují tak protoplasty (Navrátilová, 2004). Kombinace těchto dvou druhů enzymů je velmi důležitá pro zvýšení životnosti protoplastů. Existují však i jiné druhy enzymů, které jsou uvedené v Tabulce 1, včetně jejich komerčních názvů, zdroje původu a dodavatele.

Tab. 1: Komerčně dostupné enzymy pro izolaci protoplastů. Převzato z Bhojwani *et Razdan*, 1996.

Enzym	Zdroj	Dodavatel
Celulázy:		
Onozuka RS	<i>Trichoderma viride</i>	Yakult Honsha, Japan
Celuláza R-10	<i>Trichoderma viride</i>	Yakult Honsha, Japan
Celulyzin	<i>Trichoderma viride</i>	Calbiochem, USA
Driseláza	<i>Irpex lactes</i>	Kyowa Hakko Kogyo, Japan
Meiceláza-P	<i>Trichoderma viride</i>	Meiji Seik Kaisha, Japan
Hemicelulázy:		
Hemiceluláza	<i>Aspergillus niger</i>	Sigma, USA
Rhozym HP-150	<i>Aspergillus niger</i>	Rohm and Hass, USA
Zymolyáza	<i>Arthrobacter luteus</i>	Sigma, USA
Pektinasy:		
Macerozym R-10	<i>Rhizopus</i> sp.	Yakult Honsha, Japan
Maceráza	<i>Rhizopus</i> sp.	Calbiochem, USA
Pectináza (purifikovaná)	<i>Aspergillus niger</i>	Sigma, USA
Pectolyáza Y23	<i>Aspergillus japonicus</i>	Seishin Pharmaceutical, Japan
Pectinol	<i>Aspergillus niger</i>	Rohm and Hass, USA

Liu *et al.* (2006) ve své práci optimalizovali parametry pro izolaci protoplastů z mořské řasy *Chlamydomonas*. Pro své experimenty použili komerční enzymy Celuláza R-10, Macerozym R-10, Abalone Acetone Powder, Hemiceluláza a enzym izolovaný z mořského plže *Lunella coronata*. Zjistili, že nejvíce životaschopných protoplastů získali použitím 3% Celuláza R-10 a 2% Macerozym R-10, a to v poměru 2,4 : 1,6. Fakt, že nejvyšší životnost protoplastů zajišťuje kombinace celulázy a macerozymu, potvrzuje i práce Raikar *et al.* (2008), kteří taktéž hledali nejlepší poměr enzymů pro izolaci protoplastů, tentokrát však u štírovníku růžkatého. Nejlepší kombinace enzymů byla 2% celuláza, 1% macerozym, 0,5% driseláza a 0,2% pectolyáza.

Aktivita enzymů je závislá na hodnotě pH. Optimální hladina pH se pohybuje v rozmezí od pěti do šesti. Optimální teplota pro tyto enzymy je 40 až 50 °C, což je pro buňky příliš vysoká hodnota. Obecně však pro izolaci protoplastů stačí pokojová teplota (Bhojwani *et Razdan*, 1996). Pohyb a slabé třepání směsi během enzymatického působení zvyšuje

množství izolovaných protoplastů. Doba působení enzymů je různá, může být krátkodobá (2 až 6 hodin) nebo delší (16 až 24 hodin) ve tmě. Purifikace protoplastů a perfektní odstranění zbytků buněčné stěny, zničených protoplastů a izolačních enzymů za pomoci centrifugace jsou podmínkou další kultivace protoplastů (Navrátilová, 2004).

3.3.1.3 Osmotické podmínky

V izolovaných protoplastech je tlak chybějící buněčné stěny nahrazen určitými osmotickými hladinami použitého roztoku a média. Osmotický potenciál je upraven manitolem, sorbitolem, glukózou nebo sacharózou v enzymatickém roztoku, promývacím roztoku a kultivačním médiu. Stabilita, životnost a další růst jsou spojeny s dobrými osmotickými podmínkami izolace a kultivace. Optimální osmotický potenciál se pohybuje od 470 do 700 mOsm. Z kvantitativního hlediska jsou protoplasty stabilnější ve slabě hypotonickém prostředí než v izotonickém. Vyšší osmotický potenciál předchází praskání protoplastů, ale může vést k inhibici jejich dělení (Bhojwani *et* Razdan, 1996).

3.3.1.3 Oxidativní stres

Izolace protoplastů sama o sobě je velice stresující procedura doprovázená zvýšenou syntézou etylenu, produkcí polyfenolů, fytoalexinů a superoxidových radikálů. Tyto látky rostliny normálně produkují jako obranu proti vnějšímu poškození nebo proti napadení patogenem. Všechny tyto faktory však mohou způsobit nižší výtěžek izolovaných živých protoplastů. V průběhu let se tedy vědci zaměřili na snížení těchto stresů, např. vystavením donorových rostlin kratším fotoperiodám a purifikací komerčních enzymatických roztoků.

Papadakis *et* Roubelakis-Angelakis (2002) poukázali na to, že by oxidativní stres mohl být zodpovědný za rekalcitranci rostlinných protoplastů v oblasti regenerace rostlin. Aktivní kyslíkové radikály vzniklé během izolace protoplastů se totiž objevují v síti buněčné stěny a hydroxylové radikály mají na svědomí její oslabování. Akumulací kyslíkových radikálů vzniká oxidativní stres a fytotoxicita, která způsobuje peroxidaci membránových lipidů. Radikály taktéž poškozují nukleové kyseliny a proteiny a způsobují buněčnou dysfunkci až smrt. Rostliny se proti oxidativnímu stresu brání pomocí antioxidantních enzymů – superoxid dismutázy, které z radikálů vyprodukují peroxid vodíku, který je dále eliminován peroxidázami, katalázami a enzymy tzv. Halliwell-Asada cyklu (askorbát peroxidáza, glutation reduktáza, monodehydroaskorbát reduktáza a dehydroaskorbát reduktáza). Oxidativní stres tedy vzniká dysbalancí mezi kyslíkovými radikály a antioxidantní kapacitou

buňky. Akumulací radikálů dochází k rekonstituci buněčné stěny a k jejímu ochabování a slouží jako signál pro aktivaci antioxidantní obrany, což způsobuje potlačení totipotence, zastavení buněčného cyklu a smrt buňky.

3.4 Purifikace protoplastů

Podmínkou úspěšné kultivace protoplastů je odstranění izolačních enzymů, nestrávených fragmentů tkáně a zničených protoplastů. Protoplasty bývají obvykle purifikovány kombinací filtrace, centrifugace a promývání. Enzymatický roztok obsahující protoplasty je filtrován přes nylonové sítko (50 až 100 μm) k odstranění větších částí nestrávené tkáně a shluků buněk. K dalšímu odstranění poškozených buněk a izolačních enzymů dochází pomocí opakované centrifugace (3 až 10 minut, 75krát až 100krát g) a resuspenze v promývacím roztoku. V případě protoplastové suspenze obsahující hodně reziduí se provádí flotace protoplastů v gradientu. V takovém případě jsou protoplasty smíchány s 20% sacharózou, směs se převrství promývacím roztokem a po centrifugaci se odsaje prstýnek protoplastů flotující mezi sacharózou a promývacím roztokem. Rezidua tedy zůstanou v peletu. Promytí je opakováno 2krát až 3krát. Vápenaté ionty v promývacím roztoku stabilizují protoplastovou membránu. Gradient separuje protoplasty získané z různých tkání a listů stejného stáří a umožňuje získat homogenní materiál (Bhojwani *et* Razdan, 1996).

3.5 Životnost a hustota protoplastů

Životnost protoplastů po izolaci lze určit několika metodami. Nejpoužívanější metodou je barvení fluorescein diacetátem (FDA), který barví živé protoplasty a světélkuje pod fluorescenčním mikroskopem. FDA samotný je nefluoreskující, nepolární a volně proniká přes membránu. Uvnitř živé buňky je rozštěpen esterázou za vzniku fluoreskujícího polárního fluoresceinu. Fluorescein již nemůže volně pronikat přes membránu a kumuluje se tedy v nepoškozených buňkách. Z mrtvých nebo poškozených buněk se však uvolňuje (Bhojwani *et* Razdan, 1996).

Další metodou je použití barvy Evansovy modře (živé protoplasty nepropustí pigment přes membránu) a neutrálního červeného pigmentu (koncentrován pouze v metabolicky aktivních buňkách). Pozorování cytoplazmatického toku nám také umožní detekci aktivního metabolismu. V neposlední řadě můžeme použít i Calcofluor MR2 nebo Calcofluor white, kdy je obnova buněčné stěny detekována pomocí fluorescenčního mikroskopu (Navrátilová, 2004).

Hustota protoplastů ovlivňuje jejich dělení a formaci mikrokalusu. Měla by se pohybovat mezi 1×10^4 až 1×10^6 protoplastů v 1 ml média. Pokud je hustota velká, protoplasty se spojují v kolonie. Přibližný počet protoplastů v 1 ml média můžeme spočítat pomocí Bürkerovy komůrky, přesnější měření je však zajištěno hemocytometrem (Navrátilová, 2004).

3.6 Kultivace protoplastů

Izolované protoplasty zahajují regeneraci buněčné stěny během krátké doby (často minut) po zavedení do kultury. Nicméně vyžadují osmotickou ochranu až do doby, kdy jejich nové primární stěny mohou působit proti turgorovému tlaku vyvíjenému cytoplazmou. V některých případech je pro udržení mitotického dělení zásadní postupné snižování osmotického tlaku zředěním kultivačního média roztokem podobného složení avšak s redukováným osmotickým tlakem (Davey *et al.*, 2005a).

Protoplasty z různých druhů nebo i z různých tkání stejného druhu se mohou lišit v nutričních požadavcích. V důsledku toho musí být stanoveno optimální médium pro dlouhodobou kulturu empiricky. Mnoho médií bylo založeno na MS (Murashige *et* Skoog, 1962) a B5 (Gamborg *et al.*, 1968) vzorcích s přidavkem osmotika (obvykle manitol nebo poněkud více rozpustný sorbitol). Samozřejmě je někdy potřebné změnit mikroelementy a organické složky původních médií (Blackhall *et al.*, 1994).

3.6.1 Typy kultivačních médií

Izolované protoplasty jsou obvykle kultivovány na Petriho miskách v kapalných, polopevných či pevných médiích. Kapalné médium však bývá mnohdy upřednostňováno, jelikož se snadněji vyměňuje a můžeme lépe kontrolovat osmotický tlak a hustotu protoplastů. Někdy je nejlepší izolované protoplasty kultivovat nejdříve v tekutých médiích, než zregenerují svou buněčnou stěnu, a poté je přemístit na agarové (pevné) médium. U tekutých médií byly vyvinuty určité modifikace (Chawla, 2002):

Liquid droplet method: Do Petriho misky se napipetují 100 až 200 μ l kapky protoplastové suspenze (na jednu Petriho misku asi sedm kapek), misky se uzavrou a kultivují. Tato metoda je užitečná zejména pro mikroskopické zkoumání protoplastů. Nevýhodou je možnost slítí kapek dohromady.

Hanging droplet method: Malé kapky (40 až 100 μ l) protoplastové suspenze jsou umístěny na spodní stranu víčka misky. Když se miska víčkem přiklopí, kapky visí dolů.

Tato metoda umožňuje kultivaci méně protoplastů vztahujících se na jednu kapku než metoda předcházející.

Feeder layer: V některých případech potřebujeme snížit hustotu protoplastů na minimum. Vrstva obsahující ozářené, nedělící se, avšak živé protoplasty je zavedena na agarové médium v misce. Protoplasty jsou nanášeny na tuto vrstvu v minimální hustotě v tenké vrstvě. Tato metoda je zvláště důležitá pro selekci určitého mutanta či hybridních buněk na agaru.

Ko-kultivace (Co-culturing): Jedná se o kultivaci dvou druhů protoplastů. První druh je rychle rostoucí, druhý pochází z rekalcitrantní rostliny. Tyto dva druhy jsou smíchané v určitých poměrech. Rychle rostoucí protoplasty poskytují pomalému druhu rostoucí faktory a další látky, které jim pomáhají urychlit regeneraci buněčné stěny a buněčné dělení.

3.6.2 Nutriční požadavky protoplastů

Nejlepší kultivační médium pro protoplasty je většinou podobné médiu používanému pro regeneraci orgánů z jiných explantátů. Pro stimulaci buněčného dělení je většinou vyžadována úprava obsahu vápníku a nitrátu amonného. Nitrát amonný je důležitý pro stimulaci buněčného dělení, avšak při koncentraci 20 mmol/l (koncentrace použita ve většině tkáňových kultivačních médií) je již pro protoplasty toxický. Proto se tato koncentrace snižuje na polovinu až čtvrtinu. Naopak koncentrace vápníku bývá zvyšována. U většiny kultivačních médií se koncentrace vápníku pohybuje od 0,5 do 3 mmol/l. Při této koncentraci se však protoplasty shlukují a hnědnou. Zvýšení koncentrace vápníku (14 až 40 mmol/l) podporuje buněčné dělení a buněčnou synchronizaci, snižuje se shlukování a hnědnutí protoplastů. Normální hodnoty nitrátu amonného a vápníku jsou obnoveny poté, co protoplasty zregenerují buněčné stěny a rozdělí se (Veilleux *et al.*, 2005).

