

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2022

Zuzana Klaciková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Molekulárne metódy analýzy DNA: Aplikácia
v epigenetike**

Bakalářská práce

Zuzana Klaciková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2022

Vedoucí práce: prof. RNDr. Boris Vyskot, DrSc.

Konzultant: Dr. José Luis Rodríguez Lorenzo

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Zuzana KLACIKOVÁ
Osobní číslo: R18646
Studijní program: B1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Molekulární metody analýzy DNA: Aplikácia v epigenetike
Zadávací katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

1. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
2. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce.
3. Provedení a zvládnutí vybraných molekulárních metod analýzy DNA při studiu epigenetiky.
4. Vypracování bakalářské práce a multimediální prezentace k obsahové bakalářské práce.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Jazyk zpracování: Slovenština

Seznam doporučené literatury:

- Tamari, F., Hinkley, C. S. (2016). Extraction of DNA from plant tissue: review and protocols. In *Sample preparation techniques for soil, plant, and animal samples* (pp. 245-263). Humana Press, New York, NY.
- Dairawan M., Shetty P. J. (2020): The Evolution of DNA Extraction Methods. *American Journal of Biomedical Science and Research* 8(1), 39-45.
- Kadri, K. (2019). Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. In *Perspectives on Polymerase Chain Reaction*. IntechOpen.
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., & Patel, H. R. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert review of molecular diagnostics*, 5(2), 209-219.
- Ferguson-Smith, M. A. (2015). History and evolution of cytogenetics. *Molecular cytogenetics*, 8(1), 19.

Vedoucí bakalářské práce:

prof. RNDr. Boris Vyskot, DrSc.
Biofyzikální ústav Av ČR, Brno

Datum zadání bakalářské práce: 30. dubna 2020
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2021

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan



prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc – Holice
tel.: +420 585 634 901
-2-

BIBLIOGRAFICKÉ ÚDAJE

Meno a priezvisko autora: Zuzana Klaciková

Názov práce autora: Molekulárne metódy analýzy DNA: Aplikácia v epigenetike

Typ práce: bakalárska

Pracovisko: Katedra bunčnej biológie a genetiky, PŘF UP v Olomouci

Vedúci práce: prof. RNDr. Boris Vyskot, DrSc.

Rok obhajoby: 2022

Kľúčové slová: epigenetika, molekulárne metódy, DNA, metylácia, hydroxymetylácia

Počet strán: 46

Počet príloh: 0

Jazyk: slovenský

ABSTRAKT

Epigenetika je vedný odbor zaoberajúci sa zmenou fenotypu vplyvom interakcie génov s prostredím, pričom nedochádza k zmene primárnej štruktúry DNA. Dôsledky epigenetických procesov môžeme pozorovať naprieč širokým spektrom molekulárnych procesov počnúc diferenciáciou buniek, cez reguláciu génovej expzie až po progredáciu rôznych typov závažných ochorení. Dôležitú rolu v rámci epigenetických procesov zohrávajú modifikácie DNA, predovšetkým metylácia a hydroxymetylácia cytozínu. Na štúdium týchto modifikácií bola vyvinutá široká škála metód, vďaka ktorým je možné porozumieť súvislosti rozšírenia epigenetických vzorcov v jednotlivých pletivách či tkanivách s rastom a vývojom organizmu, vznikom ochorení, ako aj interakciám s environmentálnymi podnetmi. V tejto práci sú zhrnuté a popísané dostupné molekulárne metódy analýzy DNA využívané pri štúdiu epigenetických modifikácií. V experimentálnej časti sú demonštrované vybrané metódy na detekciu hydroxymetylačného profilu a metóda na lokalizáciu transponovateľných elementov v genóme modelového organizmu *Silene latifolia*.

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname: Zuzana Klaciková

Title: Molecular methods for the analysis of DNA: Application to epigenetics

Type of thesis: bachelor

Department: Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science Palacký University
Olomouc

Supervisor: prof. RNDr. Boris Vyskot, DrSc.

The year of presentation: 2022

Keywords: epigenetics, molecular methods, DNA, methylation, hydroxymethylation

Number of pages: 46

Number of appendices: 0

Language: Slovak

ABSTRACT

Epigenetics is a scientific field dealing with the change of phenotype due to interaction of the genes with the environment, without changing the primary structure of the DNA. The consequences of epigenetic processes can be observed across a wide range of molecular processes, from cell differentiation, through the regulation of gene expression, to the progression of various types of serious diseases. DNA modifications, especially cytosine methylation and hydroxymethylation, play an important role in epigenetic processes. To study these modifications, a wide range of methods have been developed, thanks to which it is possible to understand the connections between the spread of epigenetic patterns in individual tissues with the growth and development of the organism, diseases development and interactions with environmental stimuli. This thesis summarizes and describes the available molecular methods of DNA analysis used in the study of epigenetic modifications. The experimental part demonstrates selected methods for the detection of hydroxymethylation profile and method for the localization of transposable elements in the genome of the model organism *Silene latifolia*.

Prehlásenie

Prehlasujem, že som túto bakalársku prácu vypracovala samostatne pod vedením prof. RNDr. Borisa Vyskota, DrSc. a s použitím uvedených literárnych zdrojov.

V Olomouci dňa:

.....

Zuzana Klaciková

Pod'akovanie

Rada by som pod'akovala môjmu vedúcemu bakalárskej práce prof. RNDr. Borisovi Vyskotovi, DrSc. a konzultantovi Dr. José Rodríguezovi za poskytnutie cenných rád, ochotný prístup, trpezlivosť a odborné vedenie pri vypracovaní bakalárskej práce.

Ďalej ďakujem Ing. Marcelovi Hubinskému a Ing. Václavovi Bačovskému, PhD. za praktické rady a pomoc pri spracovaní experimentov.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CIELE PRÁCE.....	2
3	LITERÁRNY PREHLAD.....	3
3.1	Štúdium epigenetiky.....	3
3.2	Molekulárne metódy štúdia DNA v epigenetike.....	5
3.3	Nebisulfidové metódy	7
3.3.1	Metylačne senzitívne reštrikčné endonukleázy	7
3.3.2	Diferenciálna metylačná hybridizácia	7
3.3.3	Tretia generácia sekvenovania	8
3.3.3.1	SMRT sekvenovanie	8
3.3.3.2	Nanopórové sekvenovanie	9
3.3.4	Fluorescenčná <i>in situ</i> hybridizácia	10
3.4	Bisulfidové metódy	11
3.4.1	Bisulfidová konverzia	11
3.4.2	Bisulfidové sekvenovanie	11
3.4.3	Oxidatívne a TET-asistované sekvenovanie	12
3.4.4	Metylačne špecifická PCR	12
3.4.5	Kombinovaná bisulfidová reštrikčná analýza	14
3.4.6	Analýza krivky topenia s vysokým rozlíšením	14
3.5	Imunoafinitné metódy	16
3.5.1	Metylačne závislá imunoprecipitácia	16
3.5.2	Imunodetekcia epigenetických modifikácií DNA.....	17
4	MATERIÁL A METÓDY	18
4.1	Biologický materiál	18
4.2	Zoznam použitých chemikálií	18
4.3	Zoznam použitých roztokov a ich príprava.....	20
4.4	Zoznam použitých prístrojov	21
4.5	Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy.....	22
4.5.1	DNA extrakcia.....	22
4.5.2	Elektroforetická kvantifikácia	23
4.5.3	DNA sonikácia	23
4.5.4	Imunoprecipitácia hydroxymetylovanej DNA.....	24
4.5.5	Purifikácia a kvantifikácia hydroxymetylovanej DNA.....	24
4.5.6	Génovo-špecifická qPCR	25

4.5.7	Príprava chromozómových preparátov	26
4.5.8	Fluorescenčná <i>in situ</i> hybridizácia	27
4.5.9	Imunofarbenie na detekciu 5-hydroxymetylcytosínu	28
5	VÝSLEDKY	29
5.1	hMeDIP	29
5.2	FISH	34
5.3	Imunolokalizácia 5-hmC	35
6	DISKUSIA	36
7	ZÁVER.....	38
8	LITERATÚRA.....	39

ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK

5-caC	5-karboxylcytozín
5-fC	5-formylcytozín
5-hmC	5-hydroxymetylcytozín
5-mC	5-metylcytozín
bp	bázové páry
BS	bisulfidové sekvenovanie
COBRA	kombinovaná bisulfidová reštrikčná analýza
CpG	cytozín-fosfát-guanín; 'cytosine-phosphate-guanin'
DMH	diferenciálna metylačná hybridizácia
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	dvojvláknová deoxyribonukleová kyselina
ELISA	'enzyme linked immunosorbent assay'
FISH	fluorescenčná <i>in situ</i> hybridizácia
gDNA	genómová deoxyribonukleová kyselina
hMeDIP	imunoprecipitácia hydroxymetylovaných oblastí deoxyribonukleovej kyseliny
HRMA	analýza krivky topenia s vysokým rozlíšením
IP	imunoprecipitácia
LTR	dlhé koncové repetície; 'long terminal repeats'
MeDIP	imunoprecipitácia metylovaných oblastí deoxyribonukleovej kyseliny
MSP	metylačne špecifická polymerázová reťazová reakcia
MSRE	metylačne senzitivne reštrikčné endonukleázy
PAR	pseudoautozomálna oblasť; 'pseudoautosomal region'
PCR	polymerázová reťazová reakcia; 'polymerase chain reaction'
qPCR	kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia
SMRT	'single molecule real-time'
ssDNA	jednovláknová deoxyribonukleová kyselina
TE	transponovateľné elementy
TET	'ten-eleven translocation'

ZOZNAM OBRÁZKOV A GRAFOV

Obrázok 1: DNA modifikácie v databáze DNAmoD.

Obrázok 2: Časová os vývoja molekulárnych metód využívaných v epigenetike.

Obrázok 3: Schéma templátu SMRTbell.

Obrázok 4: Schéma zaznamenávania interpulzných trvaní.

Obrázok 5: Schématické zobrazenie metódy nanopórového sekvenovania DNA.

Obrázok 6: Konverzia cytozínu na uracil.

Obrázok 7: Reprezentatívne výsledky gélovej elektroforézy po MSP génu *BRC1*.

Obrázok 8: Schéma denaturačnej krivky DNA.

Obrázok 9: Schéma porovnania denaturačných kriviek dvoch sekvenčne odlišných DNA.

Obrázok 10: Optická kvantifikácia genómových DNA extrahovaných z druhov *Silene*.

Obrázok 11: Sonikácia genómovej DNA.

Obrázok 12: Overenie kvantity 5-hmC imunoprecipitovanej DNA.

Obrázok 13: Distribúcia retrotranspozónu *Athila* CL10 na metafázových chromozómoch *Silene latifolia*.

Obrázok 14: Imunolokalizácia 5-hydroxymetylcytozínu.

Graf 1: Vypočítané hodnoty pomeru obohatenia 5-hmC imunoprecipitovanej DNA.

Graf 2: Graf reprezentujúci pozitívne obohatenie 5-hmC imunoprecipitovanej DNA.

Graf 3: Graf reprezentujúci záporné obohatenie 5-hmC imunoprecipitovanej DNA.

ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1: Zoznam použitých primérov pre qPCR.

Tabuľka 2: Príprava hybridizačného mixu pre celkový objem 20 μ l so stringenciou 93 %.

Tabuľka 3: Obohatené gény s vypočítaným pomerom obohatenia.

Tabuľka 4: Neobohatené gény s vypočítaným pomerom obohatenia.

1 ÚVOD

Pojem epigenetika zaviedol v roku 1942 vývojový biológ Conrad Waddington ako zmenu fenotypu pod vplyvom interakcie génov s prostredím. Epigenetika je široko zasahujúci vedný odbor, ktorá pôsobí na génovú expresiu, embryonálny vývin, opravy DNA, vznik ochorení a mnohé iné oblasti molekulárnej biológie a genetiky. Pod vplyvom epigenetiky dochádza ku štruktúrnym a chemickým modifikáciám predovšetkým DNA a nukleozómových histónov. Modifikácie DNA nemenia základnú sekvenciu, ale nesú dodatočnú informáciu, ktorá môže slúžiť ako označenie endogénnej DNA, reguláciu transkripcie alebo zabezpečenie genómovej stability.

Táto práca rozoberá rôzne dostupné metódy analýzy DNA, ktoré je možné využiť pri štúdiu epigenetických procesov. Metódy sú prehľadne rozdelené do troch skupín na základe možnosti detekcie ich metylačného stavu. Práca sa predovšetkým zameriava na charakteristiku a aplikovateľnosť daných metód v praxi.

2 CIELE PRÁCE

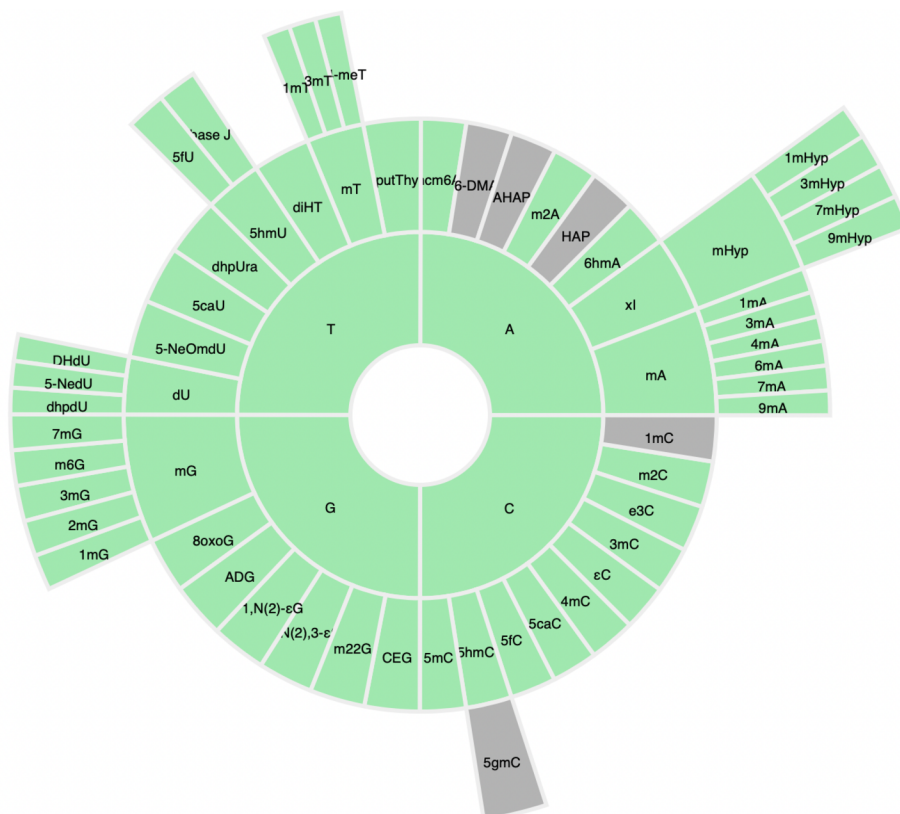
Cieľom teoretickej časti bakalárskej práce bolo spracovať literárnu rešerš na tému molekulárne metódy analýzy DNA využívané pri štúdiu epigenetiky. Opísané boli ako rutinne využívané, tak aj menej využívané metódy.

Cieľom praktickej časti bolo osvojiť si vybrané metódy analýzy DNA a vysvetliť ich výstupy. Prostredníctvom metódy hMeDIP detegovať obohatenie 5-hydroxymetylcytozínu v promótorových oblastiach vybraných génov *Silene latifolia* a *Silene vulgaris*. Prostredníctvom špecifickej protilátky imunolokalizovať túto modifikáciu v genóme *Silene latifolia*. Posledným cieľom bolo fluorescenčnou *in situ* hybridizáciou zmapovať prítomnosť retrotranspozónu *Athila* CL10 v genóme *Silene latifolia*.

3 LITERÁRNY PREHLAD

3.1 Štúdium epigenetiky

Vymedzenie distribúcie DNA modifikácií v genóme má dôležitý vplyv na pochopenie ich úloh v diferenciácii buniek, ontogenéze alebo aj pri rozvoji rôznych ochorení. Databáza DNAmod doteraz eviduje 58 reverzibilných kovalentných modifikácií DNA (Obr. 1), ktoré sa nachádzajú v prirodzenej DNA (Sood *et al.*, 2019). Väčšina DNA modifikácií je výsledkom poškodenia, ale niektoré z nich majú významné regulačné úlohy (Korlach a Turner, 2012).



Obrázok 1: DNA modifikácie v databáze DNAmod. (zdroj: DNAmod, 2022)

Doteraz najviac preštudovaná DNA modifikácia, metylácia cytozínu, reguluje génovú expresiu primárne kondenzáciou chromatinovej štruktúry. Štúdie metylácie genómu odhalili metylačné vzorce, ktoré ovplyvňujú hlavne promótorové alebo repetitívne oblasti. Hypermetylácia génov sa vyskytuje v ich promótorovej oblasti na cytozínových reziduách známych ako CpG ostrovy. Za CpG ostrovy sa vo všeobecnosti považujú oblasti s viac ako 200 bp a s viac ako 50% obsahom CpG dinukleotidov (Li *et al.*, 2019). V bežných bunkách sú tieto oblasti nemetylované, čo umožňuje génovú transkripciu (Bird, 1986). Hypermetylácia promótorov tumor supresorových génov zohráva kritickú úlohu v zníženej expresii týchto

génov a participuje tak pri vzniku rakoviny. Zároveň hypometylácia pôvodne metylovaných oblastí môže viesť k expresii potenciálne nebezpečných génov, najmä ak sa jedná o onkogény (Ehrlich, 2002). Metylácia v telách génov môže stimulovať predĺženie transkripcie alebo môže mať vplyv na zostrih (Jones, 2012).

