

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Využití systému CRISPR/Cas9 pro značení
mitotických chromozomů v suspenzi**

Diplomová práce

Bc. Lucie Dostálová

Studijní program: B1501 Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: Mgr. Petr Cápál, Ph.D.

Olomouc 2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lucie DOSTÁLOVÁ**
Osobní číslo: **R18925**
Studijní program: **N1501 Biologie**
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**
Název tématu: **Využití systému CRISPR/Cas9 pro značení mitotických chromozomů v suspenzi**
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracování rešerše na dané téma 2. Shromáždění dostupných literárních zdrojů 3. Zvládnutí technik přípravy suspenze intaktních rostlinných chromozomů a fluorescenční mikroskopie 4. Experimenty s využitím molekulárně biologických a cytogenetických metod FISH a CRISPR/CASFISH 5. Zpracování multimediální prezentace k obhajobě diplomové práce

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. Deng et al. (2015) CASFISH: CRISPR/Cas9-mediated in situ labeling of genomic loci in fixed cells. PNAS 112: 1187011875
2. Vrána et al. (2016) Flow analysis and sorting of plant chromosomes. Curr Protoc Cytom 78:5.3.1-5.3.43.
3. Doležel et al. (2014) Advances in plant chromosome genomics. Biotech Adv 32: 122136
4. Giorgi et al. (2013) FISHIS: Fluorescence In Situ Hybridization in Suspension and Chromosome Flow Sorting Made Easy. PlosONE 8(2): e57994

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Petr Cápál, Ph.D.

ÚEB Olomouc



Datum zadání diplomové práce:

12. října 2018

Termín odevzdání diplomové práce:

31. července 2020

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

25. 9. 18

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry



V Olomouci dne 27. března 2017

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Katedra cytogenetiky

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Lucie Dostálová
Název práce	Využití systému CRISPR/Cas9 pro značení mitotických chromozomů v suspenzi
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav experimentální botaniky
Vedoucí práce	Mgr. Petr Cápál, Ph.D
Rok obhajoby práce	2020
Klíčová slova	CRISPR/Cas9, průtoková cytometrie, CASFISH
Počet stran	77
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Souhrn

Velikost rostlinných genomů je v rámci rostlinné říše velice variabilní. Jednou z příčin vysoké variability rostlinných genomů je skutečnost, že v průběhu evoluce bylo mnoho rostlinných druhů ovlivněno vnitrodruhovými nebo mezidruhovými hybridizacemi a polyploidizací, při níž dochází ke zdvojování sad chromozomů. Dalším důvodem, který přispívá k proměnlivosti je přítomnost rozdílného obsahu repetitivních sekvencí DNA, které se v genomu nachází. Mnoho hospodářsky významných plodin, jako například pšenice, ječmen či žito mají velké a komplexní genomy, což znesnadňuje a prodražuje jejich analýzu. Ta může být ale zjednodušena rozdělením genomu na jeho podjednotky - chromozomy pomocí metody průtokové cytometrie. Nicméně i třídění chromozomů je u mnohých rostlinných druhů komplikováno malými rozdíly v jejich velikosti DNA. Proto je snaha vyvinout různé alternativní přístupy pro značení chromozomů v suspenzi, které by mohli být do budoucna řešením tohoto problému. Jako jedna z možností se nabízí značení chromozomů v suspenzi metodou CASFISH, která používá systém CRISPR/Cas9 typu II z bakterie *Streptococcus pyogenes*. Teoreticky je možné jej využít pro značení chromozomů, a to bez denaturace, která má negativní dopad na morfologii chromozomů.

Bibliographical identification

Author's name	Bc. Lucie Dostálová
Title of thesis	CRISPR/Cas9 system for labeling mitotic chromosomes in suspension
Type of thesis	Diploma thesis
Department	Ústav experimentální botaniky
Supervisor	Mgr. Petr Cápál, Ph.D
The year of presentation	2020
Keywords	CRISPR/Cas9, flow cytometry, CASFISH
Number of pages	77
Number of appendices	0
Language	Czech

Summary

The size of plant genomes is very variable within the plant kingdom. One of the causes of high variability in plant genomes is that during evolution, many plant species were affected by intraspecific or interspecific hybridization and polyploidization, resulting in duplication of chromosome complement. Another reason contributing to variability is the presence of different content of repetitive DNA sequences present in the genome. Many economically important crops, such as wheat, barley and rye, have large and complex genomes, making it difficult and more expensive to analysis. A possible way to simplify their analysis is to divide their genomes into natural subunits - chromosomes. However, even the sorting of chromosomes is complicated by small differences in their DNA size in many plant species. Therefore, efforts are made to develop various alternative approaches for labelling chromosomes in suspension. A plausible alternative for chromosome labelling might be CASFISH. This method uses a CRISPR/Cas9 type II system from *Streptococcus pyogenes*. Fluorescently labelled Cas9 construct can be used as a probe for labelling target DNA sequence without denaturation, which has a negative impact on chromosome morphology.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala zcela samostatně s použitím citované literatury.

V Olomouci dne.....

.....

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Mgr. Petrovi Cápalovi, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce, přátelský přístup, věnovaný čas a cenné rady. Dále bych ráda poděkovala své rodině za podporu a trpělivost během studia.

Obsah

1 ÚVOD	16
2 CÍLE PRÁCE	17
3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	18
3.1 Struktura dědičné informace	18
3.2 Komplexita rostlinných genomů.....	20
3.3 Průtoková cytometrie	24
3.3.1 Využití průtokové cytometrie pro snížení komplexity genomu	25
3.4 Značení chromozómů v suspenzi	26
3.4.1 FISH/PRINS	26
3.4.2 FISHIS	28
3.4.3 Polyamidy	29
3.4.4 Proteinové komplexy - ZINC-FINGER NUKLEÁZY a TALEN	29
3.5 CRISPR/Cas9.....	31
3.5.1 Využití CRISPR/Cas9 pro fluorescenční značení.....	33
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	35
4.1 Použité chemikálie	35
4.2 Biologický materiál.....	35
4.3 Použité přístrojové vybavení	35
4.4 Použité nástroje a spotřební materiál	36
4.5 Použité roztoky	36
4.6 Metody	38
4.6.1 Nasazení semínek pšenice a synchronizace buněčného cyklu.....	38
4.6.2 Fixáž, izolace a purifikace chromozómů pšenice	38
4.6.3 Nasazení semínek ječmene a synchronizace buněčného cyklu	39
4.6.4 Fixáž, izolace a purifikace chromozómů ječmene.....	39
4.6.5 CASFISH	39
4.6.5.1 CASFISH se značenou sgRNA.....	39
4.6.5.2 CASFISH se značenou dCas9 endonukleázou	41
4.6.6 Analýza vzorků na průtokovém cytometru.....	42
5 VÝSLEDKY A HODNOCENÍ.....	43
5.1 Optimalizace fixáže chromozómů ječmene	43
5.2 Značení chromozómů ječmene pomocí CASFISH se značenou dCas9-EGFP ...	45

5.3 Značení ječmene značenou sgRNA/ATTO 550	48
5.3.1 Chromozómy ječmene značené klasickou CASFISH značenou sgRNA	49
5.3.2 Chromozómy ječmene značené CASFISH v suspenzi značenou sgRNA	51
5.4 Optimalizace fixáže chromozómů pšenice	53
5.5 Značení chromozómů pšenice pomocí CASFISH se značenou dCas9.....	56
5.6 Značení pšenice značenou sgRNA/ATTO 550.....	59
5.6.1 Chromozómy pšenice značené klasickou CASFISH značenou sgRNA.....	60
5.6.2 Chromozómy pšenice značené CASFISH v suspenzi značenou sgRNA	62
6 DISKUZE.....	64
7 ZÁVĚR	67
8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	68

SEZNAM ZKRATEK

APM - amiprofosmethyl

CASFISH - *in vitro* fluorescenční systém CRISPR/Cas9

CRISPR/Cas - úseky pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetice (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR associated)

crRNA – cílově specifická CRISPR RNA

dCas9 - deaktivovaná endonukleáza Cas9

DNA - deoxyribonukleová kyselina

dsDNA – dvouřetězcová deoxyribonukleová kyselina

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

EGFP – zelený fluorescenční protein

FISH - fluorescenční *in situ* hybridizace

FISHIS - fluorescenční *in situ* hybridizace v suspenzi

HDR - homologicky řízená rekombinace

NHEJ - nehomologní koncové spojení

HNH - nukleázová doména endonukleázy Cas9

HU - hydroxymočovina

LB01 - lysis buffer (lyzační pufr)

PAM - protospacer adjacent motif

pre-crRNA - prekurzorová CRISPR RNA

PRINS - Primed *in situ* labeling

RNP – ribonukleoproteinová částice

sgRNA - guide RNA, krátká naváděcí nekódující ribonukleová kyselina

RGEN – ISL - RNA-vedená endonukleáza - *in situ* hybridizace

RuvC - nukleázová doména endonukleázy Cas9

tracrRNA - pomocná trans-aktivační CRISPR RNA

ZFN - nukleázy zinkové prstu (zinc finger nuclease)

ZF - zinkový prst (zinc finger)

TALEN – efektorové nukleázy podobné transkripčním faktorům (Transcription Activator Like Effector Nuclease)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Kondenzace chromatinového vlákna.....	20
Obrázek 2: Vznik hexaploidní pšenice seté (<i>T. aestivum</i>) z druhů <i>T. urartu</i> , <i>Ae. speltoides</i> a <i>Ae. tauschii</i>	23
Obrázek 3: Schéma průtokového cytometru a třídění chromozómů	25
Obrázek 4: Schématické znázornění fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace - FISH	27
Obrázek 5: Flow karyotyp <i>Triticum turgidum</i> , ssp. <i>Durum</i> . Po použití FISHIS je možné rozlišit všech 14 chromozómů	28
Obrázek 6: Flow karyotyp lidské buněčné linie pro značení TTCCA cílcí polyamidovou sondou.	29
Obrázek 7: Na obrázku jsou znázorněny místně specifické nukleázy zinkového prstu, které jsou tvořeny DNA vazebnou a restriční doménou - endodonukleáza FokI.	30
Obrázek 8: Na obrázku je znázorněn mechanismus TALEN systému.....	30
Obrázek 9: Obecný mechanismus systému CRISPR/Cas, který se skládá ze tří fází: adaptace, exprese a interference.....	32
Obrázek 10: Systém CRISPR/Cas	33
Obrázek 11: Flow karyotyp chromozómů ječmene cv. <i>Morex</i> při 20 minutové fixáži...	43
Obrázek 12: Chromozómy ječmene cv. <i>Morex</i> při 20 minutové fixáži.	43
Obrázek 13: Flow karyotyp chromozómů ječmene cv. <i>Morex</i> při 10 minutové fixáži...	44
Obrázek 14: Chromozómy ječmene cv. <i>Morex</i> při 10 minutové fixáži.	44
Obrázek 15: Flow karyotyp chromozómů ječmene cv. <i>Morex</i> při 5 minutové fixáži.....	45
Obrázek 16: Chromozómy ječmene cv. <i>Morex</i> při 5 minutové fixáži.	45
Obrázek 17: Flow karyotyp chromozómů ječmene cv. <i>Morex</i> bez značení.....	46
Obrázek 18: Flow karyotyp chromozómů ječmene cv. <i>Morex</i> se značenou sekvencí AGG značenou dCas9-EGFP	46
Obrázek 19: Flow karyotyp chromozómů ječmene cv. <i>Morex</i> se značenou telomérou..	47
Obrázek 20: Chromozómy ječmene cv. <i>Morex</i> se značenou sekvencí AGG.....	47
Obrázek 21: Chromozómy ječmene cv. <i>Morex</i> se značenou telomérou	48
Obrázek 22: Flow karyotyp chromozómů ječmene cv. <i>Morex</i> bez značení.....	48
Obrázek 23: Flow karyotyp chromozómů ječmene cv. <i>Morex</i> se značenou sekvencí AGG po přidání 1 µl značené sgRNA/ATTO 550.....	49
Obrázek 24: Flow karyotyp chromozómů ječmene cv. <i>Morex</i> se značenou sekvencí AGG po přidání 9 µl značené sgRNA/ATTO 550.....	49

Obrázek 25: Chromozómy ječmene cv. <i>Morex</i> se značenou sekvencí AGG značené pomocí značené sgRNA/ATTO 550	50
Obrázek 26: Chromozómy ječmene cv. <i>Morex</i> s próbou cílící na telomerické oblasti se značenou sgRNA fluochromem ATTO 550	50
Obrázek 27: Chromozómy ječmene cv. <i>Morex</i> se značenou sekvencí AGG pomocí značené sgRNA/ATTO 550	51
Obrázek 28: Chromozómy ječmene cv. <i>Morex</i> se značenou sekvencí AGG značenou sgRNA/ATTO 550	52
Obrázek 29: Chromozómy ječmene cv. <i>Morex</i> se značenou sekvencí AGG značenou pomocí značené sgRNA/ATTO 550	52
Obrázek 30: Chromozómy ječmene cv. <i>Morex</i> se značenou sekvencí AGG značenou sgRNA/ATTO 550	53
Obrázek 31: Flow karyotyp chromozómů pšenice cv. <i>Chinese spring</i> při 20 minutové fixáži.....	54
Obrázek 32: Chromozómy pšenice cv. <i>Chinese spring</i> při 20 minutové fixáži	54
Obrázek 33: Flow karyotyp chromozómů pšenice cv. <i>Chinese spring</i> při 10 minutové fixáži.....	55
Obrázek 34: Chromozómy pšenice cv. <i>Chinese spring</i> při 10 minutové fixáži	55
Obrázek 35: Flow karyotyp chromozómů pšenice cv. <i>Chinese spring</i> při 5 minutové fixáži.....	56
Obrázek 36: Chromozómy pšenice cv. <i>Chinese spring</i> při 5 minutové fixáži	56
Obrázek 37: Flow karyotyp chromozómů cv. <i>Chinese spring</i> bez značení	57
Obrázek 38: Flow karyotyp chromozómů pšenice cv. <i>Chinese spring</i> se značenou sekvencí <i>afa</i> značenou dCas9-EGFP	57
Obrázek 39: Flow karyotyp chromozómů pšenice cv. <i>Chinese spring</i> se značenou telomérou značenou dCas9-EGFP	58
Obrázek 40: Chromozómy pšenice cv. <i>Chinese spring</i> se značenou sekvencí <i>afa</i> značenou dCas9-EGFP.....	58
Obrázek 41: Chromozómy pšenice cv. <i>Chinese spring</i> se značenou telomerickou oblastí značenou dCas9-EGFP.....	59
Obrázek 42: Flow karyotyp chromozómů pšenice cv. <i>Chinese spring</i> bez značení	59
Obrázek 43: Flow karyotyp zobrazující chromozómy pšenice cv. <i>Chinese spring</i> , ke kterým byl přidán 1 μ l značené sgRNA/ATTO 550	60

Obrázek 44: Flow karyotyp zobrazující chromozómy pšenice cv. <i>Chinese spring</i> , ke kterým bylo přidáno 9 μ l značené sgRNA/ATTO 550	60
Obrázek 45: Chromozómy pšenice cv. <i>Chinese spring</i> se značenou sekvencí <i>afa</i> značenou sgRNA/ATTO 550	61
Obrázek 46: Chromozómy pšenice cv. <i>Chinese spring</i> se značenou telomérickou oblastí značenou sgRNA/ATTO 550	61
Obrázek 47: Chromozómy pšenice cv. <i>Chinese spring</i> se značenou sekvencí <i>afa</i> značenou sgRNA/ATTO 550	62
Obrázek 48: Chromozómy pšenice cv. <i>Chinese spring</i> se značenou telomerickou oblastí značenou sgRNA/ATTO 550	62
Obrázek 49: Chromozómy pšenice cv. <i>Chinese spring</i> se značenou sekvencí <i>afa</i> značenou sgRNA/ATTO 550 v suspenzi	63
Obrázek 50: Chromozómy pšenice cv. <i>Chinese spring</i> se značenou telomérou v suspenzi	63
Obrázek 51: Specificky značená cílová sekvence AGG na chromozómech ječmene cv. <i>Morex</i>	66

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Individuální použité objemy ribonukleové částice sgRNA v jednotlivých experimentech	40
Tabulka 2: Jednotlivé podmínky inkubace DNA sond.....	40
Tabulka 3: Shrnutí jednotlivých podmínek inkubace v suspenzi	41
Tabulka 4: Jednotlivé podmínky inkubace DNA sond.....	42

1 ÚVOD

Studium rostlinných genomů je důležité z hlediska pěstování hospodářsky významných plodin. Na tyto plodiny je kladen velký důraz z hlediska vysokého výnosu a jejich přínosné vlastnosti, jako je odolnost plodin proti abiotickým (suchu, vysokým teplotám) a biotickým (škůdci) stresům. (Briggs a Walters 2001, Grant 1981). Dále je studium polyploidních komplexů důležité i pro pěstování rostlin. Rostliny některých hospodářsky významných plodin mají velké a komplexní genomy. Jedním z těchto faktorů, který má výrazný vliv na komplexitu rostlinných genomů je polyploidizace, při které dochází ke zdvojování sad chromozomů. Dalším faktorem je i přítomnost velkého množství repetitivních DNA sekvencí v rostlinných genomech, které značnou měrou přispívají k vysoké variabilitě (Bennetzen a kol. 2005). Tím pádem není analýza těchto komplexních rostlinných genomů snadná. Pro usnadnění lze využít průtokové cytometrie, pomocí níž lze rozdělit genom na jeho jednotlivé podjednotky chromozómy. Nicméně i třídění chromozomů je u mnohých rostlinných druhů komplikováno malými rozdíly v jejich velikosti DNA. Tato skutečnost, vede k rozvoji různých alternativních metod, které by mohly do budoucna usnadnit značení chromozomů v suspenzi. Mezi takové metody, které byly v minulosti vyvíjeny, patří například PRINS, FISHIS, metody využívající polyamidových sond, TALENů a další. V současné době je předmětem intenzivního zájmu metoda zvaná CASFISH. Je příznačná tím, že používá systém CRISPR/Cas9 typu II odvozeny z bakterie *Streptococcus pyogenes* (Deng a kol. 2015). Klíčovou roli v tomto systému hraje endonukleáza cas9, která provádí sestřih cílové sekvence DNA. Ovšem při značení chromozomů v suspenzi je používána deaktivovaná endonukleáza dCas9 vyznačující se katalytickou inaktivitou. To znamená, že jakmile rozpozná cílovou sekvenci na DNA, nebude v ní štěpit. Mimo jiné je endonukleáza v CASFISH sfúzována s fluorescenčním proteinem. Slouží tedy jako sonda pro značení cílové sekvence na deoxyribonukleové kyselině. Značnou výhodou metody CASFISH je, že nemá negativní dopad na morfologii chromozomů, jako je tomu u jiných metod používajících denaturaci DNA jako je například FISH. Metoda CASFISH byla využita například v práci Ishii a kol. 2019 při značení chromozomů huseníčku, čiroku a tabáku.