Cukry jsou dalšími důležitými komponentami kultivačního média. Manitol, sorbitol a glukóza jsou nejčastějšími osmotickými stabilizátory. Používají se v koncentracích od 0,3 do 0,7 mol/l. Sacharóza a glukóza se používají jako zdroje uhlíku při koncentracích od 0,2 do 0,6 mol/l. Protoplasty rostou stejně dobře při kombinaci sacharózy a glukózy, avšak sacharóza samotná nemusí být pro protoplasty dostačující. Koncentrace cukrů se postupně snižuje poté, co protoplasty nasyntetizují nové buněčné stěny a rozdělí se. Osmotické stabilizátory se většinou eliminují v době, kdy jsou viditelné makroskopické kolonie (Chawla, 2002; Veilleux *et al.*, 2005).

Hlavní regulátory růstu (auxiny a cytokininy) jsou obvykle nezbytné pro trvalý růst protoplastů. Jejich typ a koncentrace se liší v rámci jednotlivých druhů a typu regenerace. Mezi typické auxiny patří kyselina naftyloctová (NAA) a 2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina (2,4-D) o koncentracích od 0,45 do 10,7 $\mu\text{mol/l}$. Běžnými cytokininy kultivačních médií jsou benzyladenin (BA) a zeatin o koncentraci 2 až 5 $\mu\text{mol/l}$. V některých případech se místo těchto cytokininů používá kinetin nebo zeatin ribosid nebo se používají v jejich kombinaci (Veilleux *et al.*, 2005). Ne vždy však musí médium obsahovat jak auxiny, tak i cytokininy. Výjimkou jsou například protoplasty *Arabidopsis thaliana*, které rostou rychleji v přítomnosti auxinů bez cytokininů (Dovzhenko *et al.*, 2003).

V mnoha kultivačních médiích můžeme také nalézt organické složky jako je inositol, kyselina nikotinová, pyridoxin, thiamin, glycin, kyselina listová a biotin. Dále se do médií přidávají v malých množstvích (0,01 až 10 mg/l) látky: kasein hydrolyzát, cholin chlorid, cystein, kyselina malonová, kyselina askorbová, adenin sulfát, riboflavin a glutamin, které urychlují syntézu buněčné stěny a podporují buněčné dělení (Veilleux *et al.*, 2005).

3.6.3 Vnější faktory kultivace

Obecně vysoká intenzita světla inhibuje růst protoplastů, pokud je světlo přítomné hned od začátku kultivace. Proto je lepší první dny protoplasty kultivovat ve tmě a později je přenést na světlo o intenzitě 32 - 36 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$. Výjimku tvoří luštěniny, které potřebují světlo pro iniciaci dělení protoplastů. Protoplastové kultury jsou většinou kultivovány při teplotě 20 až 28 °C (Chawla, 2002).

3.7 Regenerace rostlin z protoplastových kultur

Regenerací se nemyslí pouze syntéza nové buněčné stěny ale také regenerace celé rostliny. Prvním viditelným signálem je seřazení většiny organel kolem jádra a tvorba nové buněčné stěny, která se začíná syntetizovat ihned po izolaci. Během prvního až druhého dne kultivace ztrácí protoplasty svůj sférický tvar, což indikuje, že buněčná stěna byla obnovena. Protoplasty, které nejsou schopny regenerovat svou stěnu, nejsou schopny normální mitózy. Schopnost dělení se pohybuje mezi 0 až 80 %. Buňky, které pokračují v dělení, vytváří viditelné kolonie po dvou až třech týdnech a po několika dalších týdnech i kalusy (Navrátilová, 2004). Proces regenerace rostlin z protoplastů byl rozlišen (Nagata *et Takebe*, 1971) do tří stádií, které jsou definovány složením kultivačního média s různým obsahem růstových regulátorů a osmotikem:

Iniciační stádium - médium vhodné pro tvorbu nové buněčné stěny a iniciaci prvního buněčného dělení, tvorbu viditelných kolonií a mikrokalusů. Médium obsahuje osmotikum, růstové regulátory, cukry, soli a vitamíny.

Diferenciační stádium - indukuje tvorbu stonků na kalusech. Médium obsahuje malé množství auxinů a vysoké množství cytokininů.

Kořenové stádium - indukuje tvorbu kořenů na výhoncích separovaných kalusů. Médium obvykle neobsahuje růstové regulátory.

3.8 Somatická variabilita

Protoplasty jsou během izolace, kultivace a následné regenerace pod neustálým stresem. Díky tomu dochází k reorganizaci chromatinu a změnám sekvence DNA. Dále může dojít k začlenění transpozónů a retrotranspozónů do oblastí kódujících proteiny, což způsobuje různé mutace (Grafí, 2009). Mohou se objevit i přestavby chromozómů a zlomy v dvoušroubovici DNA, které mají za následek různé aberace, jako jsou inverze, delece, inserce a translokace (Lebel *et al.*, 1993). Všechny tyto změny u rostlin pěstovaných *in vitro* mohou pozměnit jejich genom a odlišit tak jednu od druhé. Tento fenomén nazýváme somatická variabilita.

3.9 Využití protoplastových kultur

Protoplastizace bývá počátečním krokem mnohých technik genetických manipulací rostlin (somatická hybridizace, transformace). Jejich dalším uplatněním je také studium struktury a funkce buněčných organel, transportu přes cytoplazmatickou membránu a tvorby buněčné stěny.

3.9.1 Studium syntézy buněčné stěny

Během buněčného růstu jsou buňky obklopeny jen primárními stěnami, které jsou zejména tvořeny polysacharidy a proteiny. Nicméně tyto buňky syntetizují sekundární stěnu, když se růst zastaví. Kompozice buněčné stěny se liší závisle na rostlinném druhu, typu tkáně, typu buňky, regionu okolo stěny a vývojovému stádiu buňky.

Nejdříve protoplasty sloužily k pozorování a studiu složení buněčné stěny. Burgess *et Fleming* (1974) pozorovali pod elektronovým mikroskopem regeneraci buněčné stěny u protoplastů izolovaných z mezofylu tabáku. Buněčnou stěnu barvili pomocí těžkých kovů

a při pozorování poukázali na to, že buněčná stěna se skládá ze dvou složek. První složkou je celulóza, která je sestavena z nevětvených vláken, nejdříve orientovaných kolmo k povrchu plazmalemy. Jak pokračuje růst stěny, vlákna se prodlouží a převezmou orientaci rovnoběžně k plazmalemě. Druhá složka stěny je amorfní a hustěji se obarví, jedná se o pektin.

Později již vědci používali protoplasty i k určení genů zodpovědných za syntézu buněčné stěny. Yang *et al.* (2008) analyzovali expresní profil genů podílejících se na regeneraci buněčné stěny u protoplastů bavlníku. Odlišili různá stádia použitím světelného a fluorescenčního mikroskopu s a bez barvení Calcofluor White, jenž barví přednostně celulózu. Zjistili, že nová buněčná stěna se vytvoří za 48 hodin kultivace, což je doba, kdy protoplasty zapínají mnoho genů nejen pro syntézu buněčné stěny, ale i pro udržení normálního chodu metabolismu a přípravu buňky na následné dělení.

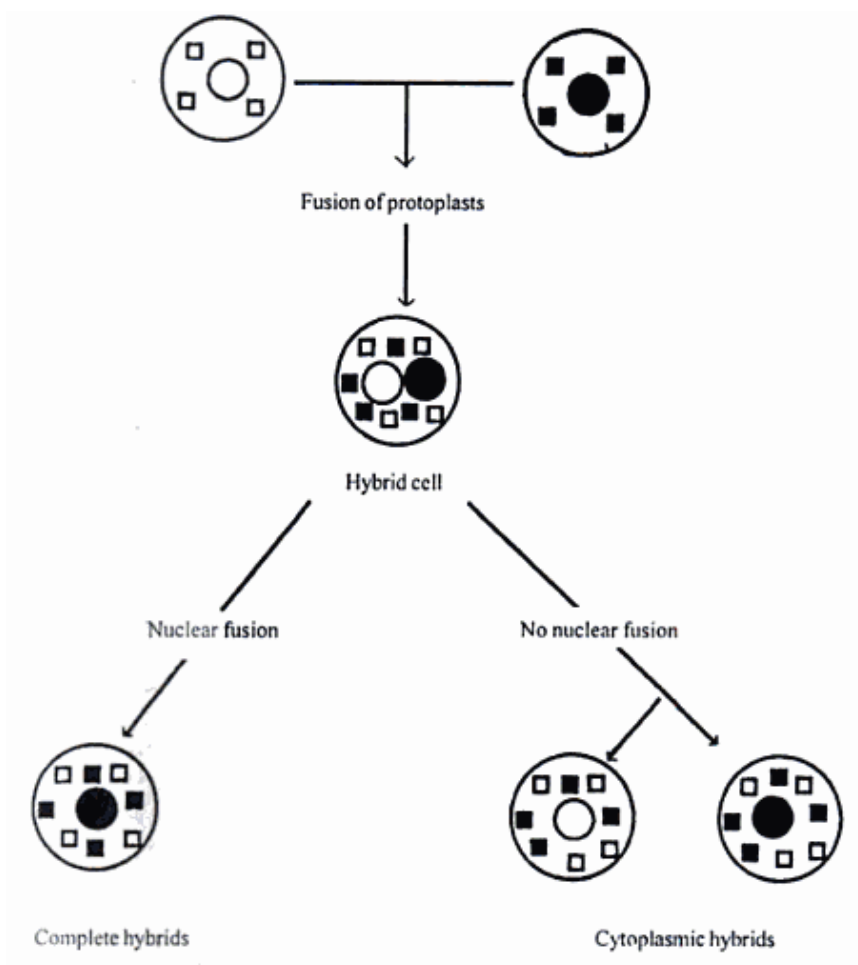
3.9.2 Somatická hybridizace

Pohlavní křížení u blízce příbuzných druhů bylo používáno ke šlechtění rostlin již spoustu let. Bohužel je však limitováno sexuálními bariérami, které mohou být překlenuty právě somatickou hybridizací. Během fúze somatických buněk dochází ke splynutí jádra a cytoplazmy obou rodičů. Můžeme tedy získat životaschopné hybridy, kteří by klasickou cestou nevznikli. Jsme tedy schopni šlechtit rostliny tak, že do jejich genomu začleníme geny rezistence k různým virům, houbám, škůdcům či ke stresu, což umožní zvýšit výtěžek ekonomicky důležitých plodin. Ren *et al.* (2000) vyprodukovali fúzí protoplastů rostlin *Brassica rapa* a *B. oleracea* somatické hybridy rezistentní na hnilobu způsobenou bakterií *Erwinia carotovora*. Také můžeme do genetické výbavy rostlin přidat geny pro syntézu rezervních proteinů, vitamínů a sekundárních metabolitů, čehož můžeme využít i k biosyntéze léčiv (Chawla, 2002; Navrátilová, 2004).

Existují dva typy somatické hybridizace – symetrická a asymetrická. Schéma procesu obou těchto typů můžeme vidět na Obrázku 2. Při symetrické somatické hybridizaci dochází ke splynutí cytoplazmy i jader obou protoplastů. Tato metoda je využívána ke změně ploidie rostlin, protože se po splynutí jader sčítá. Asymetrická somatická hybridizace produkuje tzv. cybridy. Jedná se o fúzi normálního protoplastu s protoplastem bez jádra. Takového protoplastu můžeme dosáhnout ionizovaným ozářením. Vzniklý cybrid tedy obsahuje směs obou cytoplazem a jádro z neozářeného protoplastu. Asymetrická somatická hybridizace se využívá zejména pro vytvoření rostlin, které budou rezistentní na určitý herbicid. Přenos mitochondriálního genomu může také způsobit cytoplazmatickou pylovou sterilitu

– CMS (Sathyanarayana *et Varhese*, 2007). Pro studium genů zodpovědných za CMS jsou výbornými kandidáty cybridi, kteří vznikly fúzí protoplastů *Arabidopsis thaliana* a *Brassica napus* (Yamagishi *et al.*, 2002).

Somatická hybridizace rostlin zahrnuje čtyři stádia: izolace protoplastů, fúze protoplastů, selekce a regenerace rostliny a analýza regenerované rostliny. Fúze protoplastů musí být zahájena ihned po jejich izolaci, než dojde k resyntéze buněčné stěny. Fúze může být spontánní (fertilizace vajíčka) nebo indukovaná (Navrátilová, 2004).



Obr. 2: Schéma somatické hybridizace symetrické (vlevo) a asymetrické (vpravo). Převzato z Chawla, 2002.