Na zachovanie genómovej stability môžu byť určité metylačné vzorce dedené prostredníctvom bunkového delenia alebo aj naprieč generáciami. Najlepšie zdokumentovanými prípadmi transgeneračne dedených epigenetických modifikácií sú metylované transponovateľné elementy a promótorové oblasti niektorých génov (Klosin a Lehner, 2016). Aktívne transponovateľné elementy sú semiparazitické sekvencie, ktoré sú vysoko mutagénne, často celičia na proteín kódujúce gény a môžu spôsobiť chromozómové zlomy, či prestavby genómu (Girard a Freeling, 1999). Epigeneticky neaktívny TE si zachováva kódujúci potenciál na mobilizáciu, ale neprodukuje potrebné proteíny v dôsledku represie (Slotkin a Martienssen, 2007).

Fenomén genomického imprintingu pre zmenu ilustruje, ako môžu modifikácie DNA ovplyvňovať vývoj organizmov. Na rozlíšenie rodičovských alel sú imprintované gény epigeneticky značené už v gamétach a po oplodnení zabezpečujú v diploidných bunkách rozdielnú expresiu génov v závislosti od toho, či boli zdedené z vajíčka alebo zo spermie. Rodičovsky špecifické rozdiely v expresii zabezpečuje na akejkoľvek úrovni génovej regulácie, či už na promótoroch, zosilňovačoch, miestach zostrihu alebo aj v polyadenylačných oblastiach. Zaujímavé je, že skupina génov podliehajúca genomickému imprintingu do značnej miery kóduje faktory regulujúce embryonálny a neonatálny vývin (Barlow a Bartolomei, 2014).

Metylácia DNA je rozhodujúca pre embryonálny vývin a bunkovú identitu. Zároveň demetylácia DNA po vzniku zygóty je nevyhnutná pre pluripotenciu embryonálnych kmeňových buniek. Jednotlivé gény sú špecificky metylované v závislosti od typu bunky alebo tkaniva a od vývojového štádia (Rai *et al.*, 2008).

Široký záujem o výskum vyvolal taktiež objav modifikácie 5-hydroxymetylcytozínu, ktorý vzniká oxidáciou 5-metylcytozínu prostredníctvom TET-enzýmov. Zatiaľ čo 5-mC bol pomerne rozsiahlo študovaný, o distribúcii a funkcii 5-hmC sa stále vie len málo. Príchod celogenómových možností skúmania metylácie DNA a pokrok v možnosti rozlíšenia 5-mC od 5-hmC (či iných modifikácií) odhalil, že 5-hmC sú v najväčšej miere na promótoroch a v telách génov, či v distálnych častiach regulačných elementov v genómoch cicavcov (Wu *et al.*, 2011).

3.2 Molekulárne metódy štúdia DNA v epigenetike

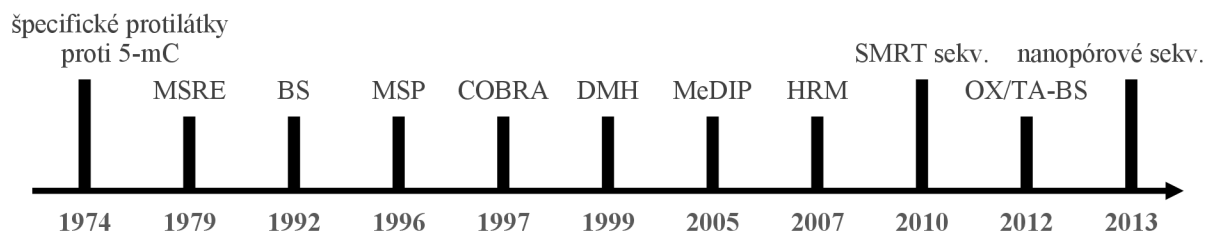
Metódy na analýzu metylačných vzorcov DNA sa ešte stále dynamicky vyvíjajú, no vyvinuli sa zo schopnosti merať množstvo 5-metylcytozínu v konkrétnom genóme. Počiatočné štúdie metylácie DNA sa zameriavali na identifikáciu polohy metylácie v skúmaných génoch a určenie celkového obsahu 5-mC.

Po zistení, že metylcytozín je prístupný špecifickým protilátkam neskôr otvorilo možnosť mapovať metylačné vzorce v spojení s konfokálnymi a fluorescenčnými zobrazovacími metódami (Miller *et al.*, 1974; Santos *et al.*, 2002). Využitie špecifických protilátok našlo svoje uplatnenie aj v imunohistochemii či cytogenetike, kde umožňujú skúmanie distribúcie jednotlivých epigenetických modifikácií v špecifických typoch buniek (Li a Tollefsbol, 2021).

V roku 1992 bola opísaná významná chemická interakcia medzi hydrogénsiričitanom sodným a 5-metylcytozínom v DNA (Frommer *et al.*, 1992). Sekvenovanie takto ošetrenej DNA (bisulfidové sekvenovanie) sa ukázalo ako zlatý štandard analýzy a porovnávaní metylačných vzorcov v špecifických lokusoch, čo umožnilo nový pohľad na reguláciu a dynamiku DNA metylácie v genóme (Lister a Ecker, 2009).

Metódy sekvenovania druhej generácie spôsobili revolúciu v epigenetike. Celogenómové bisulfidové sekvenovanie (WGBS) prvýkrát demonštrovali Lister a Ecker, ktorí vytvorili epigenómovú mapu *Arabidopsis thaliana* (Lister a Ecker, 2009). Tieto metódy však zvyčajne pre veľmi podobnú štruktúru nerozlišujú 5-mC od 5-hmC (prípadne iných modifikácií), a preto sa v tejto oblasti stále vyvíjajú a prispôbujú techniky, ktoré umožňujú štúdium epigenómu špecifického pre určité bunkové typy nezávislého na kroku bisulfidovej konverzie (Skvortsova *et al.*, 2019). Priamu detekciu špecifických modifikácií v natívnej DNA ponúkajú až sekvenátory tretej generácie, ako je SMRT a nanopórové sekvenovanie (Song *et al.*, 2012).

Hoci sú experimentálne metódy vzdialené od epigenetických kontrol pôsobiacich počas vývoja organizmu, stále dokážu poskytnúť prostriedky na objasnenie pravidiel, ktorými sa riadi aparát umlčovania génov (Holliday *et al.*, 1990). Revolúcie v metódach analýzy epigenómu DNA priniesli za posledné desaťročia vylepšenie genómového mapovania metylácie z reštrikčného cez lokusovo-špecifické až na celogenómové mapovanie s rozlíšením na jednotlivé bázy (Li a Tollefsbol, 2021). Prehľad vývoja molekulárnych metód využívaných pri štúdiu epigenetiky je zobrazený na časovej osi (Obr. 2) a v nasledujúcich kapitolách bude princíp jednotlivých metód detailnejšie opísaný.



Obrázok 2: Časová os vývoja molekulárnych metód využívaných v epigenetike. Špecifické protilátky proti 5-mC (Miller *et al.*, 1974); MSRE: metylačne senzitivne reštrikčné endonukleázy (Cedar *et al.*, 1979); BS: bisulfidové sekvenovanie (Frommer *et al.*, 1992); MSP: metylačne špecifická PCR (Herman *et al.*, 1996); COBRA: kombinovaná bisulfidová reštrikčná analýza (Xiong a Laird, 1997); DMH: diferenciálna metylačná hybridizácia (Huang *et al.*, 1999); MeDIP: metylačne závislá imunoprecipitácia DNA (Weber *et al.*, 2005); HRMA: analýza topenia s vysokým rozlíšením (Wojdacz a Dobrovic, 2007); SMRT sekv.: sekvenovanie jednej molekuly v reálnom čase (Flusberg *et al.*, 2010); OX/TA-BS: oxidatívne a TET-asistované bisulfidové sekvenovanie (Booth *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2012); nanopórové sekvenovanie (Schreiber *et al.*, 2013).

3.3 Nebisulfidové metódy

3.3.1 Metylačne senzitivne reštrikčné endonukleázy

Metylačne senzitivne reštrikčné endonukleázy sú špecifické enzýmy baktérií, ktoré umožňujú ochranu hostiteľského genómu pred genómovými parazitmi. Každá endonukleáza je asociovaná s DNA metyltransferázou, ktorá ochraňuje endogénnu DNA pred reštrikčným štiepením pomocou naviazania metylových skupín na rozpoznávajúce miesto. Napríklad typickým párom reštrikčných endonukleáz sú izoschizoméry *HpaII/MspI*, ktoré rozpoznávajú sekvenciu C/CGG. Pokiaľ je vnútorný cytozín v danej tetranukleotidovej sekvencii metylovaný, štiepenie s *HpaII* je inhibované, ale štiepenie s *MspI* nie je ovplyvnené (Cedar *et al.*, 1979). Ďalšia reštrikčná endonukleáza *McrBC* štiepi DNA obsahujúcu metylcytozín alebo hydroxymetylcytozín v miestach (G/A)mC vzdialených od seba 50 až 3 000 bp (Badal *et al.*, 2003). Produkty štiepenia sa môžu v závislosti od množstva ďalej analyzovať technikou Southernovej hybridizácie alebo PCR. Táto metóda je limitovaná prítomnosťou reštrikčného miesta v géne záujmu alebo v promótoře (Bartošík a Ondroušková, 2016).

3.3.2 Diferenciálna metylačná hybridizácia

Diferenciálna metylačná hybridizácia bola prvou metódou založenou na mikročipoch, ktorá bola určená na celogenómový skrining *de novo* hypermetylovaných CpG ostrovov. Kombinuje použitie reštrikčných endonukleáz a mikročipov na kvantifikáciu a identifikáciu stavu metylácie v genóme. Genómová DNA je štiepená reštrikčnou endonukleázou (napr. *MseI*) mimo CpG oblastí, po ktorej nasleduje ligácia syntetických linkerov na konce vzniknutých fragmentov. Polovica fragmentov je následne ošetrená metylačne senzitivnou endonukleázou (napr. *BstUI*, *HpaII*) a druhá neošetrená polovica je použitá ako kontrola. Výsledkom je, že metylované fragmenty a kontrola sú amplifikovateľné pomocou PCR s primérmí špecifickými pre linkery (Huang *et al.*, 1999). Metódu je zároveň možné modifikovať v druhom kroku použitím reštrikčnej endonukleázy *McrBC*, ktorá štiepi metylované sekvencie. Amplikóny sú fluorescenčne odlišne značené a kohybridizované na knižnicu CpG ostrovov mikročipu. Pomer intenzít jednotlivých fluorescenčných značení udáva stav metylácie v daných vzorkách (Nouzova *et al.*, 2004).

3.3.3 Tretia generácia sekvenovania

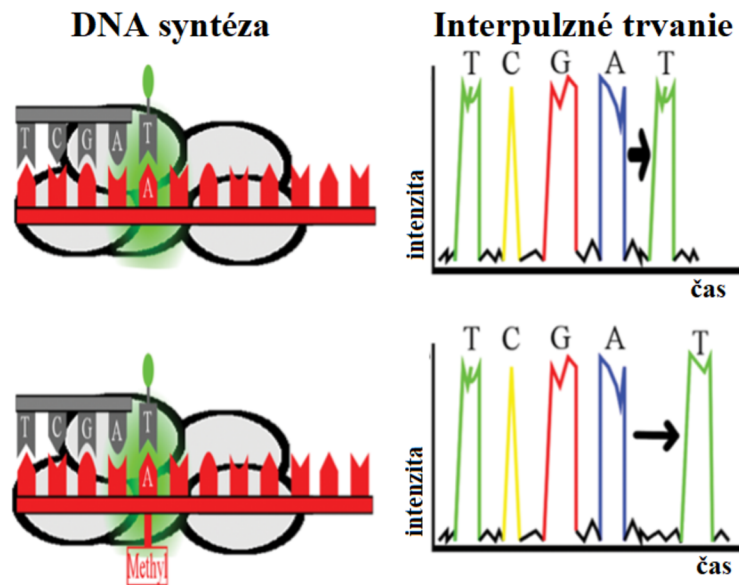
Sekvenátory druhej generácie majú prirodzené obmedzenia, ako napríklad to, že nerozlišujú nukleotidové modifikácie DNA, skresľujú GC oblasti, majú problémy s mapovaním repetitívnych sekvencií alebo s rozlišovaním paralógných sekvencií, nakoľko je potrebné molekuly fragmentovať. Sekvenátory tretej generácie ponúkajú rýchlu sekvenáciu jednej molekuly DNA v natívnom stave, ktorá môže dosahovať veľkosť až niekoľkých desiatok tisíc bázových párov (Schadt *et al.*, 2010).

3.3.3.1 SMRT sekvenovanie

Metóda od spoločnosti Pacific Biosciences, ktorá sleduje v reálnom čase prebiehajúcu replikáciu molekuly DNA. Pred samotným SMRT sekvenovaním musí byť pripravená knižnica z dvojvláknovej DNA. Príprava knižnice pozostáva z ligácie jednovláknových vlásenkových adaptérov na oba konce molekuly DNA, čím sa vytvorí kruhová molekula tzv. SMRTbell (Obr. 3) (Travers *et al.*, 2010). Reakcie prebiehajú súčasne na jednom čipe v mnohých nanofotonických štruktúrach označených ako „neriadené vlnové vedenie“ ('zero-mode waveguide', ZMW), ktoré znižujú pozadie fluorescencie. Na dne štruktúry je imobilizovaná DNA polymeráza, na ktorú sa pripojí adaptér. Polymeráza katalyzuje *in vitro* DNA replikáciu pridávaním deoxyribonukleozidtrifosfátov, na ktorých fosfátové skupiny sú naviazané odlišné fluorofóry. Tvorba fosfodiesterovej väzby vedie k uvoľneniu komplexu fluorofór-linker-pyrofosfát z inkorporovaného nukleotidu, zanikne fluorescenčný signál (pulz) a polymeráza sa translokuje na ďalšiu pozíciu (Gupta, 2008). Fluorescenčné signály sú charakterizované svojimi emisnými spektrami a zároveň je zaznamenávaný aj čas medzi inkorporáciou jednotlivých nukleotidov, ktorý sa nazýva interpulzné trvanie ('interpulse duration', IPD). Keď polymeráza narazí na nukleotid, ktorý obsahuje (epigenetickú) modifikáciu, tak to ovplyvní jej kinetiku a IPD bude trvať dlhšie v porovnaní s nemodifikovaným nukleotidom (Obr. 4) (Flusberg *et al.*, 2010).



Obrázok 3: Schéma templátu SMRTbell. Prevzaté z Travers *et al.*, 2010. Kruhová molekula pozostáva z inzertu dvojvláknovej DNA (žltá-fialová), ktorý je lemovaný dvoma jednovláknovými adaptérmi (zelená). Na adaptér nasadá špecifický sekvenačný primér (oranžová).



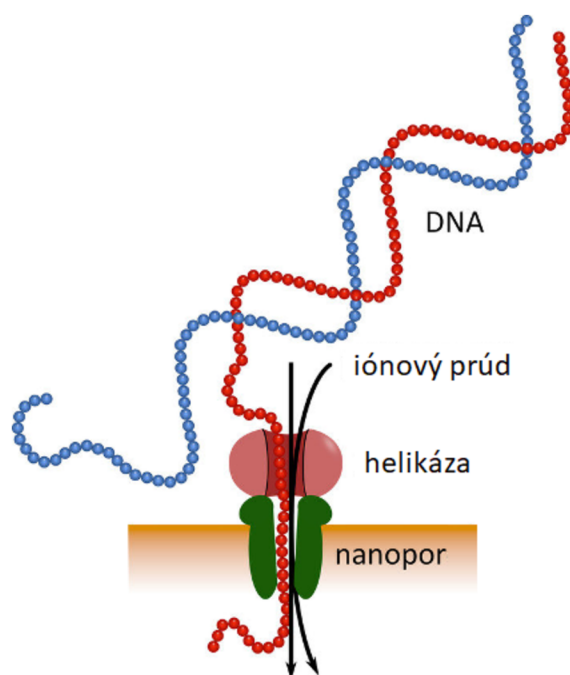
Obrázok 4: Schéma zaznamenávania interpulzných trvaní. Prevzaté z Ardui *et al.*, 2018, upravené.

3.3.3.2 Nanopórové sekvenovanie

Ďalšiu technológiu sekvenovania tretej generácie vyvinula spoločnosť Oxford Nanopore Technologies, ktorej prístroje sú cenovo dostupné, rýchle a schopné sekvenovať natívnu molekulu DNA s veľkosťou aj viac ako 100 kbp. Molekula nanopóru bola inšpirovaná oligomérom iónovým kanálom v membránach buniek (Bayley, 2015).

Pred samotným sekvenovaním sa na oba konce DNA pripoja adaptéry, ktoré zabezpečia prichytenie 5'konca vlákna DNA na procesný enzým. Enzým denaturuje DNA a zabezpečuje precízny posun vlákna v jednom smere po jednotlivých bázach cez nanopór, ktorý je zabudovaný v elektricky odolnej membráne obklopenej iónovým roztokom. Cez membránu je aplikované napätie, čo spôsobí vznik iónového prúdu v nanopóre (Obr. 5). Jednotlivé posúvajúce sa nukleotidy prechádzajúce nanopórom spôsobujú charakteristické zmeny v iónovom prúde, ktoré zaznamenáva detektor (Jain *et al.*, 2016).