2 CÍLE PRÁCE

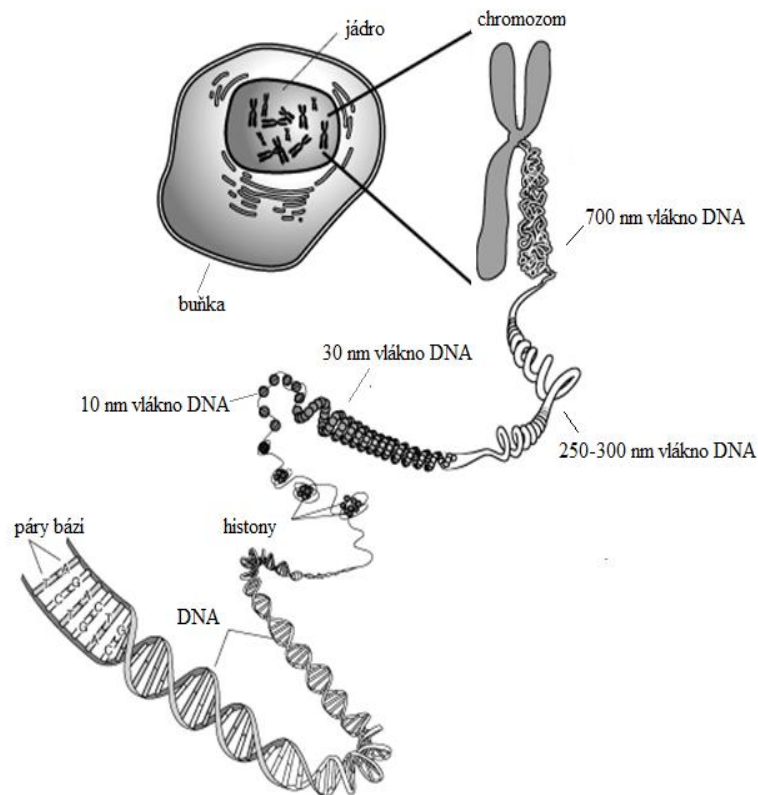
- Vypracování rešerše na dané téma
- Shromáždění dostupných literárních zdrojů
- Zvládnutí technik přípravy suspenze intaktních rostlinných chromozómů a fluorescenční mikroskopie
- Experimenty s využitím molekulárně biologických a cytogenetických metod CRISPR - CASFISH
- Zpracování multimediální prezentace k obhajobě diplomové práce

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Struktura dědičné informace

Nositelkou genetické informace nacházející se v jádře eukaryotických organismů je deoxyribonukleová kyselina (DNA), která byla poprvé objevena v roce 1869 Friedrichem Miescherem (Miescher 1869a; Dahm 2008). Její struktura však byla objasněna až v roce 1953 Watsonem a Crickem (Watson a Crick 1953) na základě difrakčních dat naměřených Rosalindou Franklin a Raymondem Goslingem (Franklin a Gosling 1953). Základním stavebním prvkem DNA je tzv. nukleotid skládající se z pětiuhlíkatého cukru (pentózy), dusíkaté báze (purinové - adenin, guanin nebo pyrimidinové - thymin, cytosin) navázané na C₁'uhlíku a fosfátové skupiny na C₅'uhlíku. Nukleotidy jsou propojené fosfodiesterovou vazbou. DNA je tvořena dvěma antiparalelními (ve směru 5'→3', 3'→5') polynukleotidovými vlákny stočenými do šroubovice o průměru 2 nm (Dickerson a Drew 1981). Vlákna DNA jsou propojená vodíkovými můstky na základě komplementarity dusíkatých bází. DNA eukaryot je 2 nm dlouhá lineární molekula a přesto v jádře zaujímá malý objem. To je zajištěno sbalováním molekuly DNA pomocí speciálních proteinů známe jako histony. Jedná se o proteiny s vysokým obsahem lysinu a argininu. Tyto aminokyseliny nesou kladný náboj, čímž je zajištěna pevná vazba histonů na negativně nabitou cukr-fosfátovou páteř molekuly DNA (Alberts a kol. 2005). DNA spolu s histony tvoří jadernou hmotu chromatin (van Holde 1989). Základem organizace chromatinu je nukleozom, jež obsahuje histonové jádro, molekuly spojovacího histonu H1 a molekulu DNA. Histonové jádro je tvořeno oktamerem histonů (H2A, H2B, H3 a H4) ve dvou kopiích, kolem kterého se v 1,65 smyčkách smotává molekula DNA o délce 146 párů bází (Annunziato 2008). Nukleozomy jsou na DNA rozmístěny pravidelně, díky tomu je tak chromatin uspořádán do tenkého nukleozomového vlákna, připomínající šňůru korálků o tloušťce 11 nm. Na nukleozomy se vážou další histony typu H1. Hrají klíčovou roli ve zpevnění DNA smyčky na histonovém oktameru a zároveň zajišťuje interakci se sousedním nukleozomem na základě vzájemného propojení jednotlivých histonů H1. To má za následek kondenzaci chromatinu do tzv. solenoidu, který utváří smyčku o velikosti 30 nm. Na jeden závit solenoidu připadá přibližně 6 nukleozomů (Cooper 1996). Ačkoliv tyto poznatky jsou součástí intenzivního výzkumu tak je 30nm vlákno stále předmětem sporů (Zhu

a Guohong 2016). Spiralizace chromatinu se odvíjí od toho, v jaké fázi buněčného cyklu se buňka zrovna nachází. Vlákno je dále spiralizováno do smyček o velikosti cca 250-300 nm (chromozomové domény). Jsou připojeny k centrální ose - lešení jádra, které je tvořeno proteiny nehistonové povahy. Toto uspořádání je charakteristické pro interfázi. Během interfáze tzv. interfázni chromozomy vypadají jako dlouhá, tenká a vzájemně proplétající se vlákna. V roce 1928 Emil Heitz zjistil, že v průběhu interfáze se chromatin v jádře nachází jak v kondenzovaném, tak i v rozvolněném stavu (Heitz 1928). Chromatin je buď to rozvolněný-transkripčně aktivní euchromatin, anebo kondenzovaný transkripčně inaktivní heterochromatin. Euchromatin je charakteristický velkým množstvím genů a také zde dochází k aktivnímu přepisování genetické informace. Zatímco heterochromatin je transkripčně téměř inaktivní (Heitz 1928; Passarge 1979). Jakmile buňka projde interfází, následuje mitóza, pro kterou je charakteristický nejvyšší stupeň spiralizace chromatinu. Vznikají vlákna o tloušťce zhruba 700 nm, která jsou 10^5 x kratší než bylo původní vlákno DNA (Wako a Fukui 2010), to je charakteristické pro tzv. mitotické chromozómy. Jsou nejlépe pozorovatelné v metafázi mitózy. Chromozómy tvoří jednotlivé podjednotky tzv. genomu, jehož studiem se zabývá obor zvaný genomika.



Obrázek 1: Kondenzace chromatinového vlákna. Obrázek znazornující postupne sbalovaní molekuly DNA do vyšších chromatinových struktur. Nejvyšším stupněm kondenzace chromatinového vlákna jsou mitotické chromozómy (převzato z: https://www.learned.cz/userfiles/pdf/moderovane-diskuse/jaroslav.dolezel_0908.pdf a upraveno: 5. 2. 2020).

3.2 Komplexita rostlinných genomů

Velikost rostlinných genomů je v rámci rostlinné ríše velice variabilní. Dosahuje hodnot od 0,063 Gb do 148,8 Gb (Dodsworth a kol. 2015; Kelly a Leitch 2011).

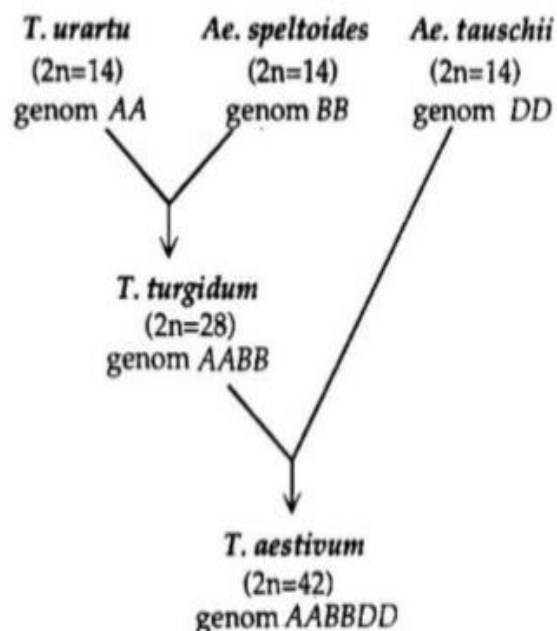
Velikost genomu je důležitým znakem biologické rozmanitosti (Bennett a Leitch 1997). Jeden z faktorů zpusobující vysokou variabilitu rostlinných genomů je skuteĉnost, že v průběhu evoluce bylo mnoho rostlin ovlivněno vnitrodruhovymi nebo mezidruhovými hybridizacemi, nebo tzv. polyploidizací (Adams a Wendel 2005; Leitch a Leitch 2008; Soltis a kol. 2009; Wendel 2000). Další prıĉinou prıspıvající k proměnlivosti je zejména i prıtomnost odlišneho mnozství repetitivních sekvencí DNA, které se v genomu nachází (Bennetzen a kol. 2005; Hrıbova a kol. 2010; Renny-Byfield a kol. 2011; Wicker a kol. 2009).

Množství DNA daného organismu nám udává C-hodnota (C-value). Tento termín byl zaveden v roce 1950 Swiftem (Swift 1950). Tato hodnota vyjadřuje kompletní obsah DNA haploidního genomu před replikací a lze jí vyjádřit v párech bází (bp) nebo pikogramech (pg). Později se ukázalo, že neexistuje žádný přímý vztah mezi C-hodnotou DNA a složitostí organismů, tento jev byl nejprve Thomasem v roce 1971 označen jako tzv. paradox C-hodnoty (Thomas 1971). Avšak s objevem nekódujících sekvencí v molekule DNA byl tento paradox přejmenován na tzv. záhadu C-hodnoty (Doležel a kol. 2007).

DNA obsahuje jak kódující (geny pro proteiny, funkční RNA, mobilní DNA elementy), tak i nekódující (repetitivní DNA, pseudogeny, atd.) sekvence. Tak jako kódující DNA i nekódující může být unikátní, anebo se může v genomu nacházet ve více identických nebo podobných sekvencích. Sekvence s vysokým počtem kopií jsou označovány jako tzv. repetitivní sekvence (nekódující). Jestliže se kopie motivu vyskytují v blocích za sebou, jsou nazývány jako tandemové repetice. V dalším případě se v genomu mohou vyskytovat i rozptýlené motivy, které jsou označovány jako rozptýlené repetice. Rozptýlené repetice se dále dělí na transpozony a retrotranspozony. Tandemové repetice, lze dále rozdělit dle délky repetice. Nejdelší repetice jsou nazývány satelity. Satelitní DNA se bohatě nachází v oblasti centromer a konstitutivního heterochromatinu. Celková délka satelitu se může pohybovat v rozmezí od 100 kbp do několika Mbp (Bennett 2000). Dalším typem tandemové repetice jsou minisatelity, které jsou kratší než satelity. Délka jednotky jejich opakování je 6 až 100 bp (Ramel 1997; Vergnaud a Denoeud 2000), délka jednoho bloku se pohybuje od 100 bp do 20 kb (Bennett 2000). Vyskytují se hlavně v subtelomerických oblastech chromozomů. Jsou obvykle vysoce polymorfní, co se týče počtu opakování jednotky repetice, v populaci existuje mnoho alel. V genomice, ale i dalších biologických disciplínách mohou být použity jako genetické markery vhodné pro fingerprinting, určování paternity a studium populací (Jeffreys a kol. 1985; Ramel 1997; Dumbovic a kol. 2017). Posledním typem s nejkratší jednotkou repetice je mikrosatelitní DNA, u které se opakuje 1–6 nukleotidů dlouhý motiv (Tóth a kol. 2000; Zane a kol. 2002; Oliveira a kol. 2006). Jiné zdroje uvádí, že se jednotka repetice pohybuje od 1–5 bp (Bennett 2000). Délka jednoho bloku bývá kolem 100 bp (Bennett 2000; Chambers a MacAvoy, 2000). V genomu se mikrosatelity vyskytují velice často a také jsou vysoce polymorfní. Proto je lze opět použít jako genetické markery například pro genetické mapování, pro studie fylogenetických vztahů mezi druhy, anebo

pro studium paternity (Goldstein a Schlötterer 1999). Rozdíly ve velikosti rostlinných genomů jsou dány jak odlišným podílem repetitivní DNA, tak i jinými faktory.

Dalším faktorem, jenž má značný vliv na komplexitu genomu je proces zvaný polyploidizace, který se vyskytuje hlavně v rostlinné říši (Soltis a Soltis 1993). Polyploidizace je příznačná tím, že způsobuje zdvojování sad chromozomů v karyotypu a tím pádem výrazně zvyšuje plasticitu genomu (Liu a Wendel 2003). Kihara a Ono v roce 1926 rozlišili dva základní typy polyploidie, a to autopolyploidii a allopolyploidii. V případě autopolyploidie se bavíme o zmnožení chromozomových sad pouze jednoho druhu v karyotypu. Příčinou autopolyploidizace bývá nejčastěji narušení správné segregace chromozomů, které probíhá při jejich mitotickém dělení do dceřiných jader (Coyne a Orr 2004; Snustad a Simmons 2009). Další možností, jak může vzniknout autopolyploid je splynutí neredukovaných gamet (Briggs a Walters 2001). Jako příklad autopolyploidizace lze uvést autotetraploidní lilek brambor (*Solanum tuberosum*), $2n = 4X = 48$. Dalším typem polyploidizace je allopolyploidie, která se v přirozených podmínkách vyskytuje běžněji než autopolyploidie (Šafářová 2011). Při allopolyploidii dochází k hybridizaci mezi dvěma genomy rozdílných rostlinných druhů s jejich následnou polyploidizací (Stebbins 1950). Výsledkem jsou sady chromozomů, které mají odlišný původ (Soltis a Soltis 2009). Typickým příkladem allopolyploida je hexaploidní pšenice setá (*Triticum aestivum*), $2n = 6x = 42$, AABBDD (viz Obrázek 2). Nejenom ke vzniku pšenice, ale i dalších hospodářsky významných plodin (banánovník, bavlník) přispěla právě mezidruhovú hybridizace spolu s polyploidizací (Renny-Byfield a Wendel 2014).



Obrázek 2: Vznik hexaploidní pšenice seté (*T. aestivum*) z druhů *T. urartu*, *Ae. speltooides* a *Ae. tauschii* (převzato z: Feldman a kol. 1997).

Polyploidní jedinci vznikají jak přirozeně, tak i uměle. Tento způsob polyploidizace bývá prováděn cíleně ve šlechtitelství například použitím kolchicinu. Funguje jako inhibitor dělicího vřeténka a tím pádem brání rozdělení chromozomů během mitózy do dceřiných buněk (Briggs a Walters 2001). Umělá polyploidizace můžeme být vyvolána i tepelným šokem (Ramsey a Schemske 1998).

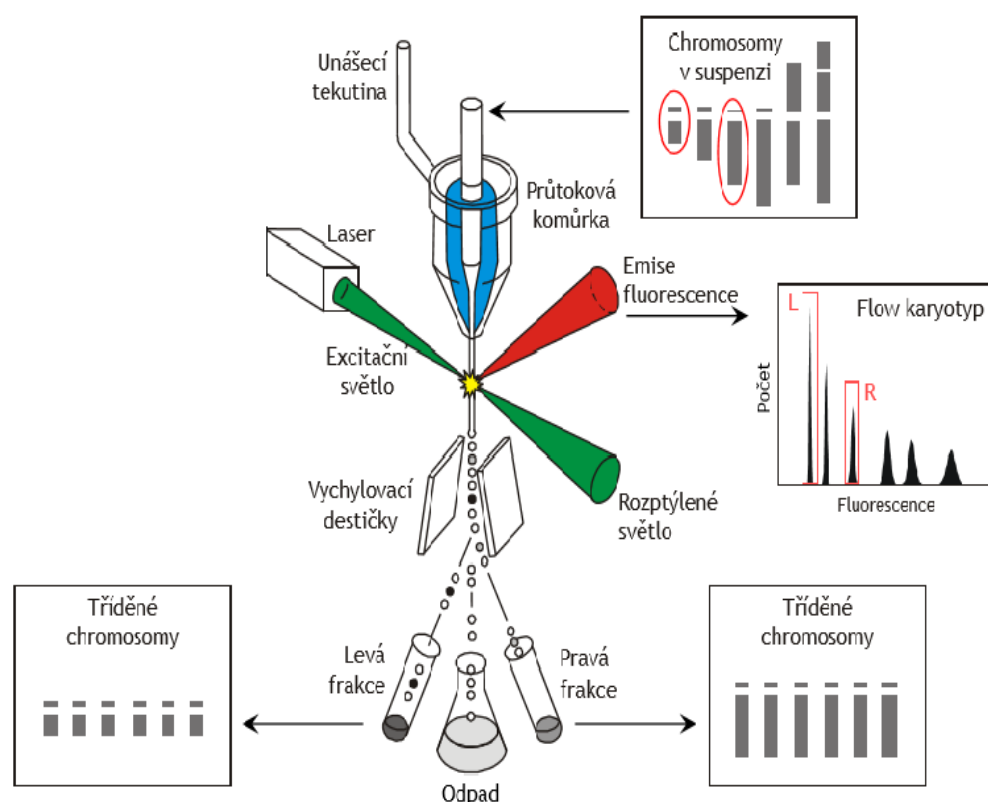
Pro polyploidní rostliny je charakteristické, že mají širší ekologickou toleranci než jejich diploidní předci (Stebbins 1950; Grant 1981), jsou také považovány za rychlejší a efektivnější kolonizátory nových území (Trewick a kol. 2002; Wu a kol. 2010). Polyploidní druhy mohou spíše přežít v nepříznivých podmínkách, ve vyšších nadmořských výškách nebo v chladnějším klimatu (Stebbins 1971). Dále polyploidní jedinci poskytují hospodářsky významné vlastnosti, například jsou bezsemenné či mají celkově větší vzrůst, větší plody a květy (Comai 2005; Grant 1981; Briggs a Walters 2001). Běžně pěstované obilniny, zelenina a ovoce patří mezi polyploidy (pšenice, jahody, brambor, kukuřice). Celkově mají polyploidní rostliny oproti diploidním předkům větší buňky potažmo orgány (Stebbins 1971). Z těchto důvodů má řada hospodářsky významných rostlin komplexní genom, tím pádem je jeho výzkum složitý a finančně nákladný.

3.3 Průtoková cytometrie

K snížení komplexity studovaných genomů se dá využít průtoková cytometrie. Průtoková cytometrie je metoda, jejíž pomocí lze analyzovat optické parametry jednotlivých mikroskopických částic, ať už celých buněk, jader, chromozomů nebo organel v suspenzi, a to při rychlosti více než 20000 částic za sekundu. V detekčním místě kde částice procházejí v úzkém vodním sloupci jedna za druhou, jsou protnuty laserovým paprskem a dochází k rozptylu světla a excitaci fluorochromů. Rozptyl světla rozlišujeme na tzv. přímý (forward scatter, FSC), který určuje relativní velikost buňky a dále boční rozptyl (side scatter, SSC), který ukazuje na vnitřní složitost nebo granularitu buňky. Dále je analyzován jeden nebo více fluorescenčních parametrů. Měřené vzorky v průtokovém cytometru jsou buď autofluorescenční (= po excitaci laserem fluoreskují jejich chlorofylová barviva, komponenty buněčné stěny či produkty metabolismu), nebo musí být fluorescenčně obarveny. Barvení analyzovaných částic lze provést několika způsoby, mezi které patří například použití fluorescenčních barviv (např. DAPI, propidium jodid) nebo barvení fluorescenčně konjugovanými protilátkami (např. CD3-FITC) (McKinnon 2018). Barvení je možno provádět také pomocí transfekce a exprese fluorescenčních proteinů (např. Green Fluorescent Protein-GFP) (Shapiro 2003; McKinnon 2018).

Tradiční průtokové cytometry se skládají ze tří systémů: fluidika, optika a elektronika. Fluidní systém je nezbytný pro separaci analyzovaných částic tak, aby se pohybovaly jedna za druhou v úzkém vodním sloupci. Toho lze docílit pomocí tzv. hydrodynamické fokusace. Suspenze částic je přiváděna tenkou kapilárou do průtokové komůrky (flow cell), kterou proudí nosná kapalina. Ta bývá do průtokové komůrky přiváděna pod větším tlakem než suspenze analyzovaných částic. Pomocí tohoto mechanismu jsou tak částice udržovány jen v úzké centrální části proudu (Suda 2005). Optický systém je tvořen excitační optikou (lasery) a soustavou detektorů, fotonásobičů (PMTs) nebo fotodiod, které zaznamenávají světelné signály. Tyto signály jsou následovně elektronickým systémem převedeny do elektrického signálu a dále digitalizovány pro počítačovou analýzu (Suda 2005). Získaná data lze zobrazit buď to ve formě dot plotu (každá tečka reprezentuje jednu analyzovanou částici), anebo ve formě histogramu pro jednoparametrovou analýzu (Suda 2005).