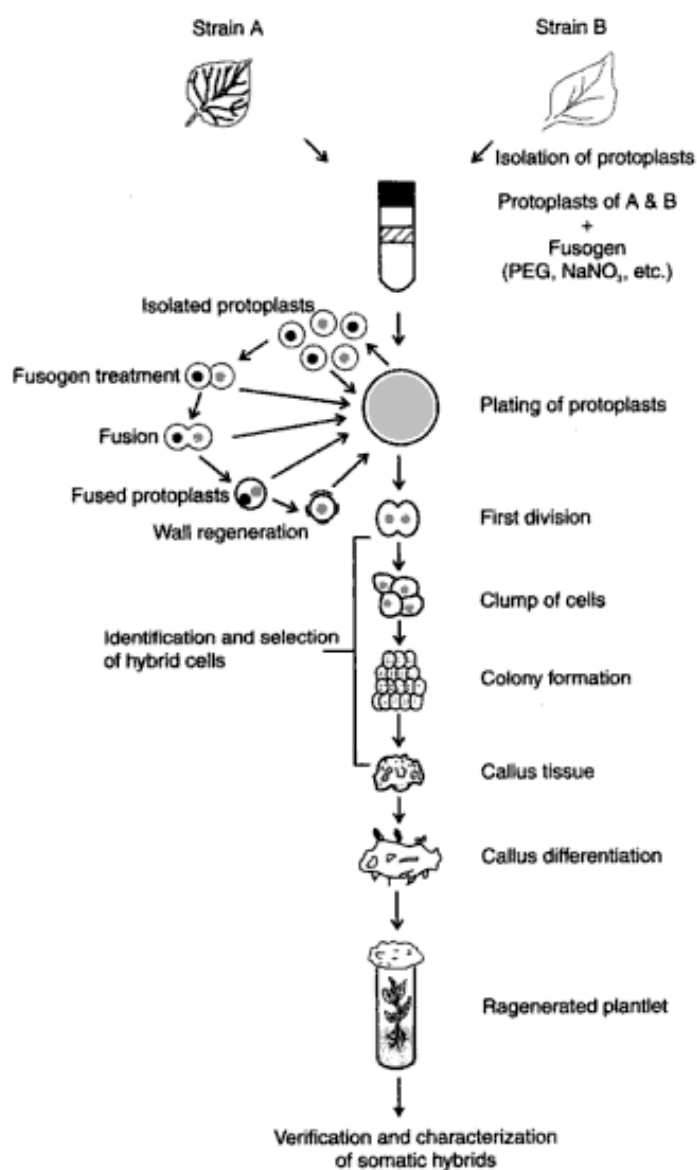
3.9.2.1 Indukovaná fúze protoplastů

Fúze protoplastů může být zprostředkována chemickou látkou či elektrickým polem (elektrofúze). V obou případech je cytoplazmatická membrána dočasně destabilizovaná a vytváří tak póry a cytoplazmatická spojení s ostatními protoplasty. Tato spojení zabraňují

uzavření pórů a umožňují lipidovým molekulám se v pórech seřadit a vytvořit membránové mosty mezi okolními protoplasty (Blackhall *et al.*, 1994).

3.9.2.1.1 Chemicky indukovaná fúze protoplastů

V případě chemické fúze protoplastů se používají chemické látky, známé pod názvem fúzogeny. Jedná se zejména o polyetylglykol (PEG), dextran, polyvinyl alkohol, NaNO_3 a CaNO_3 , které indukují tvorbu pórů. Efekt fúzogenů se může zvýšit přidáním vápenatých iontů a zvýšením pH až na hodnotu mezi 9 až 10,5 (Blackhall *et al.*, 1994). Průběh chemické fúze protoplastů je shrnut na Obrázku 3.



Obr. 3: Schematická ilustrace chemicky indukované fúze protoplastů a následná regenerace rostlin. Převzato z Chawla, 2002.

3.9.2.1.2 Elektrofúze protoplastů

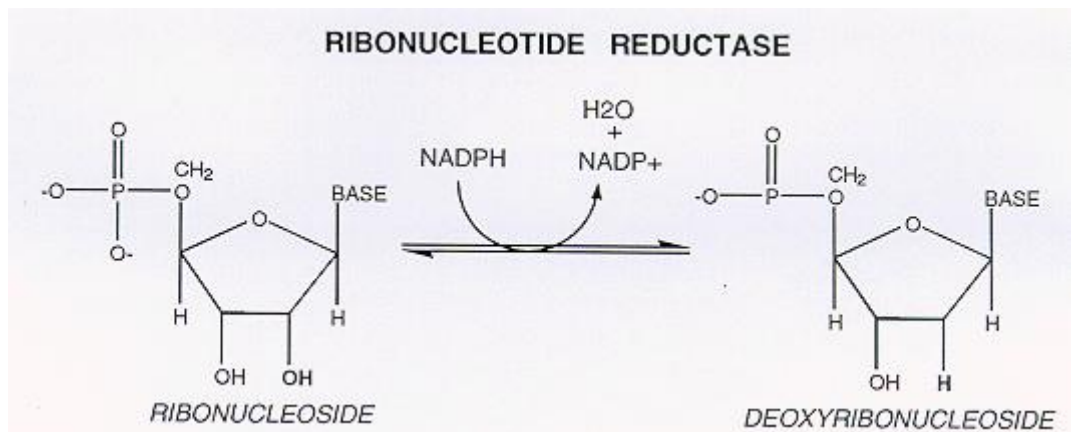
Elektrofúze rostlinných protoplastů se používá častěji než chemicky indukovaná fúze, jelikož se zde nepoužívají látky toxické pro buňky. Obecně můžeme říct, že výtěžek produktů fúze elektrofúzí se pohybuje okolo 20 %, kdežto u fúze zprostředkované pomocí PEG jen 1 %. Podmínky elektrofúze musí být optimalizovány pro každý typ buněk zvlášť. Pro efektivní elektrofúzi musí být protoplasty blízko u sebe (aglutinovány). Po elektrickém šoku se naruší cytoplazmatická membrána protoplastů a může dojít k jejich fúzi (Veilleux *et al.*, 2005).

3.9.3 Genetická transformace protoplastů

V současné době existuje mnoho metod transformace jednotlivých buněk. Lze je rozdělit do dvou hlavních skupin – přímé a nepřímé. Nepřímé metody jsou založeny na vnesení plazmidu nesoucího určitý gen do cílové buňky prostřednictvím bakterií *Agrobacterium tumefaciens* nebo *A. rhizogenes*. Tato metoda se využívá v biotechnologiích nejčastěji, avšak nenese uspokojivé výsledky u jednoděložných rostlin. Mezi přímé metody přenosu DNA do buněk patří polykationové chemikálie, elektroporace, mikroinjekce nebo mikroprojektilové bombardování. Obecnými nevýhodami přímé transformace protoplastů jsou však problémy s regenerací rostlin (zejména u jednoděložných rostlin) a nižší exprese transgenů ve srovnání s organizovanou tkání (Davey *et al.*, 2005a, Rao *et al.*, 2009).

3.10 Ribonukleotid reduktáza

Ribonukleotid reduktáza (RNR) je obecně enzym zodpovědný za přeměnu ribonukleotidů na deoxyribonukleotidy. Předpokladem pro syntézu DNA a její opravu je zásoba čtyř deoxyribonukleotidů. Tyto molekuly vznikají enzymaticky indukovanou radikálovou redukcí ribonukleotidů, což je vícestupňový chemický proces katalyzovaný RNR (Obr. 4). Jelikož všechny buněčné formy života ukládají svoji genetickou informaci jako DNA, RNR je rovněž přítomná ve všech organizmech. Dokonce i některé druhy virů a bakteriofágů se vyvinuly natolik, že nesou svou vlastní kopii RNR proteinů pravděpodobně proto, aby si zajistily rychlejší proliferaci v infikované hostitelské buňce (Andersson, 2008).



Obr. 4: Redukce ribonukleotidů pomocí ribonukleotid reduktázy. Převzato

z <http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc461/Biochem499/hillarysaxon/malaria3h.htm>

3.10.1 Rozdělení RNR

Během evoluce vznikly tři třídy RNR (Tab. 2) závisící na životních podmínkách buněk. Třída I obsahuje buď centrum složené ze dvou atomů železa, které přes oxidaci zprostředkovanou kyslíkem vytváří na proteinu založený tyrosylový radikál jako předpoklad pro katalýzu, nebo manganičito-železitě centrum, které nahrazuje tyrosylový radikál. Třída I tedy pro svou činnost potřebuje molekulární kyslík. Enzymy třídy II vytvářejí radikál díky rozštěpení koenzymu vitamínu B₁₂ (5'-deoxyadenosylkobalamin) a fungují i bez přístupu kyslíku. Enzymy třídy III také získávají radikál díky rozštěpení kofaktoru (S-adenosylmethionin). Vzhledem k tomu, že enzymy třídy II musí s každou katalýzou rozštěpit a regenerovat adenosylkobalamin, ve třídě III radikál generovaný štěpením kofaktoru (působením aktivačního proteinu) je udržován jako radikál stabilní glycyl. Glycylový radikál třídy III je citlivý na kyslík, při přítomnosti kyslíku dojde k destrukci enzymu. V důsledku toho jsou enzymy třídy III inaktivovány i za mikroaerobních podmínek (Lundin *et al.*, 2009).

Tab. 2: Třídy ribonukleotid reduktázy. Převzato z Andersson, 2008.

	Třída Ia	Třída Ib	Třída Ic	Třída II	Třída III
kov/kofaktor	Fe-O-Fe	Fe-O-Fe	Fe-O-Fe / Mn-Fe	deoxyadenosyl-kobalamin (B ₁₂)	4Fe-4S SAM/AdoMet
struktura podjednotek	$\alpha_2\beta_2$	$\alpha_2\beta_2$	$\alpha_2\beta_2$	α nebo α_2	$\alpha_2\beta_2$
radikály zapojené do přeměny	tyrosyl, cysteinyl	tyrosyl, cysteinyl	Fe(IV)Fe(III), cysteinyl	deoxyadenosyl, cysteinyl	deoxyadenosyl, glycyl, cysteinyl
závislost na kyslíku	aerobní	aerobní	aerobní	žádná závislost	anaerobní
substrát	NDP	NDP	NDP	NDP/NTP	NTP
reduktant	thioredoxin, glutaredoxin	NrdH-redoxin, glutaredoxin	NrdH-redoxin, glutaredoxin	thioredoxin	formiát
alosterická místa	2	1	1	1	2
výskyt	eukaryota, eubakterie (<i>E.coli</i>), bakteriofágy, virusy	eubakterie	eubakterie	archea, eubakterie (<i>Lactobacillus leichmannii</i>)	archea, eubakterie (<i>E.coli</i>), bakteriofágové

3.10.3 Struktura RNR

RNR třídy I se skládají ze dvou velkých podjednotek R1 a dvou malých podjednotek R2 a vytváří tak heterodimerický tetramer. RNR vykazuje více komplexní strukturu a vlastnosti u vyšších organismů jako například u savčích buněk, kde jsou známy nejméně dvě izoformy menší podjednotky R2, které mají různou funkci. První forma R2 podjednotky je aktivní během buněčného dělení (zejména v S-fázi), kde katalyzuje syntézu deoxyribonukleotidů *de novo* pro syntézu DNA. Druhá forma se značí p53R2 a je velmi důležitá pro syntézu mitochondriální DNA. Rovněž je to cílový gen pro protein p53, který zabraňuje vzniku nádorů (Andersson, 2008).

3.10.4 Inhibice RNR

RNR je rozhodující enzym pro syntézu deoxyribonukleotidů a DNA. Redukce ribonukleotidů je limitující krok v celém procesu S-fáze buněčného cyklu a jeho komplexní alosterická regulace poskytuje jeden z důležitých mechanismů kontroly relativní intracelulární

koncentrace čtyř deoxyribonukleotidů. Porucha normální bilance je mutagenní a může vést k dalším genetickým abnormalitám. Byl pozorován vztah mezi činností RNR a rychlostí proliferace dané tkáně. Vysoká aktivita je přítomna v regenerujících játrech, embryonálních tkáních, brzlíku, atd. Nádorové buňky nebo virem nakažené buňky mají také mnohem vyšší aktivitu RNR než odpovídající zdravé buněčné linie (Fontecave, 1998).

Inhibice RNR obvykle vede k inhibici syntézy DNA a buněčné proliferace. Inhibitory RNR jsou např. hydroxymočovina, resveratrol nebo analogy nukleosidů. Některé inhibitory se používají i jako léky. Další se používají v kombinaci s jinými léky při chemoterapeutické léčbě rakoviny a některé by mohly být dokonce použity pro léčbu široké škály infekcí jako např. tuberkulóza, AIDS, spavá nemoc a malárie (Andersson, 2008; Fontecave, 1998).

3.11 Proliferační antigen buněčného jádra

Proliferační antigen buněčného jádra (Proliferating Cell Nuclear Antigen = PCNA) poprvé objevili Miyaschi *et al.* (1978), kteří v séru svých pacientů s autoimunitním onemocněním systémový lupus erythematosus (SLE) našli autoprotilátky, které reagovaly s jaderným antigenem proliferujících buněk. Mathews *et al.* (1984) pomocí imunoprecipitace s anti-PCNA protilátkami ze SLE séra prokázali, že PCNA je identický s kyselým 36 kDa proteinem (cyklinem), který byl definován 2D gelovou elektroforézou, kterou provedli Bravo *et Macdonald-Bravo* (1987). Od té doby co se termín cyklin stal nejednoznačným, se začal používat termín PCNA.

3.11.1 Funkce PCNA

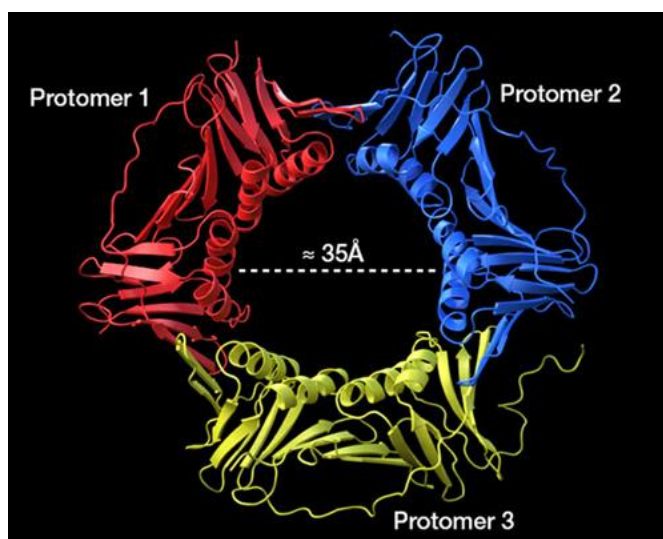
PCNA je fylogeneticky velmi konzervativní molekula. Můžeme najít značnou homologii mezi PCNA savců, kvasinek, rostlin i virů, z čehož vyplývá, že se prvotní gen pro PCNA vyvíjel více než milion let a že hraje důležitou roli v buněčném cyklu a zachování druhů (Larsen *et al.*, 2001).