Jednokanálový nanopórový systém dokáže rozpoznať jednotlivé modifikácie cytozínu (5-mC, 5-hmC, 5-fC a 5-caC), a teda lepšie identifikovať epigenetický status cytozínu v cieľových bunkách, ktoré zahŕňujú všetky tieto modifikácie (Wescos *et al.*, 2014). Napriek mnohým výhodám tejto technológie je stále potrebný vývoj, ktorý by odstránil jej pomerne veľkú chybovosť sekvenovania (až 15 % na bázu) (Quainoo *et al.*, 2017).



Obrázok 5: Schématické zobrazenie metódy nanopórového sekvenovania DNA. Prevzaté z Mueller *et al.*, 2019, upravené.

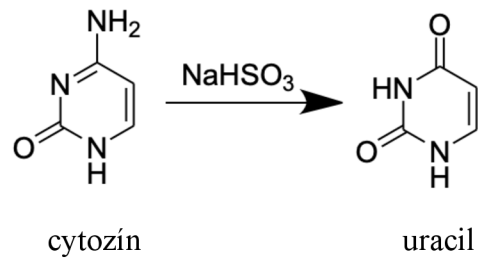
3.3.4 Fluorescenčná *in situ* hybridizácia

Fluorescenčná *in situ* hybridizácia je molekulárno-cytogenetická metóda, ktorá umožňuje lokalizáciu špecifických sekvencií DNA priamo na chromozómoch. Fluorescenne značená DNA sonda hybridizuje k špecifickému úseku DNA na základe komplementarity a následne sú chromozómy s hybridizovanou sondou vizualizované prostredníctvom fluorescenčného alebo konfokálneho mikroskopu (Levsky a Singer, 2003). Túto metódu je možné použiť predovšetkým na štúdium štruktúry, dynamiky či pôvodu určitých lokusov. Nejedná sa však o metódu, ktorá by priamo detegovala metylované alebo inak epigeneticky značené oblasti v genóme, ale poskytuje fyzické mapovanie špecifických sekvencií, medzi ktoré môžeme zaradiť aj tandémové repetície, satelity alebo transponovateľné elementy. TE sú považované za silné endogénne mutagény, čo vyplýva z ich reprodukčného mechanizmu – transpozície (Morales *et al.*, 2015). Stratégiou ochrany integrity genómu je umlčovanie transponovateľných elementov indukciou heterochromatínizácie prostredníctvom metylačných mechanizmov alebo pomocou malých interferujúcich RNA. Najviac preštudované TE sa nachádzajú v blízkosti génov, ktorým často ovplyvňujú génovú reguláciu (Sigman a Slotkin, 2016).

3.4 Bisulfidové metódy

3.4.1 Bisulfidová konverzia

Bisulfidová konverzia zahŕňa transformáciu epigenetickej informácie na genetickú informáciu. Štúdium cytozínovej metylácie spočíva v ošetrení DNA hydrogénsiričitanom sodným, ktorý deaminuje nemetylovaný cytozín na uracil, pričom metylovaný cytozín sa nemení (Obr. 6) (Hayatsu *et al.*, 1970).



Obrázok 6: Konverzia cytozínu na uracil. Načrtnuté v ChemDraw.

3.4.2 Bisulfidové sekvenovanie

Po ošetrení DNA hydrogénsiričitanom sodným nasleduje PCR amplifikácia špecifického úseku, pričom nemetylovaný cytozín je amplifikovaný ako tymín a metylovaný cytozín ako cytozín. Takto sú získané dve rôzne sekvencie DNA v závislosti na metylácii, najčastejšie prostredníctvom druhej generácie sekvenovania DNA (Frommer *et al.*, 1992). V nadväznosti na zmapovanie ľudského genómu (Human Genome Project 2003) sa touto metódou otvorila aj možnosť na zmapovanie ľudského epigenómu, čo by mohlo prispieť k štúdiu širokej škály ochorení (Rakyan *et al.*, 2004).

Napriek pokroku, ktorý ponúka bisulfidové sekvenovanie, zostáva v technike niekoľko nevýhod. Kroky prípravy vzorky spojené s bisulfidovým sekvenovaním sú nákladné a časovo náročné, pričom reakčné podmienky môžu degradovať DNA. Okrem toho, bisulfidové ošetrenie komplikuje návrh primérov na PCR amplifikáciu a tiež sťažuje zarovnanie s referenčným genómom. Taktiež nie je možné odlišiť jednotlivé cytozínové modifikácie, ktoré sú odlišiteľné až sekvenovaním tretej generácie (Huang *et al.*, 2010). Nakoľko je sekvenovanie tretej generácie stále v procese vývoja, platformy druhej generácie sekvenovania sú stále dominantné v rámci štúdia epigenetiky (Li a Tollefsbol, 2021).

3.4.3 Oxidatívne a TET-asistované sekvenovanie

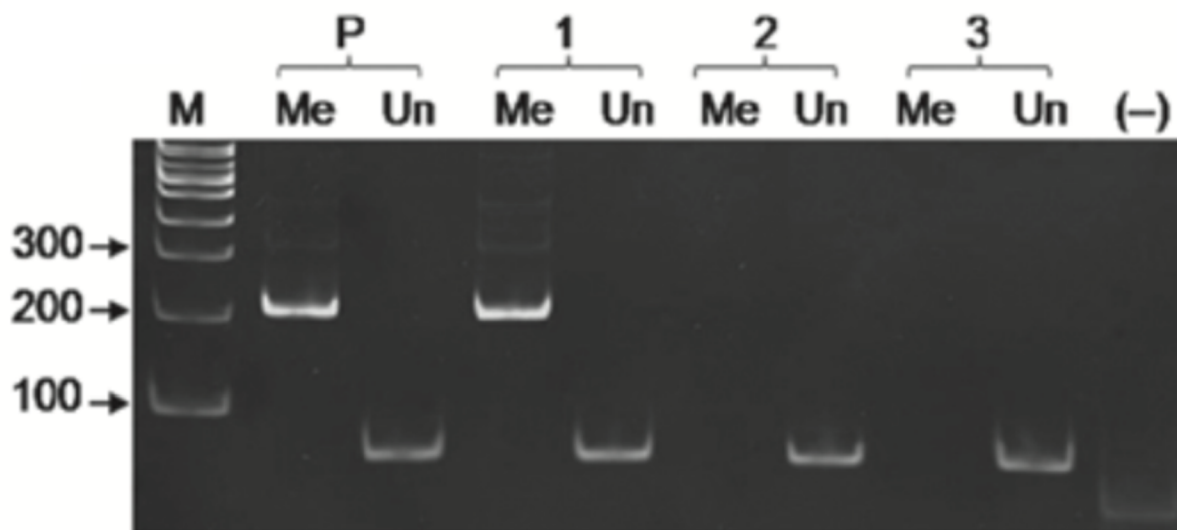
Do procesu demetylácie DNA sú zahrnuté cytozínové modifikácie ako 5-hydroxymetylcytozín, 5-formylcytozín a 5-*karboxyl*cytozín (Shi *et al.*, 2017). Konvenčné bisulfidové sekvenovanie nie je schopné rozlíšiť 5-mC a 5-hmC, preto bol vyvinutý selektívny oxidačný krok, ktorý zabezpečuje konverziu 5-hmC na 5-fC, z ktorého sa po bisulfidovom ošetrovaní stáva uracil (Booth *et al.*, 2012).

Skupina TET-enzýmov prirodzene katalyzuje oxidáciu 5-mC na 5-hmC, respektíve na 5-fC alebo 5-caC (Tahiliani *et al.*, 2009). TET-asistované bisulfidové sekvenovanie je alternatívna metóda na detekciu 5-hmC. Pomocou β -glukozyltransferázy dochádza ku glukozylácii 5-hmC, a tým k jeho ochrane pred oxidáciou TET-enzýmami. 5-mC sa tak prostredníctvom TET1-enzýmov oxiduje až na 5-caC, ktorý je schopný po bisulfidovom ošetrovaní konvertovať na uracil (Yu *et al.*, 2012). Po sekvenovaní je možné porovnať sekvencie z konvenčného, oxidatívneho či TET-asistovaného bisulfidového sekvenovania, a kvantifikovať tak prítomnosť daných modifikácií (Barros-Silva *et al.*, 2018).

3.4.4 Metylačne špecifická PCR

Vývoj polymerázovej reťazovej reakcie bol jedným z najväčších prelomov v oblasti molekulárnej biológie. PCR je definovaná ako *in vitro* enzýmová syntéza a amplifikácia špecifických DNA sekvencií (Templeton, 1992).

Templátová DNA sa počiatočne modifikuje hydrogénsiričitanom sodným, ktorý konvertuje nemetylované cytozíny na uracily. Po ošetrovaní DNA nasleduje PCR amplifikácia špecificky navrhnutých úsekov, ktorá využíva dve sady primérov – jedna sada, ktorá amplifikuje nemetylovanú DNA a druhá sada špecifická pre metylovanú DNA (Herman *et al.*, 1996). Návrh špecifických primérov pre MSP dokáže uľahčiť databáza MethPrimer, verejne dostupná na <http://www.urogene.org/methprimer> (Li a Dahiya, 2002). Pre každú vzorku sa uskutočnia dve PCR reakcie, po ktorých sa produkty amplifikácie vyhodnocujú prostredníctvom gélovej elektroforézy. V závislosti od použitých primérov sa na základe relatívnej molekulovej hmotnosti dá určiť či je produkt metylovaný alebo nemetylovaný (Herman *et al.*, 1996). Na Obrázku 7 sú zobrazené výsledky elektroforetickej separácie MSP produktov špecifických pre gén *BRCA1*, ktorý kóduje proteín účastniaci sa DNA reparácie a kontroly bunkového cyklu.



Obrázok 7: Reprezentatívne výsledky gélovej elektroforézy po MSP génu *BRCA1*. Prezaté z Lan *et al.*, 2014. Výsledky metylácie (Me) / nemetylácie (Un) génu *BRCA1* troch vzoriek (1, 2, 3) s pozitívnou kontrolou metylácie (P).

Medzi výhody MSP patrí presnosť, flexibilita pri výbere oblasti analýzy, nízke množstvo vstupného materiálu a jej cenová dostupnosť (Pajares *et al.*, 2021). Primárnym obmedzením tejto metódy je, že je kvalitatívna. Vo všeobecnosti štandardizované MSP poskytujú informácie o prítomnosti/nepítomnosti metylovanej, nemetylovanej či oboch alel. Výsledky štúdií nepreukázali jasnú korešpondenciu medzi intenzitou pruhu a pomerom riedenia, pričom mnohé prípady vykazovali veľmi podobné pruhy aj pre rôzne úrovne metylácie (Häfner *et al.*, 2011). Taktiež môže dôjsť k falošne pozitívnym výsledkom v dôsledku neúplnej bisulfidovej konverzie, čo je obzvlášť problematické pri priméroch obsahujúcich nízky počet cytozínov iných ako CpG (Kristensen *et al.*, 2012).

S vývojom kvantitatívnej PCR bolo vyvinutých aj niekoľko adaptácií MSP, vrátane MethyLight, ktorá využíva fluorescenčne odlišne značené sondy TaqMan špecifické pre metyláciu (Eads *et al.*, 2000). Kvantitatívna MSP (qMSP) umožňuje rýchlu analýzu viacerých CpG oblastí vo vzorkách, čo je možné využiť ako potenciálny biomarker určitých ochorení v klinickej praxi. Kvantitatívna MSP navyše ponúka zvýšenú citlivosť a zároveň kvantitatívne hodnotenie hladín metylácie. Na určenie relatívnych hladín metylovanej DNA sa hodnoty cieľového génu normalizujú voči hodnotám referenčného génu ('housekeeping' génu) a získaný pomer sa vynásobí $\times 1000$ (cieľový gén/referenčný gén $\times 1000$) (Ramalho-Carvalho *et al.*, 2018).

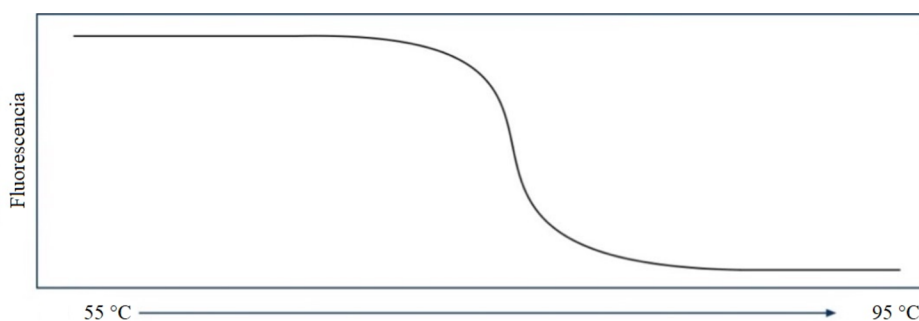
3.4.5 Kombinovaná bisulfidová reštrikčná analýza

Kvantitatívna metóda na určenie hladiny metylácie v špecifických génových lokusoch. Zahŕňa kombináciu bisulfidovej konverzie (viď 3.4.1), PCR amplifikácie a štiepenia reštrikčnými endonukleázami. Po bisulfidovom ošetrení DNA dochádza k zmene v DNA sekvencii. Táto sekvenčná konverzia môže viesť k vytvoreniu nových miest pre reštrikčné štiepenie. V PCR reakcii nie sú použité priméry obsahujúce CpG dinukleotidy, takže krok amplifikácie nezávisí od pôvodného stavu molekuly DNA. Vo výslednom amplikóne sa tak nachádzajú fragmenty DNA s novovytvoreným a zároveň aj so zachovaným reštrikčným miestom. Stupeň metylácie v pôvodnej vzorke sa určí po reštrikčnom štiepení prostredníctvom gélovej elektroforézy z pomeru relatívneho množstva štiepeného a neštiepeného produktu PCR. Výhodou je, že na prevedenie tejto metódy stačí malé množstvo vzorky (Xiong a Laird, 1997).

3.4.6 Analýza krivky topenia s vysokým rozlíšením

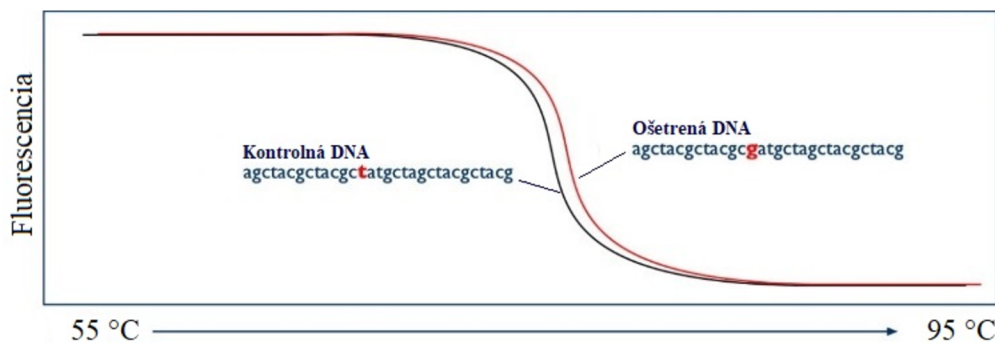
HRMA je post-PCR analýza DNA, ktorá je schopná zaznamenať genetické variácie ako mutácie, polymorfizmus alebo epigenetické modifikácie vo vzorkách DNA na základe ich rozdielnych teplôt topenia. Kombinácia qPCR a HRMA nástrojov umožňuje detekciu kvantitatívnych (delécie/duplikácie), tak aj kvalitatívnych (bodové mutácie) zmien (Rouleau *et al.*, 2009)

Pred samotnou analýzou je ku vzorke pridané fluorescenčné farbivo (napr. EVAGreen), ktoré sa interkaluje do dsDNA. V tomto momente je detegovaná najvyššia hodnota fluorescence. Postupne ako sa začnú vlákna DNA od seba oddeľovať, hodnota fluorescence začne klesať, pretože dané farbivo nie je schopné sa viazať do ssDNA (Obr. 8). HRMA zahŕňa precízny monitoring zmien fluorescence, ktoré sú zapríčinené uvoľňovaním interkalačného DNA farbiva z DNA duplexu, ktorý denaturuje pod vplyvom vysokej teploty (Wojdacz a Dobrovic, 2007).



Obrázok 8: Schéma denaturačnej krivky DNA. (zdroj: HRM guide, upravené)

Ošetrením genómovej DNA hydrogénsiričitanom sodným (viď 3.4.1) dochádza ku konverzii nemetylovaných cytozínov na uracil, čím sa zmení sekvencia DNA. Denaturačnú krivku ošetrenej DNA je v rámci HRM analýzy možné porovnať s denaturačnou krivkou neošetrenej DNA (Obr. 9) alebo profilmi riedením pripravených štandardov. Približné percento metylácií sa dá vypočítať na základe získaných rozdielov. Krivka závisí od veľkosti produktu, jeho sekvencie či obsahu GC v produkte. Cytozín a guanín komplementárnych reťazcov DNA sú viazané trojitou vodíkovou väzbou, zatiaľ čo adenín a tymín sú viazané dvojitou väzbou. Ošetrená metylovaná DNA s väčším počtom dvojitych väzieb má nižšiu teplotu topenia ako neošetrená metylovaná DNA, pretože vyžaduje nižšiu tepelnú energiu na rozpad väzieb. Bez sekvenovania však analýza topenia neponúka detailné informácie o metylácii jednotlivých cytozínov, umožňuje ale rozlíšiť plne či čiastočne metylované vzorky (Wojdacz a Dobrovic, 2007).



