

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

**Diplomová práce**

**Olomouc**

**Petr Cápál**

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



# **Epigenetické aspekty protoplastových kultur**

Diplomová práce

**Petr Cápál**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: prezenční

**Olomouc 2012**

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

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto práci na téma epigenetické aspekty protoplastových kultur zpracoval osobně, pouze za užití literatury uvedené v přehledu použité literatury.

V Olomouci dne 23. 4. 2012

Petr Cápál

**Poděkování:**

Rád bych poděkoval vedoucímu práce doc. RNDr. Vladanovi Ondřejovi, Ph.D. Za jeho cenné rady a připomínky, bez nichž by tato práce zcela jistě nevznikla, stejně tak za jeho trpělivost. Děkuji všem na katedře botaniky a katedře buněčné biologie a genetiky, kteří mi pomohli s laboratorními procedurami. Rovněž děkuji rodičům za psychickou a materiální podporu po celou dobu studia.

## Souhrn

Rostlinná buňka po protoplastizaci projde dediferenciací, jejímž jedním z hlavních rysů je masivní dekonkondenzace heterochromatinu a změny na úrovni transkriptomu. Struktura chromatinu odráží epigenetický status dané části genomu. Jedná se zejména o metylaci DNA a modifikací aminoterminálních konců histonů. V této práci byla zkoumána míra metylace a hydroxymetylace DNA na celogenomové globální úrovni a stav metylace DNA v oblastech genů zapojených v procesech regenerace a kultivace protoplastů vzhledem k jejich expresi.

Během prvních tří dní kultivace protoplastů dochází k poklesu celogenomové hladiny metylace DNA, zatímco úroveň hydroxymetylace roste. Pouze u dvou ze šesti sledovaných genů, PCNA a RNR, bylo prokázáno, že podstupují postupnou demetylaci, která koreluje s mírou jejich exprese. Repetice SAT1 a 5S rDNA si ponechávají i po dekonkondenzaci epigenetickou značku umlčeného chromatinu, metylovanou DNA. Oproti tomu oblast retroelementu Ty1-copia je postupně demetylována a v protoplastech dochází k jeho expresi.

## Summary

Plant cell after protoplastisation experiences dedifferentiation, one of its hallmarks is massive decondensation of heterochromatin and changes in transcriptome. Chromatin structure is given by epigenetic state of genome in current location, mainly by DNA methylation and modifications of histone tails. Concern of this work is global levels of whole-genome methylation and hydroxymethylation as well as methylation in particular regions of genes responsible for protoplast regeneration and cultivation.

In the first three days of protoplast cultivation the level of global DNA methylation decreases, by that time level of hydroxymethylation rises. Only two of six examined genes, PCNA and RNR, showed demethylation of their loci, which correlate with their expression. SAT1 and 5S rDNA repeats maintain their DNA methylation after decondensation. On the contrary, retroelement Ty1-copia is gradually demethylated and is transcribed in protoplasts.

# Obsah

<b>1 Cíle práce.....</b>	<b>9</b>
<b>2 Úvod.....</b>	<b>10</b>
<b>3 Současný stav řešené problematiky .....</b>	<b>11</b>
3.1 Organizace dědičné informace v jádře .....	11
3.1.1 Chromozómová teritoria.....	11
3.1.2 Prostorová regulace genové aktivity.....	12
3.1.3 Model interchromozómových domén (CT-ICD model).....	13
3.1.4 Mřížkový model .....	14
3.1.5 Model interchromozómové sítě (ICN model) .....	14
3.2 Epigenetická regulace.....	15
3.2.1 Metylace DNA.....	15
3.2.2 Hydroxymetylace DNA.....	16
3.2.4 Modifikace N-terminálních konců histonů.....	17
3.3 Protoplastové kultury.....	18
3.3.1 Jevy doprovázející protoplastizaci .....	18
3.3.2 Vliv stresu na de- a rekondenzaci repetice.....	19
3.3.3 Transkripční aktivita spojená s kultivací protoplastů.....	20
<b>4 Materiál a metody.....</b>	<b>23</b>
4.1 Biologický materiál .....	23
4.2 Seznam použitých chemikálií.....	23
4.3 Seznam použitých roztoků a médií.....	24
4.4 Seznam použitých komerčních kitů.....	25
4.5 Vybavení laboratoře .....	25
4.6 Pěstování pokusných rostlin .....	26
4.7 Izolace protoplastů.....	26
4.8 Stanovení hustoty a životnosti protoplastů.....	27
4.9 Izolace DNA .....	27
4.10 Izolace RNA .....	28
4.11 Ošetření RNA DNázou.....	28
4.12 Přepis RNA do cDNA .....	28
4.13 Použité primery a jejich navržení .....	28
4.14 qPCR.....	29
4.15 Bisulfidická konverze .....	30
4.16 PCR a elektroforéza.....	31
4.17 Kvantifikace metylace genomické DNA.....	31
4.18 Kvantifikace hydroxymetylace genomické DNA.....	32
4.19 Přečištění PCR produktu .....	33
<b>5 Výsledky .....</b>	<b>34</b>
5.1 Izolace protoplastů.....	34
5.2 Antioxidativní systém buňky.....	34
5.3 Regenerace buněčné stěny.....	37
5.4 Proliferační geny.....	38
5.5 Epigenetický stav heterochromatinu .....	40
5.6 Globální hladiny metylace a hydroxymetylace .....	41
5.7 Identita osekvenované oblasti genu PCNA .....	42
<b>6 Diskuse.....</b>	<b>43</b>

<b>7 Závěr .....</b>	<b>46</b>
<b>8 Seznam použitých zkratk .....</b>	<b>47</b>
<b>9 Seznam použité literatury .....</b>	<b>48</b>



## 1 Cíle práce

Cílem této práce je popsat průběh exprese genů aktivních při procesu regenerace protoplastů *Cucumis sativus* L. a jejich následné kultivace a srovnat tyto hodnoty s jejich epigenetickým stavem, konkrétně s metylací DNA v lokusech těchto genů. Dále ověřit nezměněnou přítomnost metylcytosinu v oblasti heterochromatinu, který dekondenzuje při protoplastizaci, a to v oblastech pericentromerických a subtelomerických repetitiv a retroelementu Ty1-copia, u kterého zároveň zjistit, zda je po dekondenzaci chromatinu v protoplastech exprimován či nikoliv. Dalším cílem je stanovit změny v globální hladině metylace a hydroxymethylace DNA v prvních dnech kultivace.

## 2 Úvod

Protoplasty jsou buňky rostlin, hub nebo bakterií zbavené buněčné stěny. Jsou využitelné v biotechnologiích, ve šlechtitelství i v základním výzkumu. Jejich vlastností je, že při protoplastizaci projdou dediferenciací a mohou se při následné kultivaci vyvíjet v jiný typ pletiva, než ze kterého byly izolovány a mohou regenerovat i v celé nové rostliny. Během kultivace protoplastů a obecně ve všech *in vitro* kulturách dochází ke změnám na genetické i fenotypové úrovni, která je příčinou odlišnosti jednotlivých regenerantů mezi sebou a od donorového organismu. Tuto odlišnost označujeme termínem somaklonální variabilita a dle současných poznatků je za ni do značné míry zodpovědný odlišný epigenetický profil buněk v kulturách. Epigenetickou regulaci je možno definovat jako soubor dědičných změn genové exprese, které nejsou zapsány v primární sekvenci DNA. Epigenetické aspekty somaklonální variace zahrnují mechanismy genového umlčování či jejich aktivace skrze modifikace DNA a aminoterminálních konců histonů, které mění lokální strukturu chromatinu a tím umožňují nebo naopak znesnadňují přístup transkripčních faktorů k cílovému genu. V kulturách rovněž dochází k reaktivaci mobilních genetických elementů, jejichž aktivita může dále měnit genovou expresi, jsou-li inzertovány do lokusu s transkribovanými geny.

Kromě metylace DNA byl v genomu živočichů objeven další druh modifikace DNA, hydroxymetylace, jejíž zvýšené hladiny byly pozorovány u embryonálních kmenových buněk myši a člověka a u pluripotentních buněk (včetně indukovaně pluripotentních) schopných diferenciaci. Její hladina by tedy měla být zvýšena i u protoplastů. Význam hydroxymetylace pro buňku zatím nebyl plně objasněn. Je možné, že je mezistupněm v demethylaci genomu, také může měnit lokální strukturu chromatinu neboť hydroxymetylovaná DNA není rozeznávána metyl-vazebnými proteiny jak je tomu u metylované DNA.

## 3 Současný stav řešené problematiky

### 3.1 Organizace dědičné informace v jádře

Dědičná informace ve formě DNA musí být uložena co nejkompaktněji a zároveň tak, aby byla přístupná replikačním a transkripčním faktorům, enzymům a dalším elementům interagujícím s nukleovou kyselinou. Dále musí být zajištěn její bezpečný přenos do dalších generací buněk. Eukaryotní genomická DNA je v buněčném jádře uložena velmi specifickým způsobem, v komplexní struktuře DNA a proteinů, známé jako chromatin. Řetězec nukleotidů DNA dlouhý 147 párů bazí těsně obtáčí oktamer bazických proteinů nazývaných histony, čímž tvoří strukturu zvanou nukleozom. Nukleozomy jsou spojeny tzv. linkerem, úsekem DNA dlouhým cca 50 bazí. Tato struktura je přirovnávána ke „korálkům na niti“ a tvoří nevětvené vlákno o průměru 10 až 11 nm, které je dále skládáno podle aktuálních potřeb buňky do kompaktnějších struktur o průměru 30 nm, 120 nm a 240 nm (zde již hovoříme o kondenzovaných chromozómech při mitóze a meióze). Buněčné jádro je z 30 až 40 % tvořeno právě chromatinem.

Chromatin se z hlediska kompaktnosti, resp. míry jeho kondenzace, rozděluje na euchromatin a heterochromatin. Euchromatin je méně kondenzovanou frakcí chromatinu, jeho struktura je rozvolněná a tedy více přístupná transkripční mašinérii eukaryotické buňky, proto jsou v oblastech euchromatinu zastoupeny aktivně transkribované geny. Naproti tomu heterochromatin je více kondenzovanou frakcí a dále se dělí na konstitutivní, obsahující hlavně geneticky neaktivní oblasti, a fakultativní, který je neaktivní pouze v určitých typech buněčných linií či pouze v určitém čase, zatímco v jiných je aktivně transkribován. Heterochromatin se nachází hlavně v telomerických oblastech a v oblasti centromery, heterochromatinem je například i celý neaktivní chromozóm X savců (Park a Kuroda, 2001, Reik *et al.*, 2001), či B chromozómy vyskytující se u některých druhů rostlin (Fransz *et al.*, 2000).

#### 3.1.1 Chromozómová teritoria

Už na přelomu 70. a 80. let dvacátého století vyslovili bratři Cremerové myšlenku, že chromozómy pozorovatelné v mitóze si i po dekonenzaci v interfázním jádře zachovávají určitou míru kompaktnosti a v prostoru jádra zaujímají vymezené oblasti. Přivedl je na ni

experiment s ozařováním interfázních jader tenkými UV paprsky. V následující mitóze viděli, že poškozeny jsou vždy jen některé chromozomy (Cremer *et al.*, 1982). Tyto oblasti pojmenovali chromozómová teritoria (CT). V dalších letech s postupným zdokonalováním cytologických metod, hlavně fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) a následně tzv. chromosome painting (vícebarevná verze hybridizace na celé chromozomy), byla tato myšlenka potvrzena (shrnuto v Cremer a Cremer, 2001). Nynější otázkou je, jak organizace buněčného jádra ovlivňuje genovou expresi.

### 3.1.2 Prostorová regulace genové aktivity

Transkripce jednotlivých genů je buňkou za fyziologických podmínek pečlivě regulována, aby byla zajištěna exprese správných genů ve správný čas a na správném místě. Rozdílné aktivity genů je žádáno v různých fázích buněčného cyklu, během diferenciačních pochodů či jako odpověď na okolní podmínky. Tato regulace probíhá na několika úrovních, jejichž mechanismy jsou úzce propojeny a výslednou genovou aktivitu je třeba brát jako souhru těchto mechanismů. Lineární sekvence DNA obsahuje regulační elementy, jako jsou různé silné promotory či enhancery, které regulují úroveň transkripce příslušných genů v závislosti na dostupnosti transkripčních faktorů (Hobert, 2008). Dále je exprese regulována dvěma velmi těsně propojenými soubory mechanismů – epigeneticky a prostorovým uspořádáním chromatinu.

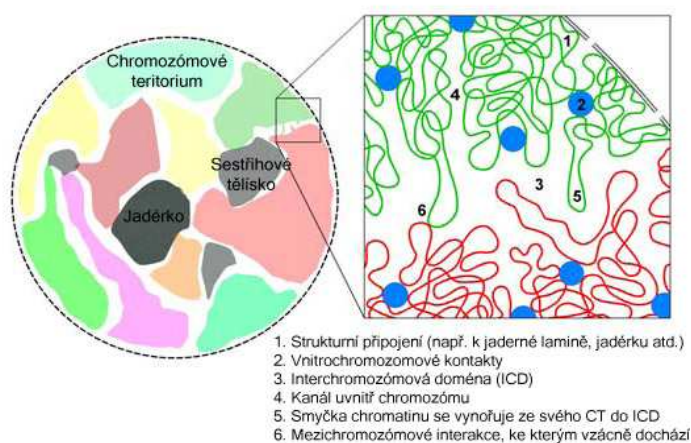
Prostorové uspořádání chromatinu má značný vliv na expresi genů. Fyzická přístupnost transkripčních faktorů a RNA polymeráz k DNA je ovlivněna mírou kondenzace chromatinu. Geny, nacházející se v oblasti heterochromatinu, jejichž promotory jsou pro polymerázy nedostupné, nejsou transkribovány. Jedním z nejdiskutovanějších témat jsou tzv. transkripční továrny. Oproti dřívější představě, kdy k chromatinovému vláknu míří polymeráza a zahajuje transkripci, četné cytologické studie navrhují opačný přístup. K pevně ukotveným shlukům RNA polymeráz o průměru cca 70 nm (Iborra *et al.*, 1996) se posunuje chromatin a k transkripci dochází protahováním smyčky rozvolněného chromatinového vlákna skrze polymerázovou jednotku. Nad tímto tématem ovšem zůstává spousta otazníků, zejména jak se tyto továrny formují, co je jejich stavební součástí a jaký je jejich počet - odhady se pohybují od několika stovek po mnoho tisíc (Cook, 2009). Dále není známo, jsou-li zformovány již před samotnou expresí nebo se objeví jako důsledek v místě, kde jsou akumulovány geny s vysokou expresí (Sutherland a Bickmore, 2009). Řadou autorů byly napsány separáty podporující (Osborne *et al.*, 2004, Xu a Cook, 2008) i

odporující (Femino *et al.*, 1998, Darzacq *et al.*, 2007) tomuto modelu transkripce, resp. zřejmě není obecně platný pro všechny lokusy. Podstatné pro tuto studii však je, že tato prostorová regulace je možná a geny si pro svou transkripci musejí takříkajíc dojit.

Vztah mezi pozicí chromozómových teritorií, pozicí genů na nich umístěných a transkripční aktivitou těchto genů shrnují Branco a Pombo (2006a) a předkládají tři možné modely.