Bylo zjištěno, že PCNA hraje klíčovou roli v několika biologických procesech, které se objevují různorodě, ale jejich společným rysem je metabolismus DNA. PCNA je nutnou součástí aparátu replikace DNA, kde funguje jako přídavný protein DNA polymerázy δ a ϵ . PCNA je také nutný pro rekombinaci DNA a její opravy. Dále bylo prokázáno, že PCNA interaguje s buněčnými proteiny, které jsou zapojeny do regulace buněčného cyklu a dozoru nad kontrolním bodem (Kelman, 1997).

3.11.2 Struktura PCNA

Struktura PCNA byla během evoluce velmi konzervativní, jeho sekvence aminokyselin u potkanů a lidí se liší pouze o 4 aminokyseliny z 261. PCNA je organizován do toroidní struktury, která je charakteristická a velmi podobná svorkovým proteinům (sliding clamps) potřebným pro upevnění DNA polymerázy k DNA, čímž zvyšuje procesivitu syntézy DNA u bakteriofágů, archeí a eukaryot (Naryzhny, 2008).

Celkovou strukturu PCNA tvoří prsten z trimeru o průměru 35 Å (vnější), 80 Å (vnitřní) a šířce 30 Å (Obr. 5). I když má PCNA celkový náboj negativní, vnitřní povrch je kladně nabitý díky přítomnosti velkého množství lyzinových a argininových zbytků. To naznačuje, že záporně nabitá DNA může projít prstýnkem PCNA bez elektrostatických repulzí (Krishna *et al.*, 1994).



Obr. 5: Struktura PCNA. Převzato z http://www.pdbj.org/eprints/index_en.cgi?PDB%3A1SXJ

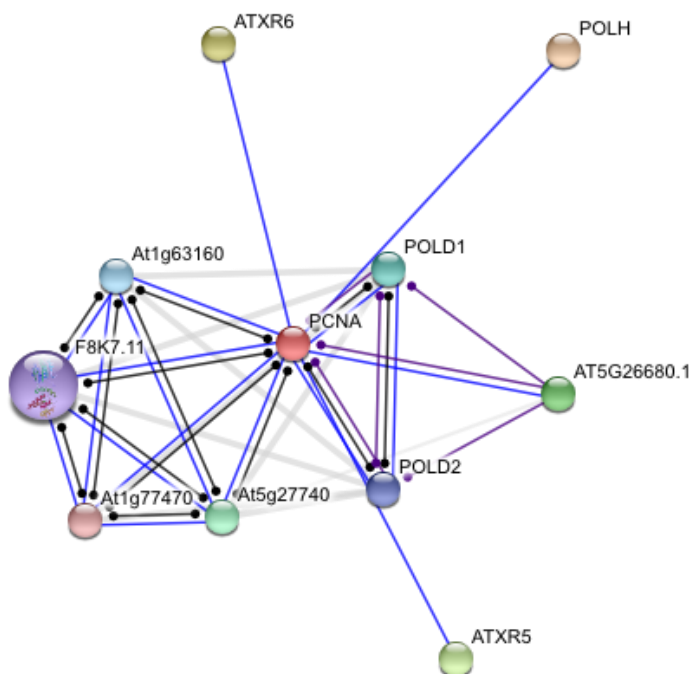
3.11.3 Množství PCNA v buňkách

Nejdříve bylo zjištěno, že PCNA je protein, který se rozdílně exprimuje v průběhu buněčného cyklu a stal se markerem buněčné proliferace (van Diest *et al.*, 1998). Proto se stalo množství PCNA v buňce předmětem zvláštní pozornosti. Přestože může dojít ke zvýšení syntézy PCNA u buněk přecházejících z G_0 do S-fáze, změny v hladině PCNA jsou jen dvakrát až třikrát větší. Jak buňka stárne, hladina PCNA se výrazně nemění, i když se doba zdvojení buňky dramaticky zvyšuje (Tanno *et al.*, 1996). Se zvýšenou hladinou PCNA často koreluje výskyt rakoviny, což napovídá tomu, že množství PCNA může být použito u některých případech jako prognostický marker (Czyzewska *et al.*, 2004). Analýza

buněčných kultur ukázala, že nádorové buňky mají výrazně vyšší množství PCNA než normální buňky a to i v případech, kdy mají stejnou dobu zdvojnásobení (Naryzhny *et Lee*, 2007). Buňky si udržují velkou zásobu volného PCNA během celého buněčného cyklu. Dokonce i v S-fázi je jen malá část PCNA (20 až 30 %) přímo zapojena do replikace DNA. Poločas rozpadu proteinu PCNA je osm hodin a celkový obsah PCNA v buňce se pohybuje mezi 0,06 až 0,08 % všech buněčných proteinů (Naryzhny, 2008).

3.11.4 Interakce proteinového produktu genu PCNA s ostatními proteiny

PCNA tvoří důležitý rozcestník mezi mnohými regulačními cestami souvisejícími s regulací buněčného cyklu a metabolismu DNA (Obr. 6). PCNA tedy interaguje i s několika proteiny zprostředkovávajícími přestavbu chromatinu (Meng *et al.*, 2009). Mezi tyto proteiny patří například *Arabidopsis* trithorax-related protein 5 (ATXR5) a ATXR6, které jsou součástí epigenetické kontroly exprese genů (Raynaud *et al.*, 2006). Jedná se o monomethyltransferázy, které methylojí histony a přetvářejí tak euchromatin v heterochromatin (Meng *et al.*, 2009). Proto je interakce proteinového produktu genu PCNA s ATXR5 a ATXR6 taktéž velmi důležitá pro celkovou přestavbu chromatinu v jádře a následné umlčování určitých genů spojených s dediferenciací buněk.



Obr. 6: Interakce PCNA s ostatními proteiny *Arabidopsis thaliana*. Převzato z http://string-db.org:8080/newstring_userdata/net_image_a_34PcOJcETv3u_dw.png

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Semena *Brassica oleracea* var. *botrytis* (cv. Siria F1, Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha - Ruzyně, Česká republika).

4.2 Seznam použitých roztoků a médií

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

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

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

Enzymatický W5 roztok: 0,5 g celulózy; 0,15 g macerozymu; 50 ml zásobního roztoku W5; pH 5,8; sterilizováno filtrací.

Médium B: 3,164 g Gamborg B5 medium (Duchefa, Nizozemí) – viz. Tab. 3; 20 g glukózy; 70 g manitolu; 1 mg NAA; 1 mg BAP; 0,25 mg 2,4-D; 1 litr destilované vody; pH 5,8; sterilizováno filtrací.

Médium D 3,164 g Gamborg B5 medium (Duchefa, Nizozemí) – viz. Tab. 3; 20 g sacharózy; 1 mg 2,4-D; 30 mg adenin sulfátu; 1 litr destilované vody; pH 5,8; sterilizováno filtrací.

Médium E: 3,164 g Gamborg B5 medium (Duchefa, Nizozemí) – viz. Tab. 3; 2 mg glycinu; 10 g glukózy; 10 g sacharózy; 10 g manitolu; 1 mg NAA; 0,5 mg BAP; 0,5 mg IPA; 0,02 mg GA₃; 1 litr destilované vody; pH 5,9; sterilizováno filtrací.

Médium OK: 4,405 g MS médium (Duchefa, Nizozemí) – viz. Tab. 4; 20 g sacharózy; 20 mg kyseliny askorbové; 0,01 mg IBA; 0,01 mg BAP; 10 g agaru; 1 litr destilované vody; pH 5,8; sterilizováno autoklávováním.

W5: 9 g NaCl; 0,8 g KCl; 27,4 g CaCl₂ · 6 H₂O; 1 g glukózy; 1 litr destilované vody; pH 5,8; sterilizováno filtrací.

Tab. 3: Složení Gamborg B5 média. Převzato z Gamborg *et al.*, 1968.

makroprvky	mg/l	organické přísady	mg/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	134	i-inositol	100
H ₃ BO ₃	3	niacin	1
CaCl ₂ · 2H ₂ O	113,24	pyridoxin · HCl	1
CaCl ₂ · 6 H ₂ O	0,025	thyamin · HCl	10
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,025	sacharóza	20 000
Na ₂ EDTA	37,3		
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,8		
MgSO ₄	122,09		
MnSO ₄ · H ₂ O	10		
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25		
KI	0,75		
KNO ₃	2500		
NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O	150		
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2	pH = 5,8	

Tab. 4: Složení MS média. Převzato z Murashige *et_*Skoog, 1962.

makroprvky	mg/l	organické přísady	mg/l
NH ₄ NO ₃	1650	i-inositol	100
H ₃ BO ₃	6,2	niacin	0,5
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	pyridoxin · HCl	0,5
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025	thyamin · HCl	0,1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	kyselina indol-3-octová	1 - 30
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025	kinetin	0,04 - 10
KH ₂ PO ₄	170	glycin	2000
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,8	edamin S	1000
KNO ₃	1900	sacharóza	20 000
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22,3	agar	10 000
KI	0,83		
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25		
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,6		
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	37,2	pH = 5,8	

Ostatní chemikálie:

2-merkaptoethanol, agaróza, ethanol, ethidium bromid (Serva, Německo), pracovní roztok fluorescein diacetátu (FDA) – 5 mg FDA v 1 ml acetonu, chloroform, izoamylalkohol, izopropanol, loading dye, octan sodný, Savo, standard molekulové váhy 19-1114 bp (Roche, Německo)

Komerční kity:

FastStart PCR Master (Roche, Německo), Spektrum™ Plant Total RNA Isolation Kit (Sigma, USA), RNase – free DNase (Promega, USA), Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Sample Kit (Roche, Německo), LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I (Roche, Německo)

4.3 Vybavení laboratoře

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), Thermo Scientific NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer, 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, uheltonové sítko o průměru 72 µm, parafilm, centrifugační zkumavky, mikrozukavky, PCR mikrozukavky, dávkovací mikropipety, sterilní špičky, ochranné rukavice, kahan, skalpel, pinzeta, podložní a krycí skla.

4.4 Pěstování pokusných rostlin

Vybraná nenarušená semena *Brassica oleracea* var. *botrytis* byla vysterilizována v 36% roztoku Sava po dobu 30 minut a čtyřikrát opláchnutá sterilní destilovanou vodou. Následně byla vysázena do Petriho misek na vlhký filtrační papír. Po pěti dnech ve tmě při teplotě 25 °C byla semena dostatečně naklíčená a byla přesazena na OK médium do plastových boxů. Ty byly umístěny do kultivační místnosti s fotoperiodou 16/8 h den/noc o intenzitě 32 - 36 µmol/m²s a teplotou 22 ± 2 °C.

4.5 Izolace protoplastů

Apikální mladé lístky byly z rostlin odřezány vysterilizovaným skalpelem a přeneseny do Petriho misky. Poté byly nasekány ve 4 ml enzymatického roztoku obsahujícího 1% roztok celulózy Onozuka R-10 (Duchefa) a 0,5% roztok macerozymu R-10 (Duchefa) a takto byly ponechány po dobu 18 hodin v inkubátoru při 25 °C. Tato hrubá protoplastová suspenze byla přefiltrována do víčka Petriho misky přes uhelonové sítko (72 μm) a filtrát byl přenesen Pasteurovou pipetou do centrifugačních zkumavek. Následně byly zkumavky centrifugovány při 70 g (= 700 ot/min) po dobu 5 minut. Supernatant byl odstraněn a sediment resuspendován ve 4 ml 20% sacharózy, převrstven 2 ml W5 tak, aby nedošlo k promíchání obou vrstev a centrifugován při 70 g 10 minut. Flotující protoplasty na rozhraní obou kapalin byly odebrány Pasteurovou pipetou, resuspendovány ve 4 ml W5 a centrifugovány za stejných podmínek po dobu 5 minut. Dále byla spočítána životnost a hustota protoplastů.