Obrázok 9: Schéma porovnania denaturačných kriviek dvoch sekvenčne odlišných DNA. (zdroj: HRM guide, upravené)

Všetky metódy využívajúce PCR amplifikáciu bisulfidovo modifikovanej DNA môžu byť rozdelené do dvoch skupín na základe použitých PCR primérov. Prvá skupina zahŕňa priméry, ktoré špecificky amplifikujú metylované (alebo nemetylované) templáty, napr. pri MSP alebo qMSP. Druhá skupina je založená na priméroch, ktoré umožňujú amplifikáciu templátu bez ohľadu na jeho metylačný status a umožňujú post-PCR analýzu, napr. bisulfidové sekvenovanie, reštrikčné štiepenie alebo HRMA (Wojdacz a Dobrovic, 2007).

3.5 Imunoafinitné metódy

3.5.1 Metylačne závislá imunoprecipitácia

Konverzia nemetylovaného cytozínu hydrogénsiričitanom sodným je veľmi pracná a nedá sa použiť na skrining veľkého súboru sekvencií alebo vzoriek. Metylačne závislá imunoprecipitácia DNA ('methylation-dependend immunoprecipitation', MeDIP) sa dá bežne dosiahnuť buď izoláciou DNA metylovaných fragmentov pomocou monoklonálnych protilátok špecifických ku 5-metylcytozínu (anti-5-mC) alebo izoláciou DNA fragmentov obsahujúcich metylované CpG dinukleotidy za použitia proteínu viažúceho metylovú doménu ('methylation binding domain', MBD). Túto metódu je možné modifikovať použitím rozličných typov špecifických protilátok voči rôznym epigenetickým modifikáciám (Weber *et al.*, 2005).

Izolácia metylovanej DNA prebieha nasledovne: ultrazvukom fragmentovaná genómová DNA je rozdelená do dvoch frakcií, pričom jedna frakcia slúži ako referenčná kontrola ('input', IN) a druhá frakcia je určená k imunoprecipitácii (IP). DNA je pred imunoprecipitáciou denaturovaná a inkubovaná s primárnou protilátkou (napr. anti-5-metylcytidín) alebo s rekombinantným proteínom viažúcim metylovú doménu. Na magnetické častice naviazaná sekundárna protilátka zachytáva komplex metylovaná DNA-protilátka/MBD, a tak je metylovaná DNA zachytená v skúmavke a nemetylovaná DNA je vymytá z roztoku. Po purifikácii získanej IP DNA od použitých proteínov môže byť DNA následne analyzovaná rôznymi variantami PCR, DNA mikročipmi alebo hlbokým sekvenovaním (Thu *et al.*, 2009).

Táto analýza je predovšetkým zameraná na hypermetylované oblasti, ktoré sú efektívnejšie zachytené (CpG dinukleotidy a promótorové oblasti) (Barros-Silva *et al.*, 2018). Sú to najekonomickejšie a najefektívnejšie metódy štúdia metylácie DNA, či už celého genómu alebo špecifických úsekov. V prípade hodnotenia obohatenia metylovanej DNA po MeDIP je často využívaná génovo špecifická qPCR. Ako meradlo sa využíva rozdiel medzi zaznamenanými Ct hodnotami IN DNA a IP DNA (Weng *et al.*, 2009). Užitočná je taktiež aplikácia MeDIP v kombinácii s hybridizáciou na DNA mikročipy na skúmanie korelácie medzi DNA metylačnými vzorcami a histónovými modifikáciami (Jacinto *et al.*, 2008).

3.5.2 Imunodetekcia epigenetických modifikácií DNA

Schopnosť metylcytozínu byť prístupný špecifickým protilátkam otvorila možnosť mapovať metylačné vzorce s využitím optických zobrazovacích metód konfokálnej či fluorescenčnej mikroskopie. Imunolokalizácia distribúcie epigenetických modifikácií v genóme dokáže pomôcť identifikovať špecifické sekvencie hypermetylovaných génov, ktoré môžu byť asociované s rôznymi druhmi ochorení. Po potvrdení asociácie špecifických protilátok alebo MBD proteínov s oblasťami hypermetylovaných génov, tak môžu byť tieto gény predmetom podrobnejšej cielenej charakterizácie, čo sa týka DNA metylácie a expresie daného génu (Ballestar *et al.*, 2003). Špecifické protilátky proti 5-metylcytozínu (príp. iným modifikáciám) zvyknú byť taktiež používané v rámci štúdia embryonálneho vývinu. Prvýkrát boli použité na zobrazenie epigenetického procesu dynamiky metylácie a demetylácie v raných fázach preimplantačného vývinu embrya (Santos *et al.*, 2002).

V súčasnosti sú komerčne dostupné špecifické protilátky prakticky voči všetkým známym epigenetickým modifikáciám DNA nukleotidov. Aby bola umožnená ich detekcia, na naviazanú špecifickú (primárnu) protilátku sa naviaže sekundárna protilátka značená fluorofórom, ktorá amplifikuje signál. Rozhodujúcim krokom je zároveň príprava vhodných preparátov (či už jadrových alebo chromozómových). Nedostatočná permeabilizácia membrán môže mať za následok slabú kvalitu signálu (Beaujean *et al.*, 2018).

Globálny metylačný či hydroxymetylačný profil vzorky sú prostredníctvom špecifických protilátok schopné kolorimetricky alebo fluorescenčne kvantifikovať aj komerčne dostupné ELISA súpravy. Analyzovaná DNA je zachytená na ELISA mikrotitračnú doštičku, ku ktorej je následne pridaná primárna protilátka voči konkrétnej modifikácii a značená sekundárna protilátka. Jednoduché kolorimetrické či fluorescenčné vyhodnotenie profilu slúži prevažne na identifikáciu veľkých zmien v metylácii genómu (Kurdyukov a Bullock, 2016).

4 MATERIÁL A METÓDY

4.1 Biologický materiál

V praktickej časti bol použitý materiál rastlín rodu *Silene*, ktoré pochádzajú z kultivarov oddelenia Vývojovej genetiky rastlín Biofyzikálneho ústavu Akadémie vied Českej republiky v Brne. Všetky rastliny boli pestované za štandardných podmienok pri teplote 24 °C s režimom svetlo/tma 16/8 hodín.

- Na DNA extrakciu boli použité mladé zelené listy samčích a samičích rastlín inbrednej populácie ekotypu U15 druhu *Silene latifolia* a druhu *Silene vulgaris*.
- Na prípravu chromozómových preparátov boli použité semená inbrednej populácie ekotypu U16 druhu *Silene latifolia*.

Silene latifolia ($2n=24$, XY) je dvojdómá rastlina, ktorú tvorí 11 párov autozómov a 1 pár výrazne väčších pohlavných chromozómov. *Silene vulgaris* ($2n=24$) je jej blízky príbuzný druh, avšak jedná sa o gynodioecickú rastlinu bez pohlavných chromozómov.

4.2 Zoznam použitých chemikálií

- 2-merkptoetanol (Sigma-Aldrich, kat. č. M3148)
- 5-hydroxymetylcytidín protilátka, rat monoclonal (Diagenode, kat. č. C15220001)
- agaróza (Serva, kat. č. 11404)
- boviný sérový albumín (BSA) (Thermo Fisher Scientific, kat. č. B14)
- celulóza (Merck, kat. č. 219466)
- celulóza R10 Onozuka (Duchefa Biochemie, kat. č. C8001.0005)
- citrónan sodný dihydrát (Penta, kat. č. 11470-31000)
- cytohelikáza (Merck, kat. č. C8274)
- deoxyribonukleozidtrifosfáty (dNTPs), pracovný roztok s koncentráciou 10 mM
 - dATP (Sigma-Aldrich, kat. č. D4788)
 - dCTP (Sigma-Aldrich, kat. č. D4913)
 - dGTP (Sigma-Aldrich, kat. č. D5038)
 - dTTP (Sigma-Aldrich, kat. č. D9656)
- destilovaná deionizovaná voda (ddH₂O)
- dezinfekčný prostriedok Savo Original (Unilever, kat. č. 9218443)
- DreamTaq Buffer (10×) (Thermo Fisher Scientific, kat. č. B65)

- DreamTaq DNA Polymerase (5 U/μl) (Thermo Fisher Scientific, kat. č. EP0701)
- Dynabeads Protein G (Invitrogen, kat. č. 10004D)
- EDTA (kyselina etyléndiamínotetraoctová) (Invitrogen, kat. č. 15575020)
- etanol 100% (Sigma-Aldrich, kat. č. 459836)
- etanol 96% (Avantor, kat. č. 20822.290)
- etídium bromid (Sigma-Aldrich, kat. č. E1510)
- fenol (Penta, kat. č. 13780-30500)
- fenol:chloroform:isoamylalkohol 25:24:1 (AppliChem, kat. č. A0889)
- formaldehyd 37% roztok (Merck, kat. č. 103999.1000)
- fosfát sodný (Sigma-Aldrich, kat. č. 342483)
- GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific, kat. č. SM0331)
- glykogén (Sigma-Aldrich, kat. č. G0885)
- hydroxyurea (Sigma-Aldrich, kat. č. H8627)
- chlorid horečnatý hexahydrát (Penta, kat. č. 16330-31000)
- chlorid sodný (Lach-Ner, kat. č. 30093)
- chloroform (Penta, kat. č. 17130-11000)
- isopropanol (Penta, kat. č. 17510-11000)
- kolchicín (Merck, kat. č. C3915)
- kyselina citrónová (Penta, kat. č. 18790-31000)
- kyselina chlorovodíková 35% (Lach-Ner, kat. č. 10033)
- kyselina octová 99,8% ľadová (Penta, kat. č. 19990-11000)
- pektináza (Merck, kat. č. P2611)
- pektolyáza (Merck, kat. č. P3026)
- PMSF (fenylmetylsulfonyl fluorid) (Thermo Fisher Scientific, kat. č. 36978)
- priméry pre qPCR (Generi Biotech)
- proteináza K (Sigma-Aldrich, P2308)
- sacharóza (Lach-Ner, kat. č. 40135)
- SDS (dodecylsírán sodný) (Sigma-Aldrich, kat. č. L3771)
- SensiFAST™ HRM Kit (Bioline, kat. č. BIO-32005)
- tekutý dusík (Linde Gas, kat. č. 2210129)
- Tris base (Merck, kat. č. 648310)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, kat. č. T8787)

- Tween 20 (Merck, kat. č. P9416)
- Tween 80 (Merck, kat. č. P4780)
- VectaShield (Vector Laboratories, kat. č. H-1200)

4.3 Zoznam použitých roztokov a ich príprava

- Pufer A: 15 g sacharózy, 1 ml 1M Tris-HCl (pH 8,0), 40 μ l 14M 2-merkaptóetanolu, 50 μ l 200mM PMFS rozpustiť za stáleho miešania v 50 ml ddH₂O a doplniť vodou do 100 ml.
- Pufer B: 8,55 g sacharózy, 1 ml 1M Tris-HCl (pH 8,0), 1 ml 1M MgCl₂, 5 ml 20% Triton X-100, 40 μ l 14M 2-merkaptóetanolu, 50 μ l 200mM PMFS rozpustiť za stáleho miešania v 50 ml ddH₂O a doplniť vodou do 100 ml.
- Pufer C: 8,55 g sacharózy, 1 ml 1M Tris-HCl (pH 8,0), 1 ml 1M MgCl₂, 40 μ l 14M 2-merkaptóetanolu, 50 μ l 200mM PMFS rozpustiť za stáleho miešania v 50 ml ddH₂O a doplniť vodou do 100 ml.
- Lyzačný Pufer: 0,5 ml 1M Tris-HCl (pH 8,0), 0,2 ml 5M EDTA, 0,1 ml 10% SDS, 0,5 μ l 200mM PMFS zmiešať a doplniť vodou do 1 ml.
- 10 \times IP Pufer: 28 ml 5M NaCl, 10 ml 1M fosfátu sodného (pH 7,0), 2,5 ml 20% Triton X-100 zmiešať a doplniť vodou do 100 ml.
- 1 \times IP Pufer: 1 ml 10 \times IP buffer + 9 ml ddH₂O
- Pufer D: 2,5 ml 1M Tris-HCl (pH 8,0), 1 ml 5M EDTA, 2,5 ml 10% SDS zmiešať a doplniť do 50 ml ddH₂O.
- 0,5M EDTA (pH 8,0): 186,1 g EDTA rozpustiť v 800 ml ddH₂O, upraviť pH a doplniť vodou do 1 000 ml.
- 50 \times TAE (Tris-Acetate-EDTA): 242 g Tris base rozpustiť za stáleho miešania v 800 ml ddH₂O, pridať 57,1 ml ľadovej kyseliny octovej a 100 ml 0,5M EDTA (pH 8,0), doplniť vodou do 1 000 ml.
- 5M NaCl: 14,6 g chloridu sodného rozpustiť v 40 ml ddH₂O, doplniť vodou do 50 ml.
- 1M Tris-HCl (pH 8,0): 121,1 g Tris base rozpustiť v 800 ml ddH₂O, upraviť pH a doplniť vodou do 1 000 ml.
- 10% SDS: 10 g SDS + 10 ml ddH₂O
- TE (Tris-EDTA) pufer (pH 8,0): zmiešať 1 ml 1M Tris-HCl (pH 8,0), 2 ml 0,5M EDTA a 80 ml ddH₂O, upraviť pH a doplniť vodou do 100 ml.

- 15% Savo: 1,5 ml Savo Original + 100 ml ddH₂O + 20 µl Tween 80
- 2mM hydroxyurea: 0,2 g hydroxyurey rozpustiť v 100 ml ddH₂O, uchovať v chladničke.
- 0,05% kolchicín: 0,05 g kolchicínu doplníme do 100 ml ddH₂O, zmiešať a uchovať v chladničke pri 4 °C.
- Clarkova fixáž (etanol : ľadová kyselina octová (3:1)): zmiešať 7,5 ml 96% etanolu s 2,5 ml 99,8% ľadovej kyseliny octovej.
- 0,01M citrátový pufer: (pH 4,8): zmiešať 40 ml 0,01M kyseliny citrónovej zmiešať s 60 ml 0,01M citrátu trisodného, upraviť pH.
- 1% enzýmový roztok: zmiešať 0,5 g celulázy R10 Onozuka, 0,5 g celulázy, 0,5 g pektolyázy, 0,5 g cytohelikázy a 0,25 g pektinázy v 50 ml 0,01M citrátového pufru, uskladniť pri teplote -20 °C.
- 20× SSC: 175,3 g chloridu sodného a 88,2 g citrónanu sodného rozpustiť za stáleho miešania v 800 ml ddH₂O, doplniť vodou do 1 000 ml a upraviť pH na 7,0.
- 2× SSC: 100 ml 20× SSC zmiešať s 900 ml ddH₂O.
- 4% formaldehyd: 82,5 ml 2× SSC + 10 ml 37% formaldehydu
- 3% blokovací roztok: 3% BSA + 0,05% Triton X-100
- 1% blokovací roztok: 1% BSA + 0,1% Tween 20
- nanášací pufer: 1% brómfenolová modrá + 30% glycerol

4.4 Zoznam použitých prístrojov

- analytické váhy ABS 80-4N (Kern)
- centrifúga Universal 32 R (Hettich)
- dokumentačný system InGenius LHR s UV transiluminátorom (Syngene)
- horizontálna elektroforetická komora Midi (Sigma-Aldrich)
- konfokálny mikroskop TCS SP8 SMD (Leica)
- magnetická miešačka s ohrevom MSH-300 (Biosan)
- magnetický držiak (Invitrogen Life Technologies)
- mikrocentrifúga Spectrafuge 24D (Labnet International)
- mikroskop s fázovým kontrastom CX40 (Olympus)
- mikrovlnná rúra (Whirlpool)
- minicentrifúga Prism Mini (Labnet International)
- ohrievacia platňa (Medax)

- rotačná plošina Intelli-Mixer RM-2L (Elmi)
- spektrofotometer NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific)
- termoblok Dry Bath Incubator (Major Science)
- termocyklér Rotor-Gene Q (Qiagen)
- termocyklér TOne 96 (Biometra)
- ultrazvukový procesor UP50H (Hielscher Ultrasonics)
- vortex mixér S0200 (Labnet International)
- výrobnik ľadu GB 601 (Brema)
- zdroj jednosmerného prúdu CS-300V (Clever Scientific)

4.5 Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy

4.5.1 DNA extrakcia

K extrakcii DNA bolo použitých 500 mg mladých listov jednotlivých rastlín, ktoré boli zmrazené tekutým dusíkom a rozotreté vo vychladenej trecej miske do svetlozeleného prášku. Vzorka bola prenesená do 15ml plastovej skúmavky, ku ktorej bolo po stenách skúmavky opatrne pridaných 8 ml Pufru A na vytvorenie izotonického prostredia k zabráneniu prasknutia jadier. Skúmavka bola ponechaná 30 min na ľade s občasným pretrepaním vzorky. Po inkubácii sa vzorka prefiltrovala cez 3-vrstvovú mušelínu s veľkosťou pórov 20 – 50 μm a filtrát bol centrifugovaný 15 min pri 3 000 g a 4 °C. Supernatant bol opatrne odpipetovaný a pelet obsahujúci jadrá a ostatné organely bol resuspendovaný v 5 ml Pufru B. Vďaka obsahu neiónogénneho detergentu Tritonu X-100 v tomto pufri došlo k narušeniu lipidových dvojvrstiev v membránových organelách (chloroplasty a mitochondrie), a tým k ich solubilizácii. Vzorka bola ponechaná na 10 min v ľade s občasným premiešaním a následne centrifugovaná 10 min pri 3 000 g a pri 4 °C. Tento krok bol opakovaný do získania bieleho peletu. Pre odstránenie detergentu z predchádzajúceho kroku bol vytvorený pelet resuspendovaný v 8 ml Pufru C a 10 min centrifugovaný pri 3 000 g pri 4 °C. Po centrifugácii bol odstránený supernatant a pelet obsahujúci jadrá bol resuspendovaný v 1 ml Lyzačnom Pufri. Vzorka bola následne purifikovaná pridaním 0,5 ml fenol/chloroformu v pomere 1:1 a skúmavka bola pretrepávaná do vzniku mliečneho roztoku. Fenol slúži na denaturáciu a vyzrážanie proteínov zo vzorky, zatiaľ čo chloroform zvyšuje efektivitu fenolu pri denaturácii a zároveň umožňuje separáciu organickej fázy od vodnej fázy, ktorá obaluje DNA. Po 10 min centrifugácii pri 11 000 g bola vodná fáza obsahujúca DNA prepipetovaná do 1,5ml

mikroskúmvky a precipitovaná pridaním rovnakého objemu isopropanolu. Vzorka bola zamiešaná a centrifugovaná 10 min pri 18 000 g pri 4 °C. Supernatant bol odstránený a pelet bol premytý 500 µl 80% etanolom a po odstránení etanolu bol pelet vysušený. Vysoké percento etanolu zabraňuje rozpustnosti DNA a umožňuje odstránenie solí, ktoré by mohli interferovať v nasledujúcich experimentoch. Pelet bol resuspendovaný v 100 µl ddH₂O (aby sa predišlo problémom s resuspendáciou peletu, treba dávať pozor, aby sa pelet nepresušil).