### 3.1.3 Model interchromozómových domén (CT-ICD model)

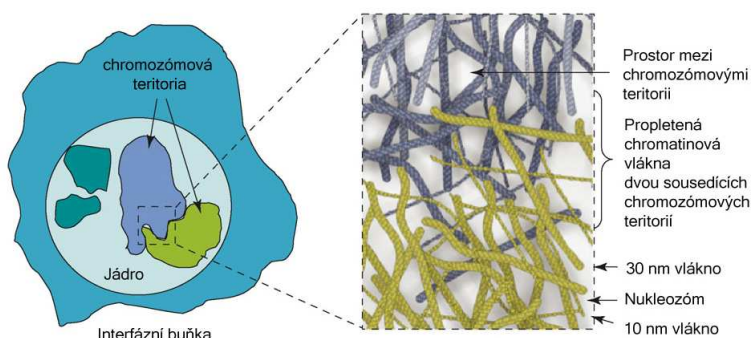
Tento model vznikl na základě pozorování, kde v jádře se odehrává transkripce a sestřih mRNA vzhledem k chromozómovým teritoriím (Zirbel *et al.*, 1993). Hledaný signál se akumuloval mimo chromozómová teritoria a tato část jádra evidentně separující CT byla pojmenována interchromozómová doména (ICD), vzhledem připomínající síť kanálů rozprostírající se napříč celým jádrem, umožňující přístup proteinů (zejména zprostředkávajících transkripci) k chromatinu. Dle tohoto modelu jsou aktivně transkribované geny umístěny na okraji CT, zatímco neaktivní uvnitř, kde je limitován přístup polymeráz a transkripčních faktorů. Veškerý transkripční aparát je umístěn právě v interchromozómové doméně. Geny nebo celé genové klastry se mohou ve smyčce oddělit od svého CT, tato chromatinová smyčka pronikne do interchromozómové domény a dojde k zahájení transkripce (Volpi *et al.*, 2000). Dále jsou v tomto modelu CT rozdělena na menší, zhruba 1 Mbp domény, kde je chromatin dále skládán nad 30 nanometrovou strukturu, resp. do více komplexních struktur. A tyto domény jsou ještě rozděleny na 1 kbp smyčky, které pronikají do interchromozómové domény. Dle tohoto modelu také nedochází k mísení CT, smyčky chromatinu jednoho CT nezasahují do oblasti jiného CT (viz obrázek č. 1)



**Obr. č. 1:** Model interchromozómových domén. Hlavní odlišností od ostatních modelů je přítomnost interchromozómové domény (3). Upraveno dle Branco a Pombo

### 3.1.4 Mřížkový model

Popisovaný model (viz obr. č. 2) byl navržen po zkoumání jádra pomocí elektronového spektroskopického zobrazování (electron spectroscopic imaging = ESI). Tato metoda zjišťuje rozdílné ztráty energie elektronů při kontaktu s různými látkami, je tak možné rozlišit mezi proteiny s vysokým obsahem atomů dusíku a nukleovými kyselinami obsahujícími atomy síry. Takto vznikla mapa jádra s nanometrovým rozlišením (Deghani *et al.*, 2005). Dle tohoto modelu je chromatin organizován v 10 nm a 30 nm vlákna s odlišnými lokálními koncentracemi v jádře. Protirečí modelu interchromozómových domén, ESI žádné oblasti bez chromatinu neobjevila. Výše popisované interchromozómové domény jsou prostě místa s nízkou koncentrací 10 nebo 30 nm vláken chromatinu. Taktéž model nepočítá s vyšší organizací chromatinu než 30 nm vlákno, nebyly pozorovány žádné 1 Mpb a 1 kbp domény. Dle tohoto modelu také dochází k mísení sousedících CT. Problémem tohoto modelu jsou však oblasti vysoce kondenzovaného heterochromatinu, kde nejde rozlišit, zda se jedná pouze o velkou místní koncentraci chromatinových vláken, nebo jde o komplexnější strukturu. Druhým problémem je nemožnost rozlišit mezi DNA a RNA. RNA tak může dávat falešný signál a vyplňovat interchromozómové domény.

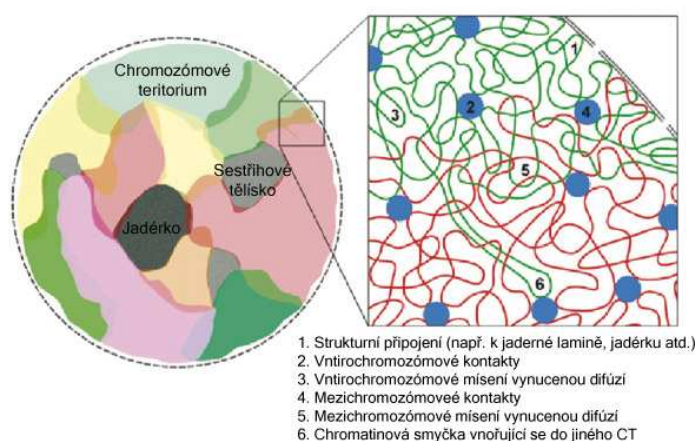


**Obr. č. 2:** Mřížkový model jádra. Pomocí ESI nebyly pozorovány interchromozómové domény, chromatin je složen z vláken o průměru 10 a 30 nm v různých lokálních koncentracích. Upraveno dle Branco a Pombo

### 3.1.5 Model interchromozómové sítě (ICN model)

Fyzickou separaci CT interchromozómovou doménou nepodporují experimentálně zjištěná data o dynamice chromatinu a frekvence translokací (Hlatky *et al.*, 2002). Ačkoliv jsou chromatinové domény, co se týče pozice, poměrně stabilní, jednotlivé lokusy difundují v živých buňkách o 0,4  $\mu\text{m}$ , popsán je dokonce posun o 1,5  $\mu\text{m}$  (Chubb *et al.*, 2002). Dochází tak k poměrně významnému mísení CT, což protirečí výše popsanému modelu

CT-ICD. Buňky mají tkáňově specifický expresní profil, kterému odpovídá prostorové uspořádání chromatinu. S přihlédnutím k tomuto modelu není překvapivé, že dochází také k tkáňově specifickým translokacím přesně odpovídajícím míře promísení příslušných CT v těchto buňkách. Tyto výsledky byly získány pomocí pokročilejší metody *in situ* hybridizace, tzv. Cryo-FISH, provedené na 150 nm tenkých zmražených tkáňových řezech (Branco a Pombo, 2006b). Model byl pojmenován jako model interchromozómové (někdy zmiňován jako interchromatinové) sítě a je zobrazen na obrázku č. 3.



**Obr. č. 3:**

Model interchromozómové sítě. Na obrázku je možné vidět vzájemné propletení chromatinu sousedících CT. Upraveno dle Branco a Pombo

## 3.2 Epigenetická regulace

Epigenetickou regulací se rozumí široký soubor mechanismů, které dědičně ovlivňují genovou expresi beze změny primární genetické informace zapsané v sekvenci deoxyribonukleotidů. Epigenetické modifikace zahrnují jak modifikaci přímo DNA, tak nejrozmanitější modifikace aminokyselin koncových řetězců histonů. Zásadní roli hraje epigenetika při embryogenezi a při vývoji obecně. Epigenetické procesy nepůsobí samostatně, genovou aktivitu komplexně reguluje jejich kombinace (Vyskot, 2010).

### 3.2.1 Metylace DNA

Metylování je u eukaryot pouze jeden typ báze, a to cytosin, konkrétně na 5. uhlíku pyrimidinového kruhu. Jedná o enzymatický proces, kde DNA metyltransferáza (S-adenosyl-L-methionine:DNA-cytosin-5-methyltransferasa, EC 2.1.1.37) přenáší metylovou skupinu z S-adenosylmethioninu (SAM) na cytozin. SAM je zdrojem metylové

skupiny pro všechny metylace odehrávající se v buňce. Methylace DNA představuje mechanismus regulace genové exprese u většiny vyšších eukaryotických organismů a u všech bez výjimky má represivní účinek. Přítomnost 5-metylcytosinu je signálem pro vazbu metyl-DNA vazebných proteinů (jako např. HP1) nebo pro enzymy modifikující histony (Vyskot, 2010).

Poměr metylovaných cytosinů ku všem cytosinům vyskytujícím se v genomu označujeme jako metylační index. U savců činí tento metylační index asi 10 %, u velkých genomů krytosemenných rostlin přesahuje tento index i 30 %.

**Metylační index:**  $\text{obsah mC}/(\text{mC}+\text{C}) \times 100 \%$

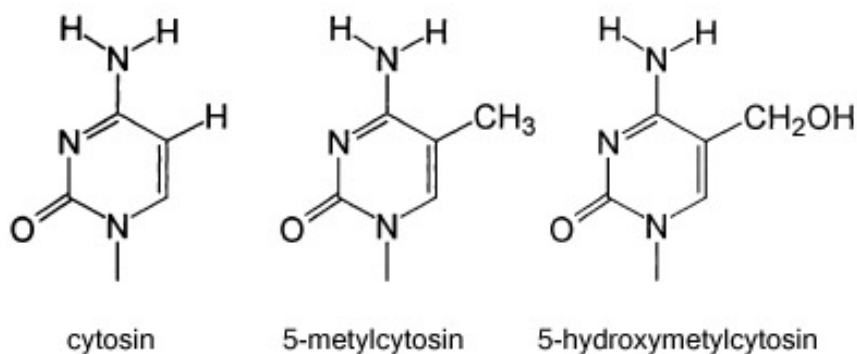
Rozmístění 5-mC v genomu není rovnoměrné. Nejvyšší hustota 5-mC je v heterochromatinových oblastech, jako jsou centromery či subtelomerické repetitivní sekvence DNA. Vysoce metylované jsou zejména DNA transpozony a retroelementy, což souvisí s obranným mechanismem buňky ve vztahu k aktivitě těchto mobilních sekvencí. U živočichů je 5-mC přítomen pouze v CpG dinukleotidech, naproti tomu u rostlin jsou metylovány i jiné sekvence, nejčastěji CpNpG a CpNpN, kde N představuje libovolný nukleotid (Bird, 2002). Tyto sekvence jsou u živočichů sdruženy v tzv. CpG ostrovech a jsou často umístěny v promotorových oblastech genů, obsaženy jsou v cca 60 % promotorů. U aktivně transkribovaných genů jsou tyto sekvence demetylované, zatímco u neaktivních jsou metylovány, kde methylace zabraňuje vazbě transkripčních faktorů nebo je signálem pro navázání inhibičních a chromatin-remodelujících komplexů (Bird, 2002). U rostlin jsou podobně metylovány mimo transkripčně neaktivních oblastí heterochromatinu též promotory neaktivních genů. Z aktivně transkribovaných bylo metylováno v promotorech jen asi 5 % (Zhang *et al.*, 2010).

### 3.2.2 Hydroxymethylace DNA

Hydroxymetylcytosin (5-hmC) byl jako epigenetická značka poprvé identifikován v buňkách jater a mozku krys (Penn *et al.*, 1972). U rostlin byla prokázána přítomnost hydroxymetylcytosinu (Yao *et al.*, 2012), dosud však nebyla zjištěna a potvrzena jeho funkce. *In vitro* může vznikat 5-hmC ozářením 5-mC v provzdušněném vodném roztoku UV zářením (Valinluck *et al.*, 2004), *in vivo* může být 5-mC oxidován na 5-hmC v přítomnosti ROS (Le *et al.*, 2011). Fyziologicky, čili ne jako produkt oxidativního



poškození, byl *in vivo* popsán pouze jediný způsob, a to oxidací 5-mC katalyzovanou skupinou 2-oxoglutarát oxygenáz, enzymů TET1 a TET2 (Le *et al.*, 2011). Tyto enzymy jsou hojně exprimované v embryonálních kmenových buňkách a regulují expresi genů souvisejících s udržením stavu pluripotence těchto buněk, tím, že udržují hladinu 5-hmC v CpG ostrovech jejich promotorů. Experimentální knock-out Tet genů vede k zahájení diferenciace (Fitz *et al.*, 2011). Ve chvíli, kdy embryonální kmenová buňka nastoupí jednu z možných drah diferenciace, klesne exprese TET enzymů, sníží se celková hladina hydroxymethylace o zhruba 40 % a geny udržující stav pluripotence jsou umlčeny metylací (Koh *et al.*, 2011, Kinney *et al.*, 2011). Zajímavá je též situace u indukovaně pluripotentních buněk, jejichž hladina 5-hmC a exprese Tet1 a Tet2 je shodná s embryonálními kmenovými buňkami, přičemž fibroblasty, z nichž tyto buňky vznikly nevykazovaly žádnou expresi Tet1 a 2 a měly mnohem nižší zastoupení 5-hmC (Koh *et al.*, 2011). Úloha 5-hmC v buňce zatím není zcela objasněna. Jeho přítomnost vede ke zvýšené expresi genů, v jejichž promotorech je obsažen. Může být mezistupněm v demethylaci cytosinů, též může přímo měnit lokální strukturu chromatinu, protože úseky obsahující 5-hmC namísto 5-mC nejsou rozeznány metylcytosin-vazebnými proteiny a nedojde k následné reorganizaci chromatinu (Shock *et al.*, 2011). Cytosin a popsané modifikace jsou schematicky zobrazeny na obrázku č. 4.



**Obr. č. 4:** Schémata cytosinu a jeho modifikací, 5-metylcytosinu a 5-hydroxymetylcytosinu. Upraveno dle Tardy-Planechaud

### 3.2.4 Modifikace N-terminálních konců histonů

Jádro nukleosomu, okolo kterého se obtáčí DNA, tvoří oktamer histonů, je složen z tetrameru H3-H4 a dvou dimerů H2A-H2B. Histony jsou bazické proteiny tvořené

globulární doménou, tzv. tělo histonu, a lineární fibrilární doménou čnící ven z nukleosomu. Právě tato aminoterminální doména je místem četných modifikací, které mění afinitu k DNA a tím i lokální strukturu chromatinu a přístupnost DNA k transkripčním a regulačním faktorům. Různé kombinace těchto modifikací tvoří výsledný stav chromatinu a dynamicky mohou měnit euchromatin v heterochromatin a naopak. Vytváří tak další komplexní systém regulace genové exprese a podstatně rozšiřují informaci uloženou v čtyřpísmenném genetickém kódu. Souhrnně se hovoří o tzv. histonovém kódu (shrnují Jenuwein a Allis, 2001). Modifikací je velké množství (metylace, acetylace, fosforylace, ubiquitinylace a více než stovka dalších) a enzymy, které katalyzují přenos modifikačních skupin, jsou vysoce specifické, přímo pro konkrétní pozici na histonech. Modifikace v těchto konkrétních pozicích má také svou specifickou funkci, např. metylace histonu H3 na lysinu 9 (H3K9) je spojena s formováním heterochromatinu, metylace H3 v lysinu 4 (H3K4) se objevuje převážně v transkripčně aktivních oblastech (Soppe *et al.*, 2002).

### **3.3 Protoplastové kultury**

Protoplast je buňka zbavená buněčné stěny, je možné je odvodit z buněk bakterií, hub a rostlin. Dříve se pro jejich izolaci využívaly mechanické metody, získané protoplasty však neregenerovaly buněčnou stěnu, nebyla možná jejich další kultivace a vhodné tak byly pouze pro studium osmotických jevů. Od 60. let se využívá pro degradaci buněčné stěny lytických enzymů (shrnuje Cocking, 2000). Takto izolované protoplasty je již možné kultivovat, při vhodných podmínkách *in vitro* kultur je možné z protoplastů regenerovat celé nové rostliny (Takebe *et al.*, 1971), fúze protoplastů izolovaných z rozdílných druhů se využívá ve šlechtitelství a v biotechnologiích (Kao *et al.*, 1974). V současnosti jsou protoplasty využívány jako model pro studium buněčné dediferenciace (Ondřej *et al.*, 2009).