4.6 Životnost protoplastů

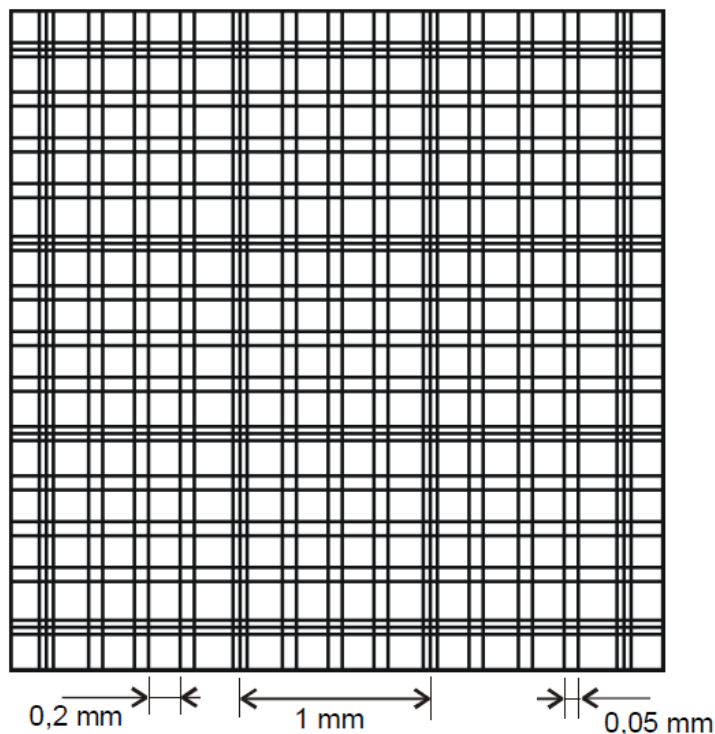
Po izolaci protoplastů byla stanovena jejich životnost pomocí fluorescenčního mikroskopu (Olympus BX 60). 1 ml média B byl smíchán s 10 μl pracovního roztoku FDA. Na podložní sklo byla přenesena kapka protoplastů v médiu B. K protoplastům bylo přidáno 10 μl směsi média B s FDA. Tato směs byla ponechána a dále již nebyla promíchávána. Podložní sklo bylo dáno do fluorescenčního mikroskopu, kde byly pozorovány červené (mrtvé) a zelené (živé) protoplasty.

4.7 Stanovení výtěžku protoplastů

Po izolaci protoplastů byl pomocí Bürkerovy komůrky vypočten výtěžek izolovaných protoplastů. V této komůrce jsou vyryta dvě počítací pole. Každé z nich je rozděleno třemi čarami na devět velkých čtvercových polí, jejichž strana měří 1 mm. Tato pole jsou tvořena středními čtverci o ploše 1/25 mm² a v jejich rozích jsou malé čtverce s plochou 1/400 mm². Přikrytím ploch s mřížkami krycím sklem vzniká prostor na počítání buněk vysoký 0,1 mm (Obr. 7).

Obě počítací pole byla naplněna 1 ml kultivačního média B s resuspendovanými protoplasty. Protoplasty byly vždy počítány v deseti středních čtvercích Bürkerovy komůrky umístěné pod světelný mikroskop (Olympus CK 40). Při počítání protoplastů bylo dodrženo tzv. pravidlo dvou počítacích stran, takže byly počítány všechny protoplasty dotýkající

se zvolených dvou stran i z vnějšku, avšak protoplasty, které se dotýkaly zbylých dvou stran, počítány nebyly. Počet protoplastů v deseti středních čtvercích byl následně sečten a podle vzorce byl stanoven celkový počet protoplastů v 1 ml suspenze.



Obr. 7 : Počítací pole Bürkerovy komůrky. Převzato z <http://che1.lf1.cuni.cz/html/TK.pdf>

4.8 Kultivace protoplastů

Pro kultivaci protoplastů byla použita tekutá média B, D a E a pevné medium OK. Po izolaci byly protoplasty kultivovány v kultivačních nádobách (25 cm²) v médiu B ve tmě v termostatu při teplotě 25 °C po dobu 72 hodin. Poté byly protoplasty přeneseny do kultivační místnosti s fotoperiodou 16/8 h den/noc o intenzitě 32 - 36 μmol/m²s a teplotou 22 ± 2 °C. Po sedmi dnech kultivace v kultivační místnosti bylo médium B odsáto Pasteurovou pipetou a nahrazeno čerstvým médiem B. Po dalších čtrnácti dnech bylo médium B vyměněno za médium D a za dalších čtrnáct dnů bylo vyměněno za médium E. Po dalších třech týdnech kultivace byly viditelné mikrokalusy přeneseny na pevné médium OK.

4.9 Izolace DNA

Ve třecí misce bylo v tekutém dusíku tloučkem rozetřeno 100 mg listu *Brassica oleracea* var. *botrytis*. Třecí miska byla vypláchnuta 1 ml CTAB doplněným 4 μl 2-merkapt ethanolu zahřátým na 65 °C. Výsledná směs byla z třecí misky přenesena do 2ml mikrozskumavky a inkubována jednu hodinu při 65 °C na termobloku.

Po inkubaci bylo ke směsi přidáno 600 µl směsi chloroform : izoamylalkohol (poměr 24 : 1), po promíchání byl roztok ponechán stát, než se kapaliny rozdělily. Poté byl centrifugován 15 minut v chlazené centrifuze při 4 °C a 11 000 otáček/min. Po centrifugaci byl supernatant odebrán do nové mikroskopické kumavky a krok s přidáním směsi chloroformu a izoamylalkoholu byl zopakován včetně centrifugace. Poté bylo k supernatantu přidáno 60 µl 3mol/l octanu sodného a 500 µl izopropanolu. Po jemném promísení byl roztok inkubován při -20 °C.

Po 12ti hodinách byl roztok centrifugován 30 minut v chlazené centrifuze při 4 °C a 11 000 otáček/min. Po centrifugaci byl supernatant slit, ke sraženině DNA bylo přidáno 200 µl 70% ethanolu a roztok byl opět centrifugován 15 minut v chlazené centrifuze při 4 °C a 11 000 otáček/min. Po centrifugaci byl supernatant odstraněn. K DNA bylo přidáno 150 µl sterilní vody a po stanovení koncentrace DNA pomocí Nanodropu byl roztok DNA v mikroskopické kumavce zamražen při -20 °C.

4.10 Izolace RNA

Pomocí Spektrum™ Plant Total RNA Isolation Kitu (Sigma, USA) byla vyizolována RNA z listů, protoplastů (0 h, 48 h a 72 h) a kalusů *Brassica oleracea* var. *botrytis*. Nejdříve byl připraven mix 2-merkptoethanolu (2-ME) a Lysis Solution (na každý 1 ml Lysis Solution připadlo 10 µl 2-ME). List a kalusy byly po přidání 500 µl tohoto mixu rozdrceny tloučkem v třecí misce pomocí tekutého dusíku a směsi byly přeneseny do mikroskopických kumavek. Protoplasty v mikroskopických kumavkách nemusely být drceny, proto se k nim pouze přidalo stejné množství mixu.

Všechny mikroskopické kumavky byly následně 30 sekund vortexovány a inkubovány po dobu 3 až 5 minut při 56 °C. Poté byly centrifugovány 3 minuty při rychlosti 12 000 otáček/min. Tato rychlost byla stejná u všech následných reakcí. Supernatant byl přenesen na filtrační kolonu umístěnou ve speciální 2ml mikroskopické kumavce. Mikroskopické kumavky byly znovu centrifugovány 1 minutu. Do roztoku, který kolonou protekl, bylo přidáno 500 µl Binding Solution a směs byla promíchána opakovaným nasátím a vysátím pipetou. 700 µl této směsi bylo přeneseno na vazebnou kolonu umístěnou v nové mikroskopické kumavce. Následovala centrifugace po dobu 1 minuty. Kolona byla vyjmuta a otočena dolů na papír, aby v ní nezůstala žádná tekutina. Poté byla kolona vrácena do mikroskopické kumavky k následnému promytí. Nejdříve bylo přidáno 500 µl Wash Solution 1. Následovala centrifugace po dobu 1 minuty. Roztok, který protekl kolonou, byl odlit a tekutina z kolony byla opět odsána papírem. Na kolonu vrácenou do mikroskopické kumavky bylo napipetováno dvakrát po sobě 500 µl Wash Solution 2 s následnou centrifugací 30 sekund. Kolona poté musela být vysušena

umístěním suché kolony do mikrozkušavky a centrifugací 1 minutu. Nakonec byla kolona přenesena do nové mikrozkušavky a přímo do jejího středu k ní bylo napipetováno 50 μ l Elution Solution. Nejdříve byla mikrozkušavka ponechána 1 minutu stát a poté byla centrifugována 1 minutu. Eluát obsahující purifikovanou RNA, jejíž koncentrace byla změřena, byl následně připraven k dlouhodobému uschování při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.11 Odstranění DNA z RNA

DNA byla z roztoku odstraněna pomocí kitu RNase – free DNase (Promega, USA). K 8 μ l každého vzorku RNA byl přidán 1 μ l reakčního pufru (RNase Buffer) a 1 μ l DNazy. Mikrozkušavky byly umístěny po dobu 30 minut do termobloku při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté bylo přidáno 1 μ l Stop Solution a vše bylo zahřáto na $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 min. Takto upravená RNA byla připravená k reverzní transkripci – převedení do cDNA.

4.12 Reverzní transkripce RNA

Přepis vzorků RNA do cDNA byl umožněn pomocí Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kitu (Roche, Německo). K 8 μ l RNA byl přidán 1 μ l Anchored-oligo (dT)₁₈ Primeru a 2,4 μ l vody. Tato směs byla zahřána v cycleru po dobu 10 minut na $65\text{ }^{\circ}\text{C}$, což umožnilo denaturaci sekundární struktury RNA. Po uplynutí této doby byla směs ihned přemístěna na led. K této směsi bylo následně přidáno 4 μ l reakčního pufru, 0,5 μ l inhibitoru RNazy, 2 μ l mixu deoxynukleotidů, 1 μ l dithiothreitolu a 1,1 μ l reverzní transkriptázy. Vše bylo v mikrozkušavce opatrně promícháno a umístěno do cycleru, kde bylo vše po dobu 30 minut zahřáno na $45\text{ }^{\circ}\text{C}$. K inaktivaci reverzní transkriptázy byla směs dále zahřána na $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 minut. Nakonec byla mikrozkušavka ihned vložena do ledu a cDNA byla připravena k dalšímu použití nebo zamražena při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.13 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Ke zjištění expresní úrovně proliferčního antigenu buněčného jádra (PCNA, GenBank Access. No. S64617) a ribonukleotid reduktázy (RNR, GenBank Access. No. H07688) byla použita amplifikace fragmentů DNA a cDNA pomocí kitu FastStart PCR Master (Roche, Německo) a následné polymerázové řetězové reakce

(PCR) pomocí primerů uvedených v Tabulce 5. Sekvence genů RNR a PCNA včetně zaznačených použitých primerů jsou uvedeny v příloze (Kap. 10).

Tab. 5: Primery použité pro amplifikaci fragmentů cDNA a DNA pomocí PCR.

Název primeru:	Sekvence primeru:
PCNA forward	5'-GACAGTGAGCATTTGGGTAT-3'
PCNA reverse	5'-ATGTTAGCTGTCCCAATGTC-3'
RNR forward	5'-GGTACAAGAACATGTGAGGA-3'
RNR reverse	5'-TTATAGTCTGTCTCGGGTTTCG-3'

K 1 μ l vzorku bylo přidáno 0,5 μ l reverse primeru, 0,5 μ l forward primeru, 10 μ l Master mixu a 8 μ l sterilní destilované vody. Časový a teplotní profil PCR reakce je uveden v tabulce 6.

Tab. 6: Časový a teplotní profil PCR reakce

1 cyklus	Počáteční denaturace	95 °C	4 min
30 cyklů	Denaturace	95 °C	30 s
	Hybridizace primerů	50 °C	30 s
	Prodlužování primerů	72 °C	45 s
1 cyklus	Konečné prodloužení primerů	72 °C	7 min

4.14 Gelová elektroforéza v agarózovém gelu

PCR produkty byly identifikovány pomocí elektroforézy v 2% agarózovém gelu. K 45 ml destilované vody bylo přidáno 5 ml TBE pufru a 1 g agarózy. Tato směs byla zahřívána v mikrovlnné troubě, dokud nebyl roztok úplně čirý. Po krátkém vychladnutí na cca 50 °C byly do směsi přidány 2 μ l ethidium bromidu. Roztok byl promíchán a vylit do připravené vaničky s hřebínkem. Po ztuhnutí gelu byl gel přemístěn do elektroforetické komůrky a hřebínek byl vyjmut. Komůrka byla naplněna TBE pufrem tak, aby byl gel ponořen 2 až 5 mm pod hladinu pufru. Do první jamky bylo napipetováno 6 μ l standardu molekulové váhy 19-1114 bp (Roche, Německo). Do dalších jamek bylo napipetováno vždy 6 μ l vzorku smíchaného s 2 μ l barvy loading dye. Poté byly zapojeny elektrické vodiče ke zdroji, na kterém bylo nastaveno 100 V. Elektroforetická separace PCR produktů probíhala 30 minut. Poté byla elektroforetická komůrka odpojena od zdroje

a gel byl přenesen do Transluminátoru UVT-20M (Herolab) s digitálním fotoaparátem (Codak 290), pomocí kterého byl gel vyfocen.

4.15 Real-Time PCR ribonukleotid reduktázy a proliferačního antigenu buněčného jádra

Po izolaci celkové RNA z listu, kalusů a protoplastů (0, 48 a 72 h) a přepsání do cDNA byla potřebné zjistit expresní úroveň ribonukleotid reduktázy (RNR) a proliferačního antigenu buněčného jádra (PCNA). K tomuto účelu byl využit LightCycler 2.0 (Roche, Německo). Real-Time PCR RNR a PCNA byla provedena několikanásobnou amplifikací cDNA za účasti SYBR Green I pomocí primerů RNR a PCNA (viz Tab. 5).

Všechny vzorky cDNA byly zředěny na koncentraci 200 ng/μl. K 5 μl tohoto vzorku bylo přidáno 10 μl vody, 0,5 μl příslušných primerů reverse i forward a 4 μl Master mixu. Tyto směsi umístěné ve speciálních skleněných kapilárách byly přemístěny do kovových stojánků, ve kterých byly krátce centrifugovány. Poté byly kapiláry umístěny do LightCycleru, kde proběhla kvantitativní Real-Time PCR. Časový a teplotní profil reakce je uveden v Tabulce 7. Získaná data byla vyhodnocena pomocí LightCycler Software 4.1. K relativní kvantifikaci byla jako standard použita hodnota exprese aktinu v příslušných vzorcích.