4.5.2 Elektroforetická kvantifikácia

Extrahovaná DNA bola vizualizovaná v agarózovom géli a zároveň kvantifikovaná použitím rozličných známych koncentrácií DNA. 1% agarózový gél bol pripravený v reagenčnej fľaši rozpustením 0,5 g agarózy v 50 ml 1× TAE pufre a následným rozpustením v mikrovlnnej rúre za občasného miešania. K číremu roztoku boli napipetované 2 µl etídia bromidu a po premiešaní bol roztok schladený na 60 °C. Po schladení bol vyliaty do vopred pripravenej elektroforetickej vaničky a bol do neho vložený hrebienok. Po stuhnutí gélu bol hrebienok vybratý a do elektroforetickej vane bol naliaty 1× TAE pufer tak, aby zakrýval celý gél. Do prvej jamky boli napipetované 2 µl markera relatívnej molekulovej hmotnosti a do ďalších jamiek boli napipetované jednotlivé vzorky v objemoch 5 µl, 10 µl a 15 µl, ktoré boli na parafilme zmiešané s 2 µl nanášacieho pufre. Do posledných štyroch jamiek boli napipetované štyri rôzne objemy DNA so známymi koncentraciami. Elektroforéza prebiehala približne 45 min pri napätí 80 V, po skončení bol gél vyhodnotený pomocou dokumentačného systému s UV transiluminátorom.

4.5.3 DNA sonikácia

Na ďalšiu prácu bola potrebná DNA s veľkosťou v rozmedzí medzi 200 – 800 bp. V 1,5ml mikroskúmvke s nízkou priľnavosťou bolo rozpustených 20 µg genómovej DNA v 400 µl 10× IP Pufre. Na fragmentáciu DNA bolo použitých celkovo 7 impulzov s 90% intenzitou po dobu 15 s na každú vzorku. Impulzy boli zabezpečené ultrazvukovým procesorom pri teplote 4 °C. Na overenie veľkosti fragmentov sonikovanej DNA bola prevedená gélová elektroforéza v 2% agarózovom géli. Gél bol pripravený rozpustením 1 g agarózy v 50 ml 1× TAE pufre a ďalej obdobným postupom ako v predchádzajúcom pododdieli (4.5.2). Do jamiek však bolo napipetovaných 4 µl DNA z každého cyklu a elektroforéza prebiehala približne 1 hod pri napätí 80 V. 14 µg sonikovanej DNA zo siedmeho cyklu bolo rozdelených do dvoch 1,5ml mikroskúmviek (7 µg DNA na mikroskúmvku).

4.5.4 Imunoprecipitácia hydroxymetylovanej DNA

Vzorky DNA boli 10 min denaturované vo vriacej vode a následne okamžite ochladené v ľade po dobu 10 min. Alikvot z každej vzorky bol uskladnený pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ na ďalšie použitie ako vstupná (input = IN) kontrola. Tepelná denaturácia umožňuje ľahšie naviazanie protilátky tým, že sprístupňuje DNA. Do každej vzorky bolo pridaných $7\text{ }\mu\text{g}$ monoklonálnych (rat) protilátok voči 5-hydroxymetylcytidínu. Zmes bola cez noc inkubovaná na rotujúcej plošine pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vďaka relatívne vysokej väzobnej afinite Proteínu G voči potkaním protilátkam, bolo do mixu DNA-protilátky pridaných $50\text{ }\mu\text{l}$ magnetických Dynabeads Protein G guľičiek a vzorky boli 2 hod inkubované na rotujúcej plošine pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vložením mikroskúmavky do magnetického držiaka bol vytvorený pelet pozostávajúci z DNA-protilátka-Dynabead Protein G, ktorý bol magnetom pevne prichytený ku držiaku, zatiaľ čo bol supernatant vymytý. Po odobratí mikroskúmaviek z držiaka bolo do každej z nich pripipetovaných po $1\text{ ml } 1\times\text{ IP}$ Pufru. Mikroskúmavky boli vrátené do držiaka a tento premývací krok bol trikrát opakovaný. Magnetické guľičky boli resuspendované v $250\text{ }\mu\text{l}$ Pufru D s $5\text{ }\mu\text{g}$ proteínázy K na rozštiepenie všetkých proteínov. Zmes bola cez noc inkubovaná na rotujúcej plošine pri teplote $50\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.5.5 Purifikácia a kvantifikácia hydroxymetylovanej DNA

Vzorky boli extrahované pridaním $400\text{ }\mu\text{l}$ fenol:chloroform:isoamylalkoholu (25:24:1) a následne 30 s vortexované. Viditeľne sa oddelila organická fáza, ktorá sa nachádzala pod géloom a vodná fáza bola nad ním. Vodná fáza bola prepipetovaná do novej mikroskúmavky a DNA v nej bola precipitovaná pri teplote $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v $800\text{ }\mu\text{l}$ 100% etanolu s $1,5\text{ }\mu\text{l}$ glykogénu a $16\text{ }\mu\text{l}$ 5M roztoku chloridu sodného. Po 10 min centrifugácii pri $20\text{ }000\text{ g}$ a pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ bol opatrne odpipetovaný supernatant a pelet bol resuspendovaný v $500\text{ }\mu\text{l}$ 80% etanolu. Následne bola vzorka opäť centrifugovaná 5 min pri $20\text{ }000\text{ g}$ pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a supernatant bol odstránený. Vysušená DNA (pelet) bola resuspendovaná v $70\text{ }\mu\text{l}$ TE Pufru a kvantifikovaný pomocou spektrofotometra NanoDrop 2000c. Ako blank boli použité $3\text{ }\mu\text{l}$ TE pufru, po zmeraní blanku bol senzor očistený a na senzor bol napipetovaný $1\text{ }\mu\text{l}$ DNA vzorky. Imunoprecipitovaná génomová DNA bola amplifikovaná pomocou PCR, na kontrolu PCR produktu (amplikónu) pred samotnou génovo-špecifickou qPCR. Reakčný PCR mix pozostával z $20\text{ }\mu\text{l}$ ddH₂O, $2,5\text{ }\mu\text{l}$ 10× DreamTaq Buffer, $0,5\text{ }\mu\text{l}$ dNTPs, $0,5\text{ }\mu\text{l}$ forward priméra SIAP3YPmF, $0,5\text{ }\mu\text{l}$ reverse priméra SIAP3YPmR, $0,25\text{ }\mu\text{l}$ DreamTaq Polymerase a $0,75\text{ }\mu\text{l}$ imunoprecipitovanej (IP) vzorky DNA. Nastavený PCR profil bol: počiatočná denaturácia na aktiváciu polymerázy 5 s pri $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, po ktorej nasledovalo 40 cyklov: denaturácia 5 s pri $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ a extenzia 30 s pri $60\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Do 2% agarózového gélu (príprava gélu vid' vyššie) bolo napipetovaných 5 µl vzorky spolu s 2 µl nanášacieho pufru a pomocou dokumentačného systému s UV transiluminátorom prebehla vizualizácia. Množstvo 5 ng IP DNA bolo odložené na stanovenie obohatenia pomocou génovo-špecifickej qPCR.

4.5.6 Génovo-špecifická qPCR

Kvantitatívne PCR boli prevedené na promótorových oblastiach génov SIAP3/SvAP3; SIDD44/SvDD44; SI3/Sv3; SI4/Sv4; SI7/Sv7; SIsS/SvSs. Zoznam špecifických primérov je v Tabuľke 1. Reakčný mix bol pripravený nasledovne: 5 µl 10× SensiFAST HRM Kit, 3,5 µl ddH₂O, 0,5 µl forward priméra, 0,5 µl reverse priméra, 0,5 µl vzorky DNA – buď IN DNA ako normalizačná kontrola alebo 0,5 µl IP DNA. Amplifikácia prebiehala v termocykléri Rotor-Gene Q s nastavenými PCR podmienkami: počiatočná denaturácia na aktiváciu DNA polymerázy 5 s pri 95 °C, po ktorej nasledovalo 40 cyklov: denaturácia 5 s pri 95 °C a extenzia 30 s pri 60 °C.

Tabuľka 1: Zoznam použitých primérov pre qPCR (navrhnuté Dr. Rodríguezom).

Názov priméru	Sekvencia priméru 5' – 3'
SvAP3PR:	GGCAACCATACTCTTGAATGAAAAC
SvAP3PF:	AGTCTTTTGATGTGTTTCATTGAGATGA
SIAP3XPfR:	AAAGGGCATTAAACCAAATCCG
SIAP3XPfF:	ACAAGTTTGATTATTTTGAATTTTCGGT
SIAP3XPmR:	AACAAATGATTGAAACGGCTTCG
SIAP3XPmF:	AAAGAGGCTCATTGTCATACTACA
SIAP3YPmR:	ACCCGAAATAGACCCGAAACC
SIAP3YPmF:	TTTGAGATGATTAGACATTACGTTAACT
Sv3PR:	ATTCCGCTAGTCAAATCTTCTTTCT
Sv3PF:	AGGAAGTGGATTTCGAACGTGA
SI3XPfR:	ATATAATCTCCTTGAAAGTCTTTTCTTTTGACC
SI3XPfF:	GTGTTTGTGAAGAATGTATTTTATATGGGTTTC
SI3XPmR:	ATAAAAGCTAGCTAAACCATTTGGAATAATATGG
SI3XPmF:	AATGGTAGGCTATTTGTTACTAGCTTGATAAAT
SI3YPmR:	AATATATAATCTCTACTCACCTTAATCAAACCG
SI3YPmF:	GTAATACTACGGTTTTCTATCTTAGCTTAGAG
Sv7PR:	GCCACCTTTGTTTTACTTCTATATATGTATGAT
Sv7PF:	AAAGGGTACACGATAGAAAATGAAAACTATAG
SI7XPfR:	GGCATAATATCTTTTGTGAGTTTATATATGTCCG
SI7XPfF:	CCGGTAGAGTTACTTTAATGGAGAATATTTATT
SI7XPmR:	ACCTCTTTTACTCTGACAAGCCC
SI7XPmF:	ACTCTACCCGATCTCAACACG
SI7YPmR:	CGATATTTACTAAAACGTGTCGATATAAATCAG
SI7YPmF:	GTGTTATTCTTTCTTGCTTTGTTTTACTTCTA

SvSsPR:	TTTTACCAATTTGTCACTTAACCCCACTTTTT
SvSsPF:	GGTTTAACTTCCCCATAAACTAAAAGAATAAG
SISsXPfR:	AAAGGGCATTAAACCAAATCCG
SISsXPfF:	ACAAGTTTGATTATTTTGAATTTTCGGT
SISsXPmR:	TCCGACCCGTATAAACCCGT
SISsXPmF:	TCAAACGGGTCGGATGTACG
SISsYPmR:	TCCATGTCTTACAAACGCAATCA
SISsYPmF:	AGGGTAAAGACACAGTTTCTTCCT
SvDD44PR:	GGAAAATAAGTCATTTTAGATACCTGATAACCT
SvDD44PF:	GATATTTTCAGGTAGCTTATTTGATCAAAGTAGT
SIDD44XPfR:	AACAAGTCAATTCGTGTCATTTTCG
SIDD44XPfF:	GTGATCCGAATAGTGTGACTCGA
SIDD44XPmR:	AAGGTAGTTCAGGTGGGCG
SIDD44XPmF:	TAAGGCAGACCCGAGACTCA
SIDD44PYPmR:	TGTGGGTTAATAGATGGGGAAAGG
SIDD44PYPmF:	ACTCACATTTTCAAATCTTGTTCTT
Sv4PR:	ATGAATTAACAAATCGACATCGCAATAAATCTG
Sv4PF:	GGAAGAATCTTTGAAATTGAAGAATTTACAGTG
S14XPfR:	ATTGACTGAGAAGTGAGAAAGTACTCGTAAGTC
S14XPfF:	ATTGAAGAATTTACAGTGAAAAGAAGAGAAGAC
S14XPmR:	TATTATCATCAATCTCAATACTCAGATCTGTTT
S14XPmF:	GATGATCTAGTTAGATTATAATCTGGGTCATTG
S14YPmR:	TTATCATCAATCTCAAATCTCAATACTCAGATC
S14YPmF:	GATCTTATTAAATTATCATCTGGGTCAATCTCA

4.5.7 Príprava chromozómových preparátov

Semená boli prepláchnuté v 50% etanole, 20 minút v 15% Save a následne boli opäť prepláchnuté v 50% etanole. Takto sterilizované semená boli uložené na dve vrstvy navlhčeného filtračného papiera do Petriho misky a uložené v chladničke na 7 dní pri 4 °C. Následne boli semená ponechané dva dni klíčiť pri laboratórnej teplote v tme. 2mM hydroxyurea, inhibítor DNA syntézy, bola pridaná na filtračný papier k naklíčeným semenám, tak aby boli celé korene ponorené v roztoku a boli inkubované pri laboratórnej teplote na dosiahnutie bunkovej synchronizácie. Korene boli následne po 16-tich hodinách trikrát prepláchnuté redestilovanou vodou a ponechané v nej na 4 hodiny pri laboratórnej teplote. Pridaním 0,05% kolchicínu na 2 hodiny boli bunky zastavené v metafáze cyklu narušením činnosti deliaceho vretienka. Skalpelom boli odrezané aktívne korene s dĺžkou do 1 cm, ktoré boli umiestnené na 20 hod do ľadovej vody, aby sa zvýšil výskyt metafázových buniek. Korene boli prenesené do 50 ml Clarkovej fixáže, v ktorej boli dva dni fixované pri laboratórnej teplote. Takto ošetrované korene boli uložené v rovnakom roztoku pri teplote –20 °C.

Korene boli dvakrát po 5 min premyté v 0,5 ml ľadovej vody a dvakrát po 5 min v 0,5 ml 0,01 M citrátového pufru. Počas premývania boli skalpelom odstránené nemeristematické časti pletiva. Koreňové špičky boli na hodinovom sklíčku ošetrené 200 µl 1% enzýmovým roztokom po dobu 120 minút pri teplote 37 °C, aby došlo k hydrolýze bunkovej steny a následnému zmäknutiu koreňového pletiva. Apikálne meristémy boli po macerácii opäť dvakrát po 5 min premyté v 0,5 ml 0,01M citrátového pufru na vymytie zvyškových enzýmov. Ďalej boli koreňové špičky premyté v 1 ml vychladeného 96% etanolu v rovnakom hodinovom sklíčku a po 10 minútach bol etanol nahradený čerstvo pripravenou Clarkovou fixážou, v ktorej ostali aspoň 5 minút (10 – 15 µl fixáže na jednu koreňovú špičku).

Koreňové špičky boli prenesené do 1,5ml mikroskúmavky a pomocou preparačnej ihly boli roztlačené koreňové meristémy. Obsah mikroskúmavky bol dôkladne pretrepaný, aby došlo k vytvoreniu bunkovej suspenzie. Na platňu vyhriatu na 50 °C boli položené 3 vrstvy papierových utierok nasiaknutých vodou, na ktoré boli umiestnené vopred vychladené podložné sklá. Zo vzdialenosti približne 20 cm bolo na jedno podložné sklo vypustených 10 µl bunkovej suspenzie a suspenzia bola 2 minúty inkubovaná na platni spolu s 10 µl Clarkovej fixáže. Následne sa sklo umiestnilo na platňu bez papierových vreckoviek a 1 min sa sušilo. Po vysušení skla bola skontrolovaná kvalita pripravených preparátov pomocou mikroskopu s fázovým kontrastom a vhodné preparáty boli uskladnené v 96% etanole pri teplote –20 °C.