#### **3.3.1 Jevy doprovázející protoplastizaci**

Terminálně diferencované rostlinné buňky si na rozdíl od živočišných zachovávají možnost dediferencovat a za vhodných podmínek nastoupit novou buněčnou dráhu a diferencovat v jiný buněčný typ. Výbornou demonstrací tohoto jevu je právě protoplastizace, kdy například protoplasty izolované z mezofylových buněk listů mohou při následné *in vitro* kultivaci znovu vstoupit do buněčného cyklu a regenerovat v buňky

kořene nebo rovnou v celou novou rostlinu. Dobře popsáním fenoménem při této dediferenciaci je dekondezace heterochromatinu, která je dobře pozorovatelná ve fluorescenčním mikroskopu u rostlin jako je *Arabidopsis*, tabák a okurka, protože u těchto rostlin tvoří v interfázním jádře heterochromatin tzv. chromocentra, oblasti se silným signálem po obarvení DAPI (Tessadori *et al.*, 2007, Zhao *et al.*, 2001, Ondřej *et al.*, 2009). Tato chromocentra sestávají hlavně z centromerického, pericentromerického a telomerického heterochromatinu se všemi náležitostmi transkripčně neaktivního chromatinu, jako je metylovaná DNA a dimetylace histonu H3 na devátém lysinu. Nachází se tu také umlčené mobilní genetické elementy (Tessadori *et al.*, 2004). Okamžitě po izolaci dochází k jejich dekondezaci a při následné kultivaci zpětně rekondezují, obnovená chromocentra se objevují zhruba třetí den po izolaci, v přesné shodě s repetitivy nacházejícími se v chromocentrech (Tessadori *et al.*, 2007, Ondřej *et al.*, 2009). Takto dekondezovaný heterochromatin si ponechává svoje epigenetické značky, navzdory tomu, že je dekondezovaný, zůstává transkripčně neaktivním (Tessadori *et al.*, 2007). Další zajímavostí je, že zpětná rekondezace je postupný proces a zdá se, že rychlost s jakou repetice rekondezují závisí na jejich velikosti. Největší (45S) zůstávají mírně kondenzované a tvoří reziduální chromocentra, menší pericentromerické repetice, jako 180bp nebo 5S kondenzují později samostatně a následně splynou s chromocentrem tvořeným již kondenzovanou 45S, následuje subtelomerická SAT1 a malé rozptýlené repetice, transpozony, zůstávají dekondezované i pátý den po izolaci (Tessadori *et al.*, 2007, Ondřej *et al.*, 2009). Rovněž se nijak dramaticky nemění expresní profil těchto buněk po protoplastizaci, dochází však k reaktivaci transpozónů, jejich přemístování v genomu či k zvětšování počtu jejich kopií, což může vést až ke změně fenotypu regenerantů, zde hovoříme o somaklonální variabilitě takto vzniklých rostlin (Smulders a de Klerk, 2010).

### **3.3.2 Vliv stresu na de- a rekondezaci repetice**

Společným znakem všech *in vitro* kultur je produkce a hromadění volných kyslíkatých radikálů (ROS z anglického reactive oxygen species) a míra, do jaké jsou schopny poškodit buňku závisí na přítomnosti antioxidantů, jako je například askorbát, glutathion, karotenoidy, fenolické látky a další (Bařková *et al.*, 2008), a na aktivitě antioxidantních enzymů. Oxidativní stres je považován za jednu z hlavních příčin neúspěšnosti kultivace protoplastů a může vést až k buněčné smrti, stejně jako je tomu při napadení patogenem

(Papadakis a Roubelakis-Angelakis, 2002). Nejvyšší zjištěná hladina volných kyslíkatých radikálů je těsně po izolaci protoplastů a s časem kultivace se postupně snižuje. Ihned po izolaci je rovněž minimální aktivita antioxidantních enzymů, jako je kataláza a askorbát peroxidáza (Ondřej *et al.*, 2010). Míru dekondezace a rychlost zpětné rekondenzace repetice lze ovlivnit přidávkem nízkomolekulárního antioxidantu, kyseliny askorbové, která ve vhodném množství snižuje míru dekondezace repetice, snižuje množství volných kyslíkatých radikálů a zvyšuje expresi antioxidantních enzymů, čímž pomáhá buňkám odvozeným z protoplastů znovu vstoupit do buněčného cyklu a dělit se (Ondřej *et al.*, 2010).

### **3.3.3 Transkripční aktivita spojená s kultivací protoplastů**

Protoplasty musí pro následnou úspěšnou kultivaci splnit několik náležitostí. Předně se musí vyrovnat s hladinou volných kyslíkatých radikálů, dále musí regenerovat buněčnou stěnu a vzniknuvší buňky musí znovu vstoupit do buněčného cyklu, začít syntetizovat potřebné produkty a začít se dělit. Veškerou tuto aktivitu lze sledovat na molekulární úrovni prostřednictvím aktivity příslušných genů, z nichž některé jsou popsány v této kapitole.

Všechny aerobní organismy se musí chránit před toxickými účinky ROS, které jako produkty metabolismu poškozují jejich buňky. Protoplastizace je pro rostlinnou buňku stresovou situací a proto musí aktivovat antioxidantní enzymy. Mezi ně patří mimo jiné kataláza (CAT, EC 1.11.1.6), askorbát peroxidáza (APX, EC 1.11.1.11) a glutathion peroxidáza (GPX, EC 1.11.1.12), všechny tři se účastní přeměny peroxidu vodíku na vodu a molekulární kyslík. Kataláza má vysoké číslo přeměny  $H_2O_2$ , ale má k němu nízkou afinitu, proto je potřeba i aktivity zbylých dvou zmíněných enzymů, které mají vysokou afinitu k peroxidu vodíku, protože i nízká reziduální koncentrace peroxidu vodíku může být pro buňku nebezpečná, spolu se superoxidovým aniontem může vytvářet reaktivní hydroxylový radikál (Arora *et al.*, 2002). Kataláza je umístěna v peroxisomech, askorbát peroxidáza má několik forem, cytosolární, mitochondriální, peroxisomovou, je lokalizována v plastidech i v apoplastu, glutathion peroxidáza je lokalizována v cytosolu a v chloroplastech (Piterková *et al.*, 2005).

Protoplasty při úspěšné kultivaci regenerují svou buněčnou stěnu do 48 hodin po izolaci (Yang *et al.*, 2008). Zformování buněčné stěny je dvoukrokový proces. Prvně je potřeba syntetizovat potřebné stavební části a poté je umístit a zesíťovat tak, aby z nich vznikla

funkční buněčná stěna, která buňky mechanicky chrání, ale zároveň je dynamická a dovoluje její přestavbu. Xyloglukany jsou hlavním typem hemicelulóz, které propojují dvě sousedící celulósová vlákna. Xyloglukan endo-transglukosyláza/hydroláza (XTH, EC 2.4.1.207) je enzym katalyzující hydrolytické štěpení xyloglukanových řetězců a připojení nově vzniklých štěpů na neredukující konec jiného xyloglukanového řetězce nebo na jiný polysacharid, zejména celulózu (Maris *et al.*, 2009). Tím pádem je XTH jedním z nejdůležitějších enzymů pro syntézu a remodelaci buněčné stěny, ke které dochází při růstu rostliny nebo právě při kultivaci protoplastů. I přestože v kultuře buněk *Cucumis sativus* dochází k intenzivnímu růstu buněk a jejich dělení, nezjistili Malinowski *et al.* (2004) pomocí hybridizačních technik akumulaci transkriptů XTH1 a XTH3, dokud nedošlo k zahájení embryogeneze. Posléze byla nejintenzivnější transkripce lokalizována v primordiích nově vznikajících listů, tedy v místech, kde dochází k diferenciaci v nový orgán. Tato zjištění naznačují, že exprese genů z rodiny XTH je úzce spojena s diferenciací a vývojovými procesy (Malinowski *et al.*, 2004)

Zbaveny cytotoxického a genotoxického rizika v podobě vysokých hladin ROS a s plně regenerovanou buněčnou stěnou, mohou již buňky odvozené z protoplastů znovu vstoupit do buněčného cyklu, čili procházet S-fází a buněčným dělením. Jako marker těchto dějů může sloužit exprese genů kódujících ribonukleotid reduktázu (RNR, ribonukleosid-difosfát reduktáza, EC 1.17.4.1) a proliferačního antigenu buněčného jádra (PCNA). Ribonukleotid reduktáza je enzym katalyzující přeměnu ribonukleotidů na deoxyribonukleotidy, jejichž dostatečné množství je podmínkou pro syntézu DNA v S-fázi buněčného cyklu, je přítomna v genomu všech organismů, dokonce i některé viry ji kódují. Funkční jednotkou je tetramer složený ze dvou velkých podjednotek R1 a dvou malých podjednotek R2 (Andersson, 2008).

PCNA je nutným kofaktorem syntézy DNA, patří do rodiny tzv.  $\beta$ -svorek, u rostlin je tvořen třemi podjednotkami (homotrimer) poskládanými do tvaru prstence s vnitřní stranou kladně nabitou, která interaguje s DNA. Na DNA je nakládán za účasti ATP komplexem zvaným RFC (replikační faktor C), vždy na 3' konec RNA primeru syntetizovaného primázou před vlastní elongací DNA. A poté se na PCNA váže samotná katalytická podjednotka DNA polymerázy  $\delta$ , díky specifitě vazby vždy ve směru prodlužování vlákna, lze tak také rozlišit nově vznikající vlákno od templátového, což je důležité např. pro opravy chybného párování. PCNA zvyšuje procesivitu DNA polymerázy z desítek na tisíce nukleotidů (Moldovan *et al.*, 2007). Exprese genu pro PCNA se mění v průběhu

buněčného cyklu, největší množství PCNA je při přechodu z G1 do S fáze, PCNA je tak možno použít jako marker buněčné proliferace (van Dienst *et al.*, 1998).

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Biologický materiál

Semena *Cucumis sativus* L. cv. Marketer (CZ 09 H39 00121). Semena byla poskytnuta Výzkumným ústavem rostlinné výroby Praha - Ruzyně.

### 4.2 Seznam použitých chemikálií

Agar (Duchefa, Nizozemsko), alanin (Duchefa, Nizozemsko), askorbová kyselina (Duchefa, Nizozemsko), 6-benzylaminopurin (BAP, Sigma Aldrich, USA), cellulasa Onozuka R 10 (Duchefa, Nizozemsko), dihydrogenfosforečnan draselný (Lachema, Česká republika), dusičnan draselný (Lachema, Česká republika), ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA, Sigma Aldrich, USA), ethanol, fluorescein diacetát (FDA, Serva, USA), glukosa (Lach-ner, Česká republika), hydrogenfosforečnan draselný (Lachema, Česká republika), Gamborg B5 medium včetně vitamínů (B5 medium, Duchefa, Nizozemsko), glukosa (Lachema, Česká republika), glutamin (Serva, USA), glycin (Serva, USA), hexadecyltrimethylamoniumbromid (CTAB, Sigma Aldrich, USA), chloramin B (Bochemie, Česká republika), chlorid draselný (Lachema, Česká republika), chlorid sodný (Lachema, Česká republika), chlorid vápenatý bezvodý (Lach-Ner, Česká republika), 3-indolylmásečná kyselina (IBA, Serva, USA), jodid draselný (Lach-Ner, Česká republika), kasein hydrolyzát (Duchefa, Nizozemsko), macerozym R 10 (Duchefa, Nizozemsko), mannitol (Duchefa, Nizozemsko), 2-merkptoetanol, 2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina (MES, Duchefa, Nizozemsko), Murashige a Skoog medium (MS medium, Duchefa, Nizozemsko), myo-inositol (Duchefa, Nizozemsko),  $\alpha$ -naftyloctová kyselina (NAA, Sigma Aldrich, USA), octan sodný (Lachema, Česká republika), prolin (Duchefa, Nizozemsko), sacharosa (Duchefa, Nizozemsko), síran hořečnatý heptahydrát (Lach-Ner, Česká republika), tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris, Sigma Aldrich, USA).

### 4.3 Seznam použitých roztoků a médií

Roztok	Složení	Množství (g/l)
<b>PGly</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,0272
	KNO <sub>3</sub>	0,101
	CaCl <sub>2</sub> (bezvodý)	1117,6
	KI	0,0008
	MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,246
	glycin	11,15
	glukóza	18,016
	MES	0,5857
	manitol	65,58
	pH 5,8	
	Sterilizace filtrací	
<b>Enzymatický roztok PGly</b>	celuláza Onozuka R-10	10
	macerozym Onozuka R-10	2,5
	pH 5,8 Sterilizace filtrací	
<b>20% Sacharosa</b>	Sacharosa	200
	pH 5,8 Sterilizace filtrací	
<b>OK médium</b>	MS médium, včetně vitamínů (Murashige & Skoog, 1962)	4,405
	Sacharosa	20
	Agar	8
	IBA	0,0001
	BAP	0,0001
	pH 5,8	
	Sterilizace autoklávováním	
<b>LCM1</b>	B5 médium	3,164
	Inositol	0,9
	Kyselina askorbová	0,002
	glycin	0,008
	Glutamin	0,02
	Kasein hydrolyzát	0,1
	MES	0,586
	Manitol	70
	Sacharóza	10
	Glukóza	5
	NAA	0,001
	BAP	0,0005
	Alanin	0,004
	Prolin	0,002
	pH 5,8 Sterilizace filtrací	



<b>Roztok</b>	<b>Složení</b>	<b>Množství (g/l)</b>
<b>EDTA 0,5M</b>	EDTA pH 8 Autoklávováno	186,1
<b>Tris 1M</b>	Tris pH 8 Autoklávováno	121,1
<b>5x TBE</b>	HBO2 Tris-HCl 0,5M EDTA, pH 8 filtrováno	27,5 54 g 20 ml
<b>CTAB pufr</b>	CTAB NaCl 1M Tris, pH 8 0,5M EDTA, pH8 2-merkaptóetanol filtrováno	20 81,8 100 ml 40 ml 2 ml

#### **4.4 Seznam použitých komerčních kitů**

FastStart PCR Master (Roche, Německo)

GoTaq® DNA Polymerase (Promega, USA)

Imprint DNA Modification Kit (Sigma-Aldrich, USA)

LightCycler® Fast Start DNA Master<sup>Plus</sup> SYBR Green I (Roche, Německo)

MethylFlash Hydroxymethylated DNA Quantification Kit (Colorimetric) (Epigentek, USA)

MethylFlash Methylated DNA Quantification Kit (Colorimetric) (Epigentek, USA)

RQ1 RNase-free DNase (Promega, USA)

Spectrum<sup>TM</sup> Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich, USA)

Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Německo)

GenElute<sup>TM</sup> PCR Clean-up Kit (Sigma-Aldrich, USA)

#### **4.5 Vybavení laboratoře**

Spektrofotometr BioPhotometer (Eppendorf, Německo), UV Transiluminátor UVT-20M (Herolab) + fotoaparát Kodak EDAS 290, analytické váhy (Sartorius, Německo), centrifuga Rotofix 32A (Hettich Zentrifugen, Německo) centrifuga 5414 D (Eppendorf,

Německo), centrifuga 5804 R (Eppendorf, Německo), digitální předvážky (KERN, Německo), digitální pH metr MV-87 (Practictronic, Německo), elektromagnetická míchačka (IKA, Německo), flowbox Holten Lamin Air HH 1.2 Plus (Heto-Holten, Dánsko), inkubátor MELAG 306 (P-Lab a.s, Česká republika), minicentrifuga MCF 2360 (Vitrum, Česká republika), multifunkční modulární reader Infinite M200 (Tecan, Švýcarsko), nanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologist, USA), skříň termostatovaná ET 618 (Lovibond, Německo), světelný mikroskop Olympus CK40 (Olympus Optical, Japonsko), světelný a fluorescenční mikroskop Olympus BX60 (Olympus Optical, Japonsko) s CCD kamerou (CoolSnap, Photometrics, USA), termoblok CHB-202 (BIOER technology, Čína), termocykler XP (BIOER technology, Čína), LightCycler 2.0 (Roche, Německo).