Průtoková cytometrie zahrnuje široké spektrum aplikací jako je například stanovení obsahu jaderné DNA, stanovení obsahu jednotlivých DNA bází, studium genové exprese a umožňuje také třídění chromozomů a jader, atd. (Suda 2005). V případě chromozomů je možné identifikovat jejich strukturální změny nebo změny v jejich počtu (Doležel a Bartoš 2005). Tím pádem našla velké uplatnění v biomedicině a klinické praxi především při identifikaci a třídění různých typů buněk. Tato metoda má velký přínos i v botanickém výzkumu. Začala být využívána od osmdesátých let minulého století, zejména pro stanovení ploidního stupně analyzovaného materiálu. Dále je používána pro odhad obsahu jaderné DNA, při analýze buněčného cyklu (Loureiro 2006; Suda 2005). Speciálním využitím cytometrie je třídění jader a chromozomů (Doležel, Lucretti a Macas 1997; Doležel a kol. 2007).



Obrázek 3: Schéma průtokového cytometru a třídění chromozomů (převzato z: <http://kfrserver.natur.cuni.cz/lide/opat/biotech/BAGIR%20016%20DOLEZEL.pdf> a upraveno: 9. 2. 2020).

3.3.1 Využití průtokové cytometrie pro snížení komplexity genomu

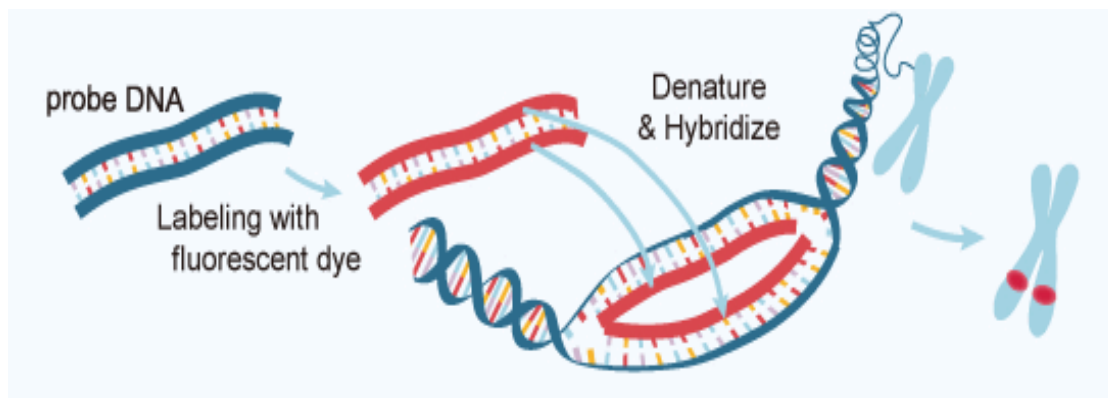
Komplexita rostlinných genomu je usnadněna rozdělením do jejich přirozených podjednotek - chromozomů. Třídění pomocí průtokové cytometrie bylo využito například pro získání vysokomolekulární DNA (HMW), při konstrukci fyzických, genetických a optických map (Šafař a kol. 2016; Vrána a kol. 2016; Doležel a kol. 2012; Šimková

a kol. 2003). Jedním z příkladu využití průtokové cytometrie bylo třídění chromozomových ramen pšenice seté - z nichž byly zkonstruovány tzv. BAC knihovny. Ty byly následně použity pro konstrukci fyzických map (Šafář a kol. 2010) a významně přispěly k projektu čtení genetické informace pšenice (Lukaszewski a kol. 2014; Appels a kol. 2018). Tříděné chromozomy přispěly k sestavení hrubé genomové sekvence ječmene (Mayer a kol. 2011), anebo žita (Martis a kol. 2013). Tříděním tedy byla usnadněna analýza složitých rostlinných genomů. Třídění chromozomů je však u spousty rostlin komplikováno malými rozdíly v jejich velikosti. Proto je snaha vyvinout různé alternativní přístupy značení chromozomů v suspenzi, které by mohli do budoucna vyřešit tento problém. Byla vyzkoušena řada metod, například FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) PRINS (Primed *in situ* labeling), TALENY (efektorová nukleáza typu transkripčního aktivátoru), polyamidy a další, které budou popsány v dalších kapitolách.

3.4 Značení chromozómů v suspenzi

3.4.1 FISH/PRINS

Mezi metody používané pro studium komplexních rostlinných genomů patří i fluorescenční *in situ* hybridizace – FISH (Ohmido a kol. 2010). Jedná se o molekulárně cytogenetickou metodu, která se používá k lokalizaci a identifikaci specifických úseků DNA. Základem této metody je denaturace a hybridizace molekul DNA. Proces hybridizace je v podstatě stejný jako je renaturace DNA. Avšak zásadní rozdíl spočívá v tom, že nedochází k obnově původní struktury DNA, nýbrž ke vzniku hybridního duplexu tvořeného původní neznačenou molekulou a značenou molekulou. Denaturace je prováděna buď chemicky (např. použitím hydroxidu) či vysokou teplotou. Při denaturaci dsDNA dochází k rozrušení vodíkových můstků mezi komplementárními dusíkatými bázemi, které drží řetězce dohromady. Podmínky denaturace dsDNA však mohou mít škodlivé dopady na morfologii buněk, jader a chromozomů (Deng a kol. 2015). Po denaturaci následuje hybridizace fluorescenčně značenou DNA sondou, která musí být komplementární k vybranému jednořetězcovému úseku DNA viz obrázek 4.



Obrázek 4: Schématické znázornění fluorescenční *in situ* hybridizace – FISH (převzato z: Deng a kol. 2015).

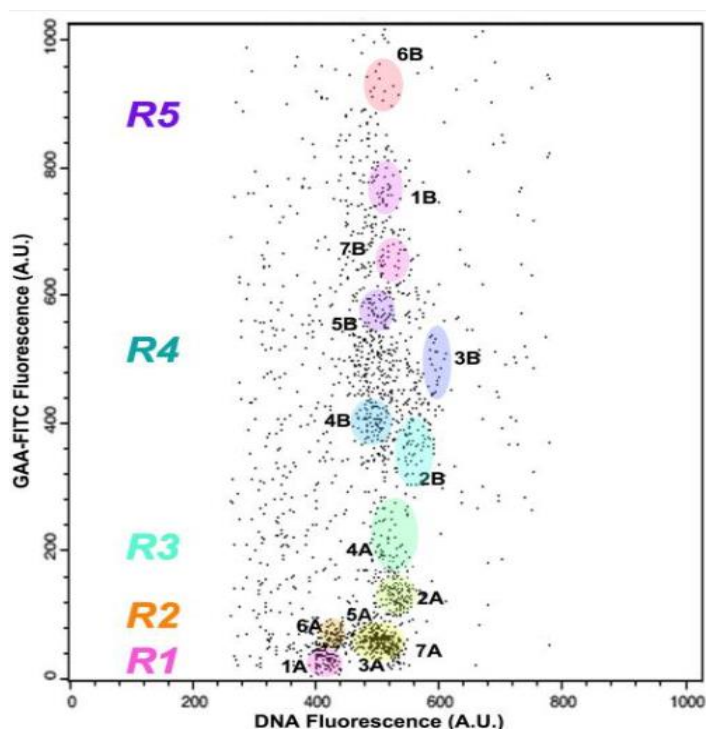
FISH využívá sondy, které jsou značeny buď to přímo anebo nepřímo (Kočárek 2007). Výhodou přímého značení je rychlost detekce a také jednoduchost. Oproti tomu nepřímo značená sonda nese haptenu, na něhož se v následujícím kroku váže fluorochrom ve formě konjugátu s protilátkou. Výhodou nepřímého značení je vyšší citlivost oproti přímému značení, ovšem nevýhodou je vysoké pozadí (Viegas-Pequignot a kol. 1989). Samotné chromozomy jsou pak značeny interkalačními barvivy jako jsou 4',6-diamidin-2-fenylindol (DAPI) nebo propidium jodid (PI). Metoda FISH je standardem cytologických technik a je rutinně prováděna na preparátech na mikroskopických sklíčkách, avšak její provedení v suspenzi zatím nebylo optimalizováno pro celou škálu využitelných sond.

Během dalšího vývoje molekulárně genetických metod byla vyvinuta jako rychlá a citlivá alternativa k tradiční technice FISH metoda PRINS (Primed *in situ* labeling) (Koch a kol. 1989), která kombinuje metodu FISH a PCR (polymerázová řetězová reakce). Rozdíl spočívající v metodě PRINS oproti FISH je v použití neznačené DNA sondy. Ta po denaturaci dsDNA nasedá na cílovou sekvenci na chromozomální ssDNA. Sonda potom funguje jako primer v polymerázové řetězové reakci katalyzované DNA Taq polymerázou (Koch a kol. 1989, Hindkjaer a kol. 2001). Během syntézy řetězce jsou nukleotidy, z nichž je jeden nukleotid značen, inkorporovány do chromozomální DNA, a tak značí místo hybridizace *in situ*. Mezi hlavní výhody metody PRINS oproti klasické FISH je rychlost detekce, citlivost, a vysoká specifita. Prvně byla metoda PRINS využita při objevu chromozómově specifických rozdílů ve stavbě monomeru alfa-satelitu u člověka (Koch a kol. 1989). Mimo jiné se metoda PRINS osvědčila i při studiu telomer a genů pro ribozomální RNA (Ocalewicz a kol. 2008; Wnuk a kol. 2009). V cytogenetice rostlin byla metoda PRINS použita pro mapování tandemových

repetitivních sekvencí pšenice, ječmene a fazole (Macas a kol. 1995; Kubaláková a kol. 1997). Metoda PRINS byla použita i pro značení chromozómů v suspenzi Pichem a kol. 1995, kteří ji využili pro třídění chromozómů fazole polní, jejich rozlišení umožnilo značení FokI repetitivních sekvencí (sekvencí cílených endonukleázou FokI). Tuto metodu se však nepodařilo pro jiné rostlinné druhy reprodukovat.

3.4.2 FISHIS

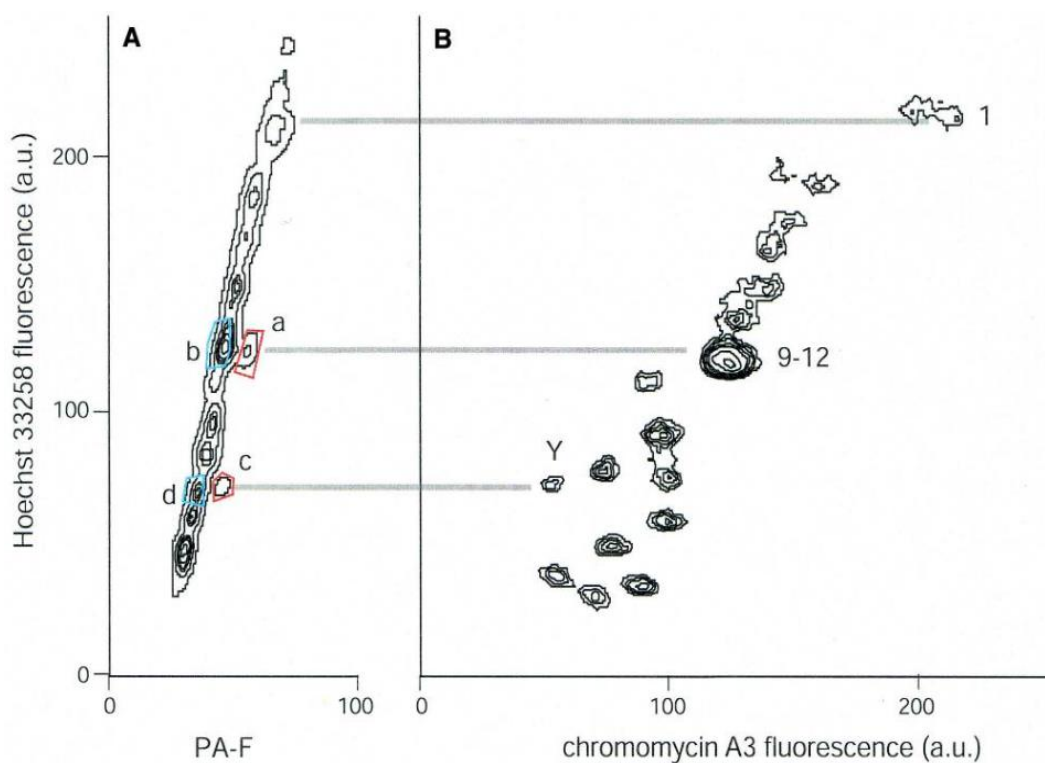
Pro vyřešení problémů se značením chromozómů v suspenzi pomocí klasické FISH byla vyvinuta reprodukovatelná metoda FISHIS (fluorescenční *in situ* hybridizace v suspenzi) (Giorgi a kol. 2013). Zásadní rozdíl oproti metodě FISH spočívá v aplikaci krátkých syntetizovaných sond a dále využívá alkalické denaturace dsDNA a zpětné renaturace snížením pH na neutrální hodnoty. FISHIS však funguje pouze s omezeným počtem mikrosatelitových sond (nepublikováno), což k rozlišení všech chromozómů nestačí. Proto je nutné k FISHIS najít alternativu, vzhledem k nutnosti značení v suspenzi a předejití poškození chromozómů denaturací se jako alternativy nabízí značení syntetickými polyamidovými sondami (Gygi a kol. 2002) nebo proteinovými komplexy cílícími na specifické nukleotidové sekvence.



Obrázek 5: Flow karyotyp *Triticum turgidum*, ssp. *Durum*. Po použití FISHIS je možné rozlišit všech 14 chromozómů (převzato z Giorgi a kol. 2013).

3.4.3 Polyamidy

Polyamidy jsou syntetické sondy, jež jsou schopné se vázat do malého žlábků DNA sekvenčně specifickým způsobem. Gygi a kol. 2002 navrhli tyto syntetické sondy pro zacílení repetitivního motivu TTCCA, který se nachází v oblasti heterochromatinu. Dosáhli tak rozdělení chromozomu 9 od chromozomu 10, 11 a 12 u člověka, které jinak tvoří neodělitelnou populaci (Gygi a kol. 2002). Navíc polyamidy nevyžadují denaturaci chromozómů, jak je tomu u konvenčních DNA sond (Gygi a kol. 2002). Na tuto práci obdobně jako na PRINS v suspenzi též nikdo nenavázal.

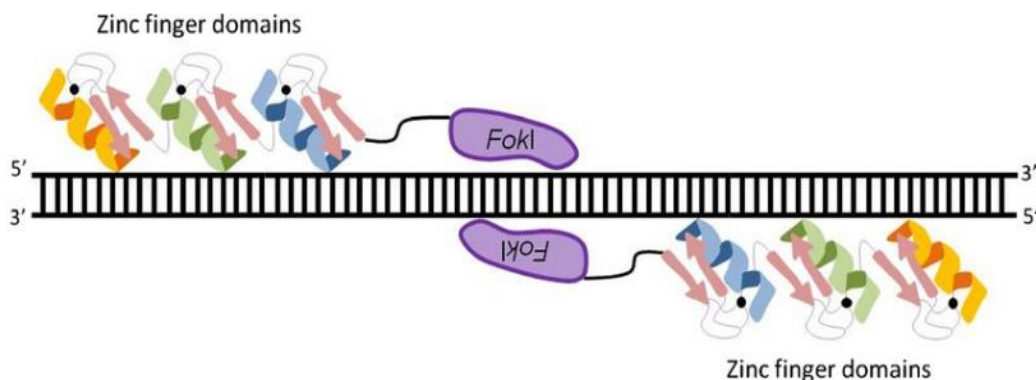


Obrázek 6: Flow karyotyp lidské buněčné linie pro značení TTCCA cílicí polyamidovou sondou. Značení umožnilo rozlišit chromozom 9 od chromozomů 10, 11 a 12, které na standardním bivariátním flow karyotypu tvoří nerozdělitelný shluk (převzato z Gygi a kol. 2002).

3.4.4 Proteinové komplexy - ZINC-FINGER NUKLEÁZY a TALEN

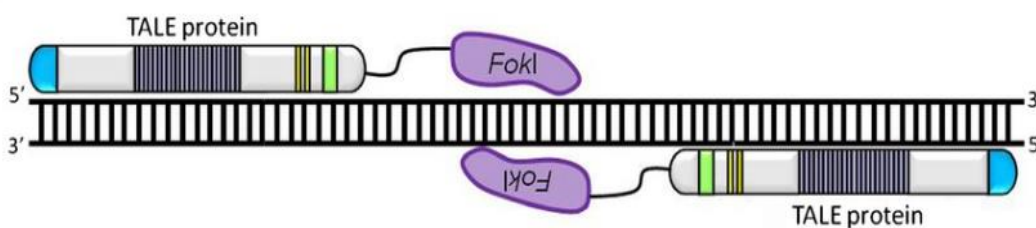
K zacílení na specifické nukleotidové sekvence v rámci komplexních genomů lze využít i proteinových komplexů, mezi které patří například tzv. nukleázy zinkového prstu (zinc finger nucleases, ZFN). Jedná se o místně specifické nukleázy, které jsou uměle vytvořené. Jsou složeny ze dvou oddělených domén, DNA vazebné domény s motivem zinkového prstu (zinc-finger, ZF) a domény FokI s endonukleázovou aktivitou. DNA

vazebnou doménu lze navrhnout právě tak, aby byla schopná zacílit na konkrétní specifickou nukleotidovou sekvenci DNA, kde poté probíhá sestra díky doméně FokI.



Obrázek 7: Na obrázku jsou znázorněny místně specifické nukleázy zinkového prstu, které jsou tvořeny DNA vazebnou a restrikční doménou - endonukleáza FokI. Ke vzniku dvouvláknového zlomu DNA je nutná dimerizace domény FokI. K tomu je zapotřebí dvou molekul ZFN, které jsou opačně orientovány a vážou se v dostatečné blízkosti (Bitinaite a kol. 1998) (převzato z: Mahfouz a kol. 2014 a upraveno 11. 3. 2020).

Dalším velice obdobným systémem je tzv. TALEN (Transcription activator - like effector nukleázy). Stejně jako ZFN i TALEN má restrikční endonukleázovou doménu FokI, která je zodpovědná za sestra DNA (Christian a kol. 2010; Miller a kol. 2011). Na rozdíl od ZFN má však tento systém jinou třídu DNA vazebných domén známou jako tzv. efekторы transkripčního aktivátoru (TALE). Oba systémy byly využity pro cílenou editaci genomů. Systém TALEN byl využit například i pro značení pluripotentních kmenových buněk (Sekine a kol. 2014). Navzdory sekvenční specifitě a možnosti nést fluorescenční značku, ZFN ani TALENy se nedočkaly většího nasazení pro značení DNA lokusů *in vivo* a *in vitro*. V průběhu několika let byl totiž objeven další systém - CRISPR/Cas9, který se stal revoluční novinkou v oblasti genového inženýrství a později i pro značení specifických DNA lokusů.