4.5.8 Fluorescenčná *in situ* hybridizácia

Následná úprava preparátov prebiehala pri laboratórnej teplote a použité roztoky boli umiestnené v dóze na mikrosklá podľa Coplina. Prvým krokom bolo umiestnenie preparátov na 5 min do 2× SSC, potom boli podložné sklá pomocou pinzety premiestnené na 5 min do Clarkovej fixáže a následne boli opäť premyté v 2× SSC po dobu 10 min. Podložné sklá s chromozómami boli fixované 10 min v 4% formaldehyde pri laboratórnej teplote a na jeho vymytie boli sklá dvakrát po 5 min opláchnuté v 2× SSC. Preparáty boli dehydratované v etanolovej sérii 70/90/96% etanolu po 2 min a vysušené v zvislej polohe.

Hybridizačný mix bol pripravený podľa Tabuľky 2, v ktorom ako referenčná DNA sonda 1 bola použitá tandémová sekvencia v subtelomére X-43.1 a ako DNA sonda 2 bola použitá sekvencia pre GAG doménu LTR retrotranspozónu *Athila* CL10 (Cermak *et al.*, 2008). Sondy boli pred použitím denaturované 10 min pri teplote 85 °C a následne boli 5 min inkubované v ľade. Na podložné sklá s chromozómami bolo pripipetovaných 20 µl hybridizačnej zmesi. Potom boli podložné sklá prekryté kryciami a vzorky boli denaturované na platni vyhriatej na 80 °C po dobu

3 min. Na sklá bolo pridané VectaShield montovacie médium doplnené o DAPI a boli uložené do tmy. Snímky chromozómov boli zachytené konfokálnym mikroskopom s príslušnými optickými filtrami, spracované v softwari LAS AF (Leica) a postprocesované pomocou dekonvolučného modulu Lightning (Leica).

Tabuľka 2: Príprava hybridizačného mixu pre celkový objem 20 μ l so stringenciou 93 %.

Látka	Objem [μ l]	Výsledná koncentrácia
100% formamid	10	50 %
50% dextransulfát	4	10 %
20\times SSC	0,2	0,2 \times
DNA sonda 1 (X-43.1)	1	25 – 100 ng/sklíčko
DNA sonda 2 (<i>Athila</i> CL10)	3	25 – 100 ng/sklíčko
ddH₂O	1,8	–

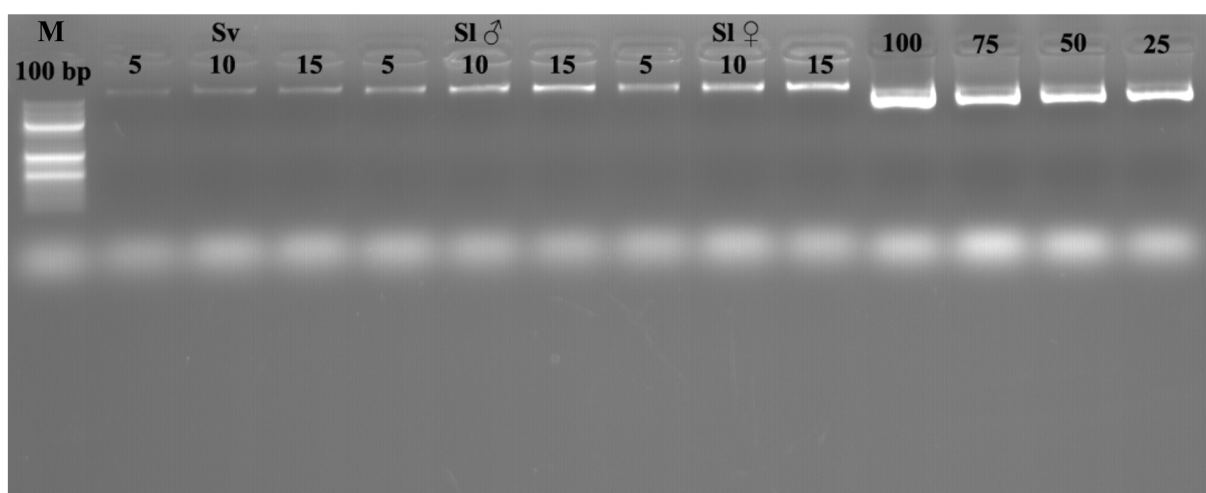
4.5.9 Imunofarbenie na detekciu 5-hydroxymetylcytozínu

Úprava preparátov s chromozómami, ktoré boli zmrazené na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ prebiehala ako pri príprave preparátov pre FISH (4.5.8) do kroku postfixácie a premytia v etanole. Aby sa predišlo nešpecifickému naviazaniu protilátok, tak na podložné sklá bol pridaný 3% blokovací roztok a boli blokované 30 min pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následne boli vzorky inkubované 60 min pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ s primárnou protilátkou (anti-5-hydroxymetylcytidín z imunizovaného potkana), ktorá bola riedená v pomere 1:500 v 1% blokovacom roztoku. Po inkubácii boli vzorky nechané na 10 min pri laboratórnej teplote a potom boli trikrát po 5 min premyté v $1\times$ PBS. Sekundárna protilátka (anti-rat konjugovaná s FITC fluorochrómom) riedená v pomere 1:200 v 1% blokovacom roztoku, bola inkubovaná spolu so vzorkou 60 min pri teplote $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nenaviazané sekundárne protilátky boli vymyté v $1\times$ PBS (trikrát po 5 min) a následne boli dehydratované v etanolvej sérii 50/70/96% etanolu po 2 min. Na sklá bolo pridané VectaShield montovacie médium doplnené o DAPI a boli uložené do tmy. Snímky boli zachytené konfokálnym mikroskopom s príslušnými optickými filtrami, spracované v softwari LAS AF (Leica).

5 VÝSLEDKY

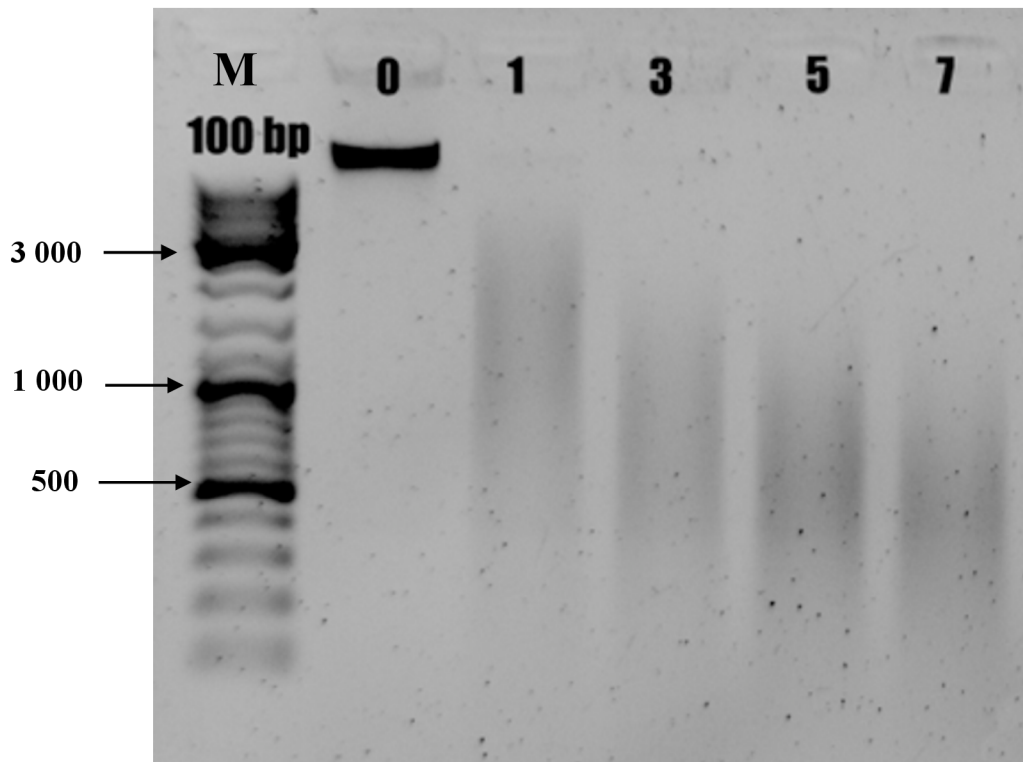
5.1 hMeDIP

Prostredníctvom gélovej elektroforézy v 1% agarózovom géli bola overená úspešnosť DNA extrakcie. Prítomnosť jedného pruhu potvrdzuje, že extrahovaná DNA je v celku a nie je fragmentovaná (Obr. 10). Súčasne boli opticky odhadnuté koncentrácie DNA. Na výpočet DNA koncentrácie je potrebné v géli separovať tri rozličné objemy extrahovanej DNA a najmenej štyri rozličné známe koncentrácie DNA pre matematický výpočet prostredníctvom softwaru na analýzu gélu (napr. GelAnalyzer).



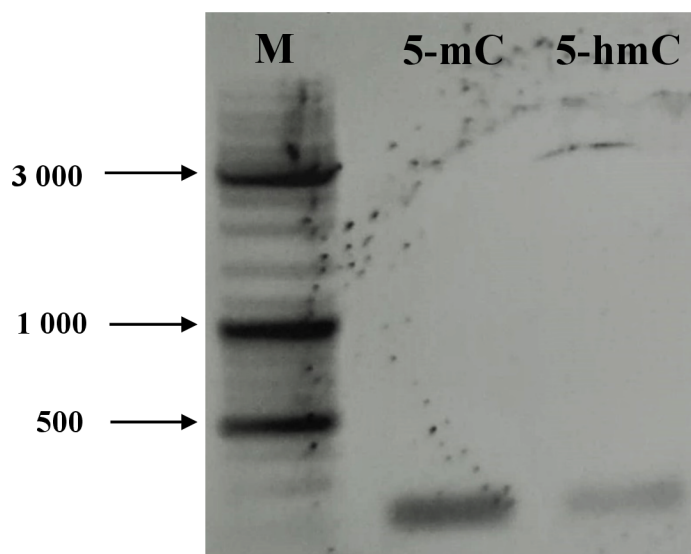
Obrázok 10: Optická kvantifikácia genómových DNA extrahovaných z druhov *Silene*. V prvej jamke označenej M je 100 bp marker relatívnej molekulovej hmotnosti, čísla nad pruhmi DNA sú napipetované objemy v µl príslušnej extrahovanej DNA a čísla vpravo označujú koncentráciu známej DNA v ng/µl. Separácia v 1% agarózovom géli.

Genómovú DNA bolo potrebné pred imunoprecipitáciou fragmentovať na kratšie úseky, čo bolo docielené sonikáciou. Priemerná veľkosť DNA fragmentov bola 400 bp, pričom sa veľkosti pohybovali v rozmedzí od 200 do 800 bp. Šmuhy DNA indikujú, že veľkosť DNA sa znižovala každým cyklom, až kým nebola dosiahnutá optimálna veľkosť fragmentov pre DNA imunoprecipitáciu. Fragmenty DNA boli použité zo siedmeho cyklu a mali priemernú veľkosť 500 bp (Obr. 11).



Obrázok 11: Sonikácia genómovej DNA. V prvej jamke označenej M je 100 bp marker relatívnej molekulovej hmotnosti a v nasledujúcich jamkách sú číslami označené príslušné vzorky *S. latifolia* (0 – intaktná gDNA, 1 – DNA po prvom cykle sonikácie, 3 – DNA po treťom cykle sonikácie, 5 – DNA po piatom cykle sonikácie a 7 – DNA po siedmom cykle sonikácie). Separácia v 1% agarózovom géli.

Génovo špecifické priméry boli overené v 2% agarózovom géli prostredníctvom separácie špecifických produktov. V tomto prípade (Obr. 12) bol amplifikovaný špecifický úsek génu SLAP3 vo vzorkách imunoprecipitovaných DNA. Na základe intenzity pruhov môžu byť identifikované rozdiely v obohatení, ale skutočné rozdiely môžu byť dôkladne zmerané iba pomocou qPCR. Vďaka markeru relatívnej molekulovej hmotnosti vieme určiť, že veľkosť amplifikovaného DNA fragmentu bola približne 100 bp, čo korešponduje s očakávanou veľkosťou daného produktu.



Obrázok 12: Overenie kvantity 5-hmC imunoprecipitovanej DNA. V prvej jamke označenej M je 100 bp marker relatívnej molekulovej hmotnosti, v druhej jamke 5-mC IP DNA (použitá z predchádzajúcich experimentov) a v tretej jamke 5-hmC IP DNA. Separácia v 2% agarózovom géli.

Po prevedení génovo špecifickej qPCR bolo 10 replikónov IP DNA každého génu klastrovaných do jednej hodnoty na porovnanie s hodnotou IN DNA. Dáta z qPCR boli spracované pomocou softwaru LinReg, ktorého výstupom boli hodnoty N_0 inverzné ku C_t hodnotám, a tie boli použité k vypočítaniu obohatenia daného génu 5-hmC na základe vzorca: 5-hmC IP DNA/IN DNA. Gény s hodnotami vyššími než 2 môžu byť považované za obohatené modifikáciou 5-hmC (daný gén je regulovaný 5-hmC) a gény s hodnotami nižšími než 2 sú považované za neobohatené. Získané hodnoty sú zaznamenané v Tabuľke 3 a Tabuľke 4. Označenie jednotlivých pohlavne viazaných génov u *S. latifolia* a ich autozomálnych homológov u *S. vulgaris* použitých v tejto analýze obsahuje: kód názvu génu s prídavnými informáciami ako X (X alela); Y (Y alela); P (promótor); f (samica); m (samec).

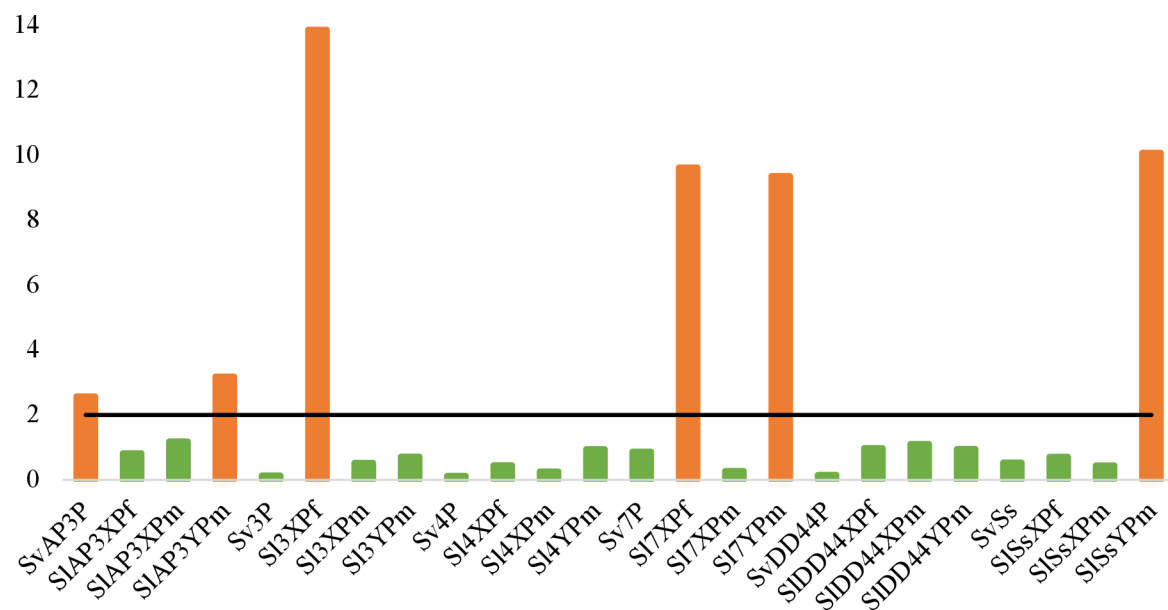
Tabuľka 3: Obohatené gény s vypočítaným pomerom obohatenia.

Obohatený gén	Pomer obohatenia
SvAP3P	2,569
SlAP3YPm	3,180
Sl3XPf	13,861
Sl7XPf	9,618
Sl7YPm	9,355
SlSsYPm	10,070

Tabuľka 4: Neobohatené gény s vypočítaným pomerom obohatenia.

NOG	PO	NOG	PO	NOG	PO
SlAP3XPf	0,819	Sl4XPf	0,448	SIDD44XPf	0,976
SlAP3XPm	1,184	Sl4XPm	0,258	SIDD44XPm	1,105
Sv3P	0,133	Sl4YPm	0,944	SIDD44YPm	0,950
Sl3XPm	0,522	Sv7P	0,869	SvSs	0,531
Sl3YPm	0,715	Sl7XPm	0,272	SlSsXPf	0,709
Sv4P	0,122	SvDD44P	0,152	SlSsXPm	0,443

*NOG (neobohatený gén); PO (pomer obohatenia)

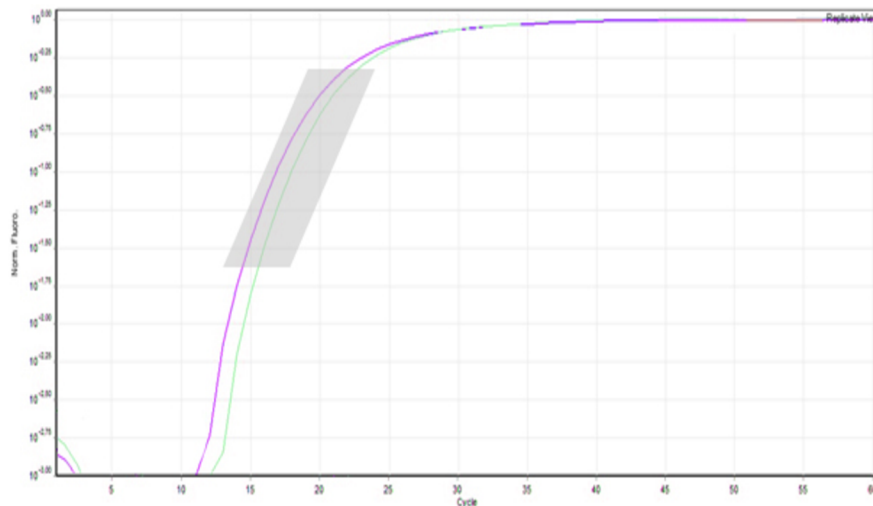


Graf 1: Vypočítané hodnoty pomeru obohatenia 5-hmC imunoprecipitovanej DNA.