#### **4.6 Pěstování pokusných rostlin**

Semínka *Cucumis Sativus* L., cv. Marketer byla vysterilizována v 2,5% roztoku chloraminu po dobu 30 minut a následně byla vysázena do Petriho misek na vlhký filtrační papír. Po naklíčení (5 dní v inkubátoru při teplotě 25 °C ve tmě) byla semínka přesazena na OK médium do plastových boxů. Ty byly umístěny do růstové místnosti s režimem 16 hodin světlo/ 8 hodin tma o světelné intenzitě 32-36  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  a teplotě 22 °C na 14 - 21 dní.

#### **4.7 Izolace protoplastů**

Výchozím materiálem pro izolaci byly apikální mladé lístky *in vitro* pěstovaných rostlin. Ve sterilním prostředí flowboxu byly nařezány skalpelem na 1 mm proužky v enzymatickém roztoku PGly (1% celulóza, 0,25% macerozym) a takto ponechány po dobu 18 hodin v inkubátoru při 25 °C. Tato hrubá protoplastová suspenze byla přefiltrována přes uhelónové sítko 72  $\mu\text{m}$  s následným promytím 2 ml roztoku PGly. Poté zcentrifugována při 80g po dobu 5 minut. Supernatant byl odstraněn a sediment resuspendován ve 4 ml 20% sacharózy, převrstven 2 ml PGly tak, aby nedošlo k promíchání obou vrstev a zcentrifugován při 80g 10 minut. Flotující protoplasty na rozhraní obou kapalin byly odebrány pasteurovou pipetou, resuspendovány v 4 ml PGly a centrifugovány za stejných podmínek. Promývací roztok PGly byl odebrán a protoplasty byly resuspendovány v 1 ml kultivačního média LCM1. Po stanovení hustoty a životnosti

byly protoplasty zředěny na koncentraci  $3 \times 10^5$ /ml a jejich suspenze přenesena pasterovou pipetou do kultivačních boxů o objemu 25 cm<sup>3</sup>. Z této suspenze bylo v každém opakování odebráno pasterovou pipetou cca 1 ml ihned po izolaci a následně v časových intervalech 24, 48 a 72 hodin po izolaci. Odebraný vzorek byl centrifugován 5 minut při 80g, supernatant odstraněn a protoplasty na dně zkumavky (ve velmi malém množství LCM1 média) přeneseny do mikrozkušavky. Poté byly zality tekutým dusíkem a uchovávány při -80 °C.

#### **4.8 Stanovení hustoty a životnosti protoplastů**

Koncentrace protoplastů byla stanovena jejich počítáním pomocí bürkerovy komůrky v inverzním mikroskopu a následně byla stanovena jejich životnost pomocí fluorescenčního mikroskopu (Olympus BX 60). 1 ml média LCM1 byl smíchán s 10 µl pracovního roztoku fluorescein diacetátu (FDA). Na podložní sklo byla přenesena kapka protoplastů v LCM1 médiu. K protoplastům bylo přidáno 10 µl směsi média LCM1 s FDA. Ve fluorescenčním mikroskopu, byl spočten poměr živých protoplastů (fluoreskují zeleně při použití U-MWB2 hranolu, esteráza živých protoplastů rozštěpí FDA na fluorescein) k jejich celkovému počtu. Neživé protoplasty fluoreskují červeně.

#### **4.9 Izolace DNA**

K rozmraženým protoplastům v mikrozkušavce byl napipetován 1 ml směsi CTAB a 2-merkaptetanolu (smícháno v poměru 4 µl merkaptetanolu na 1 ml CTAB) o teplotě 65 °C. Roztok byl inkubován 1,5 hodiny při 65 °C v termobloku. Po inkubaci bylo k roztoku přidáno 600 µl směsi chloroform: izoamylalkohol (poměr 24:1) a po promíchání byl roztok centrifugován 15 min v chlazené centrifuze (4 °C) při 13 500 g. Po centrifugaci bylo k supernatantu přidáno 60 µl 3M octanu sodného a po jedné minutě protřepávání 500 µl izopropanolu o teplotě -20 °C. Po promíchání byl roztok inkubován při -20 °C v mrazničce 30 minut. Poté byl roztok centrifugován 30 min v chlazené centrifuze (4 °C) při 13 500 g. Po centrifugaci byl supernatant odstraněn a ke sraženině DNA bylo přidáno 200 µl 70% etanolu a roztok byl opět centrifugován 15 min v chlazené centrifuze (4 °C) při 13 500 g. Po centrifugaci byl etanol opatrně slit a sražená DNA na vzduchu vysušena. K vysušené DNA bylo přidáno 50 µl sterilní vody. Koncentrace DNA byla stanovena pomocí přístroje Photometer. Nakonec byl vzorek v mikrozkušavce zamražen na -20 °C.

#### **4.10 Izolace RNA**

RNA byla izolována pomocí Spectrum™ Plant Total RNA kitu (Sigma-Aldrich), postupováno bylo dle návodu výrobce. Zmražená suspenze protoplastů nebyla třena v třecí misce s tekutým dusíkem, lyzační roztok byl aplikován přímo na suspenzi v mikrozkuvkách předtím uskladněných v -80 °C. Použit byl protokol A, objem vazbeného roztoku (binding solution) byl zvednut dle doporučení výrobce z 500 na 750 µl pro zvýšení výtěžnosti. Koncentrace eluované RNA byla proměřena spektrofotometricky a pohybovala se kolem 100 ng/µl. Kvalita RNA byla ověřena elektroforetickou separací v agarózovém gelu.

#### **4.11 Ošetření RNA DNázou**

K odstranění DNA byla vyizolovaná RNA ošetřena RNase-free DNase kitem (Promega). K 8,8 µl RNA bylo připipetováno 1 µl RQ1 10x pufru a 0,2 µl RQ1 DNázy. Směs byla inkubována 5 minut při 37 °C, poté byl přidán 1 µl RQ1 STOP Solution a DNáza inaktivována inkubací 10 minut při 65 °C. Reakce byla provedena v termocykléru Bioer. Kvalita RNA byla po tomto kroku ověřena elektroforetickou separací v agarózovém gelu.

#### **4.12 Přepis RNA do cDNA**

K reverzní transkripci byl využit kit Transcriptor First strand DNA kit (Roche) a postupováno bylo dle návodu výrobce. Použita byla RNA ošetřená DNázou, celkové množství v reakci 100 ng, přepisováno bylo pomocí Anchored-oligo(dT)<sub>18</sub> primerů, s využitím volitelného kroku predenaturace směsi před přidáním reverzní transkriptázy (10 minut při 65 °C). Kompletní reakční směs o objemu 20 µl byla inkubována 30 minut při 55 °C, inaktivace transkriptázy proběhla při 85 °C po dobu 5 minut, poté byla reakční směs přemístěna na led a vzniklá cDNA uchovávána při -20 °C. Celá reakce byla provedena v termocykléru Bioer. Vzorke byly proměřeny na přístroji Nanodrop.

#### **4.13 Použité primery a jejich navržení**

Primery jsou uvedeny v tabulce č. 1. K jejich navržení byl použit program Primer3, sekvence byly zjištěny z databáze GenBank, buď přímo nebo hledáním homologie se

sekvencemi uvedených genů u *Arabidopsis thaliana* ve WGS (Whole Genome Shotgun) databázi genomu okurky. Sekvence repetice 5S a SAT1 jsou použity z článku Ondřej et al. (2010), sekvence Ty1-copia z Lou a Chen (2007). Jako referenční gen pro qPCR byl použit klíčový enzym glykolýzy glycerinaldehyd 3-fosfátdehydrogenasa (GAPDH, EC 1.2.1.12). Primery byly syntetizovány a dodány firmami Invitrogen a Generi-Biotech.

**Tabulka č. 1:** Primery amplifikující oblasti sledovaných genů a repetitivních oblastí

Sledovaný gen	Primer	Sekvence	Velikost produktu (bp)
<b>GAPDH</b>	F	5'-ACATCATTCCTAGCAGCACT-3'	221
	R	5'-TTCAGTGTACCCCAAATTC-3'	
<b>APX</b>	F	5'-CTCTGGTGGTCACACATTGG-3'	209
	R	5'-CCTCATCGGCAGCATATTTT-3'	
<b>GPX</b>	F	5'-CAGCGCTTACAAAGCAAAGG-3'	198
	R	5'-GTGCAAGCAAAGTGCACAAT-3'	
<b>CAT</b>	F	5'-TTGACGATATTGGCATCC-3'	153
	R	5'-TAGCATCTTCTCCAGCA-3'	
<b>PCNA</b>	F	5'-GGTTCTCTCCTCAAGAAGGT-3'	214
	R	5'-TGATATCATCGTTACCAGCA-3'	
<b>RNR</b>	F	5'-TTTCTTTGGCTTCAAACTC-3'	187
	R	5'-AAAAAGGGTAGGAGAAGCAT-3'	
<b>XTH</b>	F	5'-AGCCCCATTTGTAGCTTCCT-3'	238
	R	5'-GAGACATTTGAGGCGGTAAGC-3'	
<b>Ty1-copia</b>	F	5'-TGCCGACATCTTTACTAAGC-3'	158
	R	5'-GAAATTTGGCTTTTATTTGG-3'	
<b>5S</b>	F	5'-GATCCCATCAGAACTCC-3'	298
	R	5'-GGTGCTTTAGTGCTGGTAT-3'	
<b>SAT1</b>	F	5'-CTGGGTGGCCTCATTTTG-3'	variabilní
	R	5'-GACCTTTGGCACCGTTGT-3'	

Pozn. velikost produktu je očekávaná velikost vypočítaná programem Primer3

#### 4.14 qPCR

K provedení kvantitativní PCR reakce byl použit kit LightCycler® Fast Start DNA Master<sup>Plus</sup> SYBR Green I, postupováno bylo dle pokynů výrobce. Celkový reakční objem

činil 20  $\mu$ l, množství cDNA v každé reakci bylo 200 ng. Negativní kontrola obsahovala namísto cDNA PCR-grade vodu. Teplotní a časový profil reakce zobrazuje tabulka č. 2.

**Tabulka č. 2:** Podmínky real-time PCR

Krok	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	10 min	1
Denaturace	95	10 s	40
Annealing	48	30 s	
Elongace	72	20 s	
Finální extenze	72	7 min	1
Analýza teploty tání	65→95 (0,1°C/s)	1 min	1
Chlazení	40	30 s	1

Získaná primární data (Cp amplifikačních křivek, melting křivky) byla zpracována v programu LightCycler Software 4.1. Další vyhodnocení proběhlo v programu MS Excel, byla použita metoda  $\Delta\Delta C_T$ . K relativní kvantifikaci byla standardem exprese GAPDH, jako kontrola byly použity hladiny exprese jednotlivých genů v listu *Cucumis sativus* L.

#### Výpočet relativní exprese metodou $\Delta\Delta C_T$

$$\text{Relativní exprese} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ vzorek} - \Delta C_T \text{ kontrola}$$

$$\Delta C_T = C_T \text{ studovaný gen} - C_T \text{ gen GAPDH}$$

### 4.15 Bisulfidická konverze

Podstatou metody je modifikace cytosinu hydrogensířičitanem sodným, který je v několika krocích konvertován na uracil, což v následné PCR reakci s takto modifikovanou DNA vede k tranzici cytosinu za thymin. Metylované cytosiny jsou před touto konverzí chráněny. K modifikaci byl využit Imprint DNA Modification kit, postupováno bylo dle pokynů výrobce. Celkové množství DNA v reakci bylo 200 ng. Modifikační proces byl prodloužen z 90 minut na 150, aby se snížilo riziko výskytu modifikované i nemodifikované DNA v konečném vzorku. Eluováno bylo 18  $\mu$ l a vzorek byl zamražen na -20 °C a dále využíván pro PCR reakce.

#### 4.16 PCR a elektroforéza

PCR reakce byly provedeny s kity FastStart PCR Master (Roche) a GoTaq® DNA Polymerase (Promega) dle návodu výrobců, zpravidla však v polovičním reakčním objemu. Teplotní a časové profily reakcí jsou zobrazeny v tabulkách č. 3 a 4.

**Tabulka č. 3:** Podmínky PCR reakce s kitem Roche

Krok	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	4 min	1
Denaturace	95	30 s	
Annealing	52	30 s	35
Elongace	72	45 s	
Finální extenze	72	7 min	1

**Tabulka č. 4:** Podmínky PCR reakce s kitem Promega

Krok	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	2 min	1
Denaturace	95	30 s	
Annealing	45	30 s	35
Elongace	72	30 s	
Finální extenze	72	5 min	1

Elektroforetická separace PCR produktů (i nukleových kyselin, např. ověření úspěšné izolace RNA či reverzní transkripce) proběhla v 1,5% agarosovém gelu v 0,5x TBE pufru. Jako markery molekulové hmotnosti byly použity 100bp Ladder (Promega, USA) a GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas, USA), oba mají stejný rozsah 100 až 1000 bp, v krocích po 100 bp.

#### 4.17 Kvantifikace metylace genomické DNA

Kvantifikace 5-mC byla provedena pomocí MethylFlash Methylated DNA Quantification Kit (Colorimetric). Stanovení bylo provedeno v jamkách dodávaných spolu s chemikáliemi výrobcem. Do jamek bylo napipetováno 80 µl roztoku ME2 (vazebný roztok). Do jedné jamky byla napipetována negativní kontrola (ME3), do druhé pozitivní kontrola (ME4) v konečném množství v jamce 5 ng a do dalších jamek bylo pipetováno 1 až 8 µl vzorku DNA, aby bylo v jamce vždy 200 ng DNA. Jamky byly inkubovány po dobu 90 min při 37 °C ve tmě. Před inkubací byly jamky vždy přikryty parafilmem. Po inkubaci byl roztok odstraněn a jamky byly 3x promyty 150 µl roztoku ME1 (promývací pufr, ve všech krocích byl použit 10x ředěný sterilní vodou). Do jamek bylo napipetováno 50 µl ME5 (vazebná

protilátka v koncentraci 1000 µg/ml, ředěna 1:1000 10x ředěným ME1) a byly inkubovány po dobu 60 min při pokojové teplotě ve tmě. Protilátka ME5 byla odstraněna a jamky byly 3x promyty 150 µl ME1. Do jamek bylo napipetováno 50 µl ME6 (detekční protilátka v koncentraci 400 µg/ml, ředěna 1:2000 10x ředěným ME1) a inkubovány po dobu 30 min při pokojové teplotě ve tmě. Po inkubaci byla detekční protilátka ME6 odstraněna a jamky byly 4x promyty 150 µl ME1. Do jamek bylo napipetováno 50 µl ME7 (zesilující roztok, ředěn 1:5000 10x ředěným ME1) a byly inkubovány po dobu 30 min při pokojové teplotě ve tmě. Zředěný ME7 byl z jamek odstraněn a jamky byly 5x promyty 150 µl ME1. Do jamek bylo napipetováno 100 µl ME8 (roztok vyvíjející zbarvení) a byly inkubovány 1 až 10 minut při pokojové teplotě dle vyvíjejícího se modrého zbarvení pozitivní kontroly. Poté bylo k roztoku napipetováno 50 µl stop roztoku ME9. Modré zbarvení se změnilo na žluté. Obsah jamek byl přepipetován do jamek na mikrotitrační destičce a do 15 min byla změřena absorbance při 450 nm.