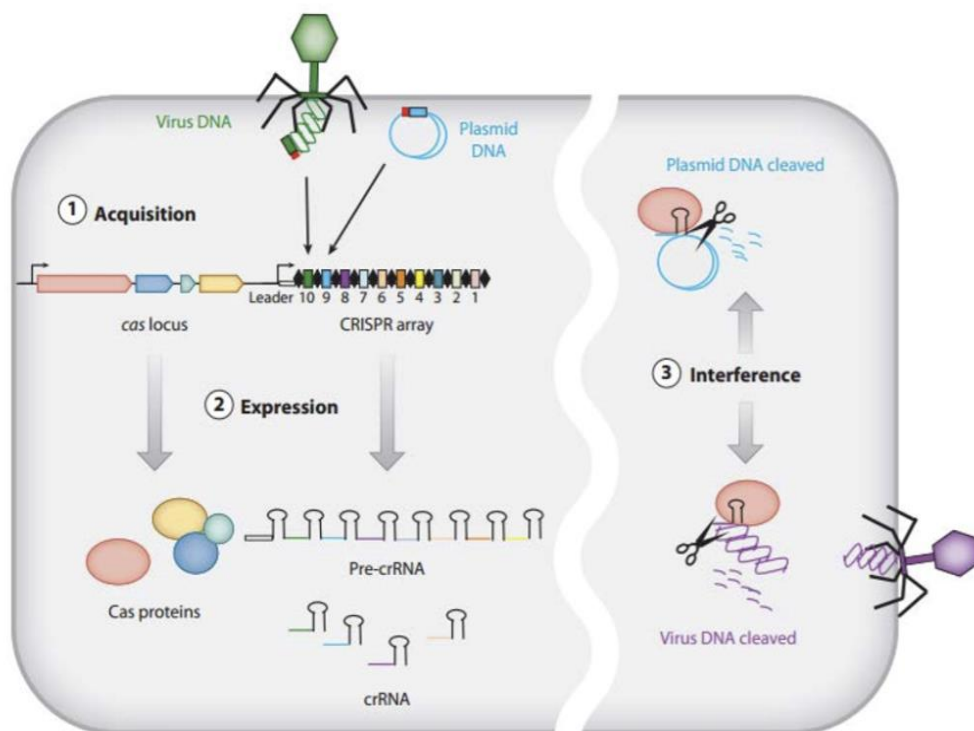


Obrázek 8: Na obrázku je znázorněn mechanismus TALEN systému (převzato z: Mahfouz a kol. 2014).

Zásadní rozdíl spočívá v tom, že nukleázy zinkového prstu i TALEN vyžadují navržení a syntézu proteinů, které dovedou rozeznat cílovou sekvenci na bázi interakce protein-DNA. To je však mnohem složitější a finančně náročnější, než je tomu při využití komplementárního párování RNA-DNA, které využívá systém CRISPR/Cas9, jenž vyžaduje pouze syntézu krátkých sekvencí RNA (Young 2014). Mimo jiné ZFN i TALEN jsou člověkem uměle vytvořené nukleázy, zatímco CRISPR/Cas9 není (La Fontaine a kol. 2015).

3.5 CRISPR/Cas9

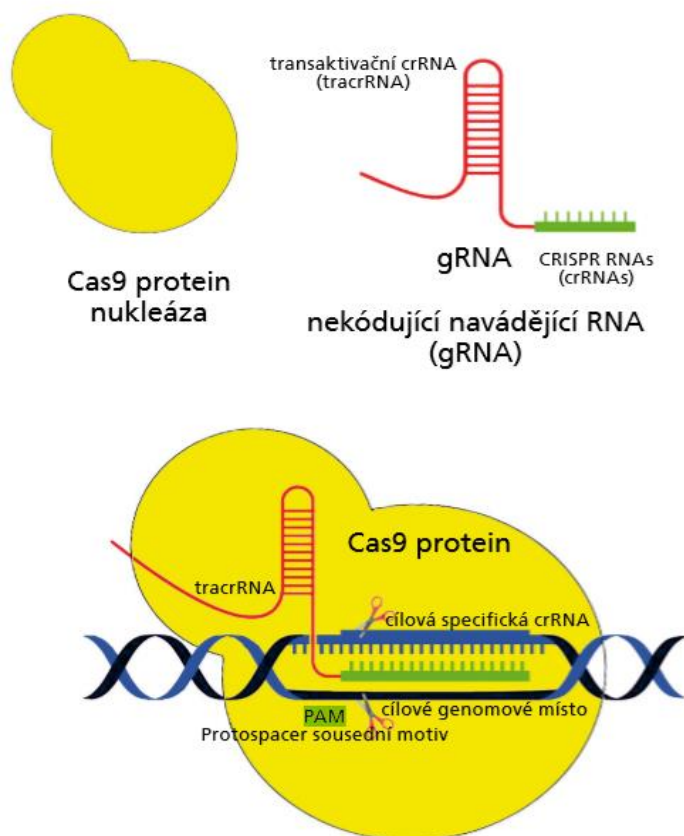
Systém CRISPR/Cas9 se stal klíčovým nástrojem pro cílené úpravy genomu (Jinek a kol. 2012; Arora a Ranula 2017; Lino a kol. 2018). Jedná se o adaptivní imunitní systém mikroorganismů, který zajišťuje jejich ochranu proti bakteriofágům či plazmidům. CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) jsou úseky nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetic, které jsou proloženy variabilními sekvencemi cizorodé DNA tzv. spacers (Cong a kol. 2013; Ran a kol. 2013). V roce 2002 Jansen objevil, že se v blízkosti CRISPR repetic vyskytují geny asociované s CRISPR tzv. Cas geny (CRISPR-associated genes, Cas) kódující nukleázy (Jansen a kol. 2002). CRISPR/Cas systém se vyznačuje třemi hlavními fázemi: adaptací, expresí a interferencí. Během adaptace dochází k získání spaceru díky inkorporaci cizorodé DNA do bakteriálního genomu, konkrétně do lokusů CRISPR. V další fázi probíhá transkripce a translace Cas genů, ale také transkripce spaceru. Jejich přepisem vzniká tzv. prekurzorová CRISPR RNA (pre-crRNA). V poslední fázi probíhá interference, během které je degradována cizorodá DNA na základě její identity se spacerem (Deltcheva a kol. 2011).



Obrázek 9: Obecný mechanismus systému CRISPR/Cas, který se skládá ze tří fází: adaptace, exprese a interference (převzato z: https://is.muni.cz/el/1431/jaro2017/Bi8090/Editace_genomu_2017.pdf).

Dosud bylo objeveno pět typů CRISPR/Cas systémů, ale nejlépe popsáným je CRISPR/Cas systém typu II pocházející z bakterie *Streptococcus pyogenes* (Jinek a kol. 2012; Doudna a Charpentier 2014). Důležitou roli v tomto systému hraje zejména enzym Cas9 o velikosti 159 kDa. Jedná se o endonukleázu, která tvoří dvouřetězcové zlomy na molekule DNA (Jinek a kol. 2012). CRISPR/Cas9 je dále tvořen dvěmi molekulárními složkami - cílově specifickou CRISPR RNA (crRNA) a pomocnou transkripční crRNA (tracrRNA), které jsou spojeny do krátké nekódující guideRNA (sgRNA). Úkolem sgRNA je navést nukleázu Cas9 do cílového místa v genomu (Makarova a kol. 2002, Ishino a kol. 2018). Mimo jiné Cas9 vyžaduje k nasednutí na dsDNA ještě sekvenci PAM (protospacer adjacent motif), která sousedí s crRNA, viz Obrázek 10 (Makarova a kol. 2002). Tato sekvence je tvořena trojicí nukleotidů - 5'→NGG→3', ve které „N“ představuje libovolnou bázi (Makarova a kol. 2002). Bylo objeveno, že endonukleáza Cas9 nasedá na stovky PAM sekvencí napříč celým genomem, avšak k sestřihu dochází pouze v případě, že je sgRNA komplementární k cílové sekvenci (Wiedenheft a kol. 2011; Jinek a kol. 2012). Po štěpení následuje oprava DNA buď, nehomologním koncovým spojením (NHEJ) anebo homologem řízenou rekombinací (HDR), což vede ke vzniku modifikované sekvence (Bannikov

a Lavrov 2017). Systém CRISPR/Cas9 má velmi široké spektrum aplikací. Kromě zmíněných dvouřetězcových zlomů DNA také indukuje vznik jednořetězcových zlomů a umlčení či aktivaci genů. Pro tuto práci je však zásadní jeho využití pro značení živých i fixovaných buněk.



Obrázek 10: Systém CRISPR/Cas (https://dspace5.zcu.cz/bitstream/11025/33911/1/Arnika_2018_3-Pavelka-web.pdf).

3.5.1 Využití CRISPR/Cas9 pro fluorescenční značení

Relativně nedávno byla vyvinuta metoda *in vitro* fluorescenčního značení využívajícího systém CRISPR/Cas9 typu II pocházejícího z bakterie *Streptococcus pyogenes*, (Deng a kol. 2015). Jedná se o tzv. metodu CASFISH (Cas9-zprostředkovaná fluorescence *in situ* hybridizace). Princip metody CASFISH spočívá v aplikaci tzv. deaktivované endonukleázy dCas9 (dead-Cas9). Jedná se o mutantní formu enzymu Cas9, která je zmutovaná v místech H840a domény HNH a D10a domény RuvC. Důsledkem mutací je deaktivace nukleázové aktivity těchto domén a zároveň jsou zachovány DNA vazebné vlastnosti enzymu. Díky tomu lze navázat endonukleázu dCas9 do jakéhokoliv místa v genomu, aniž by štěpila DNA. Pro značení cílového lokusu

na chromozómu je endonukleáza dCas9 navíc sfúzovaná s fluorescenčním proteinem. CASFISH metoda využívá různě barevné komplexy dCas9/sgRNA, což umožňuje vizualizaci několika cílových lokusů zároveň. Tato metoda je používána pro rychlé a robustní značení repetitivních elementů DNA jako je: pericentroméra, centroméra a G-bohaté teloméry (Deng a kol. 2015). CASFISH umožňuje rychlejší detekci než klasická FISH a mimo jiné není tolik destruktivní, jelikož nevyžaduje denaturace dsDNA. Tím pádem zůstává zachována morfologie chromozomů (Deng a kol. 2015). Navíc je komplex dCas9 / sgRNA velmi stabilní a váže se s cílovou DNA sekvencí s vysokou afinitou (Sternberg a kol. 2014).

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

2,2',2'',2''-(ethan-1,2-diyldinitrilo) tetraoctová kyselina (EDTA) (Sigma-Aldrich, USA); 2-(4-amidinofenyl)-1H-indol-6-c(DAPI) (Sigma-Aldrich, USA); [2-amino-2-(hydroxymethyl)propan -1, 3-diol] (Tris) (Sigma-Aldrich, USA); aceton (VWR International, Polsko); amiprofosmethyl (APM) (Duchefa, Nizozemsko); bovinní sérový albumin (BSA) frakce V (Roche, Německo); dihydrát molybdenanu sodného ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Lach:ner, Česká Republika); dusičnan amonný (NH_4NO_3) (Lach:ner, Česká Republika); dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4) (Lach:ner, Česká Republika); dusičnan draselný (KNO_3) (Lach:ner, Česká Republika); ethanol (Sigma-Aldrich, USA); 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonová kyselina (Hepes) (Sigma-Aldrich, USA); formaldehyd (FA) (Sigma-Aldrich, USA); heptahydrát síranu hořečnatého ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Lach:ner, Česká Republika); heptahydrát síranu zinečnatého ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Lach:ner, Česká Republika); hexahydrát chloridu kobaltnatého ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Lach:ner, Česká Republika); hydroxymočovina (HU) (Sigma-Aldrich, USA); chlorid draselný (KCl) (Lach:ner Česká Republika); chlorid sodný (NaCl) (Lach:ner, Česká Republika); imerzní olej Immersol 518F (Carl Zeiss, Německo); kyselina boritá (H_3BO_3) (Lach:ner, Česká Republika); merkptoethanol (Sigma-Aldrich, USA); pentahydrát síranu mědnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (Lach:ner, Česká republika); (polyethylen glycol *p*-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-fenyl ether (TRITON X – 100) (Sigma-Aldrich, USA); sacharóza (Lach:ner, Česká Republika); spermin (Sigma-Aldrich, USA); tetrahydrát dusičnanu vápenatého ($[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (Lach:ner, Česká Republika); tetrahydrát chloridu manganatého ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (Lach:ner, Česká Republika); Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA); Vectashield s DAPI (Vector Laboratories, USA)

4.2 Biologický materiál

Semínka ječmene (cv. *Morex*), semínka pšenice (cv. *Chinese spring*)

4.3 Použité přístrojové vybavení

Analytická váha CP 64 (Sartorius, Německo); digestoř (Merci, Česká Republika); fluorescenční mikroskop Axio Imager.Z2 (Carl Zeiss, Německo) s CCD kamerou;

inkubátor INCU-LINE 150R (VWR International, Polsko); homogenzátor PT 1300D (Polytron kinematica, Švýcarsko); magnetická míchačka bez topného tělesa Variomag Power direct (P-lab a.s, Česká Republika); magnetická míchačka s topným tělesem AREX VELP Scientifica (P-lab a.s, Česká republika); průtokový cytometr BD FACSAria SORP (Becton Dickinson, USA); PCR thermocycler C 1000 Touch (Bio-Rad, USA); rotátor Hula Mixer Sample mixer Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, USA); stolní centrifuga MiniStar silverline (VWR International, Polsko); třepačka REAX Top (Heidolph, Německo); zdroj Power Suply (Eplax GmbH, Německo); UV lampa X-Cite exacte (Excelitas)

4.4 Použité nástroje a spotřební materiál

Automatické pipety (Nichipet); filtrační papíry; mikrozkuhavky; odměrné válce; kádinky; PCR-mikrozkuhavky; Petriho misky; pinzeta, skalpel; vata; mikroskopická sklíčka; krycí sklíčka

4.5 Použité roztoky

Roztoky použité pro synchronizaci buněčného cyklu

- Amiprofosmethyl (AMP): 20 mM amiprofosmethyl
- Hoaglandovo medium: 2 mM KNO_3 ; 2 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,5 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,25 mM KH_2PO_4 ; 0,5 mM $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$; 25 μM H_3BO_3 ; 0,5 μM $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 2 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2 μM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,075 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 50 μM KCl ; 0,15 μM $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 40 μM Fe-EDTA
- Chelatační činidlo: 0,5 M Fe EDTA
- Hydroxymočovina: 2 mM hydroxymočovina

Fixace, izolace a purifikace chromozómů

- FA – Tris pufr (fixáž): 10 mM TRIS; 10 mM Na_2EDTA /Chelaton/; 100 mM NaCl ; 0,1 % TRITON X – 100; 15 mM merkptoethanol; 2 % FA (pH 7,5)
- Tris pufr: 10 mM TRIS; 10 mM Na_2EDTA /Chelaton/; 100 mM NaCl (pH 7,5)
- Izolační pufr (LB01): 15 mM TRIS; 2 mM Na_2EDTA ; 0,5 mM spermin, 80 mM KCl ; 20 mM NaCl ; 0,1 % TRITON X – 100; 15 mM merkptoethanol (pH 9,4)

Třídění chromozómů

- PRINS pufr: 5% sacharóza (pH 7,5)
- Fluorescenční barvivo: 1 mg/ml DAPI

CASFISH

- Duplexní pufr (IDT duplex buffer): 100 mM CH₃COOK; 30 mM Hepes (pH 7,5)
- 10x dCas9 pufr: 200mM Hepes (pH 7,5); 1M KCl; 50 mM MgCl₂; 10% BSA; 1% Tween; 50% glycerol
- Vymývací roztok PBS: 1x PBS
- Fixáž chromozómů s navázanou sondou (FA v PBS): 4% FA; 1x PBS
- Vymývací roztoky s ethanolem: 70% ethanol
90% ethanol
96% ethanol
- Uzavírací médium: Vectashield s DAPI

Použité sondy

značený protein dCas9/eGFP - 500 ng/μl dCas9–NLS–EGFP; 10x Cas9 pufr; 400 ng/μl sonda s příslušnou sekvencí - AGG, *afa*, teloméra (Genaxxon, Německo)

značená sgRNA/ATTO 550 - 100 μM crRNA; 100 μM tracrRNA/ATTO 550; 6,25 μM dCas9 protein V3; 10x Cas9 pufr; 2 μM sonda s příslušnou sekvencí - AGG, *afa*, teloméra (IDT, USA)

Použité sekvence:

Teloméra GGTTTAGGGTTTAGGGTTTAGGG

Afa CAGCCTGCTAACTAGCTATGTGG

AGG AGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG

Pozn: Tučné zvýrazněný motiv znázorňuje **sekvenci PAM** (protospacer adjacent motif)

4.6 Metody

4.6.1 Nasazení semínek pšenice a synchronizace buněčného cyklu

Bylo namočeno přibližně 25 - 30 semínek pšenice v destilované vodě, která byla ponechána ve vodě zhruba po dobu 20 - 30 min, aby semínka byla dostatečně nasáklá vodou. Poté byla semínka vyseta na Petriho misku se zvlhčenou vatou na filtrační papír. Kultivace vysetých semínek byla provedena v termostatu při 25°C po dobu 3 dnů. Poté byla provedena synchronizace buněčného cyklu v kořenových meristémech. V prvním kroku byla naklíčená semena přenesena na Hoaglandův roztok s 2 mM hydroxymočoviny (inhibitor syntézy DNA), na kterém probíhala inkubace po dobu 18 hodin. Následující den byla semena opláchnuta v destilované vodě při teplotě 25°C a přenesena na Hoaglandův roztok (živné medium). Inkubace v Hoaglandově roztoku trvala po dobu 5,5 hod. V dalším kroku synchronizace byla semínka přenesena do Hoaglandova roztoku s 2,5 μ M amiprofos methylem (APM), kde byla ponechána po dobu 2 hodin. Po skončení inkubace byla naklíčená semínka přenesena na led. Následující den byla provedena fixáž, izolace a purifikace synchronizovaných kořenových špiček.

4.6.2 Fixáž, izolace a purifikace chromozómů pšenice

Následující den byly od semínek odtrženy přibližně 1 cm dlouhé kořeny, které byly ponořeny do vychlazené destilované vody. Dále byly natrhané kořeny přeneseny do Tris pufru obsahující 2% formaldehyd. V tomto kroku probíhala fixáž synchronizovaných kořenů. Fixáž se prováděla ve vytemperované vodní lázni, která byla vychlazená na 5°C, po dobu 20 minut. Během experimentu byla vyzkoušena i doba fixáže 10 minut a 5 minut. Po ukončení fixáže byly kořeny přeneseny do vychlazeného Tris pufru kvůli promytí, které probíhalo po dobu 5 minut. Tento krok byl proveden celkem 3x. Kořinky ponořené v Tris pufru byly přeneseny na led. Takto připravené kořeny byly ihned izolovány. Pomocí skalpelu byly odříznuty špičky kořenů (meristémy) pod binokulární lupou. Odřezané špičky byly přeneseny do 1ml LBO1 pufru. Následovně byla provedena homogenizace špiček homogenizátorem při 20.000 ot. / 13s. Vzniklá suspenze byla přefiltrována přes 50 μ m sítko. Přefiltrovaná suspenze byla poté přenesena na led.

4.6.3 Nasazení semínek ječmene a synchronizace buněčného cyklu

Bylo namočeno 25 - 30 semínek pšenice v destilované vodě, která byla ponechána ve vodě zhruba po dobu 20 - 30 min, aby semínka byla dostatečně nasáklá vodou. Poté byla semínka vyseta na Petriho misku obsahující zvlhčenou vatu a filtrační papír. Kultivace vysetých semínek byla provedena v termostatu při 25°C po dobu 3 dnů. V následujících dnech byla provedena synchronizace buněčného cyklu. V prvním kroku byla naklíčená semena přenesena na hydroxymočovinu, na které probíhala inkubace po dobu 18 hodin (přes noc). Následující den byla semena opláchnuta v destilované vodě při teplotě 25°C a přenesena na Hoaglandovo medium (živné medium). Inkubace v Hoaglandově mediu trvala po dobu 6,5 hodin. V dalším kroku synchronizace byla semínka přenesena na roztok s APM, kde byla ponechána po dobu 2 hodin. Po ukončení inkubace byla naklíčená semínka přenesena na led. Další den byla provedena fixáž, izolace a purifikace synchronizovaných kořenových špiček.