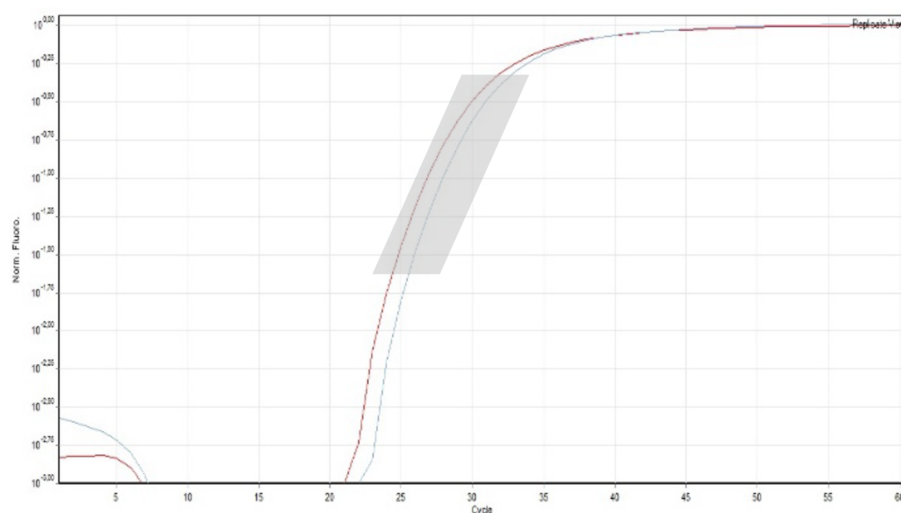
Hodnoty vynesené z Tabuľky 3 a z Tabuľky 4. Čiernou je vyznačená hranica určujúca obohatenie voči 5-hmC. Oranžové stĺpce (nad 2) sú obohatené gény a zelené stĺpce (pod 2) sú neobohatené gény. Na osi X sú označenia génov, na osi Y je pomer obohatenia.

Krivky génov obohatených 5-hmC sú na grafe vynesené vľavo od vstupnej kontroly (IN DNA) (pozitívne obohatenie – Graf 2), pretože obohatená DNA nebola vymytá v elučnom kroku na magnetickom držiaku a vysoko obohatené DNA fragmenty ostali v skúmavke (komplex DNA-protilátka-Dynabeads Protein G bol silno naviazaný na magnet a nenaviazaná DNA bola vymytá). Krivky génov nepodliehajúcich regulácii 5-hmC sú vynesené vpravo od vstupnej kontroly (záporné obohatenie – Graf 3).

Gén *Apetala 3* (označený ako SIAP3YPm) na Grafe 2 reprezentuje pozitívne obohatenie. Výsledkom je, že získaná Ct hodnota (cyklus, v ktorom exponenciálna amplifikácia presiahla úroveň pozadia) tohto génu z IP DNA je nižšia než Ct hodnota z IN DNA. Na druhej strane, gén *Spermidine synthase* (označený ako SISsXPm) na Grafe 3 reprezentuje záporné obohatenie.



Graf 2: Graf reprezentujúci pozitívne obohatenie 5-hmC imunoprecipitovanej DNA. Fialová krivka zobrazuje 5-hmC imunoprecipitovanú DNA a zelená krivka zobrazuje vstupnú DNA. Zatiernená oblasť reprezentuje logaritmickejšiu amplifikáciu. Na osi X je počet cyklov PCR, na osi Y je rastúca fluorescencia.



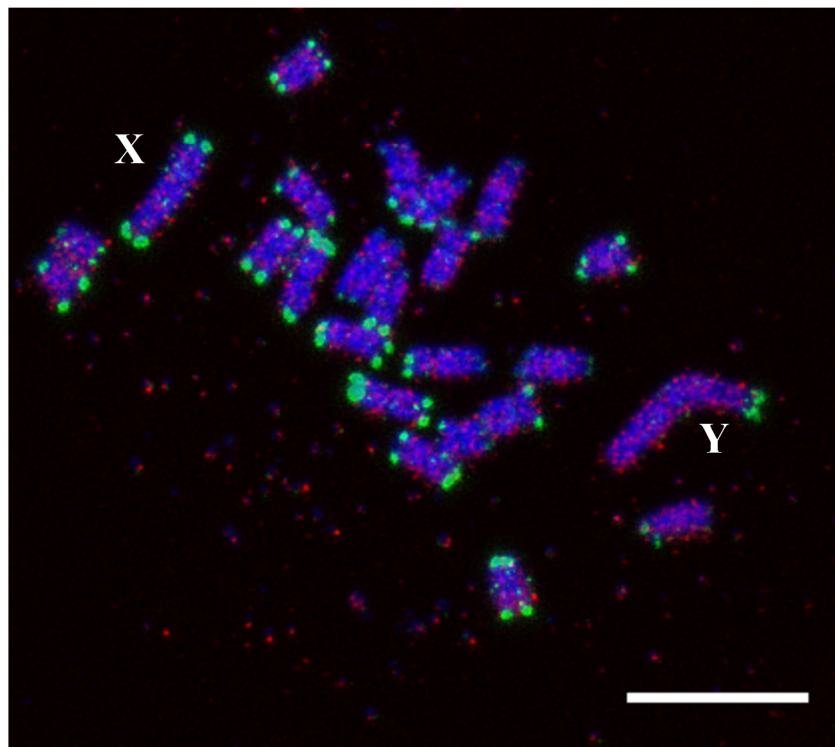
Graf 3: Graf reprezentujúci záporné obohatenie 5-hmC imunoprecipitovanej DNA. Červená krivka zobrazuje vstupnú DNA a modrá krivka zobrazuje 5-hmC imunoprecipitovanú DNA. Zatiernená oblasť reprezentuje logaritmickejšiu amplifikáciu. Na osi X je počet cyklov PCR, na osi Y je rastúca fluorescencia.

5.2 FISH

Pomocou konfokálnej mikroskopie boli zobrazené vzory vybraných repetitívnych elementov na metafázových chromozómoch *S. latifolia* (Obr. 13).

Po *in situ* hybridizácii genómovej DNA *S. latifolia* so sondou tandémovej repetície transponovateľného elementu X-43.1 bola lokalizovaná táto sekvencia na oboch typoch chromozómov (pohlavných aj autozómoch). Na pohlavnom chromozóme Y bola sonda vizualizovaná v subtelomére na q ramienkach, kde sa zároveň nachádza aj rekombinantná oblasť Y chromozómu – pseudoautozomálna oblasť (PAR). Na X chromozóme bola vizualizovaná v subtelomérach oboch ramienok, teda na q aj p ramienkach. Prítomnosť tejto sondy nebola detegovaná len na jednom páre autozómov. U ostatných desiatich párov chromozómov sa nachádzala vždy minimálne na jednom ramienku.

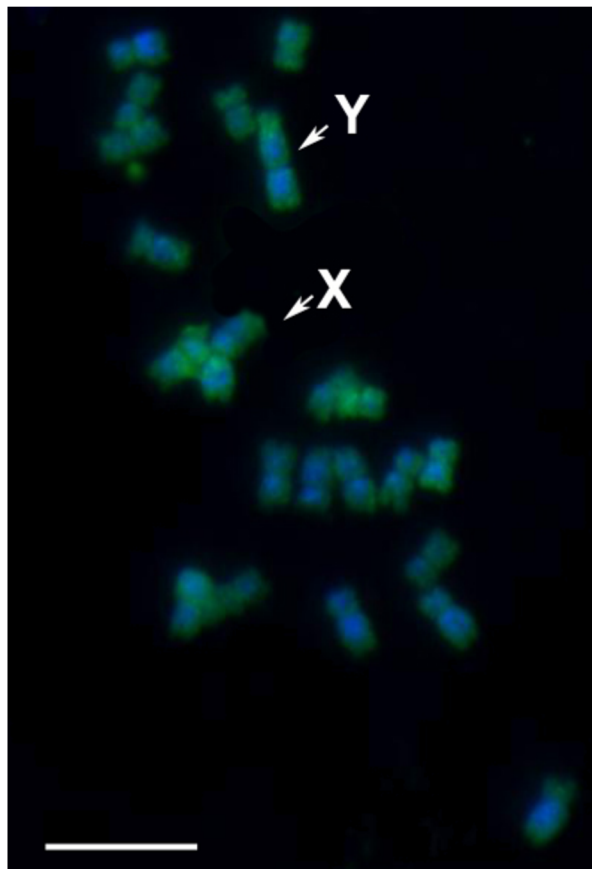
Sonda GAG domény LTR retrotranspozónu *Athila* CL10 bola lokalizovaná po celom genóme, najviac však na pohlavných chromozómoch. V rámci pohlavných chromozómov bola vo väčšej miere akumulovaná na Y chromozóme, než na X chromozóme.



Obrázok 13: Distribúcia retrotranspozónu *Athila* CL10 na metafázových chromozómoch *Silene latifolia*. Chromozómy boli vizualizované pomocou DAPI (modrá). Subtelomérová sonda X-43.1 značená SpectrumGreen-konjugovanými nukleotidmi (zelená) a sonda pre GAG doménu retrotranspozónu *Athila* CL10 značená Cy3-konjugovanými nukleotidmi (červená). Pohlavné chromozómy označené príslušnými písmenami (X, Y). Mierka reprezentuje 10 μ m.

5.3 Imunolokalizácia 5-hmC

Distribúcia 5-hydroxymetylcytozínu bola pozorovaná naprieč celým genómom na všetkých chromozómoch (Obr. 14). Najvýznamnejšou oblasťou výskytu 5-hydroxymetylcytozínu boli telomérové a subtelomérové oblasti chromozómov. U pohlavných chromozómov sa v týchto miestach nachádza už vyššie spomínaná pseudoautozomálna oblasť, ktorá je miestom rekombinácie génov počas meiotického delenia (u Y chromozómu iba na q ramienkach). Približne polovičný počet autozómov obsahoval bohaté oblasti na 5-hydroxymetylcytozín, u piatich párov sa tieto oblasti nachádzali len na okrajoch chromozómov.



Obrázok 14: Imunolokalizácia 5-hydroxymetylcytozínu. 5-hydroxymetylcytozín bol lokalizovaný pomocou FITC značenej sekundárnej protilátky (zelená). Chromozómy boli vizualizované pomocou DAPI (modrá). Pohlavné chromozómy sú označené príslušnými písmenami (X, Y). Mierka reprezentuje 10 μm .

6 DISKUSIA

Imunoprecipitácia hydroxymetylovanej DNA (hMeDIP) ponúka vysoko efektívnu možnosť získania obohatenej hydroxymetylovanej DNA s pokrytím celého genómu. V tejto metóde, monoklonálna protilátka voči 5-hydroxymetylcytidínu špecificky rozpoznáva a imunoprecipituje hydroxymetylované cytozíny v natívnych DNA fragmentoch, čo umožňuje zacieliť frakciu hydroxymetylovaných motívov na základe interakcie protilátky s modifikovanou DNA (Li a Tollefsbol, 2021). Po skombinovaní hMeDIP a qPCR, môže tento prístup ďalej ponúknuť analýzu obohatenia špecifických oblastí génov s využitím endogénnej DNA kontroly a bez potreby referenčného genómu ako v bisulfidovom sekvenovaní. Bisulfidové sekvenovanie (eventuálne TET-asistované sekvenovanie) je tiež viac časovo a finančne náročnejšie ako metóda hMeDIP.

Pomer obohatenia jednotlivých génov v našej analýze bol vypočítaný na základe vzorca 5-hmC IP DNA/IN DNA. Gény s hodnotami vyššími ako 2 považujeme za obohatené a gény s hodnotami nižšími ako 2 považujeme za neobohatené (viď Graf 1). Obohatené promótorové gény obsahujú hydroxymetylované cytozíny, ktoré sa môžu podieľať na regulácii génovej expresie, na procese tvorby heterochromatínu alebo by mohli byť súčasťou procesu aktívnej demetylácie. Ako obohatená bola detegovaná promótorová oblasť chromozómu Y génu *Apetala 3* u *Silene latifolia* (SlAP3YPm), ktorú môžeme spojiť s prítomnosťou transponovateľného elementu vo vzdialenosti do 1 kb. Transponovateľný element sa nachádza vo veľkom intróne 2 (23,855 bp), ktorý obsahuje dva rôzne retrotranspozóny medzi sebou premiešané. Zároveň porovnaním štruktúry promótorových sekvencií tohto génu u X a Y chromozómu boli nájdené významné rozdiely. Časť promótoru na Y chromozóme je tvorená 6 bp priamym opakovaním. Oba konce opakovania sú ohraničené obrátenými tandémovými repetíciami (Cegan *et al.*, 2010). V dôsledku akumulácie retrotranspozónov v rámci jedného intrónu v Y kópii génu AP3 môžeme očakávať epigeneticky indukovanú represiu vloženého transpozónu, čo by mohlo ovplyvniť obohatenie jeho promótorovej oblasti.

Použitím fluorescenčnej *in situ* hybridizácie sme vizualizovali homogénne rozšírenie GAG domény špecifickej pre retrotranspozón *Athila* CL10 v genóme *S. latifolia*. V rámci pohlavných chromozómov bola sonda viac akumulovaná na Y chromozóme ako na X. Väčšina chromozómu Y je nerekombinujúca, ale malá distálna časť q ramena, pseudoautozomálna oblasť, rekombinuje s X chromozómom. V tejto časti sonda nehybridizovala.

Akumulácia mnohých typov repetitívnych sekvencií v genóme (satelity, mikrosatelity, plastidové sekvencie, transpozóny) hrá (epigenetickú) rolu v degenerácii Y chromozómu. Inzercia transpozónu je často regulovaná prostredníctvom RNAi mechanizmov, čo vedie k metylácii cieľových sekvencií DNA. Metylácia sa šíri do oblastí obklopujúcich transpozóny s lokálnym účinkom na expresiu viazaných génov (Rodríguez Lorenzo *et al.*, 2018). Štúdium distribúcie a akumulácie týchto repetícií je dôležité, pretože nedostatok rekombinácie v pohlavne špecifických oblastiach vedie k akumulácii škodlivých mutácií a následnej degenerácii. Znížená efektívna genetická aktivita chromozómu Y je jednou z hlavných príčin vedúcej ku genetickej degenerácii tohto chromozómu (Charlesworth, 2013). Existuje však aj dôkaz, že gény viazané na Y chromozóm majú nižšiu mieru expresie ako ich homológy viazané na X chromozóm, a to v dôsledku inzercie transponovateľných elementov (Cegan *et al.*, 2010). Špecifické protilátky sme tiež použili na vizualizáciu distribúcie 5-hydroxymetylcytozínu v genóme *S. latifolia* na metafázových chromozómoch. Ako sa dalo očakávať, tak najvýraznejšie oblasti lokalizácie boli telomérové a subtelomérové oblasti chromozómov. Nedostatok imunolokalizačného signálu v intersticiálnej oblasti Y chromozómu možno vysvetliť skutočnosťou, že Y chromozóm stále obsahuje niekoľko stoviek aktívnych génov (Bergero a Charlesworth, 2011). Autozómy taktiež obsahujú bohaté oblasti na 5-hydroxymetylcytozín, ale približne u polovice z nich sa táto oblasť nachádzala len na okrajoch chromozómov.

Metódy analýzy DNA založené na imunoafinitnom obohatení DNA sa v poslednom období začali výraznejšie využívať. Citlivosť špecifických monoklonálnych protilátok voči rôznym epigenetickým modifikáciám je jedným z kľúčových prvkov tejto metódy. Okrem toho je táto metóda citlivejšia v oblastiach s vysokým obsahom CpG dinukleotidov, pretože sú tieto sekvencie DNA efektívnejšie zachytené (Soozangar *et al.*, 2018). Rôzne molekulárne metódy poskytujúce možnosť selekcie a analýzy metylovanej a nemetylovanej DNA v cieľovom genóme pozostávajú z troch hlavných fáz. V prvej fáze dochádza k rozlíšeniu metylovaných a nemetylovaných DNA fragmentov pomocou bisulfidovej konverzie, štiepenia enzýmami citlivými na metyláciu alebo fyzickej separácie pomocou špecifických protilátok. Druhou fázou je amplifikácia DNA pomocou PCR. Posledným krokom je určenie stavu metylácie DNA, a to buď globálne, špecifických génov alebo celogenómovo (Khodadadi *et al.*, 2021).