Tab. 7: Časový a teplotní profil RT-PCR

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

5 Výsledky

5.1 Stanovení výtěžku protoplastů

Protoplasty byly izolovány z mezofylového pletiva mladých listů rostlin *Brassica oleracea* var. *botrytis* kultivovaných ve sterilních *in vitro* podmínkách. Protoplasty byly získávány s průměrným výtěžkem $9,9 * 10^6$ protoplastů v 1 ml suspenze z 0,317 g listů (Tab. 8 + výpočty).

Tab. 8: Počet protoplastů v deseti středních čtvercích Bürkerovy komůrky

Střední čtverec	Počet protoplastů			
	Vzorek č. 1	Vzorek č. 2	Vzorek č. 3	vzorek č. 4
1	23	57	44	22
2	26	68	47	20
3	28	76	46	31
4	27	53	42	21
5	28	49	54	24
6	23	59	41	25
7	22	53	51	19
8	29	57	42	26
9	25	78	39	18
10	27	52	37	21
Celkem:	258	602	443	227

Výpočet celkového počtu protoplastů v 1 ml suspenze:

$$P = (p * v * h * z / y) * 10^3$$

P.....celkový počet protoplastů v 1 ml suspenze

p.....počet spočítaných protoplastů

v.....převrácená hodnota plochy jednoho středního čtverce = 25

h.....převrácená hodnota hloubky komůrky = 10

z.....zředění suspenze = 1

y.....počet čtverců, v nichž jsou protoplasty počítány = 10

Vzorek č. 1:

$$P = (p * v * h * z / y) * 10^3$$

$$P = (258 * 25 * 10 * 1 / 10) * 10^3$$

$$P = 6,5 * 10^6 \text{ protoplastů v 1 ml suspenze}$$

Vzorek č. 2:

$$P = (p * v * h * z / y) * 10^3$$

$$P = (602 * 25 * 10 * 1 / 10) * 10^3$$

$$P = 15,1 * 10^6 \text{ protoplastů v 1 ml suspenze}$$

Vzorek č. 3:

$$P = (p * v * h * z / y) * 10^3$$

$$P = (443 * 25 * 10 * 1 / 10) * 10^3$$

$$P = 11,1 * 10^6 \text{ protoplastů v 1 ml suspenze}$$

Vzorek č. 4:

$$P = (p * v * h * z / y) * 10^3$$

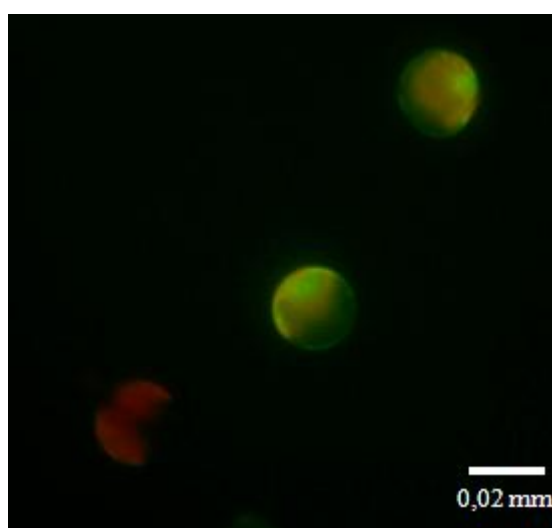
$$P = (277 * 25 * 10 * 1 / 10) * 10^3$$

$$P = 6,9 * 10^6 \text{ protoplastů v 1 ml suspenze}$$

Průměrný výtěžek: $9,9 * 10^6$ protoplastů v 1 ml suspenze

5.2 Stanovení životnosti protoplastů

Životnost izolovaných protoplastů stanovena pomocí fluorescein diacetátu (Obr. 8) se v deseti zorných polích fluorescenčního mikroskopu pohybovala po každé izolaci kolem 80 % (Tab. 9).



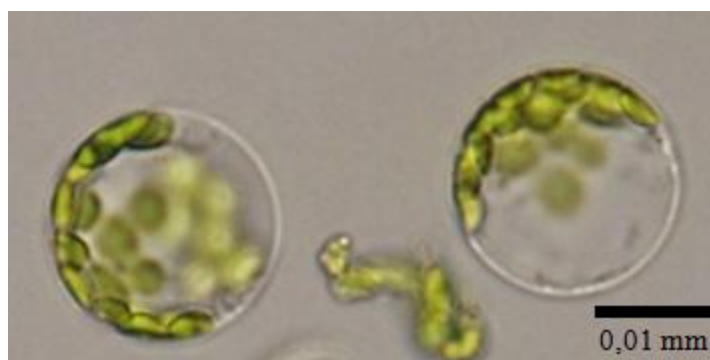
Obr. 8: Stanovení životnosti izolovaných protoplastů pomocí fluorescein diacetátu. Zeleně fluoreskující protoplasty jsou živé, protože jejich esteráza rozštěpila fluorescein diacetát na zeleně fluoreskující fluorescein.

Tab. 9: Stanovení životnosti protoplastů vzorku č. 1

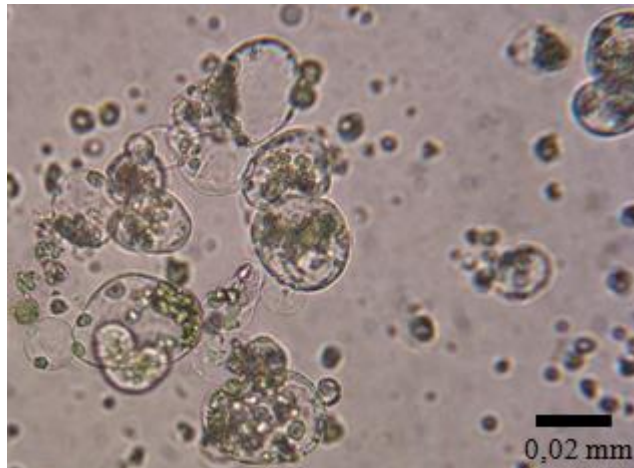
	Počet protoplastů v jednotlivých zorných polích										Celkem
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Počet živých protoplastů	32	20	23	26	24	28	24	31	25	27	260 84%
Počet všech protoplastů	42	23	26	30	29	30	37	35	30	28	310

5.3 Kultivace protoplastů

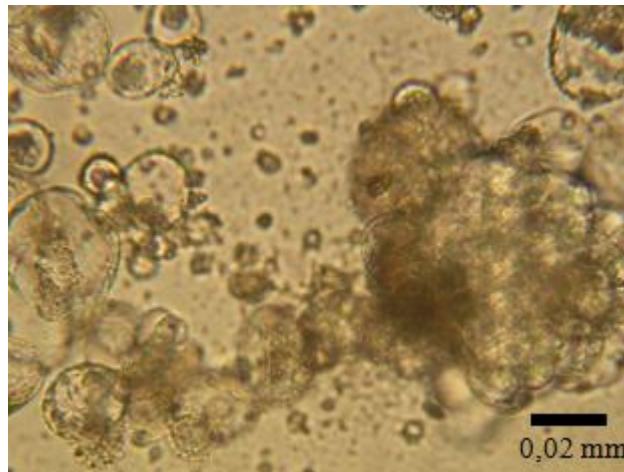
Pro kultivaci protoplastů byla použita tekutá média B, D a E a pevné médium OK. Protoplasty byly po izolaci umístěny do média B. Měly sférický tvar, protože postrádaly buněčnou stěnu (Obr. 9). Protoplasty v této době podléhaly oxidativnímu stresu, který chybějící buněčná stěna ještě zvyšuje. Musely být tedy kultivovány ve tmě v termostatu při teplotě 25 °C. Po 72 hodinách byly protoplasty přeneseny do kultivační místnosti s fotoperiodou 16/8 h den/noc. Po jednom týdnu kultivace bylo médium B vyměněno za čerstvé. Protoplasty již měly buněčnou stěnu a mohly se začít dělit (Obr. 10). Po třech týdnech od izolace bylo médium B vyměněno za médium D. Protoplasty již začaly tvořit malé shluky zatím stále nediferencovaných buněk – mikrokalusy (Obr. 11). Za dalších 14 dnů bylo médium D nahrazeno médiem E. Pod mikroskopem byly pozorovány mikrokalusy větších rozměrů (Obr. 12). Ty byly přeneseny na pevné médium OK. Po celkových osmi týdnech kultivace byly získány z protoplastů 1 cm velké kalusy, které si buď ponechávaly dediferencovaný status, nebo se z nich naopak začal diferencovat kořen či prýt budoucí rostliny (Obr. 13).



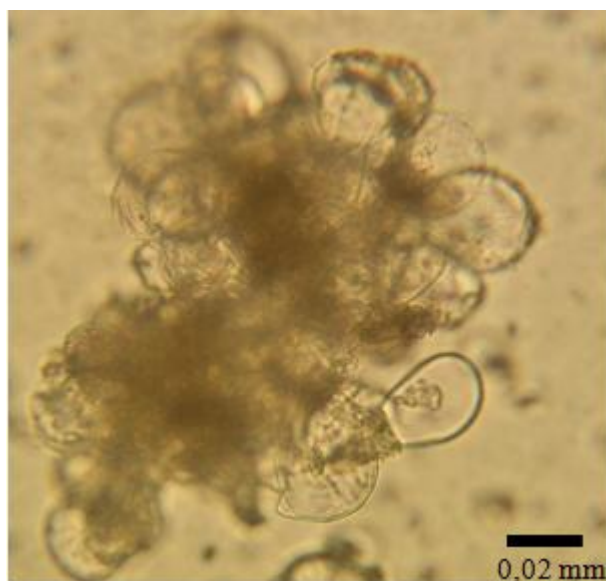
Obr. 9: Protoplasty po izolaci (0 hod.)



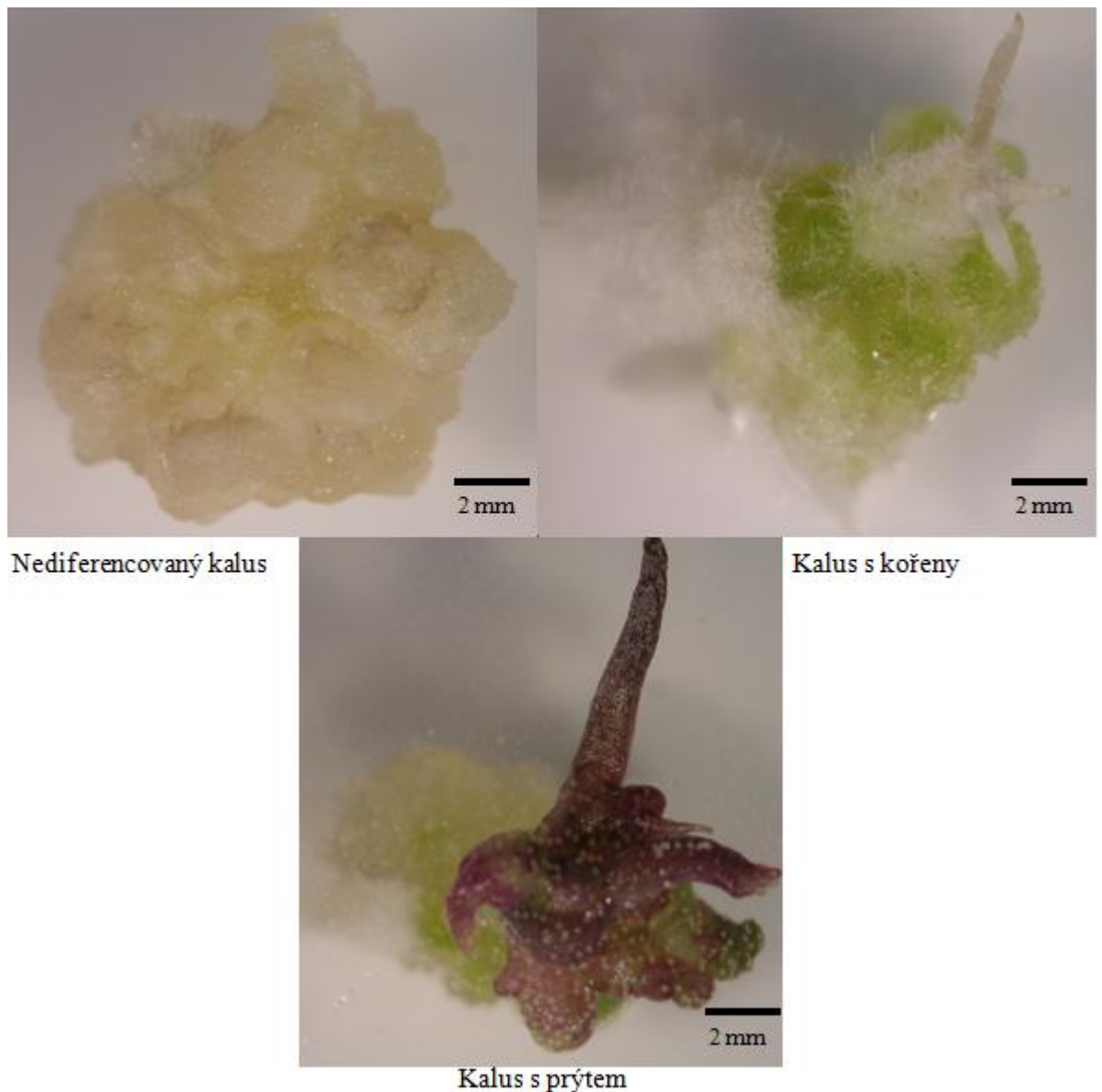
Obr. 10: Buněčná kultura odvozená z protoplastů po jednom týdnu kultivace