4.6.4 Fixáž, izolace a purifikace chromozómů ječmene

Fixáž, izolace a purifikace synchronizovaných chromozómů byla provedena stejně, jak již bylo zmíněno v pracovním postupu u pšenice. Podmínky homogenizace měly rozdílné parametry – 15. 000 ot. / 13s.

4.6.5 CASFISH

Byly provedeny dvě varianty CASFISH, se značenou dCas9-eGFP a se značenou sgRNA/ATTO 550.

4.6.5.1 CASFISH se značenou sgRNA

Bylo využito systému se značenou tracrRNA, která nese fluorochrom ATTO 550. Enzym i obě RNA (crRNA a tracrRNA) byly dodány firmou IDT. Byla připravena single guide RNA (sgRNA). Pro tvorbu naváděcí sgRNA byla lyofilizovaná cílově-specifická crRNA a tracrRNA-ATTO 550 připravena v duplexním pufru. Do PCR mikrokumavky byl pipetován 1 µl crRNA, 1 µl tracrRNA a 8 µl duplexního pufru. Smíchané reagentie byly důkladně propipetovány, zvortexovány a na závěr stočeny na ultracentrifuze. Připravená směs byla vložena do thermocycleru, ve kterém byla inkubována při 95°C po dobu 5 min. Poté byla PCR mikrokumavka v thermocycleru ještě ponechána dalších cca 10-20 min. V této fázi teplota thermocycleru postupně klesala dolů. Mezitím byly

připraveny další jednotlivé PCR zkumavky, do kterých bylo pipetováno po 10 μ l Cas9 pufru, 1 μ l enzymu dCas9, 1 μ l příslušné sondy - se sekvencí teloméry (ječmen a pšenice), se sekvencí AGG (ječmen) a sekvencí *afa* (pšenice). K jednotlivým směsím byl v každém experimentu připipetován individuální objem ribonukleové částice – sgRNA podle tabulky 1. Na závěr byly všechny směsi doplněny vodou na objem 100 μ l. Připravené směsi v jednotlivých PCR zkumavkách byly přemístěny do thermocycleru, ve kterém probíhala inkubace při teplotě 26°C po dobu 10 minut. Byla vytvořena ribonukleoproteinová částice (RNP).

Tabulka 1: Individuální použité objemy ribonukleové částice sgRNA v jednotlivých experimentech

Ribonukleoproteinová částice sgRNA	Objem [μ l]
	1 μ l
	2 μ l
	5 μ l
	9 μ l

CASFISH byla provedena na natříděných chromozómech a v suspenzi. V prvním případě byli natříděné chromozómy na mikroskopickém sklíčku promyty v roztoku PBS po dobu 5 minut. Po promytí byla provedena ekvibrace chromozomů pomocí pufru Cas9 (1x). Následovně bylo nanášeno na každé mikroskopické sklíčko po 25 μ l komplementární sondy k cílové sekvenci DNA chromozómu. Jednalo se o následující sekvence: teloméra – ječmen a pšenice, sekvence AGG – ječmen, sekvence *afa* – pšenice. Všechna mikroskopická sklíčka byla přikryta parafilmem. V tabulce 2 jsou shrnuty jednotlivé podmínky inkubace DNA sond.

Tabulka 2: Jednotlivé podmínky inkubace DNA sond

Jednotlivé DNA sondy		Podmínky inkubace	
Sekvence AGG – ječmen	26°C, 1 hod	26°C, 3 hod	4°C, přes noc
Sekvence teloméry - ječmen	26°C, 1 hod	26°C, 3 hod	4°C, přes noc
Sekvence <i>afa</i> – pšenice	26°C, 1 hod	26°C, 3 hod	4°C, přes noc
Sekvence teloméry - pšenice	26°C, 1 hod	26°C, 3 hod	4°C, přes noc

Po inkubaci byly chromozómy opět promyty v roztoku PBS po dobu 3 minut. Následovně byla provedena fixace chromozomů s navázanými DNA sondami

v ledovém roztoku PBS obsahujícím 4% formaldehyd po dobu 5 minut. Následovalo opět promytí v PBS po dobu 5 minut. Na závěr bylo provedeno promytí v 70%, 90% a 96% ethanolu, každý krok byl proveden po dobu 1-2 minut. Následovalo rychlé usušení mikroskopické sklička, které bylo dále zakryto krycím sklíčkem s 5-6 μ l Vectashieldu s obsahem DAPI.

V druhém případě bylo provedeno značení v suspenzi. Byly připraveny jednotlivé zkumavky Eppendorf, do kterých bylo pipetováno 400 μ l Cas9 pufru (1x), dále 50 μ l suspenze a 50 μ l RNP. Podle tabulky 3 byly provedeny následující podmínky inkubace. Pro mikroskopické zhodnocení bylo po inkubaci nakapáno 5 μ l suspenze na mikroskopické sklíčko. Po zaschnutí byla zaschlá suspenze přikryta krycím sklíčkem s 5-6 μ l Vectashieldu. Zbytek suspenze byl analyzován v průtokovém cytometru.

Tabulka 3: Shrnutí jednotlivých podmínek inkubace v suspenzi

Podmínky inkubace
v ledničce při 4°C přes noc
v thermoblocku při 37°C 1 hod
na rotátoru při 37°C 1 hod
na rotátoru při pokojové teplotě přes noc

4.6.5.2 CASFISH se značenou dCas9 endonukleázou

V tomto případě je endonukleáza dCas9 je přímo značena fluorescenčním proteinem EGFP (green fluorescent protein – zelený fluorescenční protein) a naváděcí RNA je neznačená, nasyntetizována je přímo ve formě sgRNA (single guide RNA) a není tedy nutné vytvořit duplex RNA jako v předchozím případě. Značená dCas a všechny sgRNA byly dodány firmou Genaxxon. Do jednotlivých mikrozkušavek bylo pipetováno po 1 μ l enzymu dCas9-NLS-EGFP, 1 μ l příslušné sondy (se sekvencí teloméry u ječmene a pšenice, se sekvencí AGG u ječmene a sekvencí *afa* u pšenice). Dále bylo připipetováno 10 μ l Cas9 pufru a 90 μ l deionizované vody. CASFISH byla provedena v suspenzi. Byly připraveny jednotlivé zkumavky Eppendorf, do kterých bylo pipetováno 400 μ l Cas9 pufru (1x), dále 50 μ l značené RNP a 50 μ l suspenze. V tabulce 4 jsou shrnuty jednotlivé podmínky inkubace DNA sond. Pro mikroskopické zhodnocení bylo po inkubaci nakapáno 5 μ l suspenze na mikroskopické sklíčko. Po zaschnutí byla zaschlá suspenze přikryta krycím sklíčkem s 5-6 μ l Vectashieldu s obsahem DAPI. Zbytek suspenze byl analyzován v průtokovém cytometru.

Tabulka 4: Jednotlivé podmínky inkubace DNA sond

Jednotlivé DNA sondy	Podmínky inkubace		
Sekvence AGG – ječmen	26°C, 1 hod	26°C, 3 hod	4°C, přes noc
Sekvence teloméry – ječmen	26°C, 1 hod	26°C, 3 hod	4°C, přes noc
Sekvence <i>afa</i>- pšenice	26°C, 1 hod	26°C, 3 hod	4°C, přes noc
Sekvence teloméry – pšenice	26°C, 1 hod	26°C, 3 hod	4°C, přes noc

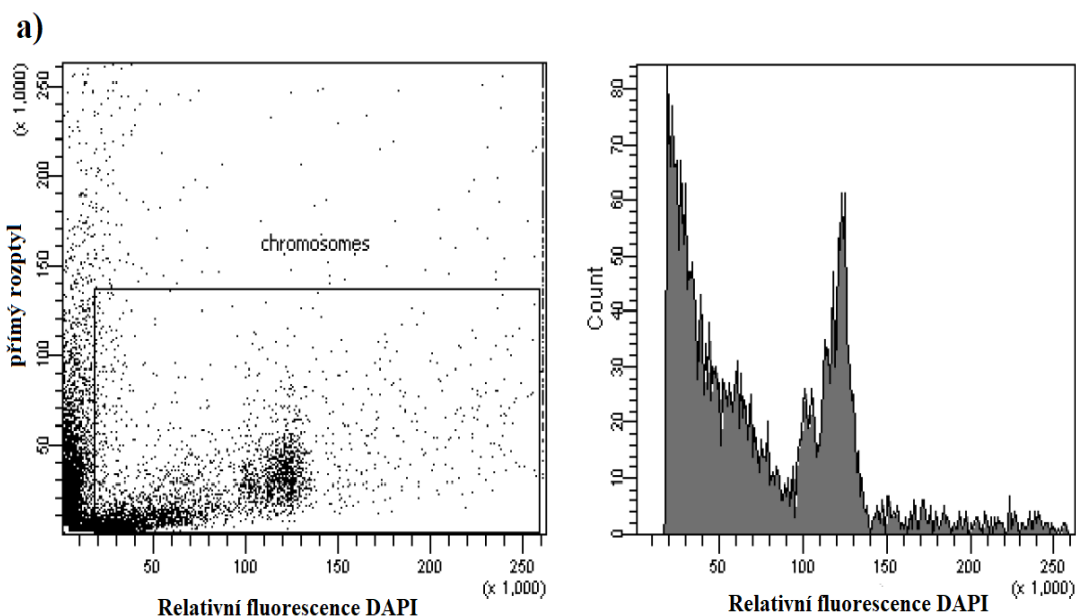
4.6.6 Analýza vzorků na průtokovém cytometru

Suspenze chromozomů byla přefiltrovaná přes 20 μm sítko. Připravené vzorky byly analyzovány na průtokovém cytometru BD FACSAria SORP (Becton Dickinson, San Jose, USA) vybaveném třemi lasery – ultrafialovým 355nm pro excitaci DAPI, modrým 488nm pro excitaci EGFP a pro měření přímého rozptylu světla a žlutozeleným 561nm pro excitaci ATTO550. Pro každý vzorek bylo analyzováno 20000 částic, chromozomy byly tříděny buď na základě relativní fluorescence DAPI a přímého rozptylu světla v případě neznačených vzorků, nebo na základě relativní fluorescence DAPI a relativní fluorescence jednoho z použitých fluorochromů (EGFP a ATTO550) u značených suspenzí.

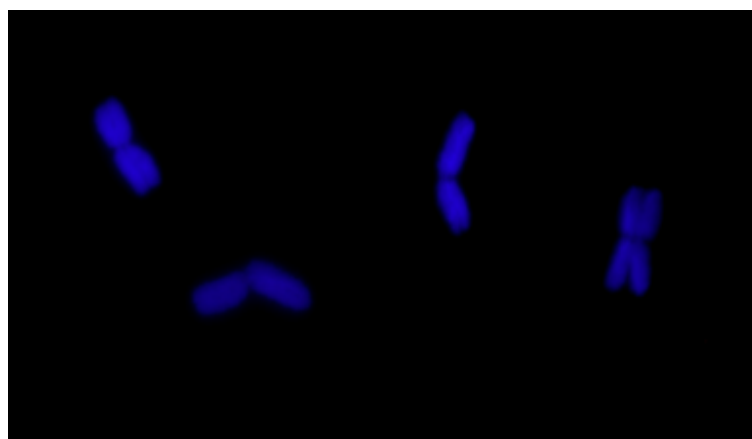
5 VÝSLEDKY A HODNOCENÍ

5.1 Optimalizace fixáže chromozómů ječmene

Během experimentální části byla optimalizována doba fixáže pro ječmen cv. *Morex*, která je zásadní při značení chromozómů, protože výrazně ovlivňuje jejich morfologii a přístupnost chromatinu. Při standardní 20 minutové fixáži lze na flowkaryotypu pozorovat úzké píky chromozómů, které na bivariátním scatterplotu tvoří jasně ohraničenou populaci. Na základě toho lze usoudit, že byla zachována morfologie chromozómů viz obrázek 11. Fixáž sice umožňuje udržet tvar chromozomu viz obrázek 12, nicméně může být důvodem nepřístupnosti pro značenou sondu.

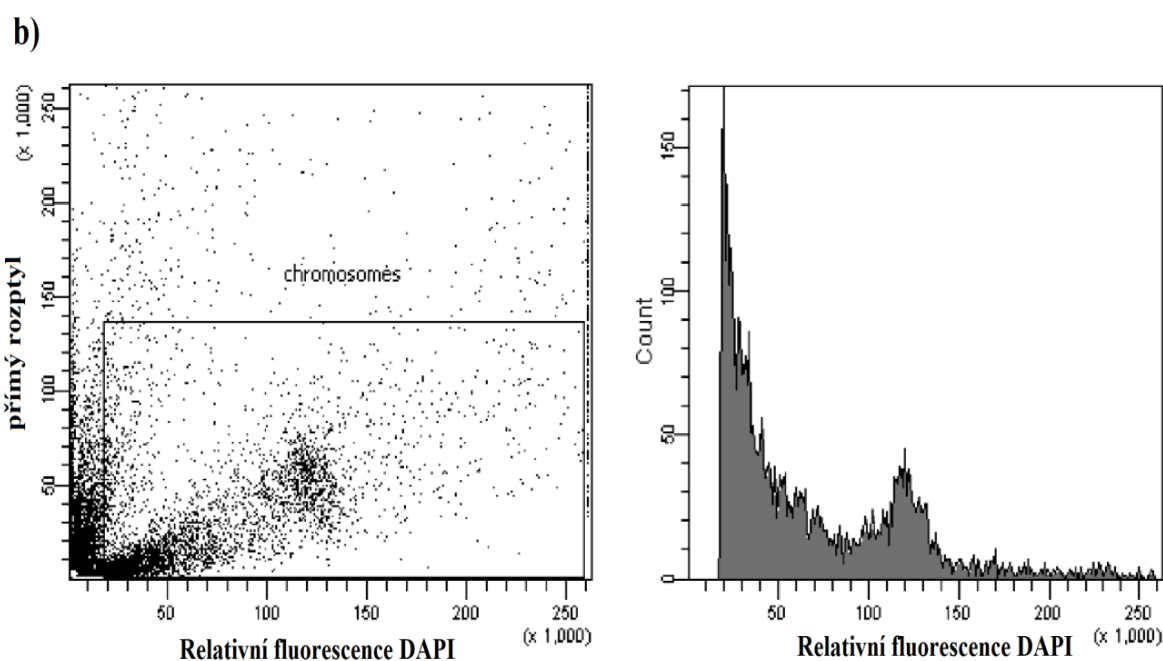


Obrázek 11: Flow karyotyp chromozómů ječmene cv. *Morex* při 20 minutové fixáži.

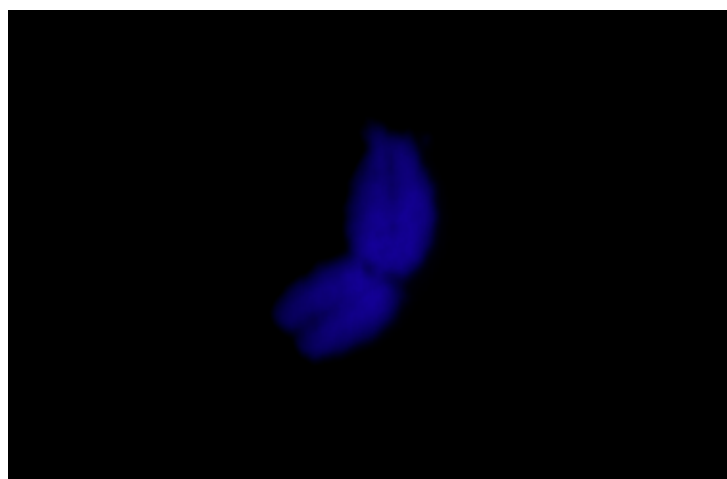


Obrázek 12: Chromozómy ječmene cv. *Morex* při 20 minutové fixáži. Zvětšení 400x.

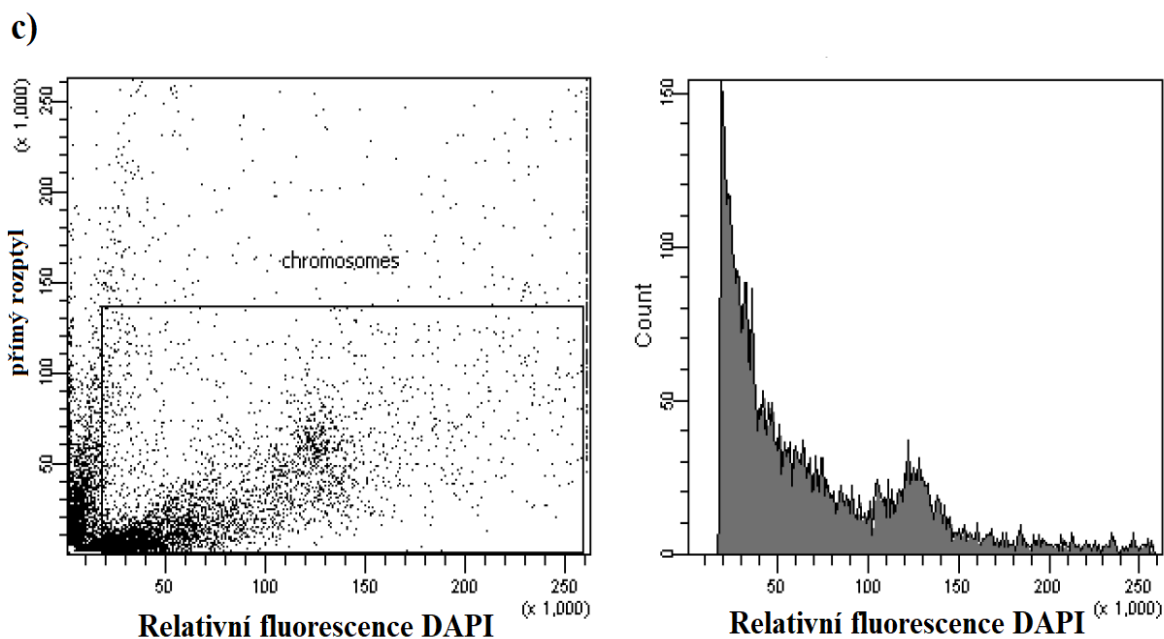
Následovně byla použita 10 minutová fixáž. Vlivem snížení fixáže se zhoršila morfologie chromozómů viz obrázek 14. To je patrné i z flowkaryotypu, píky chromozómů jsou širší a chromozómy tvoří méně ohraničenou populaci viz obrázek 13. Chromozómy mají méně kompaktní strukturu (viz obrázek 14 v důsledku čehož mohou být přístupnější pro nasednutí sondy. Jako poslední byla vyzkoušena 5 minutová fixáž, jejíž vlivem došlo k výraznému poškození struktury chromozómů viz obrázek 16. Z flowkaryotypu lze pozorovat, že chromozómy v tomto případě netvoří jasně ohraničenou populaci viz obrázek 15. Takové chromozómy jsou pro značení nepoužitelné.



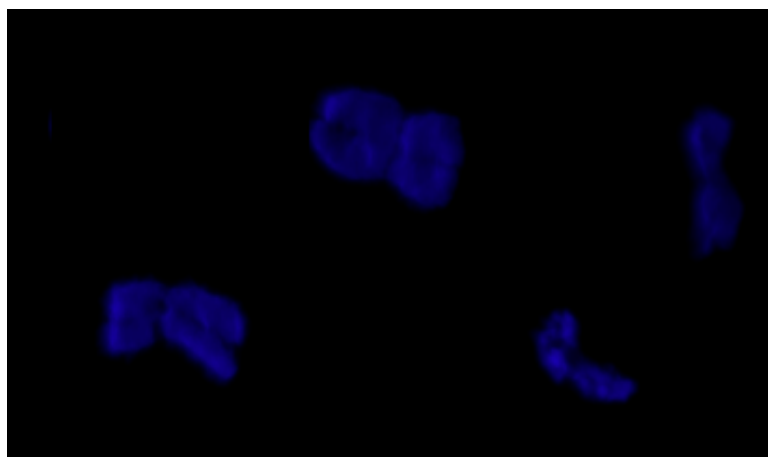
Obrázek 13: Flow karyotyp chromozómů ječmene cv. *Morex* při 10 minutové fixáži.