#### **Výpočet relativní kvantifikace 5-mC:**

$$5\text{-mC (\%)} = [(vzorek OD - ME3 OD) / S] / [(ME4 OD - ME3 OD) * 2 / P] * 100$$

OD je hodnota absorbance při 450 nm

S je množství pipetované DNA v ng

2 je faktor, který normalizuje hodnotu 5-mC v pozitivní kontrole na 100 % (pozitivní kontrola obsahuje pouze 50 % 5-mC)

P je množství pozitivní kontroly (ME4) v ng

#### **4.18 Kvantifikace hydroxymetylace genomické DNA**

Kvantifikace 5-hmC byla provedena pomocí MethylFlash Hydroxymethylated DNA Quantification Kit (Colorimetric). Stanovení bylo provedeno v jamkách dodávaných spolu s chemikáliemi výrobcem. Do jamek bylo napipetováno 80 µl roztoku HC2 (vazebný roztok). Do jedné jamky byla napipetována negativní kontrola (HC3), do druhé pozitivní kontrola (HC4) v konečném množství v jamce 5 ng a do dalších jamek bylo pipetováno 1 až 8 µl vzorku DNA, aby bylo v jamce vždy 200 ng DNA.. Jamky byly inkubovány po dobu 90 min při 37 °C ve tmě. Před inkubací byly jamky vždy přikryty parafilmem. Po inkubaci byl roztok odstraněn a jamky byly 3x promyty 150 µl roztoku HC1 (promývací pufr, ve všech krocích byl použit 10x ředěný sterilní vodou). Do jamek bylo napipetováno 50 µl HC6 (vazebná protilátka v koncentraci 1000 µg/ml, ředěna 1:1000 ředěným HC1) a inkubovány po dobu 60 min při pokojové teplotě ve tmě. Zředěný HC6 byl odstraněn a



jamky byly promyty 3x 150 µl HC1. Do jamek bylo napipetováno 50 µl HC7 (detekční protilátka) v koncentraci 400 µg/ml, ředěna 1:1000 zředěným HC1) a inkubovány po dobu 30 min při pokojové teplotě ve tmě. Po inkubaci byl zředěný HC7 odstraněn a jamky byly promyty 4x 150 µl HC1. Do jamek bylo napipetováno 50 µl HC8 (zesilující roztok, ředěn 1:5000 ředěným HC1) a jamky byly inkubovány po dobu 30 min při pokojové teplotě ve tmě. Zředěný HC8 byl z jamek odstraněn a jamky byly promyty 5x 150 µl HC1. Do jamek bylo napipetováno 100 µl HC9 (roztok vyvíjející zbarvení) a byly inkubovány 1 až 10 min při pokojové teplotě dle vyvíjejícího se modrého zbarvení pozitivní kontroly. Poté bylo k roztoku napipetováno 50 µl HC10 (stop roztok). Modré zbarvení se změnilo na žluté. Obsah jamek byl přepipetován do jamek na mikrotitrační destičce a do 15 min byla změřena absorbance při 450 nm.

#### **Výpočet relativní kvantifikace 5-hmC:**

$$5\text{-hmC (\%)} = [(vzorek OD - HC3 OD) / S] / [(HC4 OD - HC3 OD) * 5 / P] * 100$$

OD je hodnota absorbance při 450 nm

S je množství použité DNA v ng

5 je faktor, který normalizuje hodnotu 5-hmC v pozitivní kontrole na 100 % (pozitivní kontrola obsahuje pouze 20 % 5-hmC)

P je množství pozitivní kontroly (HC4) v ng

#### **4.19 Přečištění PCR produktu**

PCR produkt amplifikovaný primery PCNA popsány v kapitole 4.13 byl přečištěn pomocí GenElute<sup>TM</sup> PCR Clean-up kitu (Sigma-Aldrich). PCR reakce pro přečištění byla provedena v objemu 50 µl, přečištění proběhlo dle pokynů výrobce, konečný eluční objem byl 30 µl namísto 50 µl, kvůli nízkým koncentracím produktu. Přečištěný produkt byl ověřen elektroforetickou separací, byla změřena koncentrace a následně byl odeslán na sekvenaci firmě Generi-Biotech.

## 5 Výsledky

### 5.1 Izolace protoplastů

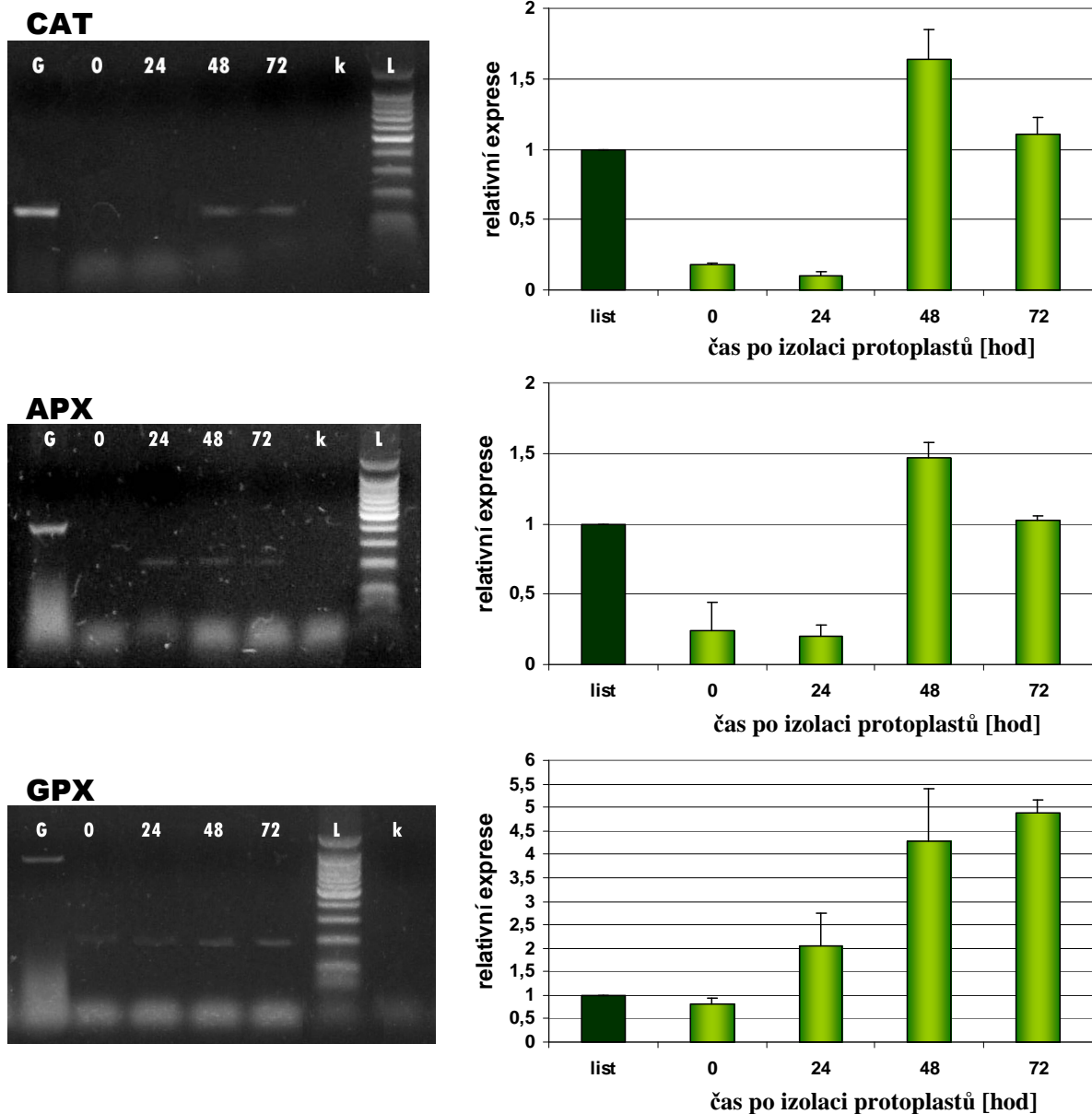
Donorovým pletivem pro izolaci protoplastů byly apikální lístky *in vitro* pěstovaných rostlin *Cucumis sativus* L. Protoplasty byly izolovány v koncentracích 1,2 – 1,7 x 10<sup>6</sup>/ml LCM1 média s průměrnou životností 85 %. Následně byly zředěny na konečnou koncentraci 5 x 10<sup>5</sup>/ml. Regenerovaná buněčná stěna byla pozorována 48 hodin po izolaci, dělení bylo pozorováno pouze u malého počtu buněk, a to 72 hodin po izolaci.



**Obrázek č. 5:** Izolované protoplasty. Ihned po protoplastizaci, bez buněčné stěny, s jasně viditelnými chloroplasty (A) a po 72 hodinách kultivace, s již regenerovanou buněčnou stěnou a dělicí se (B). Měřítka 20 µm.

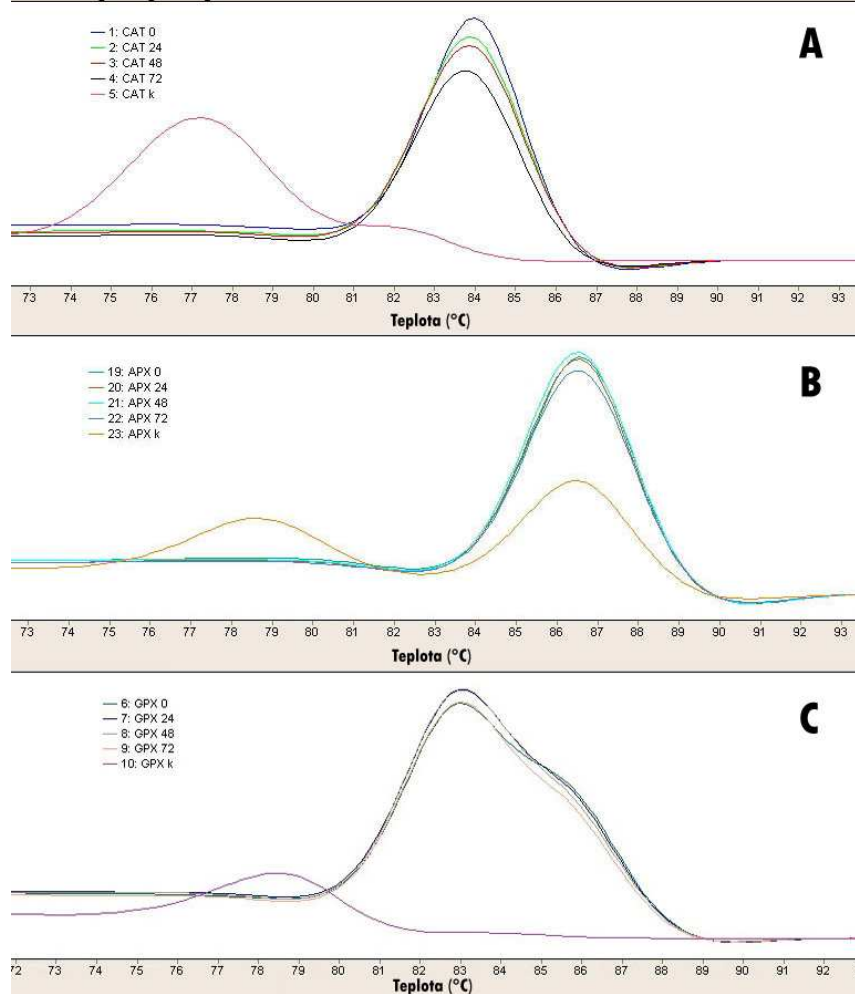
### 5.2 Antioxidativní systém buňky

Relativní exprese jednotlivých enzymů antioxidantivního systému buňky, katalázy, cytosolické askorbát peroxidázy a glutathion peroxidázy, byla stanovena pomocí real-time PCR na přístroji LightCycler 2.0, specifita produktů byla ověřena analýzou křivky teploty tání (viz obrázek č. 7). V prvních 24 hodinách po izolaci byla exprese CAT a APX minimální, úroveň exprese v listu však přesáhla 48 hodin po izolaci a v tomto čase se dostala na její 1,5 násobek. Následoval pokles a 72 hodin po izolaci se hodnoty vracely na úroveň srovnatelnou s expresí v listu. U GPX byl vývoj jiný. Okamžitě po izolaci je exprese snížena, ale po celou dobu následné kultivace její exprese stoupá, 72 hodin po izolaci je exprese téměř pětinašobná oproti hodnotám v listu, zprůměrovaná data jsou na obrázku č. 6, spolu s elektroforetickou separací produktů klasické PCR reakce s cDNA získanou přepisem RNA z protoplastů ve všech časech.

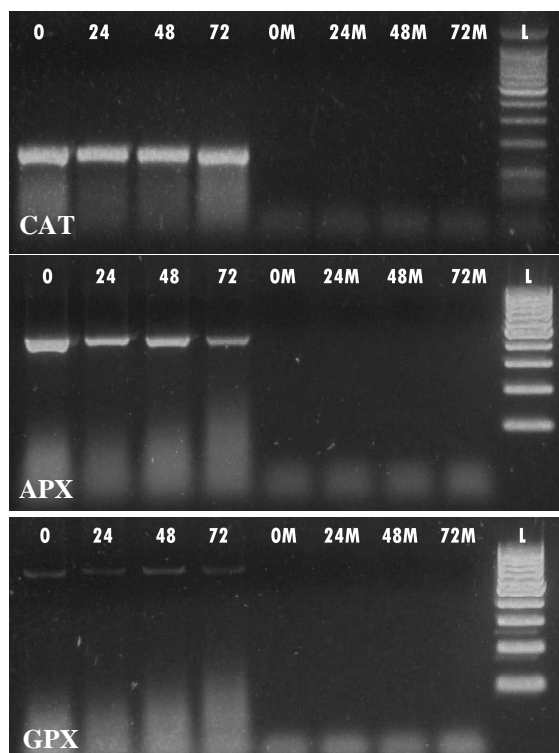


**Obrázek č. 6:** Expresse jednotlivých genů antioxidantivního enzymového systému rostliny. V levé části obrázku jsou elektroforetické separace produktů PCR reakcí s genomickou DNA (G) a s cDNA v příslušných časech (0 -72). Jako marker molekulové hmotnosti (L) byl použit 100bp Ladder (Promega) nejintenzivnější band má velikost 500 bp, jednotlivé bandy jsou odkrokovány po 100 bp. U APX a GPX byl v amplifikované oblasti genomické DNA intron o velikosti cca 250 bp (APX) a 720 bp (GPX), velikosti produktů u cDNA jsou uvedeny v kapitole 4.13. Negativní kontrolou (k) je reakce s PCR-grade vodou namísto templátové DNA. V pravé části je na grafech zobrazeno porovnání relativní exprese v jednotlivých časech s expresí v listu (list má tmavě zelený sloupec, hodnota je vždy rovna 1).