Obr. 11: Mikrokalusy po třech týdnech kultivace



Obr. 12: Mikrokalusy po pěti týdnech kultivace



Obr. 13: kalusy (8 týdnů kultivace)

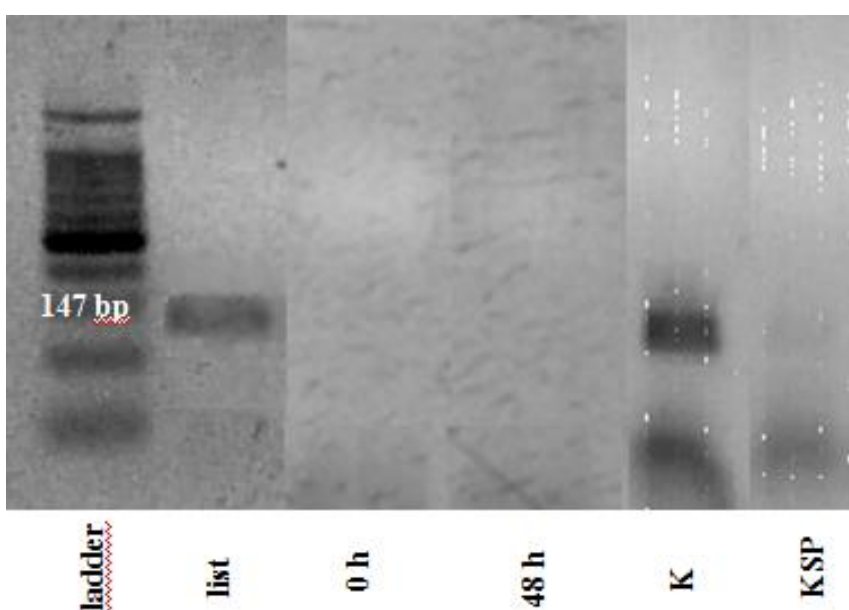
5.4 Exprese genů RNR a PCNA

Po izolaci genomické DNA z listů rostliny *Brassica oleracea* var. *botrytis* a izolaci RNA z protoplastů (0 h, 48 h, 72 h po izolaci), listu a kalusů (nediferencovaný kalus, kalus s kořenem, kalus s prýtem) a jejího přepsání do cDNA byla provedena PCR reakce s RNR a PCNA primery (Tab. 5). Následovala identifikace PCR produktů pomocí elektroforézy v 2% agarózovém gelu.

Bylo zjištěno, že RNR primer nebyl funkční, jelikož nebyly na elektroforéze identifikovány žádné amplifikované PCR produkty s tímto primerem, dokonce ani ve vzorku

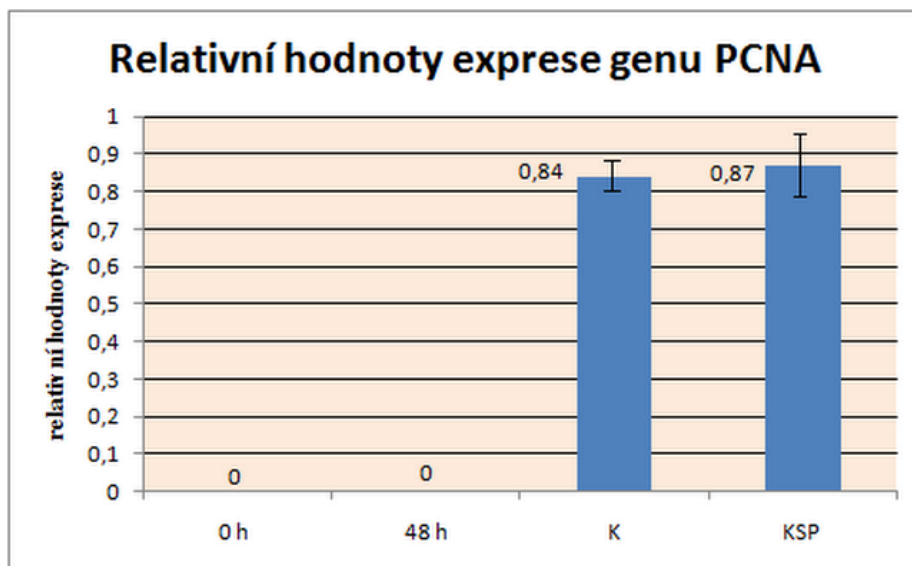
genomické DNA. Proto nemohla být provedena Real-Time PCR a zjištěna míra exprese tohoto genu v žádném vzorku.

PCNA primer fungoval, jelikož na elektroforéze byly identifikovány produkty PCR reakce s použitím genomické DNA izolované z listu jako templát (Obr. 14). Velikost těchto produktů byla přibližně 140 bází, což odpovídá sekvenci. RNA některých vzorků (protoplasty 72 h a kalusu s kořenem) byla při štěpení DNA DNazou (Promega, USA) degradována. PCR produkty ostatních vzorků ukázaly, že se gen PCNA v protoplastech 0 h a 48 h po izolaci neexprimoval. PCNA gen se exprimoval silně v nediferencovaném kalusu a slabě v již diferencovaném kalusu s prýtem.



Obr. 14: Exprese genu PCNA v různých stádiích kultivace protoplastů

Pomocí Real-Time PCR byly vyhodnoceny relativní hodnoty exprese genu PCNA ve vzorcích protoplastů (0 a 48 h), nediferencovaného kalusu (K) a kalusu s prýtem (KSP). Jako standard byla použita hodnota exprese aktinu ve studovaných vzorcích. Real-Time PCR potvrdila, že se gen exprimoval až v kalusech. Real-Time PCR byla provedena ve třech opakováních a výsledky byly zprůměrovány. Výsledný graf ukazuje, že exprese genu PCNA v nediferencovaném kalusu a v kalusu s prýtem se významně nelišila (Obr. 15).



Obr. 15: Relativní hodnoty exprese genu PCNA v různých stádiích kultivace protoplastů

6 Diskuze

Rostlinné protoplasty (buňky izolované z rostlin pomocí enzymů degradujících buněčnou stěnu) představují jednoduchý systém pro studium dediferenciačních procesů probíhajících v buňce. Dediferenciace již diferencované rostlinné buňky probíhá ve dvou fázích: získání kompetence pro provedení dediferenciace a následné znovu vstoupení do buněčného cyklu, které závisí na kultivaci protoplastů v přítomnosti fytohormonů. Obě tyto fáze jsou spojeny s dekondukcí a následnou re-kondukcí chromatinu (Grafí, 2004; Ondřej *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2001).

Regenerace protoplastů je náročný proces zahrnující izolaci a kultivaci protoplastů ve sterilních podmínkách. Je důležité zvolit správný podíl fytohormonů a ostatních látek obsažených v médiích, které je nutné měnit tak, aby v různých fázích kultivace docházelo ke správné regeneraci a růstu buněčné kultury. Jedním z cílů této bakalářské práce byla izolace protoplastů z rostliny *Brassica oleracea* var. *botrytis* a jejich regenerace. Oba tyto úkoly byly úspěšně zvládnuty a fotograficky zdokumentovány stejně jako např. v publikacích Chikkala *et al.*, 2009; Navrátilová *et al.*, 1997.

Ribonukleotid reduktáza (RNR) a proliferační antigen buněčného jádra (PCNA) patří mezi geny zodpovědné za buněčné dělení. Konkrétně je RNR gen důležitý pro replikaci DNA a PCNA pro buněčné dělení. Druhým cílem této bakalářské práce bylo zjistit, v jaké fázi kultivace rostlinných protoplastů byly tyto geny v buňkách exprimovány.

Pomocí PCR a gelové elektroforózy bylo zjištěno, že PCNA gen se po izolaci protoplastů v čase 0 a 48 h neexprimuje, protože protoplasty teprve začínají regenerovat svou buněčnou stěnu a zatím se nedělí. Tento fakt byl potvrzen i kvantitativní Real-Time PCR. Gen se začal exprimovat až ve fázi kalusu. V případě nediferencovaného kalusu byl při agaróзовé elektroforóze identifikován silný „band“ exprese genu. V případě kalusu s diferencovaným prýtem byl zaznamenán slabší „band“, což nasvědčuje faktu, že v nediferencovaném kalusu buňky prolifерují mnohem více než v kalusu s již diferencovaným prýtem. Real-Time PCR však ukázala, že míra exprese tohoto genu obou kalusů se statisticky neliší, což odráží skutečnost, že i v diferencujícím se kalusu dochází nadále k proliferaci buněk. Williams *et al.* (2003) ve své publikaci uvádí, že expresi PCNA genu taktéž nezaznamenal u protoplastů tabáku nacházejících se ve fázi 0 a 48 h po izolaci. Expresi pozoroval v protoplastech 72 h po izolaci, jelikož právě tehdy protoplasty znovu vstupují do S-fáze buněčného cyklu a začínají se dělit. Tento fakt nemohl být v této práci ověřen, neboť došlo při přepisu RNA protoplastů 72 h po ošetření DNazou k degradaci RNA.

Williams *et al.* (2003) popisuje expresi RNR genů u protoplastů tabáku shodně s expresí PCNA genu. RNR byl exprimován v protoplastech vstupujících do S-fáze buněčného cyklu, tedy protoplastů 72 h po izolaci. V diferencovaných buňkách mezofylu listu již exprese genu pozorována nebyla. V této práci nebyla exprese genu RNR zaznamenána, jelikož bylo zjištěno, že navržené RNR primery nebyly funkční a PCR reakce RNR genu neproběhla. Tento fakt může být zdůvodněn tím, že sekvence RNR genu pocházela z genomu rostliny *Brassica napus*, jakožto geneticky blízkého organismu, u kterého je sekvence tohoto genu popsána. Sekvence primerů tedy nemusely být homologní. Dalším důvodem nenavázání primerů může být jejich navržení do místa intronu tohoto genu. V tomto případě by byla daná sekvence při alternativním sestřihu genů vystřižnuta a primer by se nemohl na přeepsanou cDNA navázat.

Z výsledků této práce můžeme tedy usoudit, že PCNA gen může být považován za marker úspěšné kultivace, diferenciaci a regenerace rostlinných protoplastů. V okamžiku, kdy se spustí exprese PCNA genu, se buňka znovu vrací do S-fáze buněčného dělení a může tak dediferencovat. Jeho zapnutí je indukováno reorganizací chromatinu v jádře, neboť PCNA interaguje s dalšími proteiny (ATXR5 a ATXR6), které pomáhají přetvořit euchromatin v heterochromatin. Jedná se o monomethyltransferázy, které methylují histony chromatinu a umlčují tedy některé geny (Meng *et al.*, 2009; Raynaud *et al.*, 2006). Toto vzájemné působení je součástí složitějšího procesu, který vede k dediferenciaci, resetování exprese všech genů a následnému zapínání genů potřebných pro nové funkce.

K podobnému mechanismu reorganizace chromatinu dochází i u živočišných buněk. Jádra z kuřecího erytrocytu inkubována ve vaječném extraktu drápatky (*Xenopus*) také vykazovala před reaktivací syntézy DNA dvě odlišné fáze dekondezace chromatinu (Blank *et al.*, 1992). Proto by mohlo být studium tohoto genu v budoucnu přínosné pro studium regenerace rostlin i živočichů.

7 Závěr

Během dediferenciace rostlinných buněk dochází k reorganizaci chromatinu v buněčném jádře. Tyto změny provází dekondezace a re-kondezace chromatinu. Díky těmto zvrátům dochází k vypínání a zapínání exprese určitých genů.

V této práci byla provedena izolace a kultivace protoplastů z mladých listů rostliny *Brassica oleracea* var. *botrytis*. V různých časových obdobích kultivace a postupné regenerace protoplastů byla pozorována exprese genů PCNA a RNR (genů zodpovědných za buněčné dělení).

Ukázalo se, že RNR primery byly nejspíše nefunkční, protože exprese daného genu nebyla zjištěna v žádné fázi kultivace protoplastů a dokonce nebyl daný gen identifikován ani na genomické DNA rostliny. Také bylo zjištěno, že po aplikaci kitu RNase – free DNase (Promega, USA) došlo k degradaci RNA některých vzorků.

Výsledky experimentů naznačují, že gen PCNA se exprimuje v proliferujících buňkách kalusů a v již diferencovaných buňkách listu je exprese genu zastavena. Vzhledem k publikovaným výsledkům zahraničních autorů a také vzhledem k výsledkům této bakalářské práce může být gen PCNA považován za marker úspěšné kultivace, diferenciace a regenerace rostlinných protoplastů. Do budoucna by se mohl výzkum zaměřit na expresi tohoto genu u živočišných buněk.

8 Seznam použitých zkratek

2-ME	2-merkapt ethanol
2,4-D	2,4-dichlorfenoxycetová kyselina
ATXR5	<i>Arabidopsis</i> trithorax-related protein 5
ATXR6	<i>Arabidopsis</i> trithorax-related protein 6
BAP	6-benzylaminopurin; benzyl adenin
CTAB	cetyltrimethylammonium bromid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FDA	fluorescein diacetát
GA ₃	giberelová kyselina
IPA	6-izopentenylaminopurin
MS	Murashige-Skoog
NAA	naftyloctová kyselina
PCNA	proliferální antigen buněčného jádra
PCR	polymerázová řetězová reakce
PEG	polyetylen glykol
RNA	ribonukleová kyselina
RNR	ribonukleotid reduktáza

9 Seznam použité literatury

Andersson, K. K. (2008): Ribonucleotide reductase, pp. 1 – 16. Nova Publishers, New York, USA [ISBN: 978-1-60456-199-9].