7 ZÁVER

V posledných desaťročiach prešli metódy analýzy DNA využívané v epigenetike veľkou revolúciou. Zvoliť vhodný prístup k analýze závisí od cieľov štúdie. Žiadna metóda nebude vhodná pre všetky aplikácie. Každá metóda má svoje klady a zápory, ale vďaka znalosti typu informácie získanej danou metódou sú výskumníci schopní vybrať si najvhodnejšiu metódu na základe vlastných potrieb.

Metód schopných detegovať 5-hydroxymetylcytozín je stále nedostatok. Preto sme sa rozhodli vykonať analýzu metódami schopnými zamerať túto modifikáciu, ktoré sú cenovo dostupné, technicky nenáročné a vyžadujú bežne dostupné vybavenie väčšiny vedeckých inštitúcií. Získané výsledky nám poskytli prehľad o distribúcii 5-hydroxymetylcytozínu v genóme *Silene latifolia*, o obohatení vybraných pohlavne špecifických génov touto cytozínovou modifikáciou a jej možnú spojitosť s výskytom transponovateľných elementov v blízkosti daných génov.

8 LITERATÚRA

- Ardui, S., Ameer, A., Vermeesch, J. R., Hestand, M. S. (2018). Single molecule real-time (SMRT) sequencing comes of age: Applications and utilities for medical diagnostics. *Nucleic Acids Research*, 46(5), 2159–2168.
- Badal, V., Chuang, L. S. H., Tan, E. H.-H., Badal, S., Villa, L. L., Wheeler, C. M., Li, B. F. L., Bernard, H.-U. (2003). CpG Methylation of Human Papillomavirus Type 16 DNA in Cervical Cancer Cell Lines and in Clinical Specimens: Genomic Hypomethylation Correlates with Carcinogenic Progression. *Journal of Virology*, 77(11), 6227–6234.
- Ballestar, E., Paz, M., Valle, L., Wei, S., Fraga, M., Espada, J., Cruz Cigudosa, J., Huang, T. H.-M., Esteller, M. (2003). Methyl-CpG binding proteins identify novel sites of epigenetic inactivation in human cancer. *The EMBO Journal*, 22(23), 6335–6345.
- Barlow, D. P., Bartolomei, M. S. (2014). Genomic Imprinting in Mammals. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(2), a018382–a018382.
- Barros-Silva, D., Marques, C. J., Henrique, R., Jerónimo, C. (2018). Profiling DNA Methylation Based on Next-Generation Sequencing Approaches: New Insights and Clinical Applications. *Genes*, 9(9), 429.
- Bartošík, M., Ondroušková, E. (2016). Novel Approaches in DNA Methylation Studies – MS-HRM Analysis and Electrochemistry. *Klinická onkologie*, 29(Suppl 4), 4S64-4S71.
- Bayley, H. (2015). Nanopore Sequencing: From Imagination to Reality. *Clinical Chemistry*, 61(1), 25–31.
- Beaujean, N., Salvaing, J., Hadi, N. A. A., Pennings, S. (2018). Antibody-Based Detection of Global Nuclear DNA Methylation in Cells, Tissue Sections, and Mammalian Embryos. V J. Tost (Ed.), *DNA Methylation Protocols* (s. 59–80). Springer.
- Bergero, R., Charlesworth, D. (2011). Preservation of the Y Transcriptome in a 10-Million-Year-Old Plant Sex Chromosome System. *Current Biology*, 21(17), 1470–1474.
- Bird, A. P. (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*, 321(6067), 209–213.

- Booth, M. J., Branco, M. R., Ficz, G., Oxley, D., Krueger, F., Reik, W., Balasubramanian, S. (2012). Quantitative Sequencing of 5-Methylcytosine and 5-Hydroxymethylcytosine at Single-Base Resolution. *Science*, 336(6083), 934–937.
- Cedar, H., Solage, A., Glaser, G., Razin, A. (1979). Direct detection of methylated cytosine in DNA by use of the restriction enzyme MspI. *Nucleic Acids Research*, 6(6), 2125–2132.
- Cegan, R., Marais, G. A., Kubekova, H., Blavet, N., Widmer, A., Vyskot, B., Doležel, J., Šafář, J., Hobza, R. (2010). Structure and evolution of *Apetala3*, a sex-linked gene in *Silene latifolia*. *BMC Plant Biology*, 10(1), 180.
- Cermak, T., Kubat, Z., Hobza, R., Koblizkova, A., Widmer, A., Macas, J., Vyskot, B., Kejnovsky, E. (2008). Survey of repetitive sequences in *Silene latifolia* with respect to their distribution on sex chromosomes. *Chromosome Research*, 16(7), 961–976.
- Eads, C. A., Danenberg, K. D., Kawakami, K., Saltz, L. B., Blake, C., Shibata, D., Danenberg, P. V., Laird, P. W. (2000). MethyLight: A high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Research*, 28(8), e32-00.
- Ehrlich, M. (2002). DNA methylation in cancer: Too much, but also too little. *Oncogene*, 21(35), 5400–5413.
- Flusberg, B. A., Webster, D. R., Lee, J. H., Travers, K. J., Olivares, E. C., Clark, T. A., Korlach, J., Turner, S. W. (2010). Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing. *Nature Methods*, 7(6), 461–465.
- Frommer, M., McDonald, L. E., Millar, D. S., Collis, C. M., Watt, F., Grigg, G. W., Molloy, P. L., Paul, C. L. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(5), 1827–1831.
- Girard, L., Freeling, M. (1999). Regulatory changes as a consequence of transposon insertion. *Developmental Genetics*, 25(4), 291–296.
- Gupta, P. K. (2008). Single-molecule DNA sequencing technologies for future genomics research. *Trends in Biotechnology*, 26(11), 602–611.

- Hayatsu, H., Wataya, Y., Kai, K., Iida, S. (1970). Reaction of sodium bisulfite with uracil, cytosine, and their derivatives. *Biochemistry*, *9*(14), 2858–2865.
- Häfner, N., Diebold, H., Jansen, L., Hoppe, I., Dürst, M., Runnebaum, I. B. (2011). Hypermethylated DAPK in serum DNA of women with uterine leiomyoma is a biomarker not restricted to cancer. *Gynecologic Oncology*, *121*(1), 224–229.
- Herman, J. G., Graff, J. R., Myöhänen, S., Nelkin, B. D., Baylin, S. B. (1996). Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(18), 9821–9826.
- Holliday, R., Holliday, R., Monk, M., Pugh, J. E. (1990). DNA methylation and epigenetic inheritance. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, *326*(1235), 329–338.
- Huang, T. H.-M., Perry, M. R., Laux, D. E. (1999). Methylation Profiling of CpG Islands in Human Breast Cancer Cells. *Human Molecular Genetics*, *8*(3), 459–470.
- Huang, Y., Pastor, W. A., Shen, Y., Tahiliani, M., Liu, D. R., Rao, A. (2010). The Behaviour of 5-Hydroxymethylcytosine in Bisulfite Sequencing. *PLOS ONE*, *5*(1), e8888.
- Charlesworth, D. (2013). Plant sex chromosome evolution. *Journal of Experimental Botany*, *64*(2), 405–420.
- Jacinto, F. V., Ballestar, E., Esteller, M. (2008). Methyl-DNA immunoprecipitation (MeDIP): Hunting down the DNA methylome. *BioTechniques*, *44*(1), 35–43.
- Jain, M., Olsen, H. E., Paten, B., Akeson, M. (2016). The Oxford Nanopore MinION: Delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biology*, *17*(1), 239.
- Jones, P. A. (2012). Functions of DNA methylation: Islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics*, *13*(7), 484–492.
- Khodadadi, E., Fahmideh, L., Khodadadi, E., Dao, S., Yousefi, M., Taghizadeh, S., Asgharzadeh, M., Yousefi, B., Kafil, H. S. (2021). Current Advances in DNA Methylation Analysis Methods. *BioMed Research International*, *2021*, e8827516.

- Klosin, A., Lehner, B. (2016). Mechanisms, timescales and principles of trans-generational epigenetic inheritance in animals. *Current Opinion in Genetics & Development*, 36, 41–49.
- Korlach, J., Turner, S. W. (2012). Going beyond five bases in DNA sequencing. *Current Opinion in Structural Biology*, 22(3), 251–261.
- Kristensen, L. S., Raynor, M., Candiloro, I., Dobrovic, A. (2012). Methylation profiling of normal individuals reveals mosaic promoter methylation of cancer-associated genes. *Oncotarget*, 3(4), 450–461.
- Kurdyukov, S., Bullock, M. (2016). DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biology*, 5(1), 3.
- Lan, V. T. T., Ha, N. T., Uyen, N. Q., Duong, N. T., Huong, N. T. T., Thuan, T. B., Duong, P. A. T., To, T. V. (2014). Standardization of the methylation-specific PCR method for analyzing BRCA1 and ER methylation. *Molecular Medicine Reports*, 9(5), 1844–1850.
- Levsky, J. M., Singer, R. H. (2003). Fluorescence in situ hybridization: Past, present and future. *Journal of Cell Science*, 116(14), 2833–2838.
- Li, L.-C., Dahiya, R. (2002). MethPrimer: Designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*, 18(11), 1427–1431.
- Li, S., Chen, M., Li, Y., Tollefsbol, T. O. (2019). Prenatal epigenetics diets play protective roles against environmental pollution. *Clinical Epigenetics*, 11(1), 82.
- Li, S., Tollefsbol, T. O. (2021). DNA methylation methods: Global DNA methylation and methylomic analyses. *Methods*, 187, 28–43.
- Lister, R., Ecker, J. R. (2009). Finding the fifth base: Genome-wide sequencing of cytosine methylation. *Genome Research*, 19(6), 959–966.
- Miller, O. J., Schnedl, W., Allen, J., Erlanger, B. F. (1974). 5-Methylcytosine localised in mammalian constitutive heterochromatin. *Nature*, 251(5476), 636–637.
- Morales, M. E., White, T. B., Streva, V. A., DeFreece, C. B., Hedges, D. J., Deininger, P. L. (2015). The Contribution of Alu Elements to Mutagenic DNA Double-Strand Break Repair. *PLOS Genetics*, 11(3), e1005016.

- Mueller, A., Fischer, K., Suluku, R., Hoenen, T. (2019). Sequencing of mRNA from Whole Blood using Nanopore Sequencing. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 148, e59377.
- Nouzova, M., Holtan, N., Oshiro, M. M., Isett, R. B., Munoz-Rodriguez, J. L., List, A. F., Narro, M. L., Miller, S. J., Merchant, N. C., Futscher, B. W. (2004). Epigenomic Changes during Leukemia Cell Differentiation: Analysis of Histone Acetylation and Cytosine Methylation Using CpG Island Microarrays. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 311(3), 968–981.
- Pajares, M. J., Palanca-Ballester, C., Urtasun, R., Alemany-Cosme, E., Lahoz, A., Sandoval, J. (2021). Methods for analysis of specific DNA methylation status. *Methods*, 187, 3–12.
- Quainoo, S., Coolen, J. P. M., van Hijum, S. A. F. T., Huynen, M. A., Melchers, W. J. G., van Schaik, W., Wertheim, H. F. L. (2017). Whole-Genome Sequencing of Bacterial Pathogens: The Future of Nosocomial Outbreak Analysis. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(4), 1015–1063.
- Rai, K., Huggins, I. J., James, S. R., Karpf, A. R., Jones, D. A., Cairns, B. R. (2008). DNA Demethylation in Zebrafish Involves the Coupling of a Deaminase, a Glycosylase, and Gadd45. *Cell*, 135(7), 1201–1212.
- Rakyan, V. K., Hildmann, T., Novik, K. L., Lewin, J., Tost, J., Cox, A. V., Andrews, T. D., Howe, K. L., Otto, T., Olek, A., Fischer, J., Gut, I. G., Berlin, K., Beck, S. (2004). DNA Methylation Profiling of the Human Major Histocompatibility Complex: A Pilot Study for the Human Epigenome Project. *PLOS Biology*, 2(12), e405.
- Ramalho-Carvalho, J., Gonçalves, C. S., Graça, I., Bidarra, D., Pereira-Silva, E., Salta, S., Godinho, M. I., Gomez, A., Esteller, M., Costa, B. M., Henrique, R., Jerónimo, C. (2018). A multiplatform approach identifies miR-152-3p as a common epigenetically regulated onco-suppressor in prostate cancer targeting TMEM97. *Clinical Epigenetics*, 10(1), 40.
- Rodríguez Lorenzo, J. L., Hobza, R., Vyskot, B. (2018). DNA methylation and genetic degeneration of the Y chromosome in the dioecious plant *Silene latifolia*. *BMC Genomics*, 19(1), 540.

- Rouleau, E., Lefol, C., Bourdon, V., Coulet, F., Noguchi, T., Soubrier, F., Bièche, I., Olschwang, S., Sobol, H., Lidereau, R. (2009). Quantitative PCR high-resolution melting (qPCR-HRM) curve analysis, a new approach to simultaneously screen point mutations and large rearrangements: Application to MLH1 germline mutations in Lynch syndrome. *Human Mutation*, 30(6), 867–875.
- Santos, F., Hendrich, B., Reik, W., Dean, W. (2002). Dynamic Reprogramming of DNA Methylation in the Early Mouse Embryo. *Developmental Biology*, 241(1), 172–182.
- Shi, D.-Q., Ali, I., Tang, J., Yang, W.-C. (2017). New Insights into 5hmC DNA Modification: Generation, Distribution and Function. *Frontiers in Genetics*, 8.
- Schadt, E. E., Turner, S., Kasarskis, A. (2010). A window into third-generation sequencing. *Human Molecular Genetics*, 19(R2), R227–R240.
- Schreiber, J., Wescoe, Z. L., Abu-Shumays, R., Vivian, J. T., Baatar, B., Karplus, K., Akeson, M. (2013). Error rates for nanopore discrimination among cytosine, methylcytosine, and hydroxymethylcytosine along individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(47), 18910–18915.
- Sigman, M. J., Slotkin, R. K. (2016). The First Rule of Plant Transposable Element Silencing: Location, Location, Location. *The Plant Cell*, 28(2), 304–313.
- Skvortsova, K., Stirzaker, C., Taberlay, P. (2019). The DNA methylation landscape in cancer. *Essays in Biochemistry*, 63(6), 797–811.
- Slotkin, R. K., Martienssen, R. (2007). Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nature Reviews Genetics*, 8(4), 272–285.
- Song, C.-X., Yi, C., He, C. (2012). Mapping recently identified nucleotide variants in the genome and transcriptome. *Nature Biotechnology*, 30(11), 1107–1116.
- Sood, A. J., Viner, C., Hoffman, M. M. (2019). DNAmoD: The DNA modification database. *Journal of Cheminformatics*, 11(1), 30.
- Soozangar, N., Sadeghi, M. R., Jeddi, F., Somi, M. H., Shirmohamadi, M., Samadi, N. (2018). Comparison of genome-wide analysis techniques to DNA methylation analysis in human cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 233(5), 3968–3981.

- Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L. M., Liu, D. R., Aravind, L., Rao, A. (2009). Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science*, 324(5929), 930–935.
- Templeton, N. S. (1992). The polymerase chain reaction. History, methods, and applications. *Diagnostic Molecular Pathology*, 1(1), 58–72.
- Thu, K. L., Vucic, E. A., Kennett, J. Y., Heryet, C., Brown, C. J., Lam, W. L., Wilson, I. M. (2009). Methylated DNA Immunoprecipitation. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 23, e935.
- Travers, K. J., Chin, C.-S., Rank, D. R., Eid, J. S., Turner, S. W. (2010). A flexible and efficient template format for circular consensus sequencing and SNP detection. *Nucleic Acids Research*, 38(15), e159.
- Weber, M., Davies, J. J., Wittig, D., Oakeley, E. J., Haase, M., Lam, W. L., Schübeler, D. (2005). Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nature Genetics*, 37(8), 853–862.
- Weng, Y.-I., Huang, T. H.-M., Yan, P. S. (2009). Methylated DNA Immunoprecipitation and Microarray-Based Analysis: Detection of DNA Methylation in Breast Cancer Cell Lines. V O.-K. Park-Sarge & T. E. Curry (Ed.), *Molecular Endocrinology: Methods and Protocols* (s. 165–176). Humana Press.
- Wescoe, Z. L., Schreiber, J., Akeson, M. (2014). Nanopores Discriminate among Five C5-Cytosine Variants in DNA. *Journal of the American Chemical Society*, 136(47), 16582–16587.
- Wojdacz, T. K., Dobrovic, A. (2007). Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): A new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Research*, 35(6), e41.
- Wu, H., D'Alessio, A. C., Ito, S., Wang, Z., Cui, K., Zhao, K., Sun, Y. E., Zhang, Y. (2011). Genome-wide analysis of 5-hydroxymethylcytosine distribution reveals its dual function in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Genes & Development*, 25(7), 679–684.

Xiong, Z., Laird, P. W. (1997). COBRA: A sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Research*, 25(12), 2532–2534.

Yu, M., Hon, G. C., Szulwach, K. E., Song, C.-X., Jin, P., Ren, B., He, C. (2012). Tet-assisted bisulfite sequencing of 5-hydroxymethylcytosine. *Nature Protocols*, 7(12), 2159–2170.

Internetové zdroje:

DNAmod. [online] [navštívené 1. 4. 2022]

Dostupné z: <https://dnamod.hoffmanlab.org>

HRM guide. [online] [navštívené 3. 3. 2022]

Dostupné z: <https://www.gene-quantification.de/hrm-beginners-guide.pdf>