## Křivky teploty tání



**Obrázek č. 7:** Analýza křivek teploty tání u qPCR produktů (A) katalázy s průměrnou melting teplotou 84,01 °C, (B) askorbát peroxidázy, 86,67 °C a (C) glutathion peroxidázy, 83,89 °C. Odchytky u melting teplot byly v řádu setin stupňů celsia. Sekundární pík s melting teplotou vždy o několik stupňů nižší přítomný u všech kontrolních reakcí (CAT k, APX k, GPX k) představuje s největší pravděpodobností zřetěžené primery.

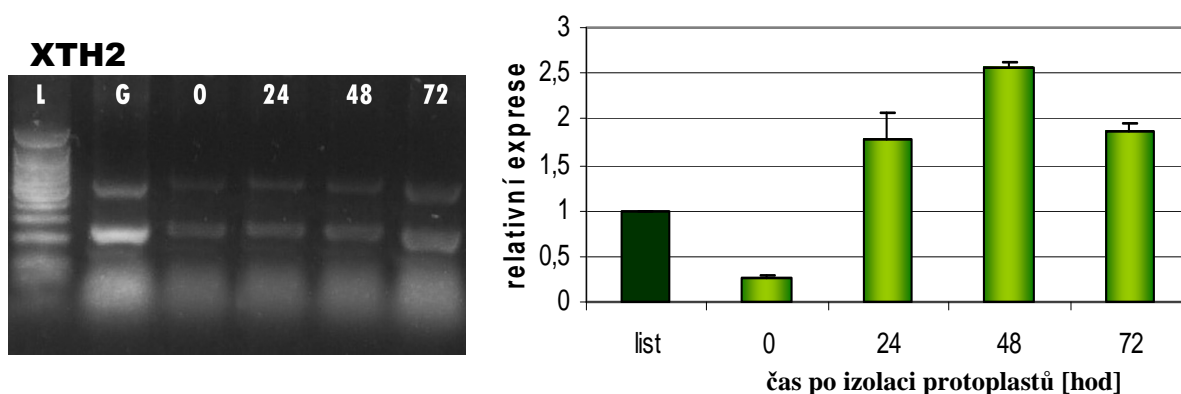


Ani jeden ze sledovaných genů nebyl zametylován, v PCR reakci s bisulfidicky konvertovanou genomickou DNA nenasedly primery, proto nebyly na následné gelové elektroforéze bandy příslušné velikosti, jak je tomu u genomické DNA (viz obrázek č. 8 vlevo)

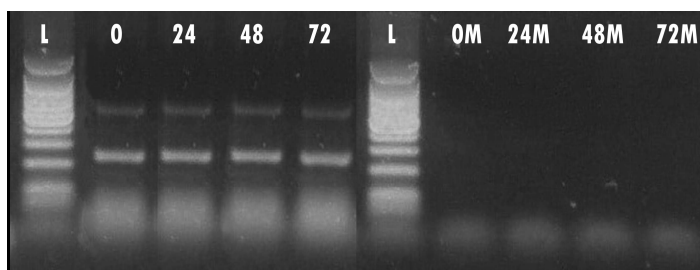
**Obrázek č. 8:** Separace produktů s genomickou (0-72) a modifikovanou DNA (0M – 72M), nepřítomnost bandů u modifikované DNA naznačuje demetylaci cílových oblastí pro nasedání primerů. Marker molekulové hmotnosti (L) 100bp Ladder (Promega) u CAT a GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas) u APX a GPX.

### 5.3 Regenerace buněčné stěny

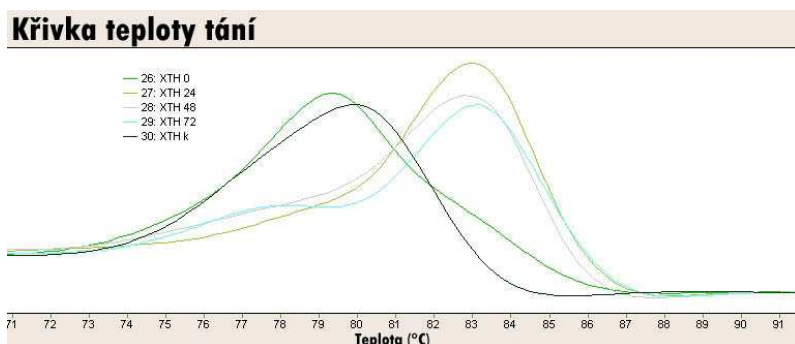
Zde byla sledováným genem xyloglukan endo-transxyloglukanáza/hydrolasa 2 (XTH2), relativní hodnoty její exprese zobrazuje obrázek č. 9. Exprese je ihned po izolaci velice nízká, ovšem hladinu v listu převyšuje už v 24. hodině po izolaci, maxima dosahuje po 48 hodinách kultivování, kde 2,5x převyšuje expresi v listu. V tuto dobu mají již protoplasty plně regenerovanou buněčnou stěnu. Dále relativní hladina exprese klesá, je však stále vyšší než v listu. Ani u tohoto genu nebyla zjištěna metylace v jeho sekvenci, produkt byl syntetizován pouze v PCR reakci s genomickou DNA, nikoliv s modifikovanou hydrogensířičitanem sodným, jak ukazuje obrázek č. 10. Analýza křivky teploty tání je na obrázku č. 11.



**Obrázek č. 9:** Exprese XTH2. Vlevo elektroforetická separace produktů PCR reakce s genomickou DNA (G) a s cDNA, čísla značí hodiny od izolace (0-72). Vpravo relativní exprese XTH2 v protoplastech vůči expresi v listu. Největší exprese dosahuje v 48 hodinách po izolaci, kdy mají protoplasty již regenerovanou buněčnou stěnu



**Obrázek č. 10:** Methylace cílové oblasti pro nasednutí primerů XTH2. V reakci s modifikovanou DNA (0M – 72M) se žádný produkt neamplifikoval, tudíž před modifikací hydrogensířičitanem sodným nebyly cytosiny v cílové oblasti metvlovány..

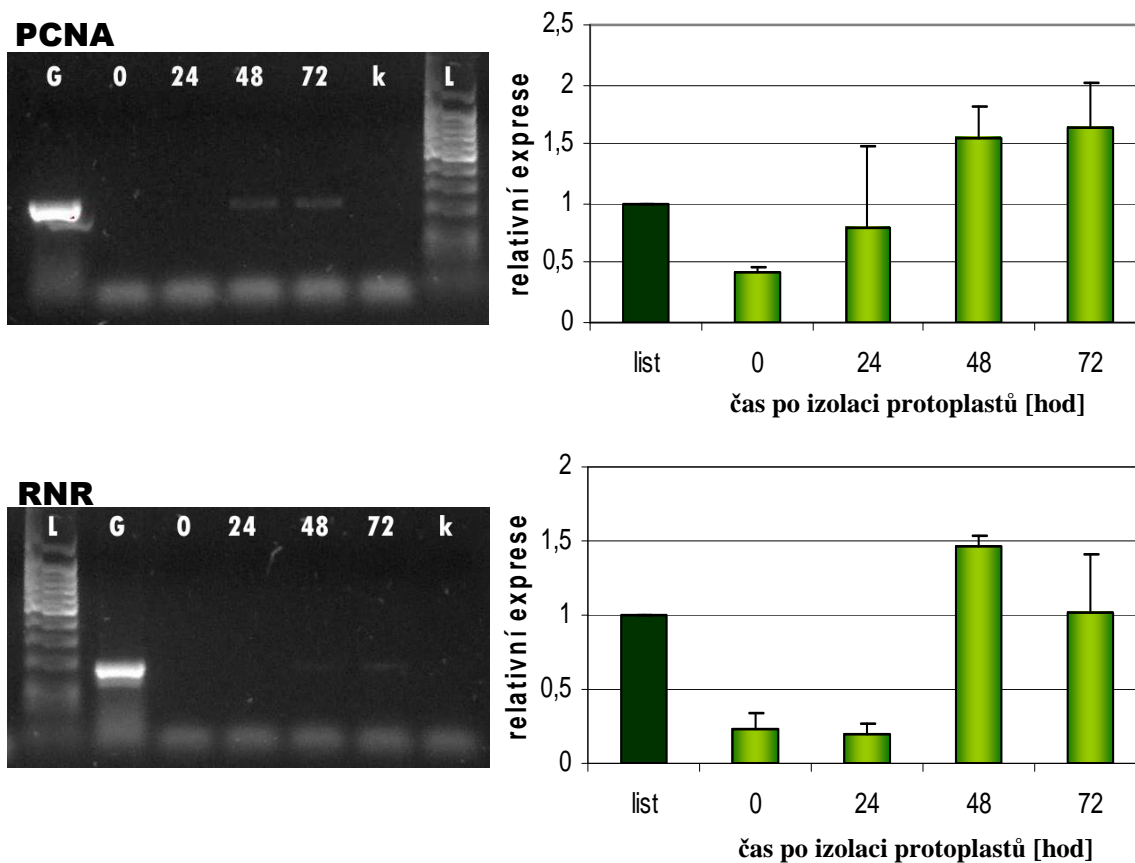


**Obrázek č. 11:** Křivka teploty tání XTH2 s teplotním píkem 83,15 °C). V čase 0 je specifického produktu zřejmě velmi malé množství, křivka se odchyluje a z větší části se kryje s melting teplotou dimerizovaných primerů.

## 5.4 Proliferační geny

Jaderný antigen proliferujících buněk (PCNA) i ribonukleotid reduktáza (RNR) jsou faktory nutné pro průběh S-fáze buněčného cyklu, čili buňky, které aktivně proliferují a dělí se by měly vykazovat jejich expresi. Průběh exprese obou genů je zobrazen na obrázku č. 12, specifita produktů je doložena analýzou křivky teploty tání na obr. č. 13.

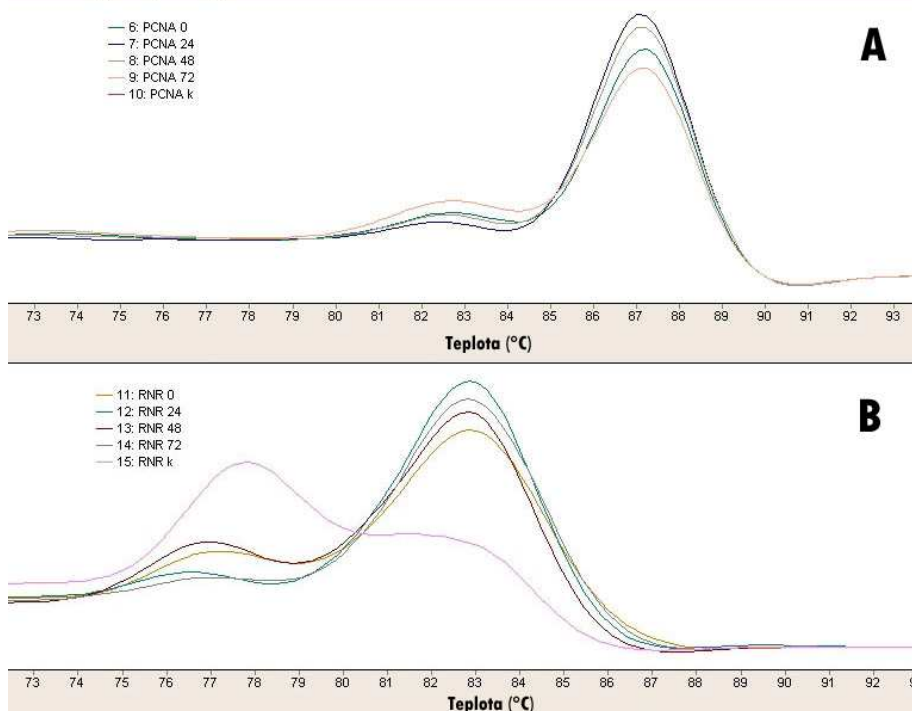
U obou genů je exprese v prvních 24 hodinách snížena (významněji u RNR), ale 48 hodin po izolaci přesáhne původní hladinu exprese v listu a dosahuje jejího 1,5 násobku. Vyšší exprese PCNA pokračuje i v 72 hodinách, exprese RNR se vrací k hodnotám před protoplastizací.



**Obrázek č. 12:** Exprese PCNA a RNR. V prvních 24 hodinách po protoplastizaci je exprese obou genů snížena, v dalších hodinách se zvyšuje (obrázek vpravo). Produkty PCR reakce s cDNA byly po elektroforéze stěží detekovatelné, a to pouze v časech 48 a 72 hodin po izolaci (vlevo).

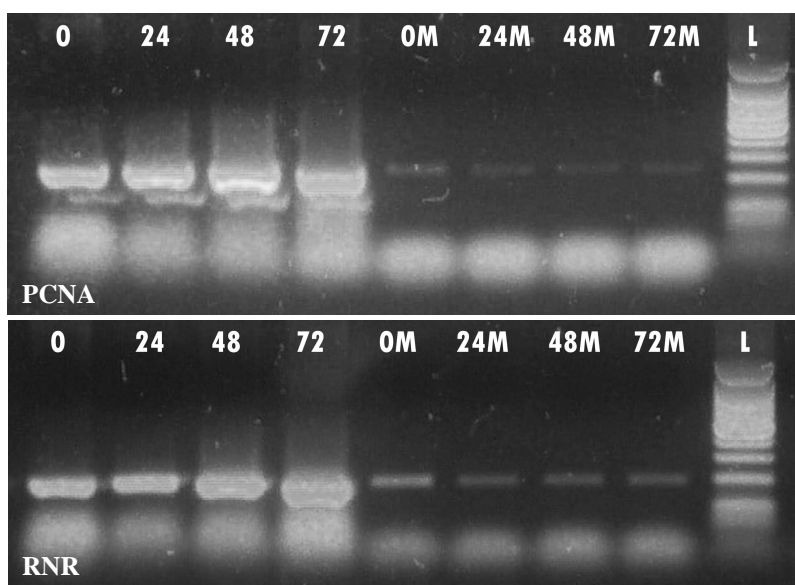


## Křivky teploty tání



**Obrázek č. 13:** Analýza křivek teplot tání produktů qPCR reakce. Melting teplota produktu PCNA byla 87,26 °C, RNR 83,07 °C.

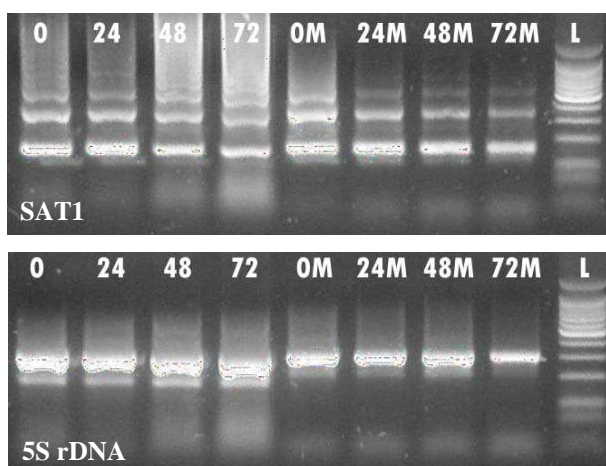
PCR s bisulfidicky konvertovanou DNA naznačuje, že u obou genů dochází k postupné demethylaci, viz obrázek č. 14. Nejintenzivnější bandy jsou 0 hodin po izolaci a postupně se jejich intenzita snižuje. Pokud totiž není cytosin metylován, dojde k jeho konverzi na thymin, což znemožní nasednutí primerů a nedojde k amplifikaci cílové sekvence. DNA z protoplastů odebraných okamžitě po izolaci tedy byla v těchto dvou oblastech v nejvíce případech metylovaná (suspenze protoplastů nemusí být striktně homogenní), což koreluje se zjištěnou expresí těchto dvou genů.