Obrázek 14: Chromozómy ječmene cv. *Morex* při 10 minutové fixáži. Zvětšení 600x.



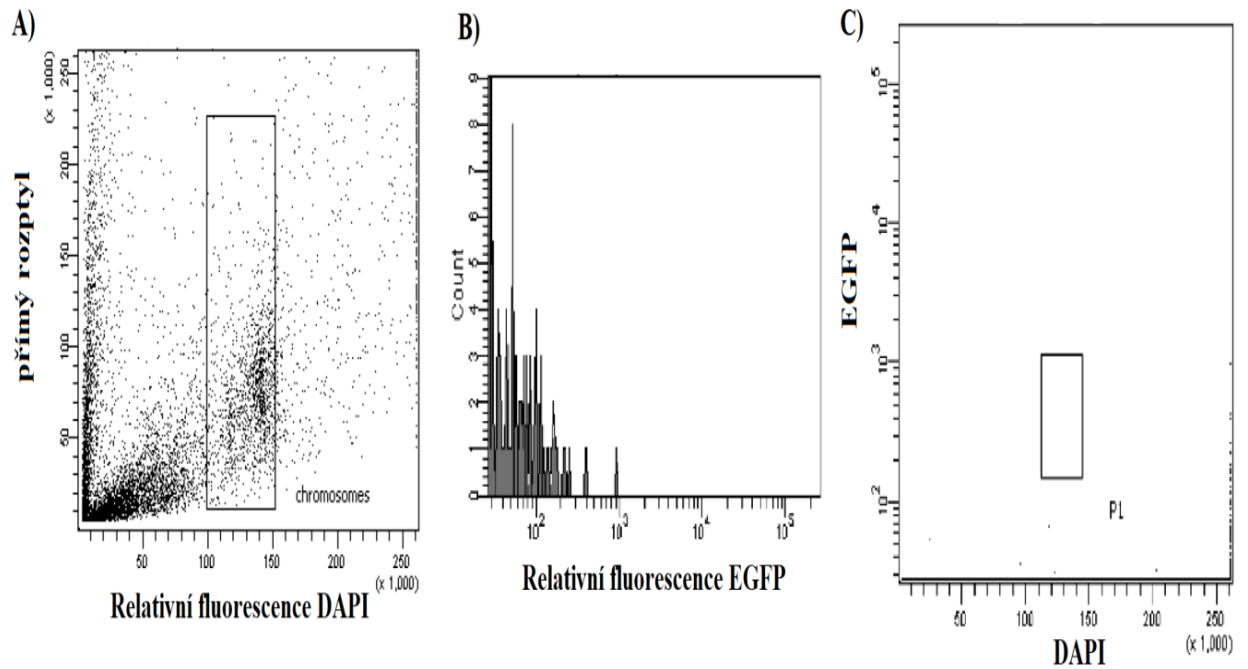
Obrázek 15: Flow karyotyp chromozómů ječmene cv. *Morex* při 5 minutové fixáži.



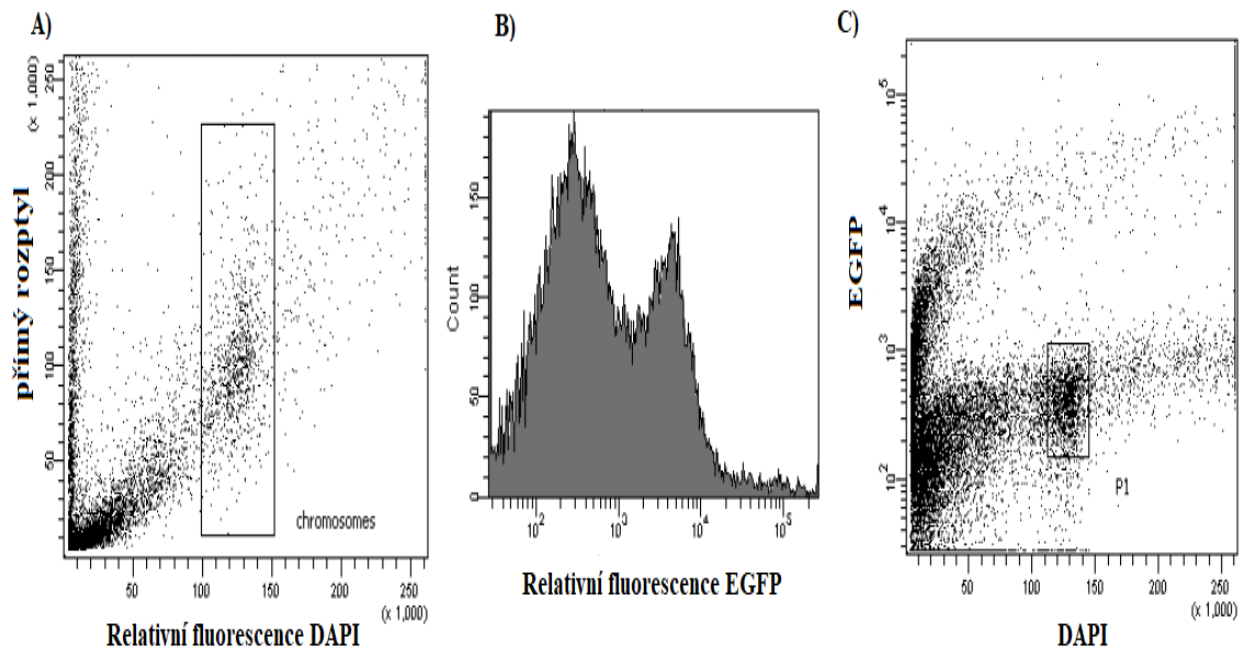
Obrázek 16: Chromozómy ječmene cv. *Morex* při 5 minutové fixáži. Zvětšení 600x.

5.2 Značení chromozómů ječmene pomocí CASFISH se značenou dCas9-EGFP

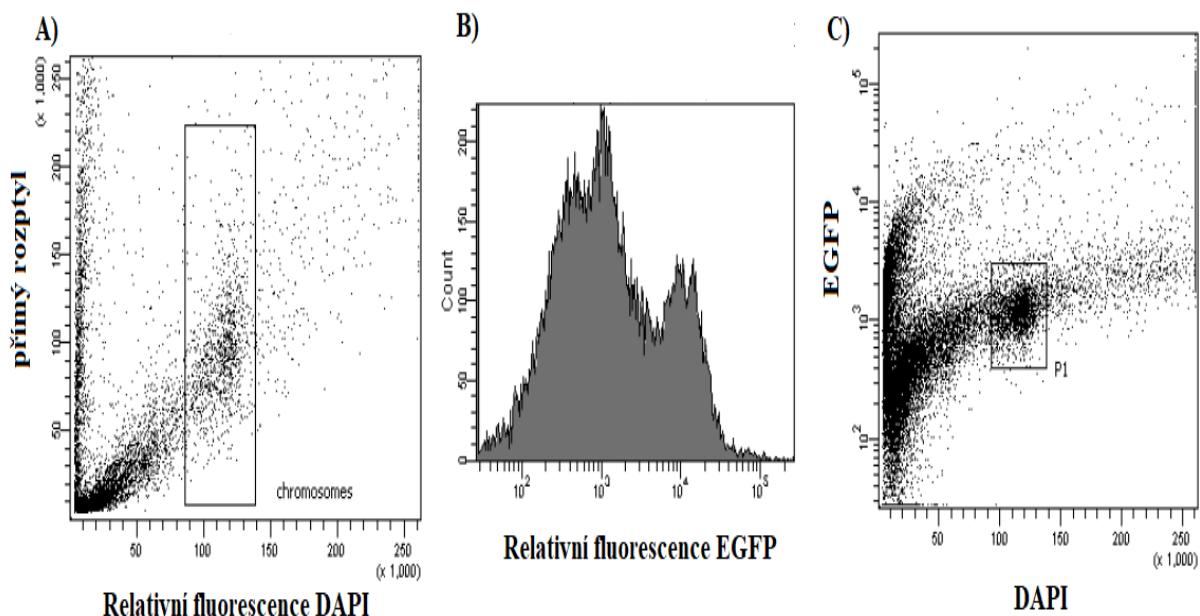
U chromozómů, které nebyly značeny a byly obarveny pouze fluorescenčním barvivem DAPI byla zachovaná morfologie viz obrázek 17. Po přidavku fluorescenčního barviva eGFP byl pozorován v cytometru signál, který naznačuje vazbu proteinu dCas9. K zacílení byly vybrány 2 typy sekvencí -sekvence AGG a teloméra viz obrázek 18 a 19. Z flowkaryotypu na obrázcích 18 a 19 je vidět, že došlo ke značení chromozómů, ale nedochází k rozlišení jednotlivých chromozómů oproti značení pouze s DAPI. Chromozómy i po značení tvořily neodlišitelnou populaci. Specifické signály jednotlivých sond nebyly pozorovány ani v mikroskopu.



Obrázek 17: Flowkaryotyp chromozómů ječmene cv. *Morex* bez značení.

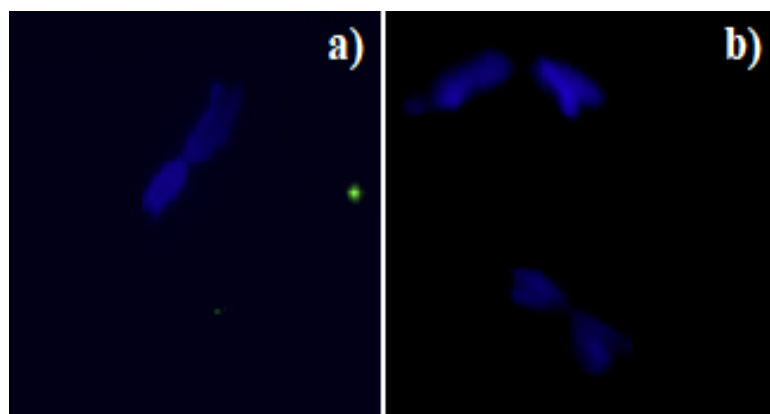


Obrázek 18: Flow karyotyp chromozómů ječmene cv. *Morex* se značenou sekvencí AGG značenou dCas9-EGFP. Na obrázku A je flowkaryotyp chromozómů barvených pomocí fluorescenčního barviva DAPI. Na obrázku B je histogram relativní fluorescence EGFP. Na obrázku C je zobrazeno bivariátní značení DAPI versus EGFP, kde je bivariátní na ose X relativní fluorescence DAPI a na ose Y relativní fluorescence EGFP. Chromozómy jsou značené, ale nevytváří rozlišitelnou populaci.

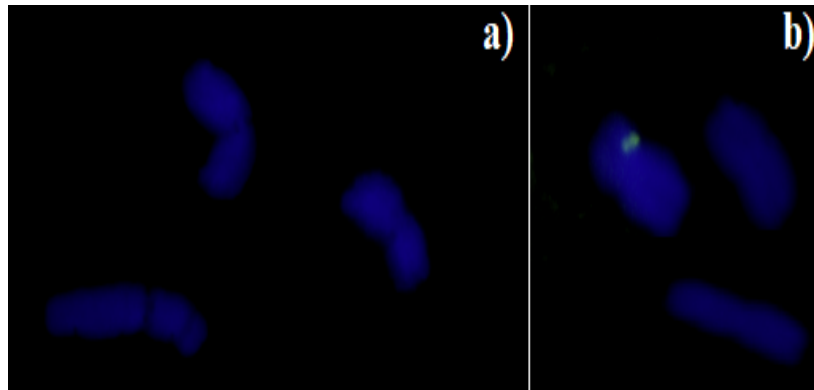


Obrázek 19: Flow karyotyp chromozómů ječmene cv. *Morex* se značenou telomérou. Na obrázku A je znázorněn flowkaryotyp chromozómů obarvených pouze fluorescenčním barvivem DAPI. Na obrázku B je histogram relativní fluorescence EGFP. Výsledné píky chromozómů nejsou příliš zřetelné. Na obrázku C je zobrazeno bivariátní značení DAPI versus EGFP, kde je na ose X relativní fluorescence DAPI a na ose Y relativní fluorescence EGFP, chromozómy tvoří stále nerozlišitelnou populaci.

Pro značení sekvence AGG a teloméry chromozómů ječmene cv. *Morex* byla pro značení použita dCas9 sfúzovaná s fluorescenčním proteinem EGFP. Z obrázku 20, kde bylo prováděno značení sekvence AGG, lze pozorovat, že nedošlo k navázání značené sondy na cílovou sekvenci. Nebyl zde detekován žádný specifický signál. I v případě značení teloméry nebyl detekován žádný signál viz Obrázek 18. Z důvodu neúspěšného značení nebyla dále značená dCas9 v dalších experimentech aplikována. Další experimenty byly prováděny se značenou sgRNA/ATTO 550.



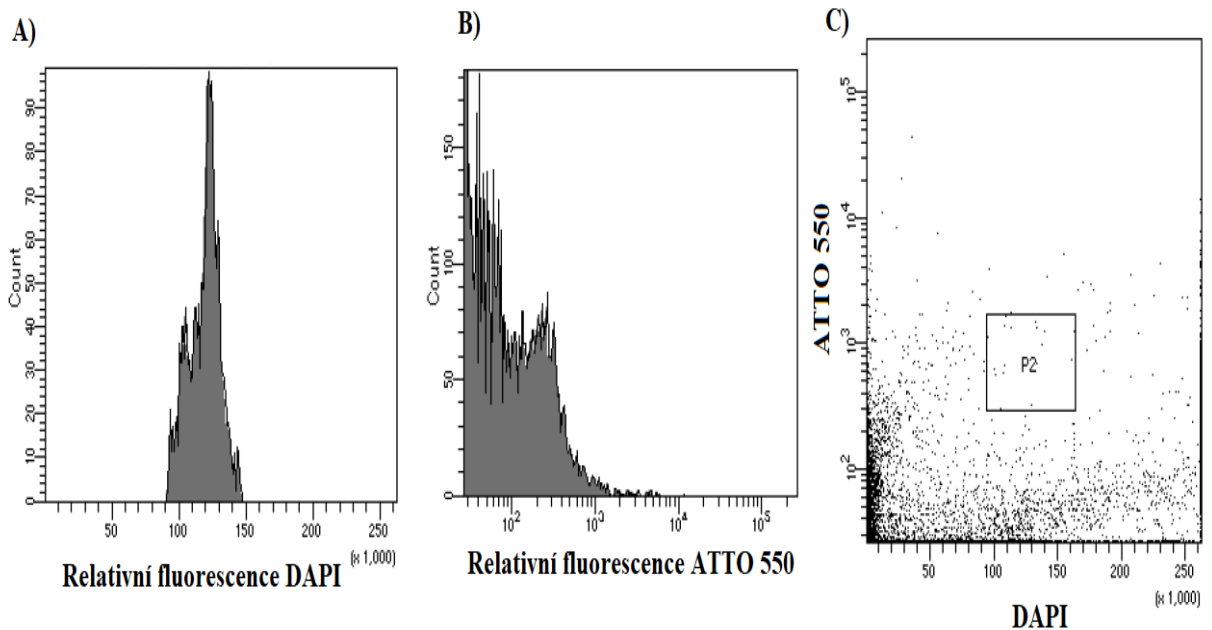
Obrázek 20: Chromozómy ječmene cv. *Morex* se značenou sekvencí AGG. Na obrázku A probíhala inkubace se značící dCas9-eGFP při teplotě 26°C po dobu 1 hodiny, na obrázku B při teplotě 4°C přes noc. Zvětšení 400x.



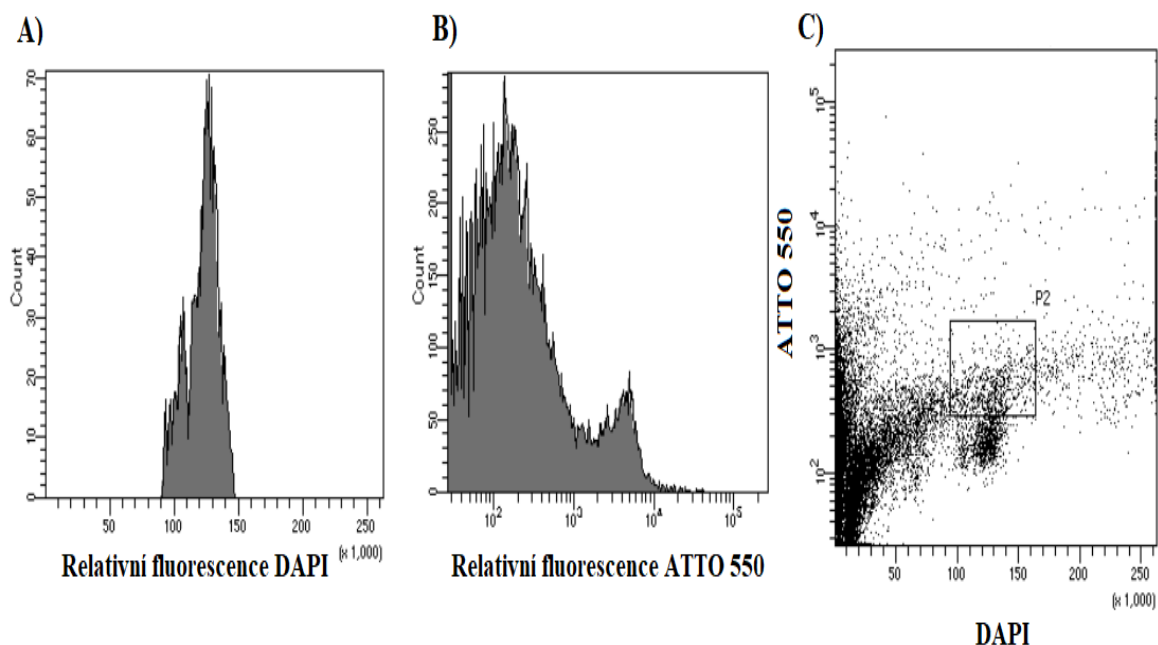
Obrázek 21: Chromozómy ječmene cv. *Morex* se značenou telomérou. Na obrázku A probíhala inkubace se značící dCas9-eGFP při teplotě 26°C, na obrázku B probíhala inkubace přes noc při teplotě 4°C. Zvětšení 400x.

5.3 Značení ječmene značenou sgRNA/ATTO 550

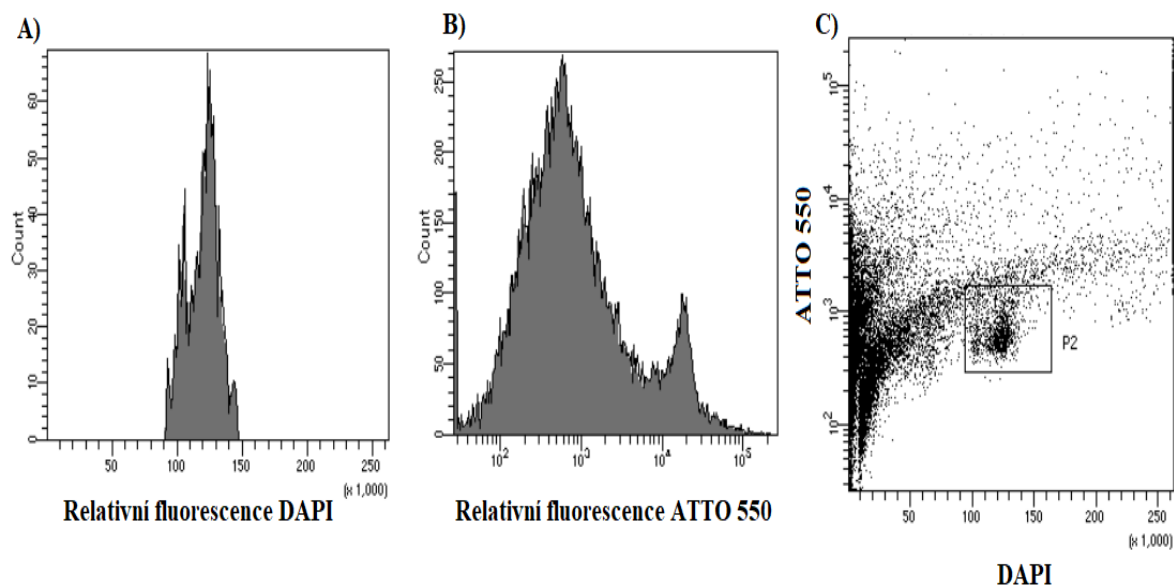
Pro druhou sadu experimentů bylo využito systému se značenou tracrRNA, která nese fluorochrom ATTO 550. Enzym i obě RNA (crRNA a tracrRNA) byly dodány firmou IDT. Při značení chromozómů ječmene cv. *Morex* byl testován vliv rozdílného množství značené sondy – sgRNA/ATTO 550. Při značení byly použity dva rozdílné objemy a to 1 μ l a 9 μ l značené sgRNA. V obou případech byl pozorován nespecifický signál, patrný z flowkaryotypů na obrázcích 23 a 24. Vyšší intenzita signálu byla dle očekávání pozorována u varianty s 9 μ l duplexní RNA.