Bhojwani, S. S., Razdan, M. K. (1996): Plant tissue culture: theory and practise, pp. 63-94. Elsevier Science, Amsterdam, the Netherlands [ISBN: 0-444-81623-2].

Blackhall, N. W., Davey, M. R., Power, B. (1994): Isolation, culture and regeneration of protoplasts, pp. 27 - 40. Eds: Dixon, R. A., Gonzales, R. A.: Plant Cell Culture. A Practical Approach. Oxford University Press, Oxford, Great Britain [ISBN: 0-19-963402-5].

Blank, T., Trendelenburg, M., Kleinschmidt, J. A. (1992): Reactivation of DNA replication in erythrocyte nuclei by *Xenopus* egg extract involves energy-dependent chromatin decondensation and changes in histone phosphorylation. Exp. Cell Res. 202: 224 - 232.

Bravo, R., Macdonald-Bravo, H. (1987): Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. The Journal of Cell Biology 105: 1549 - 1554.

Burgess, J., Fleming, E. N. (1974): Ultrastructural observations of cell wall regeneration around isolated tobacco protoplasts. J. Cell Sci. 14: 439 - 449.

Carlson, P. S., Smith, H. H., Dearing, R. D. (1972): Parasexual interspecific plant hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 2292 - 2294.

Cocking, E. C. (1960): A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. Nature 187: 927 - 929.

Czyzewska, J., Guzinska-Ustymowicz, K., Lebelt, A., Zalewski, B., Kemon, A. (2004): Evaluation of proliferating markers Ki-67, PCNA in gastric cancers. Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku 49: 64 - 66.

- Davey, M. R., Anthony, P., Power, J. B., Lowe, K. C. (2005a): Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances* 23: 131 - 171.
- Davey, M. R., Anthony, P., Power, J. B., Lowe, K. C. (2005b): Plant protoplast technology: status and applications. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 41: 202 - 212.
- Dovzhenko, A., Dal Bosco, C., Meurer, J., Koop, H. U. (2003): Efficient regeneration from cotyledon protoplasts in *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* 222: 107 - 111.
- Fontecave, M. (1998): Ribonucleotide reductases and radical reactions. *Cell. Mol. Life Sci.* 54: 684 - 695.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K. (1968): Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151 - 158.
- Grafi, G. (2004): How cells dedifferentiate: a lesson from plants. *Developmental Biology* 268: 1 - 6.
- Grafi, G. (2009): The complexity of cellular dedifferentiation: implications for regenerative medicine. *Trends in biotechnology* 27: 329 - 332.
- Chawla, H. S. (2002): Introduction to plant biotechnology, pp. 87 - 109. Science Publishers, Enfield, USA [ISBN: 1-57808-228-5].
- Chikkala, V. R. N., Nugent, G. D., Dix, P. J., Stevenson, T. W. (2009): Regeneration from leaf explants and protoplasts of *Brassica oleracea* var. *botrytis* (cauliflower). *Scientia Horticulturae* 119: 330 - 334.
- Kao, K. N., Constabel, F., Michayluk, M. R., Gamborg, O. L. (1974): Plant protoplast fusion and growth of intergeneric hybrid cells. *Planta* 120: 215 - 227.
- Kelman, Z. (1997): PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene* 14: 629 - 640.

Klercker, J. A. (1892): Eine methode zur isolierung lebender protoplasten. Oefvers Vetenskaps Akad., Stockholm 9: 463 - 471.

Krishna, T. S., Kong, X. P., Gary, S., Burgers, P. M., Kuriyan, J. (1994): Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA. Cell 79: 1233 - 1243.

Larsen, J. K., Landberg, G., Roos, G. (2001): Detection of proliferating cell nuclear antigen, pp. 419 - 431. Eds: Darzynkiewicz, Z., Robinson, J. P., Crissman, H. A.: Methods in cell biology: Cytometry (Volume 63). Academic Press, San Diego [ISBN: 9780125441667].

Lebel, E. G., Masson, J., Bogucki, A., Paszkowski, J. (1993): Stress-induced intrachromozómal recombination in plant somatic-cells. Proc. National Acad. Sci. USA 90: 422 - 426.

Liu, S., Liu, C., Huang, X., Chai, Y., Cong, B. (2006): Optimization of parameters for isolation of protoplasts from the Antarctic sea ice alga *Chlamydomonas* sp. ICE-L. J. Appl. Phycol. 18: 783 - 786.

Lowe, K. C., Davey, M. R., Power, J. B. (1998): Perfluorochemicals: their applications and benefits to cell culture. Trends Biotechnol. 16: 272 - 277.

Lundin, D., Torrents, E., Poole, A. M., Sjöberg, B. M. (2009): RNRdb, a curated database of the universal enzyme family ribonucleotide reductase, reveals a high level of misannotation in sequences deposited to Genbank. BMC Genomics 10: 589 - 596.

Mathews, M. B., Bernstein, R. M., Franza Jr, B. R., Garrels, J. I. (1984) Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. Nature 309: 374 - 376.

Melchers, G., Sacristan, M. D., Holder, S. A. (1978): Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. Carlsberg Res. Comm. 43: 203 - 208.

Meng, P. H., Raynaud, C., Tcherkez, G., Blanchet, S., Massoud, K., Domenichini, S., Henry, Y., Soubigou-Taconnat, L., Lelarge-Trouverie, C., Saindrenan, P., Renou, J. P., Bergounioux, C. (2009): Crosstalks between myo-inositol metabolism, programmed cell death and basal immunity in *Arabidopsis*. PLoS ONE 4(10): e7364. doi:10.1371/journal.pone.0007364.

Miyachi, K., Fritzler, M. J., Tan, E. M. (1978): Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. J. Immunol. 121: 2228 - 2234.

Murashige, T., Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473 - 497.

Nagata, T., Takebe, I. (1971): Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. Planta 99: 12 - 20.

Naryzhny, S. N. (2008): Proliferating cell nuclear antigen: a proteomics view. Cell. Mol. Life Sci. 65: 3789 - 3808.

Naryzhny, S. N., Lee, H. (2007): Characterization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) isoforms in normal and cancer cells: There is no cancer-associated form of PCNA. FEBS Letters 581: 4917 - 4920.

Navrátilová, B. (2004): Protoplast cultures and protoplast fusion focused on Brassicaceae. Hort. Sci. 31: 140 - 157.

Navrátilová, B., Bůžek, J., Široký, J., Havránek, P. (1997): Construction of intergeneric somatic hybrids between *Brassica oleracea* and *Armoracia rusticana*. Biologia Plantarum 39: 531 - 541.

Ondřej, V., Kitner, M., Doležalová, I., Nádvorník, P., Navrátilová, B., Lebeda, A. (2009): Chromatin structural rearrangement during dedifferentiation of protoplasts of *Cucumis sativus*. Mol. Cells 27: 443 - 447.

- Papadakis, A. K., Roubelakis-Angelakis, K. A. (2002): Oxidative stress could be responsible for the recalcitrance of plant protoplasts. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 549 – 559.
- Raikar, S. V., Braun, R. H., Bryant, C., Conner, A. J., Christey, M. C. (2008): Efficient isolation, culture and regeneration of *Lotus corniculatus* protoplasts. *Plant Biotechnol. Rep.* 2: 171 - 177.
- Rao, A. Q., Bakhsh, A., Kiani, S., Shahzad, K., Shahid, A. A., Husnain, T., Riazuddin, S. (2009): The myth of plant transformation. *Biotechnology Advances* 27: 753 - 763.
- Raynaud, C., Sozzani, R., Glab, N., Domenichini, S., Perennes, C., Cella, R., Kondorosi, E., Bergounioux, C. (2006): Two cell-cycle regulated SET-domain proteins interact with proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 47: 395 - 407.
- Ren, J. P., Dickson, M. H., Earle, E. D. (2000): Improved resistance to bacterial soft rot by protoplast fusion between *Brassica rapa* and *B. oleracea*. *Theor. Appl. Genet.* 100: 810 - 819.
- Sathyanarayana, B. N., Varhese, D. B. (2007): *Plant tissue culture: Practices and new experimental protocols*, pp. 173 – 177. K. International Pvt Ltd, New Delhi, India. [ISBN: 81-89866-11-7].
- Sinha, A., Wetten, A. C., Caligari, P. D. S. (2003): Optimisation of protoplast production in white lupin. *Biol. Plant.* 47: 21 - 25.
- Steinmetz, K. A., Potter, J. D. (1996): Vegetables, fruit, and cancer prevention. *J. Am. Diet. Assoc.* 96: 1027 - 1039.
- Stewart Jr., C. N., Cardoza, V. (2004): *Brassica* biotechnology, progress in cellular and molecular biology. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 40: 542 - 551.
- Tanno, M., Ogihara, M., Tagushi, T. (1996): Age-related changes in proliferating cell nuclear antigen levels. *Mechanisms of Ageing and Development* 92: 53 - 66.

van Diest, P. J., Brugal, G., Baak, J. P. A. (1998): Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *J. Clin. Pathol.* 51: 716 - 724.

Veilleux, R. E., Compton, M. E., Saunders, J. A. (2005): Use of protoplasts for plant improvement, pp. 213 - 224. Eds: Trigiano, R. N., Gray, D. J. (2005): *Plant Development and Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton – London – New York – Washington [ISBN: 0849316146].

Williams, L., Zhao, J., Morozova, N., Li, Y., Avivi, Y., Grafi, G. (2003): Chromatin reorganization accompanying cellular dedifferentiation is associated with modifications of histone H3, redistribution of HP1, and activation of E2F-target genes. *Developmental Dynamics* 228: 113 - 120.

Yamagishi, H., Landgren, M., Forsberg J., Glimelius, K. (2002): Production of asymmetric hybrids between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* utilizing an efficient protoplast culture system. *Theor. Appl. Genet.* 104: 959 - 964.

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.

Zimmermann, U., Scheurich, P. (1981): High frequency fusion of plant protoplasts by electrical fields. *Planta* 151: 26 - 32.

Zhao, J., Morozova, N., Williams, L., Libs, L., Avivi, Y., Grafi, G. (2001): Two phases of chromatin decondensation during cellular dedifferentiation of plant cells: distinction between competence for cell fate switch and a commitment for S phase. *J. Biol. Chem.* 276: 22772 - 22778.

Internetové zdroje:

<http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc461/Biochem499/hillarysaxon/malaria3h.htm>

http://www.pdbj.org/eprints/index_en.cgi?PDB%3A1SXJ

<http://che1.lf1.cuni.cz/html/TK.pdf>

http://string-db.org:8080/newstring_userdata/net_image_a_34PcOJcETv3u_dw.png

10 Přílohy

10.1 Sekvence PCNA a vyznačení použitých primerů

Access. No. S64617 PCNA=proliferating cell nuclear antigen [*Brassica napus* = oilseed rape, cv. Westar, apical meristem, mRNA, 1004 nt].

```

1  cggagaaaatcgattcgaattctaaagctctctgattaatccgaaaatgttggagctac
61  gtctagttcaaggctctctcttgaagaaggtgctcgaatcgatcaaggatctcgtcaacg
121 acgccaacttcgactgctccaccaccggcttctccctccaagccatggactccagccacg
181 tggcgctcgtctccctcctgctcagatccgagggcttcgagcactaccgctgcgaccgta
241 acctctccatggggatgaacctcggtaacatgtcgaagatgctcaaatgcgccggaaatg
301 acgacatcatcaccatcaaagccgatgacggcggcgacaccgtcaccttcattgttcgaga
361 gtccaagcaagacaagattgcagattttgagatgaagctgatggatagacagtgagc
>>>>>>>>>
421 atttgggtatacctgatgctgagatcattcgatcgtgaggatgccgtctaagattct
>>>>>>>>>>
481 ctaggatttgcaaagatctcagtatccatcggtgacactggtgtgatatctgtgactaaag
541 aaggggttaagtctctactgctggtgacattgggacagctaacattgtggtgagacaga
<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
601 acacaactgttgacaagccggaagatgcaattgtgattgagatgaacgagccagtgtcac
661 tctcgtttgcgctgaggtacatgaactccttcacaaaggcaactccttctgctggacacgg
721 tgacgatcagcttatcgtctgagctgccagttgtggaggagataaggtagctgagatgg
781 gttacattcgttactacttggctcctaagattgaagaagatgaagaagacaaggcctaga
841 ccccttttgatccagagcttcttctgttcttactaaaatgtcgaagattcagtcattgat
901 ggattatgatgggttttccatttacttccctctagaatcagttggtttgttggacttgt
961 tatgttctaaaatggttattgtttggg

```

Vysvětlivky:

>>>>> forward primer

<<<<<< reverse primer

10.2 Sekvence RNR a vyznačení použitých primerů

Access. No. H07688 khgs043 BNL1 *Brassica napus* cDNA 3' similar to Ribonucleotide reductase M2, mRNA sequence.

```
1 ggtacaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgt
  >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
61 tgctggcggtttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgactcgtcaa
121 gtcagaggtggcgaaacccgacagactataaagataccagctttccctga
    <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
```

Vysvětlivky:

>>>>> forward primer

<<<<<< reverse primer