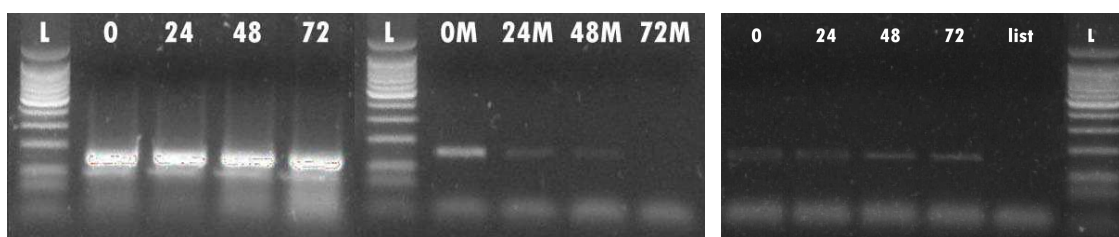
**Obrázek č. 14:** Metylace cílových oblastí PCNA a RNR. Přítomnost bandů u modifikované DNA (0M – 72M) potvrzuje přítomnost 5-mC v oblasti nasedání primerů. Bandy největší intenzity jsou u vzorků ihned po izolaci, postupně se intenzita snižuje, což naznačuje, že se snižuje i počet buněk (resp. jejich zastoupení) v suspenzi se zametylovanými oblastmi těchto dvou genů nutných k proběhnutí S-fáze buněčného cyklu.

## 5.5 Epigenetický stav heterochromatinu

V interfázních jádrech buněk listu *Cucumis sativus* L. je možné ve fluorescenčním mikroskopu po obarvení DAPI pozorovat chromocentra, obsahující centromerické, pericentromerické a subtelomerické repetice, genové repetice, jako např. 5S rDNA, a transpozony. Chromocentra vymizí po protoplastizaci a při následné kultivaci se znovu objeví, jak jednotlivé repetice zpětně kondenzují. Na obrázku č. 15 je vidět, že repetice 5S rDNA i subtelomerická SAT1 repetice jsou zametylované ve všech časech po izolaci (obrázek č. 15). Oproti tomu metylace retroelementu Ty1-copia se postupně snižuje až k demetylovanému stavu 72 hodin po izolaci. Spolu s demetylací dochází i k zvýšené expresi tohoto retroelementu v protoplastech a buňkách z nich odvozených, v listech nebyl pomocí PCR detekován žádný transkript tohoto mobilního genetického elementu, jak je vidět na obrázku č. 16.



**Obrázek č. 15:** (Vlevo) Obě repetice, subtelomerická SAT1 i genová 5s rDNA byly ve všech časech zametylovány, což dokazuje přítomnost bandů v drahách 0M až 72M, intenzita je u všech produktů stejná.

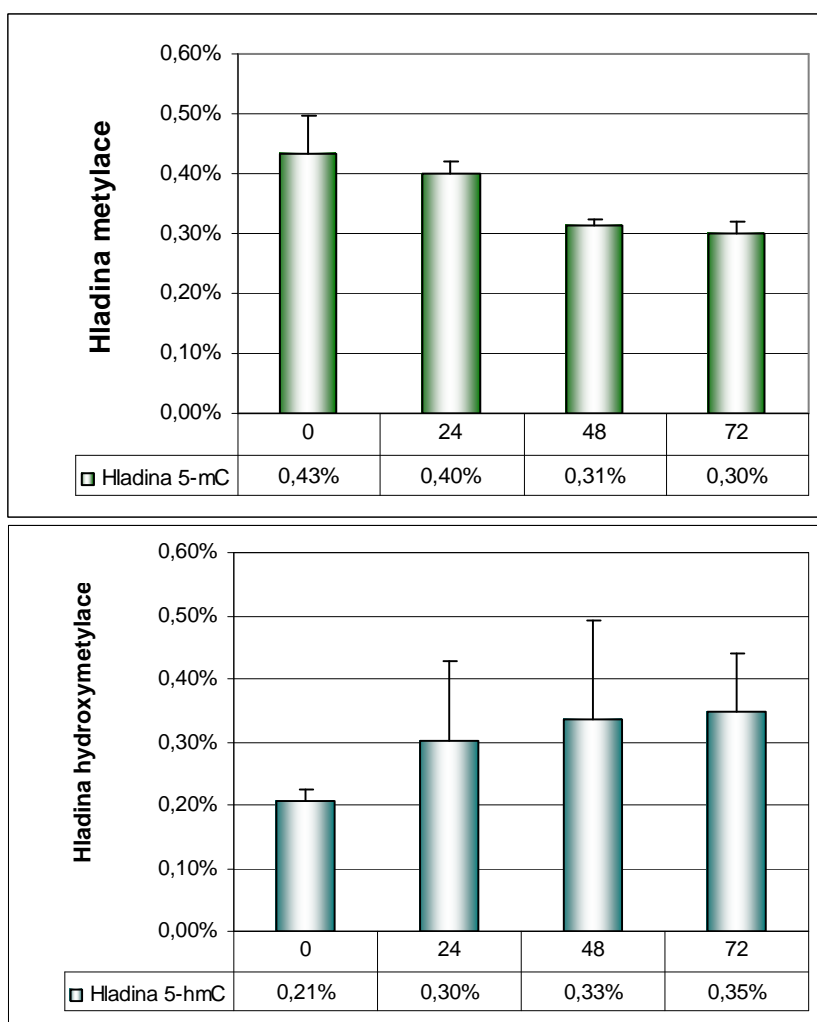


**Obrázek č. 16:** Exprese a epigenetický stav retroelementu Ty1-copia. Na obrázku vlevo je vidět postupná demethylace cílové amplifikované oblasti (0M – 72M), největší intenzita je ihned po izolaci (metylovaná DNA), 72 hodin po izolaci je oblast retroelementu již plně demetylována. Exprese má opačný průběh, intenzita bandů se zvyšuje, nejsilnější je v čase 72 hodin. V PCR reakci s cDNA získanou z listu nebyl amplifikován žádný produkt (vpravo).



## 5.6 Globální hladiny metylace a hydroxymethylace

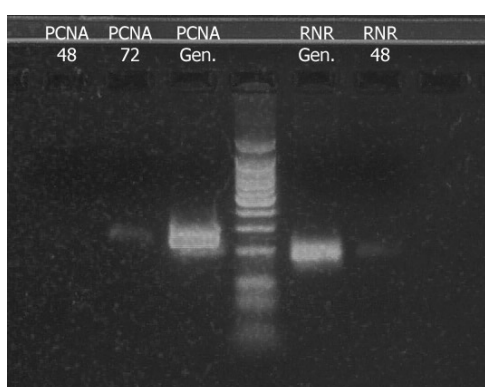
Kvantifikace metylace a hydroxymethylace v protoplastech byla provedena specifickým stanovením 5-mC a 5-hmC pomocí protilátek, kity od firmy Epigentek uvedenými v kapitole 4.4. V průběhu kultivace vykazovaly tyto epigenetické modifikace opačný trend, metylace se s postupem času snižovala, zatímco hydroxymethylace narůstala, graficky jsou data zobrazena na obrázku č. 17. Průměrná maximální hodnota metylace byla zaznamenána ihned po izolaci, 0,43 % ze všech nukleotidů byly 5-mC, což při velikosti genomu *Cucumis sativus* (1C = 376 Mbp) činí přes 3 milióny 5-mC. Naopak nejvyšší hodnota hydroxymethylace byla naměřena 72 hodin po izolaci, průměrně 0,35 % (2,6 mil 5-hmC). Hodnoty hydroxymethylace byly obecně nižší než metylace.



**Obrázek č. 17:** Hladiny metylace a hydroxymethylace. Vykazují opačnou tendenci, nejvyšší hladina metylace byla naměřena ihned po izolaci, 0,43 % a klesala k 0,30 % po 72 hodinách kultivace (obrázek nahoře), naproti tomu hladina hydroxymethylace je po izolaci nejnižší, pouze 0,21 % ze všech bazí jsou 5-hmC a po 72 hodinách kultivace dosahuje hodnoty 0,35 % (spodní obrázek). Zobrazená data jsou průměrem ze třech měření.

## 5.7 Identita osekvenované oblasti genu PCNA

Elektroforetická separace PCR produktů amplifikovaných primery PCNA a RNR je vidět na obrázku č. 18. Po změření koncentrace byly odeslány na sekvenaci firmě Genери-Biotech. Sekvence PCNA byla odeslána do databáze GenBank a přijata pod položkovým číslem JQ811518. Tato sekvence byla porovnávána pomocí algoritmu BLAST s osekvenovaným genomem okurky. Je téměř identická s kontigy označenými položkovými čísly ACYN01001774.1 a ACHR01006347.1 (viz obrázek č. 19), ze 198 nukleotidů je 183 shodných. Vysokou homologii vykazuje i se sekvencemi genu PCNA u *Arabidopsis thaliana* (Acc. no. EU072918.1) a kukuřice (Acc. no. NM\_001111934.1).



**Obrázek č. 18:**

Elektroforetická separace PCR produktů lokusů PCNA a RNR na genomické DNA a cDNA po přečištění

Srovnání sekvence PCNA s celogenomovou databází *Cucumis sativus*

Položka	Popis	Celkové skóre	Překryv sekvencí	Hodnota E	Procentuální identita
<a href="#">ACYN01001774.1</a>	<i>Cucumis sativus</i> CSB10A_v1_contig_1852, whole genome shotgun	274	90%	2e-72	92%
<a href="#">ACHR01006347.1</a>	<i>Cucumis sativus</i> contig6347, whole genome shotgun sequence	274	90%	2e-72	92%

Srovnání sekvence PCNA s nukleotidovou databází *Arabidopsis thaliana* a kukuřice

Položka	Popis	Celkové skóre	Překryv sekvencí	Hodnota E	Procentuální identita
<a href="#">EU072918.1</a>	<i>Arabidopsis thaliana</i> proliferating cell nuclear antigen 2 (PCNA2)	116	90%	6e-25	76%
<a href="#">NM_001111934.1</a>	<i>Zea mays</i> proliferating cell nuclear antigen2 (magi81248), mRNA	125	87%	1e-25	77%

**Obrázek č. 19:** Porovnání sekvence PCNA s databázemi pomocí algoritmu BLAST. V horní části obrázku je porovnání s celogenomou (WGS, whole genome shotgun) databází okurky. Uvedené dva kontigy jsou téměř identické s amplifikovanou sekvencí a mají velice nízkou E hodnotu  $2 \times 10^{-72}$  (je vyloučena náhodná podobnost). V téměř celé délce vykazuje značnou homologii (76 - 77 %) se sekvencemi kódujícími stejný gen (Proliferating cell nuclear antigen) u *Arabidopsis thaliana* a *Zea mays* a obě srovnání mají taktéž nízkou E hodnotu.

## 6 Diskuse

Dediferenciace terminálně diferencovaných mesofylových buněk listu v nesespecializované protoplasty je doprovázena dramatickým úbytkem heterochromatinu, pozorovatelného v interfázních jádrech obarvených DAPI pomocí fluorescenčního mikroskopu jako chromocentra. Rozvolnění chromocenter zahrnuje dekonenzaci všech oblastí repetice, jako je 180bp, 5S rDNA, či mobilních genetických elementů v nich lokalizovaných. Překvapivé je, že při dekonenzaci neztrácejí všechny tyto repetice svoje epigenetické markery, které z nich za fyziologických podmínek dělají heterochromatin – metylaci DNA a dimetylaci H3K9 (Tessadori *et al.*, 2007). Stejní autoři také popsali, že nedochází k transkripční reaktivaci takto umlčených částí genomu u *Arabidopsis*.

V této práci bylo potvrzeno, že metylace DNA zůstává nezměněna v oblasti repetice 5S rDNA, stejně jako u subtelomerické repetice SAT1 (její lokalizaci v chromocentrech *Cucumis sativus* a dekonenzaci při protoplastizaci popsali Ondřej *et al.*, 2009). Bylo však zjištěno, že dochází k postupné demethylaci retroelementu Ty1-copia v průběhu kultivace protoplastů až do kompletně demetylovaného stavu, kterého je dosaženo 72 hodin po izolaci. Zároveň s tím byla pozorována jeho exprese v protoplastech, ačkoliv v mesofylových buňkách listu je umlčen.

Podobná demethylace byla pozorována v protoplastech i u jiného retroelementu, Athila, nacházejícího se v pericentromerické oblasti chromozomu 1 u *Arabidopsis* (Avivi *et al.*, 2004). Nebyla ovšem nalezena jeho exprese, což naznačuje, že konfigurace chromatinu je sice důležitým, ale ne jediným předpokladem pro aktivaci transkripce retroelementů po protoplastizaci (či obecně při dediferenciaci).

Společným znakem všech *in vitro* kultur je produkce a hromadění reaktivních kyslíkatých sloučenin, představující pro buňku oxidativní stres, který musí být pro následnou úspěšnou kultivaci překonán. Buňky odvozené z protoplastů proto aktivují svůj antioxidační enzymový systém. Expresní profil APX a CAT se shoduje s výsledky, které přednesli Ondřej *et al.* (2010), exprese GPX se podobně jako u dvou předchozích nejprve snížila, po 24 hodinách však začala narůstat a po 72 hodinách kultivace se dostala na pětinasobek exprese v listu. Vzhledem k měnící se expresi však nebyla zaznamenána změna v metylaci sekvence DNA oblastí kódujících tyto enzymy, jejich regulace je tedy pravděpodobně založena na odlišném mechanismu.

XTH2 je enzym zodpovědný za remodelaci buněčné stěny pomocí hydrolýzy a následného připojování xyloglukanových řetězců k dalším xyloglukanovým jednotkám či k jiným polysacharidům. Zvýšení jeho exprese bylo popsáno u okurky během somatické embryogeneze, silná exprese je v rostoucích kořenech a v primordiích listů (Malinowski *et al.*, 2004). Exprese XTH2 v protoplastech odpovídá pozorovaným změnám regenerace buněčné stěny v protoplastové kultuře, maxima dosahuje 48 hodin po izolaci. Ani u tohoto genu nebyly zjištěny změny v metylaci DNA během kultivace, DNA v cílové oblasti zůstala demetylována. Malinowski *et al.* (2004) vzhledem k orgánově, tkáňově a vývojově specifické expresi tohoto enzymu u *Cucumis sativus* předkládají v jejich článku, že změny v expresi tohoto genu jsou podmíněny dostupností příslušných transkripčních faktorů v daných tkáních a vývojových stádiích.