Obrázek 22: Flow karyotyp chromozómů ječmene cv. *Morex* bez značení.



Obrázek 23: Flow karyotyp chromozómů ječmene cv. *Morex* se značenou sekvencí AGG po přidání 1 µl značené sgRNA/ATTO 550.

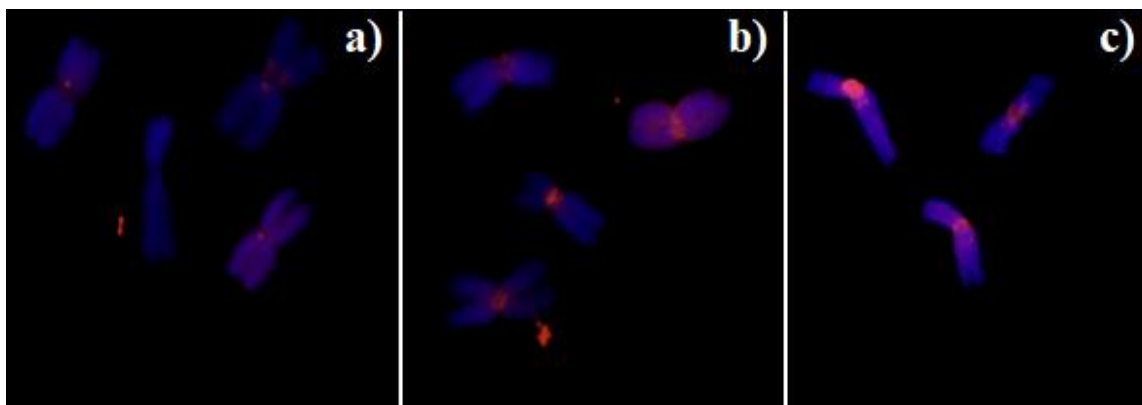


Obrázek 24: Flow karyotyp chromozómů ječmene cv. *Morex* se značenou sekvencí AGG po přidání 9 µl značené sgRNA/ATTO 550.

5.3.1 Chromozómy ječmene značené klasickou CASFISH značenou sgRNA

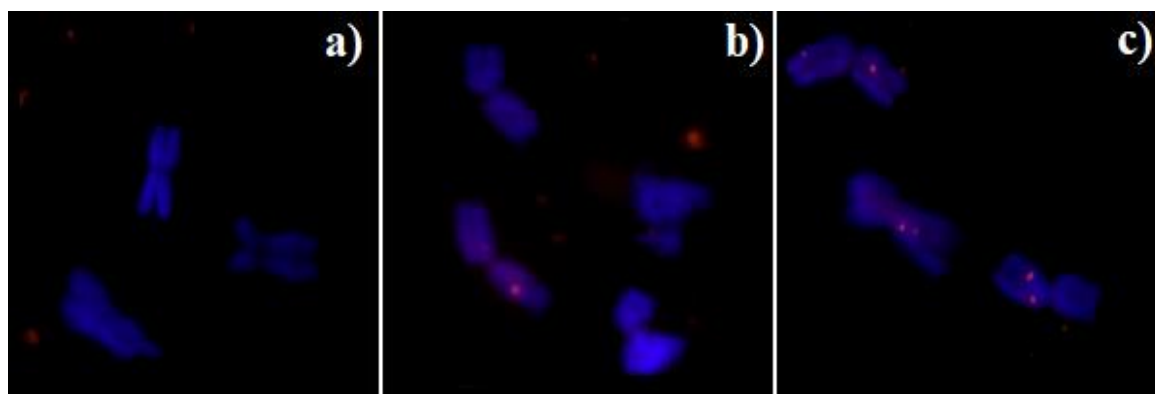
Termínem „klasická CASFISH“ je v tomto případě míněna aplikace fluorescenční RNP na tříděné chromozomy na mikroskopické sklíčko, nejedná se tedy o značení v suspenzi. Před značením cílových sekvencí AGG a teloméry v suspenzi bylo provedeno značení těchto sekvencí na natříděných chromozómech při 20 minutové fixáži. V případě značení sekvence AGG značenou sgRNA byly provedeny 3 varianty inkubací, jednou

z nich byla inkubace provedená při teplotě 26°C po dobu 1 hodiny, u které byl detekován slabý signál viz obrázek 25a. Další inkubace probíhala při teplotě 26°C po dobu 3 hodin. Při této inkubaci byl detekován specifický signál na sekvenci AGG viz obrázek 25b. Dále byla provedena inkubace, která probíhala přes noc při teplotě 4°C viz obrázek 25c. V tomto případě byl detekován nespecifický signál, při kterém došlo k navázání značené sondy i do jiných oblastí na chromozómech.



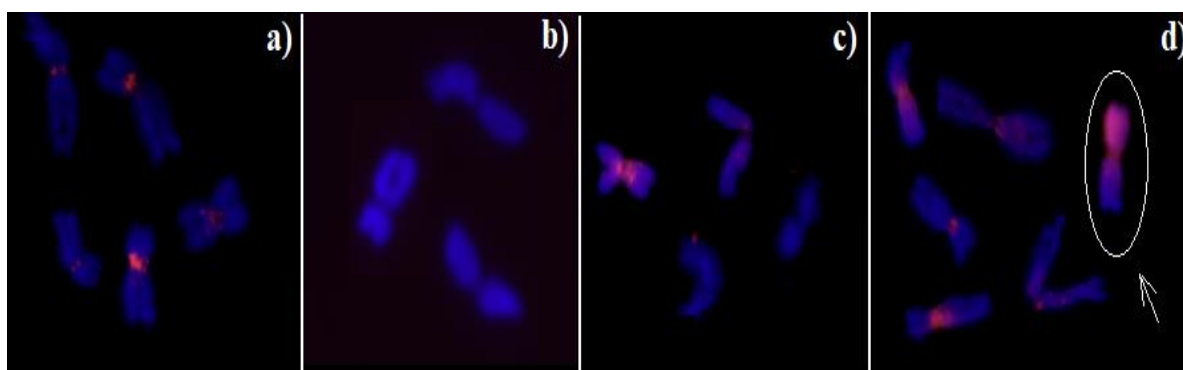
Obrázek 25: Chromozómy ječmene cv. *Morex* se značenou sekvencí AGG značené pomocí značené sgRNA/ATTO 550. Na obrázcích A, B a C jsou chromozómy se značenou sekvencí AGG, které se liší v jednotlivých inkubacích. Na obrázku A probíhala inkubace se značenou sondou při teplotě 26°C po dobu 1 hodiny. U obrázku B probíhala inkubace při teplotě 26°C 3 hodiny. Na obrázku C probíhala inkubace přes noc při teplotě 4°C. Zvětšení 400x.

Při značení telomerů značenou sgRNA byly provedeny 3 varianty inkubací. První variantou byla inkubace při teplotě 26°C po dobu 1 hodiny. Dále byla provedena 3 hodinová inkubace při teplotě 26°C a inkubace při 4°C přes noc. Ani v jednom případě nebyl na značených chromozómech detekován specifický signál viz obrázek 26.



Obrázek 26: Chromozómy ječmene cv. *Morex* s próbou cílení na telomerické oblasti se značenou sgRNA fluochromem ATTO 550. Inkubace se značenou sondou probíhala u obrázku A při teplotě 26°C po dobu 1 hodiny. Na obrázku B probíhala inkubace při teplotě 26°C 3 hodiny a na obrázku C při 4°C přes noc. Ve všech případech byl použit 1 µl značící sondy. Zvětšení 400x.

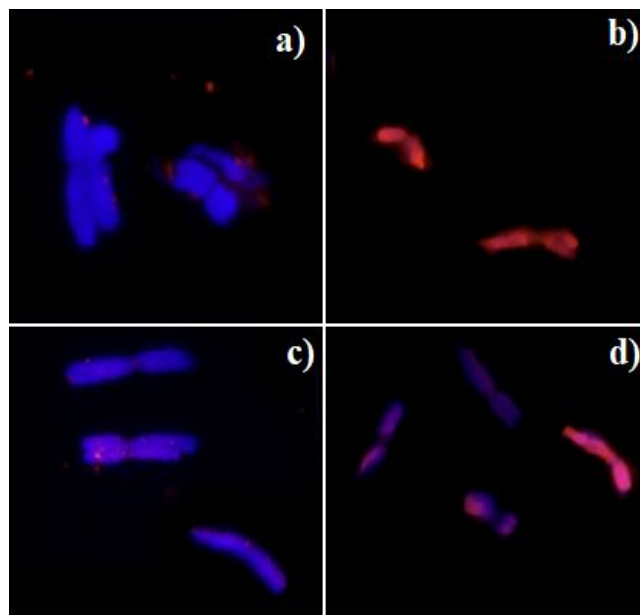
Při dalším značení na natříděných chromozómech u ječmene cv. *Morex* bylo prováděno pouze značení cílové sekvence AGG z důvodu úspěšného značení v předešlých experimentech na mikroskopických sklíčkách. Značení teloméry nebylo dále používáno pro neúspěšné značení. V této části bylo pozorováno rozdílné množství přidaného enzymu a také bylo pozorováno, jestli dochází ke značení cílové sekvence AGG bez použití enzymu (viz Obrázek 27b), pro vyloučení možnosti nespecifické vazby samotné značené RNA. Pro značení byly použity 2 μ l a 5 μ l značené sgRNA. Podmínky inkubace probíhaly při teplotě 4°C přes noc. Na obrázku 27a a 27c byl detekován specifický signál, zatímco na obrázku 27d došlo k navázání i do jiných oblastí na chromozómu nadbytkem značící sondy.



Obrázek 27: Chromozómy ječmene cv. *Morex* se značenou sekvencí AGG pomocí značené sgRNA/ATTO 550. V případě obrázku A byly použity 2 μ l značící sondy s enzymem dCas9, v případě obrázku B byly použity 2 μ l značící sondy bez enzymu dCas9. Na obrázcích C byl použit 1 μ l značící sondy s enzymem dCas9. U obrázku D bylo použité 5 μ l značící sondy s enzymem dCas9. Zvětšení 400x.

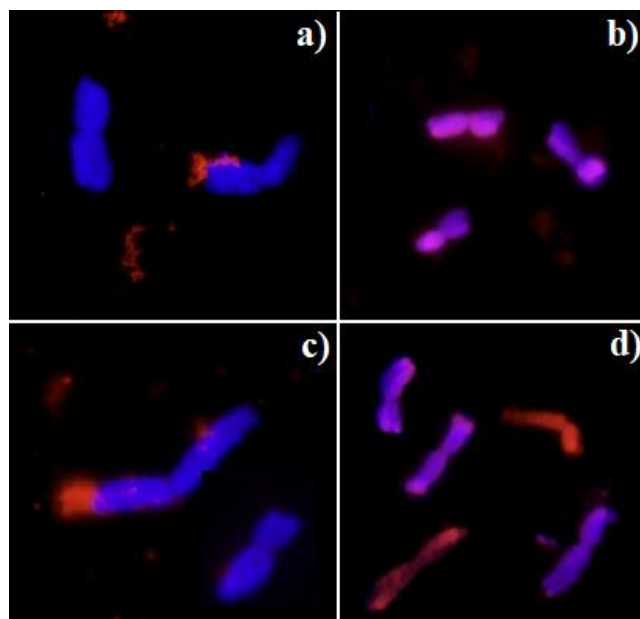
5.3.2 Chromozómy ječmene značené CASFISH v suspenzi značenou sgRNA

Na základě optimalizace fixáže byla pro značení v suspenzi vybrána 10 minutová fixáž. V následujících experimentech byl používán 1 μ l a 9 μ l značené sgRNA/ATTO 550. Bylo provedeno značení sekvence AGG se značenou sondou v suspenzi přes noc při teplotě 4°C. Na chromozómech byl zaznamenán nespecifický signál viz obrázek 28.



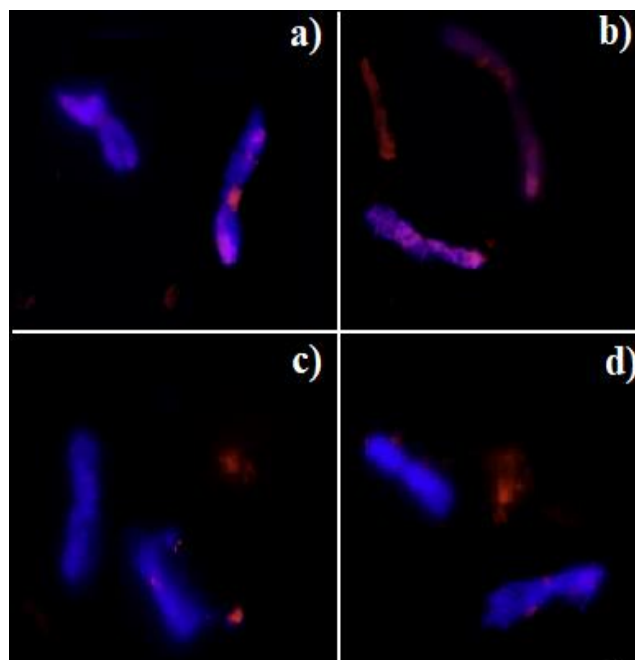
Obrázek 28: Chromozómy ječmene cv. *Morex* se značenou sekvencí AGG značenou sgRNA/ATTO 550. Na obrázcích A a B byl přidán 1 μ l značené sondy, na obrázku A bylo navíc provedeno promytí mikroskopického preparátu ethanolovou řadou. Zatímco na obrázcích C a D jsou chromozómy značeny 9 μ l značící sondy, u obrázku C bylo navíc provedeno promytí sondy. Zvětšení 400x.

Dále bylo prováděno značení sekvence AGG na chromozómech značenou sgRNA při teplotě 37°C po dobu 1 hodiny. Na chromozómech lze opět pozorovat fluorescenční signál, který je nespecifický. Značená sonda se nenavázala na cílové sekvence na chromozómech nebo došlo k vazbě v jiných oblastech viz obrázek 29.



Obrázek 29: Chromozómy ječmene cv. *Morex* se značenou sekvencí AGG značenou pomocí značené sgRNA/ATTO 550. Na obrázcích A a B byl použit 1 μ l značené sondy, u obrázku A bylo navíc provedeno standardní promytí mikroskopického preparátu ethanolovou řadou. Zatímco u obrázku C a D bylo použito 9 μ l značené sondy, u obrázku C bylo navíc provedeno promytí sondy. Zvětšení 400x.

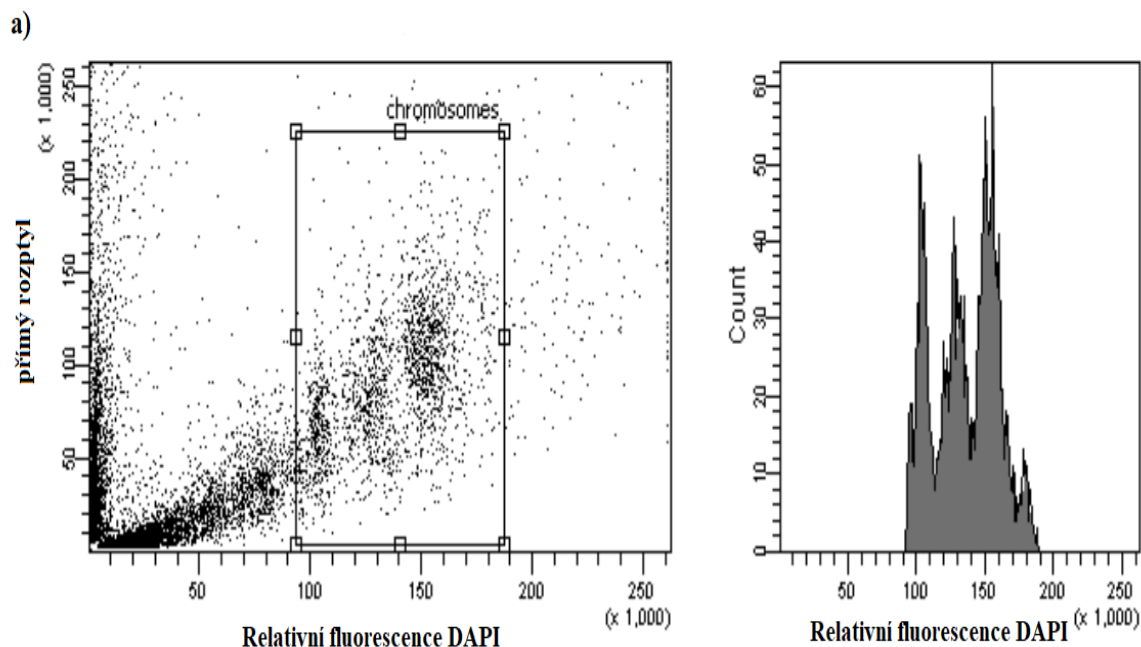
Další značení sekvence AGG se značenou sgRNA probíhalo buď 1 hodinu při 37°C nebo přes noc při pokojové teplotě na rotátoru. V obou případech sice byl na chromozómech zaznamenán fluorescenční signál, ale toto značení bylo nespecifické viz obrázek 30.



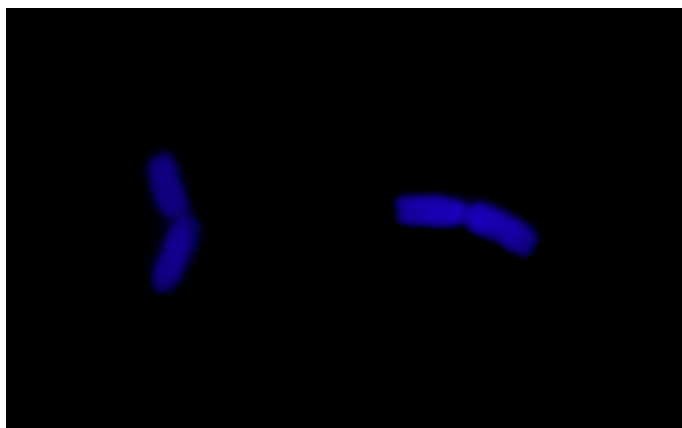
Obrázek 30: Chromozómy ječmene cv. *Morex* se značenou sekvencí AGG značenou sgRNA/ATTO 550. Na obrázcích A (1 µl) a B (9 µl) probíhala inkubace se značenou sondou po dobu 1 hodiny na rotátoru při teplotě 37°C. U obrázku C (9 µl) a D (1 µl) probíhala inkubace se značenou sondou přes noc na rotátoru při pokojové teplotě. Zvětšení 400x.