PCNA a RNR, dva geny, jejichž produkty jsou zodpovědné za průběh buněčné S-fáze, jsou cílem transkripčního faktoru E2F. V diferencovaných buňkách nejsou exprimovány a jejich lokusy jsou kondenzovány (Williams *et al.*, 2003). Ačkoliv dekondují ihned po protoplastizaci, jejich exprese byla těmito autory u protoplastů tabáku nalezena až 72 hodin po izolaci, po vstupu buněk do S-fáze. Hodnoty exprese popsané v této práci se shodují s jejich výsledky, v prvních hodinách je relativní exprese ještě snížena pod hladinu v listu, kde je minimální, začíná se zvedat až 48 hodin po izolaci a dále roste, rovněž při klasické PCR byly produkty nalezeny pouze ve vzorcích 48 a 72 hodin po izolaci. Navíc byla zjištěna postupná demethylace DNA lokusů těchto genů, která koreluje s jejich transkripční aktivitou. To může souviset s dalšími výsledky Williams *et al.* (2003), kdy pozorovali přemístění proteinu HP1 z jádra do cytoplazmy. V jádře HP1 interaguje s metylovanou DNA a potlačuje transkripci, přemístěním do cytoplazmy je transkripce umožněna.

U rostlin hraje metylace DNA zásadní roli v regulaci genové exprese, metylované lokusy nejsou transkribovány, také je důležitá pro organizaci genomu, udržení genomické stability a umlčeného stavu mobilních genetických elementů. Hypomethylace genomu u mutantů s defektem v metylačních procesech ovlivňuje organizaci chromatinu (Soppe *et al.*, 2002). Tessadori *et al.* (2007) zkoumali globální změny v hladině metylcytosinu při protoplastizaci mezofylových buněk *Arabidopsis* pomocí metody FISH, signál zůstal beze změny po protoplastizaci i po celou dobu kultivace (rozptýlený po celé ploše jádra), stejná zůstala i jeho intenzita. Vyvodili závěr, že nedochází ke změnám v úrovni metylace. V této práci bylo stanoveno pomocí protilátek specifických vůči 5-mC, že hladina metylcytosinu postupně klesá s časem kultivace. Obdobná kvantifikace byla provedena i v případě

globální hydroxymetylaci, protilátkami proti 5-hmC. Zde byla ovšem opačná tendence, hladina 5-hmC se postupně zvyšovala s dobou kultivace. Poznatky o hydroxymetylaci pocházejí ze studií na živočišných buňkách, u rostlinných buněk zatím nejsou publikována žádná data. 5-hmC vzniká z 5-mC oxidací pomocí enzymů skupiny TET (Koh *et al.*, 2011). Aktivita těchto enzymů je zvýšená v kmenových a pluripotentních buňkách, stejně jako je tomu s úrovní hydroxymetylaci a počtem transkriptů genů označovaných jako geny pluripotence, např. Oct4 nebo Sox2. Když buňka začne diferencovat, tyto geny pluripotence jsou umlčeny metylací, sníží se aktivita Tet1 a Tet2 a poklesne hladina 5-hmC (Fitz *et al.*, 2011). Platí to i naopak, indukovaně pluripotentní buňky mají vyšší hladinu 5-hmC a expresi Tet, než buňky ze kterých byly odvozeny (Koh *et al.*, 2011). V této práci byla prokázána zvyšující se hladina 5-hmC s časem kultivace protoplastů. Může tedy jít o analogii s živočišnou buňkou, protože z terminálně diferencovaných mesofylových buněk listu se za použitých kultivačních podmínek přes protoplasty stávají dediferencovanými pluripotentními buňkami kalusu.

## 7 Závěr

Pro úspěšnou kultivaci protoplastů je nutné, aby byly schopny čelit oxidativnímu stresu představovaného reaktivními kyslíkatými sloučeninami, regenerovaly buněčnou stěnu a aby se takto vzniklé buňky v kultuře začaly dělit. Všechny tyto děje lze sledovat na molekulární úrovni prostřednictvím aktivity příslušných genů. V této práci byly sledovány změny exprese šesti genů v průběhu prvních 72 hodin kultivace, a to APX, GPX, CAT, PCNA, RNR a XTH, aby mohly být porovnány se zjištěným stavem metylace DNA lokusů těchto genů. Bylo zjištěno, že až na PCNA a RNR zůstávají tyto lokusy demetylované a regulace jejich exprese probíhá na jiné úrovni. U PCNA a RNR, které jsou neaktivní v diferencovaných buňkách listu, dochází v průběhu kultivace k demetylaci jejich lokusů, která koreluje s jejich expresí 48 a 72 hodin po kultivaci. Dále bylo zjištěno, že po dekonenzaci heterochromatinu odehrávající se při protoplastizaci, si repetice SAT1 a 5S rDNA, které jsou součástí dekonenzovaného heterochromatinu zachovávají svůj epigenetický stav, tedy že jsou metylované. Oproti tomu retroelement Ty1-copia, nacházející se ve stejné oblasti je postupně demetylován a jeho exprese se v protoplastech postupně zvyšuje. Pomocí protilátek byly stanoveny také globální hladiny metylace a hydroxymethylace DNA, které mají v prvních dnech kultivace opačnou tendenci. Hladina metylace klesá, zatímco hydroxymethylace stoupá. Tato situace je analogická se situací u živočišných buněk, kdy jsou z terminálně diferencovaných buněk derivovány buňky indukovaně pluripotentní, u nichž mají hladiny obou epigenetických modifikací stejný průběh.

## 8 Seznam použitých zkratk

5-mC	5-metylcytosin
5-hmC	5-hydroxymetylcytosin
APX	askorbát peroxidáza
BAP	6-benzylaminopurin
GPX	glutahinon peroxidáza
CAT	kataláza
CT	chromozómové teritorium
CTAB	Cetyl-trimethylamonium bromid
DAPI	4,6 –diamidino-2-fenylindol
FDA	fluorescein diacetát
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
HP1	heterochromatinový protein 1
IBA	3-indolylmáselná kyselina
ICD	interchromozómová doména
ICN	interchromozómová síť
NAA	$\alpha$ -naftyloctová kyselina
PCNA	jaderný antigen proliferujících buněk
RNR	ribonukleotid reduktáza
ROS	reaktivní kyslíkaté sloučeniny
SAM	S-adenosyl methionin
SAT1	satelitní DNA typ 1
XTH	xyloglukan endo-transxyloglukanáza/hydrolasa

## 9 Seznam použité literatury

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

Arora, A., Sairam, R. K., Srivastava, G. C. (2002): Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science* 82: 1227 - 1238

Avivi, Y., Morad, V., Ben-Meir, H., Zhao, J., Kashkush, K., Tzfira, T., Citovsky, V., Grafi, G. (2004): Reorganization of specific chromosomal domains and activation of silent genes in plant cells acquiring pluripotentiality. *Developmental Dynamics* 230:12 – 22

Bařková P., Pospíšilová J., Synková H. (2008): Production of reactive oxygen species and development of antioxidative systems during in vitro growth and ex vitro transfer. *Biologia Plantarum* 52: 413 - 422

Bird, A. (2002): DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development* 16: 6 – 21

Branco, M. R., Pombo, A. (2006): Chromosome organization: new facts, new models. *Trends in Cell Biology* 17: 127 - 134

Branco, M. R., Pombo, A (2006): Intermingling of chromosome territories in interphase suggests role in translocations and transcription-dependent associations. *Public Library of Science Biology* 4: 780 - 788

Chubb, J. R., Boyle, S., Perry, P., Bickmore, W. A. (2002): Chromatin motion is constrained by association with nuclear compartments in human cells. *Current Biology* 12: 439–445.

Cocking, E. C. (2000): Turning point article - Plant protoplasts. *In Vitro Cellular Developmental Biology - Plant* 36: 77 – 82



Cook, P., R. (2009): A model for all genomes: The role of transcription factories. *Journal of Molecular Biology* 395: 1 – 10

Cremer, T., Cremer, C. (2001): Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature Reviews Genetics* 2: 292 - 301

Cremer, T., Cremer, C., Schneider, T., Baumann, H., Hens, L., Kirschvolder, M. (1982): Analysis of chromosome positions in the interphase nucleus of chinese hamster cells by laser-UV-microirradiation experiments. *Human Genetics* 62: 201 - 209

Darzacq, X. Shav-Tal, Y., de Turris, V., Brody, Y., Shenoy, S. M., Phair, R. D., Robert H Singer, R. H. (2007): In vivo dynamics of RNA polymerase II transcription. *Nature Structural & Molecular Biology* 14: 796 – 806

Dehghani, H., Dellaire, G., Bazett-Jones, D. P. (2005): Organization of chromatin in the interphase mammalian cell. *Micron* 36: 95 – 108

Femino, A. M., Fay, F. S., Fogarty, K., Singer, R. H. (1998): Visualization of single RNA transcripts in situ. *Science* 280: 585 – 590

Fitz, G, Branco, M. R., Seisenberger, S., Santos, F., Krueger, F., Hore, T. A., Marques, C. J. Andrews, S., Reik, W. (2011): Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature* 473: 398 - 404

Fransz, P. F., Armstrong, S., de Jong, J. H., Parnell, L. D., van Drunen, C., Dean, C., Zabel, P., Bisseling, T., Jones, G. H. (2000): Integrated cytogenetic map of chromosome arm 4S of *Arabidopsis thaliana*: Structural organization of heterochromatic knob and centromere region. *Cell* 100: 367 – 376

Hlatky, L., Sachs, R. K., Vazquez, M., Cornforth, M. N. (2002): Radiation-induced chromosome aberrations: Insights gained from biophysical modeling. *Bioessays* 24: 714 – 723

- Hobert, E. (2008) Gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Science* 319: 1785 - 1786
- Iborra, F. J., Pombo, A., McManus, J., Jackson, D. A., Cook, P. R (1996): The topology of transcription by immobilized polymerases. *Experimental Cell Research* 229: 167 – 173
- Iborra, F. J., Pombo, A., Jackson, D. A., Cook, P. R. (1996): Active RNA polymerases are localized within discrete transcription ‘factories’ in human nuclei. *Journal of Cell Science* 109: 1427 - 1436
- Jenuwein, T., Allis, C. D. (2001) Translating the histone code. *Science* 293: 1074 - 1080
- Kaeppler, S. M., Kaeppler, H. F., Rhee, Y. (2000): Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology* 43: 179 – 188
- 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
- Kinney, S. H, Chin, H. G., Vaisvila, R., Bitinaite, J. Zheng, Y., Este`ve, P-O., Feng, S., Stroud, H., Jacobsen, S. E., Pradhan, S. (2011): Tissue-specific distribution and dynamic changes of 5-hydroxymethylcytosine in mammalian genomes. *The Journal of Biological Chemistry* 286: 24685 – 24693
- Koh, K. P., Yabuuchi, A., Rao, S., Huang, Y., Cunniff, K., Nardone, J., Laiho, A., Tahiliani, M., Sommer, C. A., Mostoslavsky, G., Lahesmaa, R., Orkin, S. H., Rodig, S. J., Daley, J. Q., Rao, A. (2011): Tet1 and Tet2 Regulate 5-Hydroxymethylcytosine Production and Cell Lineage Specification in Mouse Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 8: 200 – 213
- Le, T., Kim, K-P., Fan, G., Faull, K. F. (2011): A sensitive mass spectrometry method for simultaneous quantification of DNA methylation and hydroxymethylation levels in biological samples. *Analytical Biochemistry* 412: 203 – 209

Lou, Q., Chen, J. (2007): Ty1-copia retrotransposon-based SSAP marker development and its potential in the genetic study of cucurbits. *Genome* 50(9): 802 - 810

Maris, A., Suslov, D., Fry, S. C., Verbelen, J.-P., Vissenberg, K. (2009): Enzymic characterization of two recombinant xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) proteins of *Arabidopsis* and their effect on root growth and cell wall extension. *Journal of Experimental Botany*. 60: 3959 – 3972

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

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

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

Osborne, C. S., Chakalova, L., Brown, K. E., Carter, D., Horton, A., Debrand, E., Goyenechea, B., Mitchell, J. A., Lopes, S., Reik, W., Fraser, P. (2004): Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription. *Nature Genetics* 36: 1065 – 1071

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

Park, Y., Kuroda, M. I. (2001): Epigenetic aspects of X-chromosome dosage compensation. *Science* 293: 1083 - 1085

Piterková J., Tománková K., Luhová L., Petřivalský M., Peč P. (2005): Oxidativní stres: lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. *Chemické listy* 99: 455 - 466

Reik, W., Dean, W., Walter, J. (2001): Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293: 1089 – 1093

Shock, L. S., Thakkar , P. V., Peterson, E. J., Moran, R. G., Taylor, S. M. (2011): DNA methyltransferase 1, cytosine methylation, and cytosine hydroxymethylation in mammalian mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 3630–3635

Smulders, M. J. M., de Klerk, G. J. (2010): Epigenetics in plant tissue culture. *Plant Growth Regulation* 63: 137 – 146

Soppe, W. J. J., Jasenčáková, Z., Houben, A., Kakutani, T., Meister, A., Huang, M. S., Jacobsen, S. A., Schubert, I., Fransz, P. F. (2002): DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in *Arabidopsis*. *European Molecular Biology Organization Journal* 21: 6549 - 6559

Sutherland, H., Bickmore, W. (2009): Transcription factories: Gene expression in unions. *Nature reviews Genetics*, 2009, Vol 10: 457 – 466

Takebe, I., Labib, G., Melchers, G. (1971): Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. *Naturwissenschaften* 58: 318 - 320

Tardy-Planechaud, S., Fujimoto, S., Lin, S. S., Sowers, L. C. (1997): Solid phase synthesis and restriction endonuclease cleavage of oligodeoxynucleotides containing 5-(hydroxymethyl)-cytosine. *Nucleic Acids Research* 25: 553 – 558

Tessadori, F., van Driel, R., Fransz, P. (2004): Cytogenetics as a tool to study gene regulation. *Trends in Plant Science* 9: 147 - 153

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

Valinluck, V., Tsai, H., Rogstad, D. K., Burdzy, A., Bird, A., Sowers, L. C (2004): Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Research* 32, No. 14: 4100–4108

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

Volpi, E. V., Chevret, E., Jones, T., Vatcheva, R., Williamson, J., Beck, S., Campbell, R. D., Goldsworthy, M., Powis, S. H., Ragoussis, J., Trowsdale, J., Sheer, D. (2000): Large-scale chromatin organization of the major histocompatibility complex and other regions of human chromosome 6 and its response to interferon in interphase nuclei. *Journal of Cell Science* 113: 1565 - 1576

Vyskot, B. (2010): Epigenetika, str. 6 - 29. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc

Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., Barton, G. J. (2009): Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* (2009) 25 (9): 1189-1191. doi: 10.1093/bioinformatics/btp033

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

Xu, M., Cook, P. R (2008): Similar active genes cluster in specialized transcription factories. *Journal of Cell Biology* 181: 615 – 623

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

Yao, J., Ardehali, M. B., Fecko, C. J., Webb, W. W., Lis, J. T (2007): Intranuclear distribution and local dynamics of RNA polymerase II during transcription activation. *Molecular cell* 28: 978 – 990

Yao, Q., Song, C., He, Ch., Kumaran, D., Dunn, J. J. (2012): Heterologous expression and purification of *Arabidopsis thaliana* VIM1 protein: *In vitro* evidence for its inability to recognize hydroxymethylcytosine, a rare base in *Arabidopsis* DNA. *Protein Expression and Purification* 83 (2012): 104–111

Zhao, J., Morozova, N., Williams, L., Libs, L., Avivi, Y., Grafi, G. (2001): Two phases of chromatin decondensation during dedifferentiation of plant cells. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 22772 - 22778

Zirbel, R.M., Mathieu, U. R., Kurz, A., Cremer, T., Lichter, P. (1993): Evidence for a nuclear compartment of transcription and splicing located at chromosome domain boundaries. *Chromosome research* 1993, vol 1: 93 - 106