5.4 Optimalizace fixáže chromozómů pšenice

Stejně jako u ječmene cv. *Morex* byla i v případě chromozómů pšenice cv. *Chinese spring* optimalizována doba fixáže, která výrazně ovlivňuje morfologii chromozómů a přístupnost chromatinu. V případě standardní 20 minutové fixáže lze na flow karyotypu pozorovat úzké píky chromozómů viz obrázek 31. Na bivariátním flowkaryotypu tvoří jasně ohraničenou populaci viz obrázek 31. Použitím této fixáže zůstala morfologie chromozómů zachována viz obrázek 32. Ačkoliv fixáž umožňuje udržet tvar chromozomu, může způsobovat nepřístupnost značící sondě.

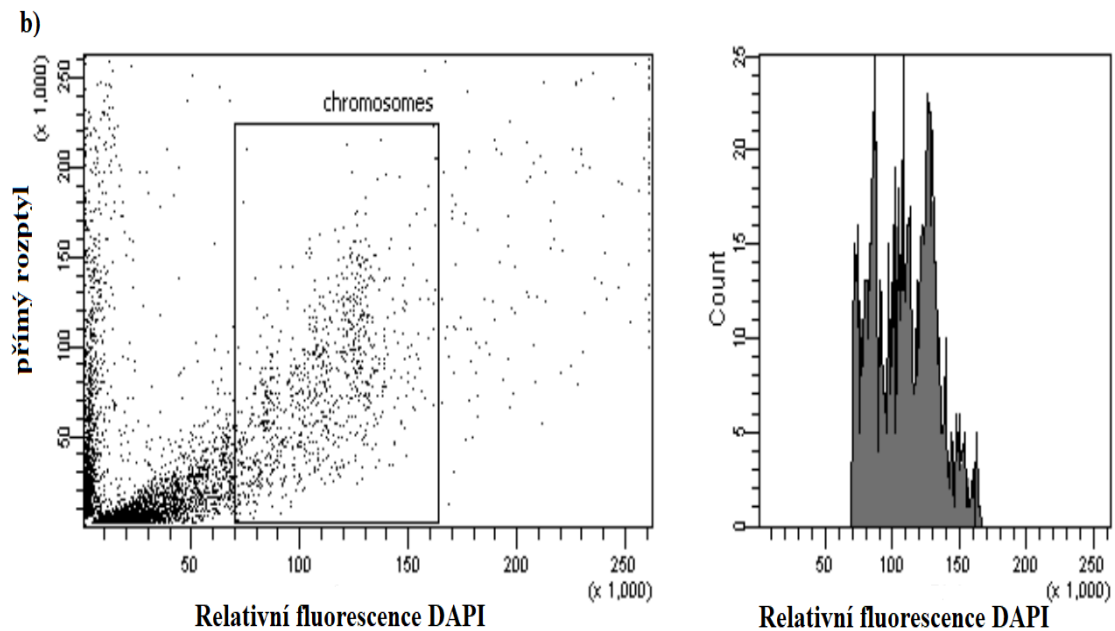


Obrázek 31: Flow karyotyp chromozómů pšenice cv. *Chinese spring* při 20 minutové fixáži.

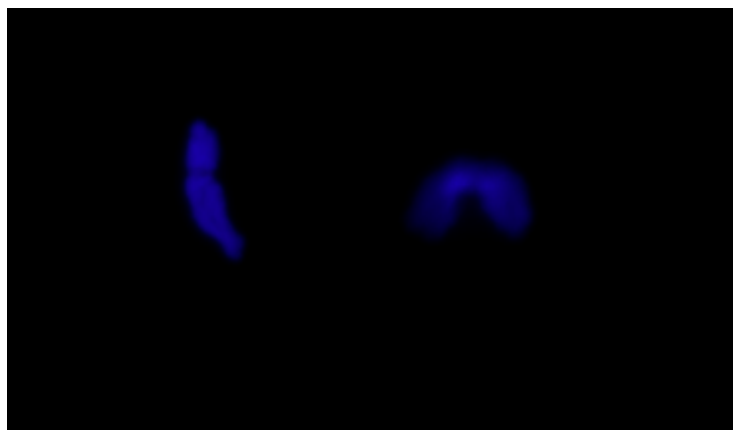


Obrázek 32: Chromozómy pšenice cv. *Chinese spring* při 20 minutové fixáži. Zvětšení 400x.

Dále byla použita 10 minutová fixáž. V důsledku snížení fixáže došlo ke zhoršení morfologie chromozómů. To lze pozorovat i z flow karyotypu, píky chromozómů jsou širší a chromozómy tvoří méně ohraničenou populaci viz obrázek 33. Chromozómy mají méně kompaktní strukturu viz obrázek 34, a tím pádem mohou být přístupnější pro nasednutí sondy.

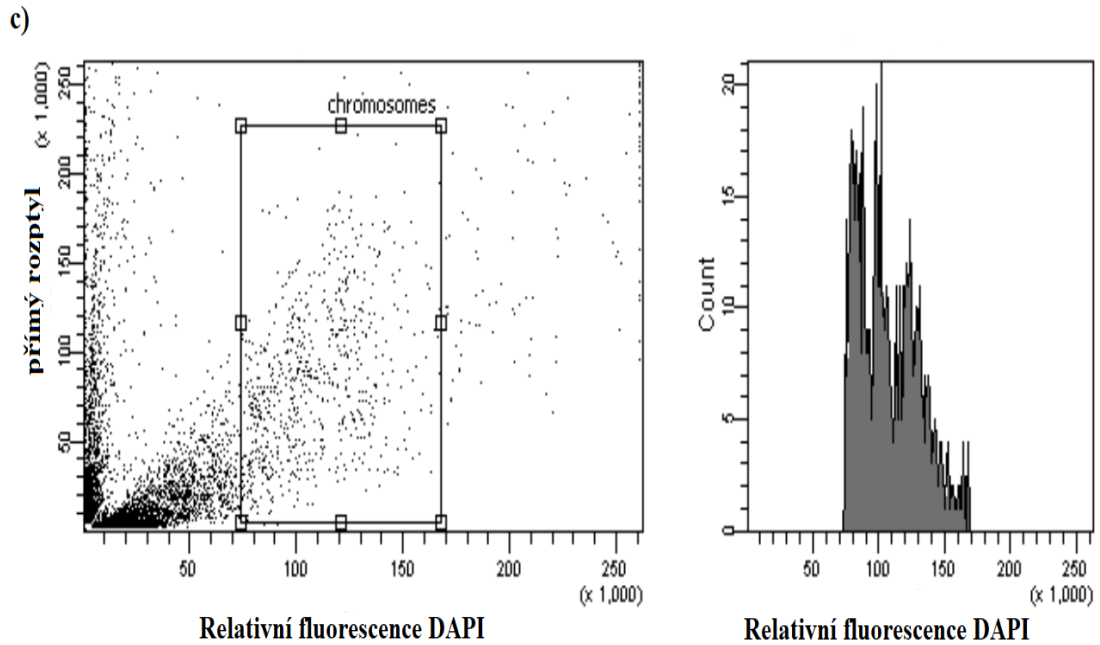


Obrázek 33: Flow karyotyp chromozómů pšenice cv. *Chinese spring* při 10 minutové fixáži.

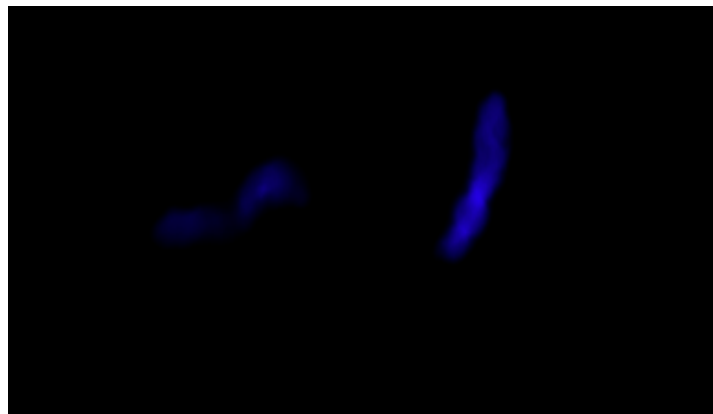


Obrázek 34: Chromozómy pšenice cv. *Chinese spring* při 10 minutové fixáži. Zvětšení 400x.

Na závěr byla provedena i 5 minutová fixáž, kdy došlo ke zřetelnému poškození struktury chromozómů viz Obrázek 36. Z flow karyotypu lze pozorovat, že chromozómy už netvoří jasně ohraničenou populaci viz obrázek 35. Pro značení jsou nepoužitelné.



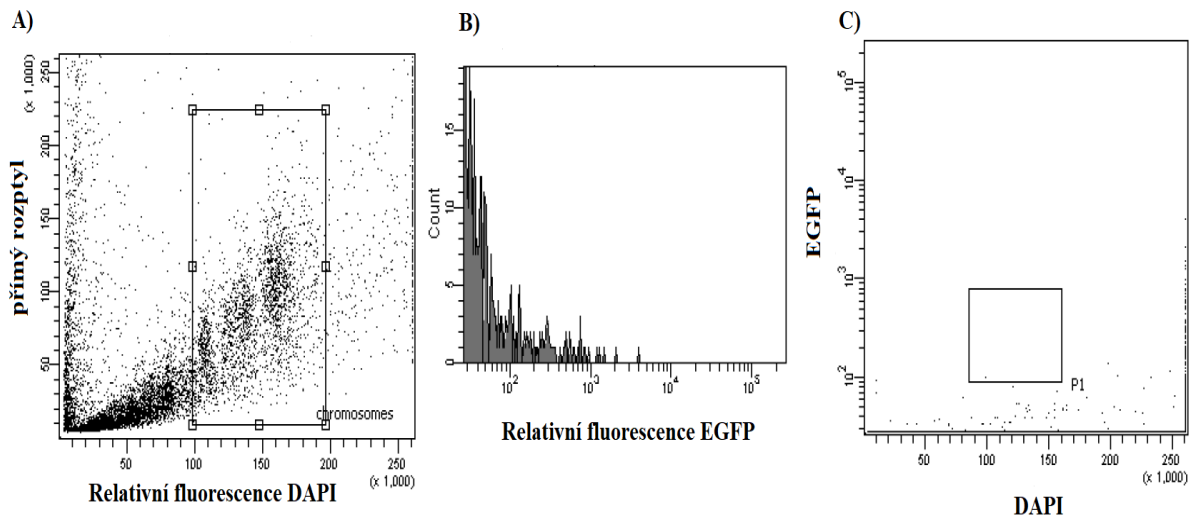
Obrázek 35: Flow karyotyp chromozómů pšenice cv. *Chinese spring* při 5 minutové fixáži.



Obrázek 36: Chromozómy pšenice cv. *Chinese spring* při 5 minutové fixáži. Zvětšení 400x.

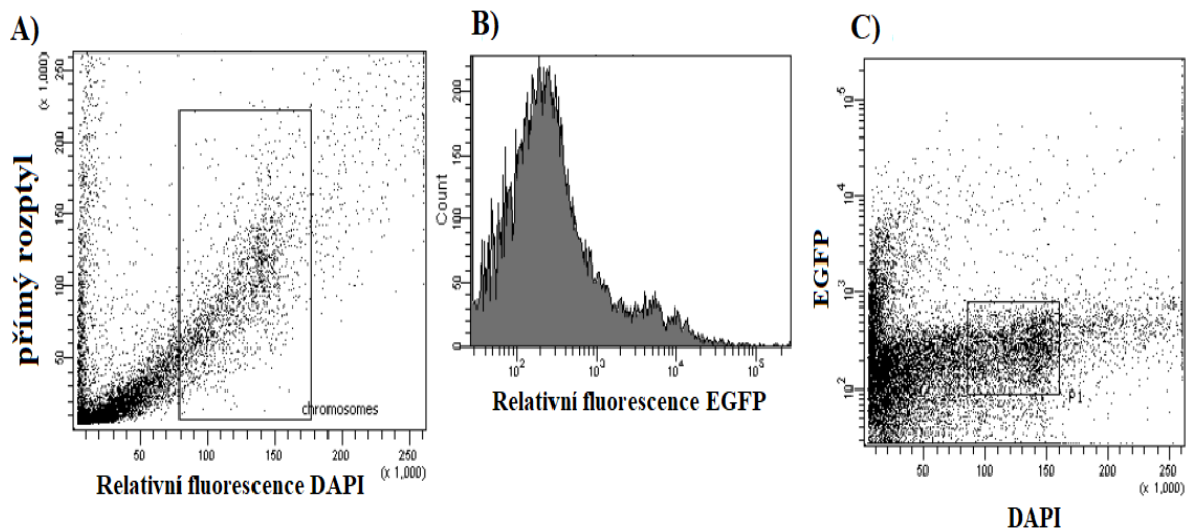
5.5 Značení chromozómů pšenice pomocí CASFISH se značenou dCas9

U chromozómů, které nebyly značeny a byly obarveny pouze fluorescenčním barvivem DAPI pro analýzu v průtokovém cytometru byla pozorována zachovalá morfologie viz obrázek 37.

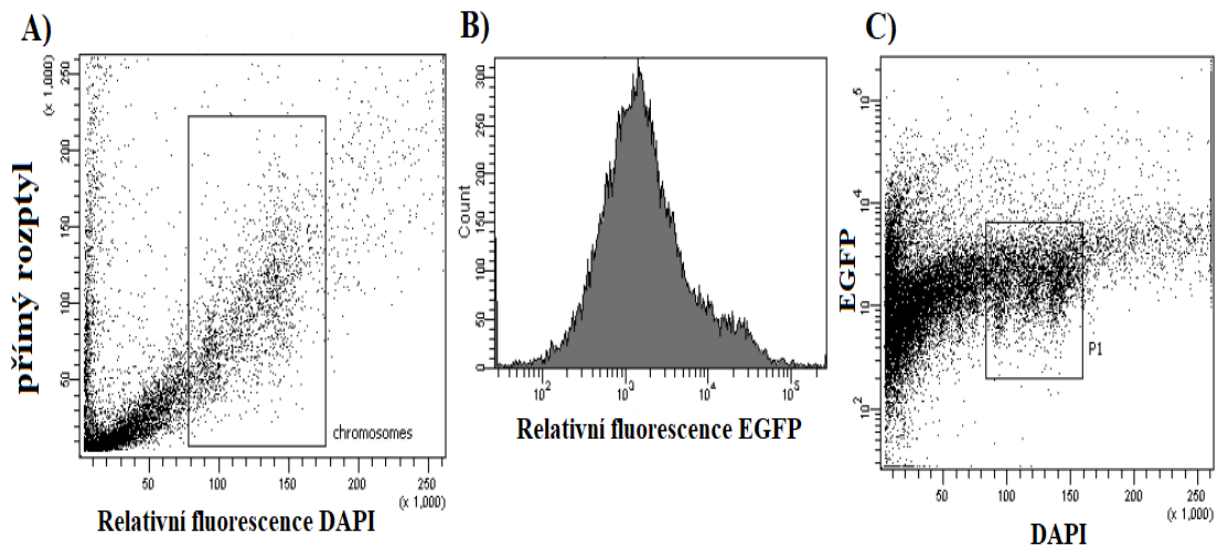


Obrázek 37: Flow karyotyp chromozómů cv. *Chinese spring* bez značení.

Pro značení byly vybrány dvě cílové sekvence *afa* a teloméru, RNA cílící jejich sekvence byly sfúzovány s značenou endonukleázou dCas9. Po značení chromozómů Cas9 nesoucí EGFP byl zaznamenán na chromozómech průtokovým cytometrem signál. Ten značil vazbu proteinu dCas9, ale stejně jako v případě chromozómů kultivaru *Morex* ani u chromozómů *Chinese spring* nedošlo k žádnému rozlišení. Žádné rozlišení nebylo pozorováno ani pomocí mikroskopu. Chromozómy kultivaru *Chinese spring* tvořily neodlišitelnou populaci viz obrázek 38 a 39.

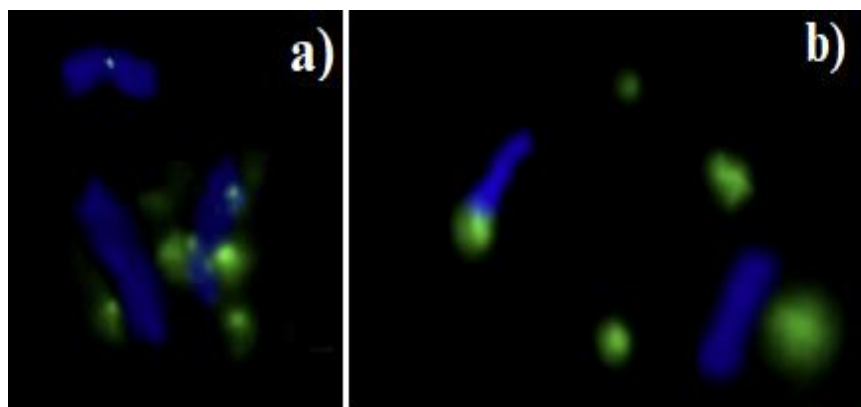


Obrázek 38: Flow karyotyp chromozómů pšenice cv. *Chinese spring* se značenou sekvencí *afa* značenou dCas9-EGFP. Na obrázku A je flow karyotyp chromozómů barvených pouze DAPI. Na obrázku B je histogram chromozómů, které byly značeny fluorescenčním barvivem EGFP. Na obrázku C je bivariátní značení DAPI versus EGFP, kde je bivariátní na ose X relativní fluorescence DAPI a na ose Y relativní fluorescence EGFP. došlo sice ke značení chromozómů, ale nedošlo k rozlišení na dílčí subpopulace.

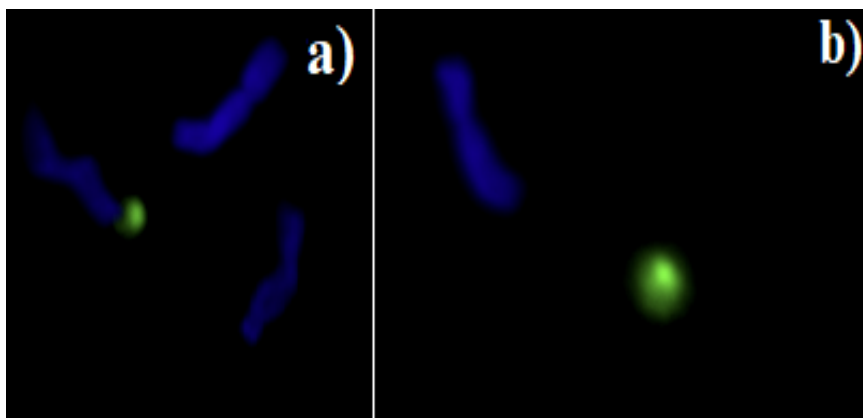


Obrázek 39: Flow karyotyp chromozómů pšenice cv. *Chinese spring* se značenou telomérou značenou dCas9-EGFP. Na obrázku A jsou chromozómy značené fluorescenčním barvivem DAPI. Zatímco na obrázku B jsou značené chromozómy fluorescenčním barvivem EGFP. Na obrázku C je znázorněno bivariátní značení DAPI versus EGFP. Na ose X je relativní fluorescence DAPI a na ose Y je relativní fluorescence EGFP. Došlo ke značení, ale nedošlo k odlišení populace chromozómů.

V případě značení sekvence *afa* a teloméru chromozómů pšenice cv. *Chinese spring* byla pro značení použita endonukleáza dCas9 sfúzovaná s fluorescenčním proteinem eGFP. Z obrázku 40, kde bylo prováděno značení sekvence *afa*, lze pozorovat, že u některých chromozómů došlo k nasednutí sondy, ale nebyl detekován žádný specifický signál. Stejný výsledek byl pozorován i v případě značení teloméru, kdy nedošlo k nasednutí sondy na cílovou sekvenci, tudíž nebyl detekován žádný specifický signál viz obrázek 41. Pro neúspěšné značení nebyla tato značená dCas9 v dalších experimentech používána. Další experimenty byly prováděny se značenou sgRNA/ATTO9 550.



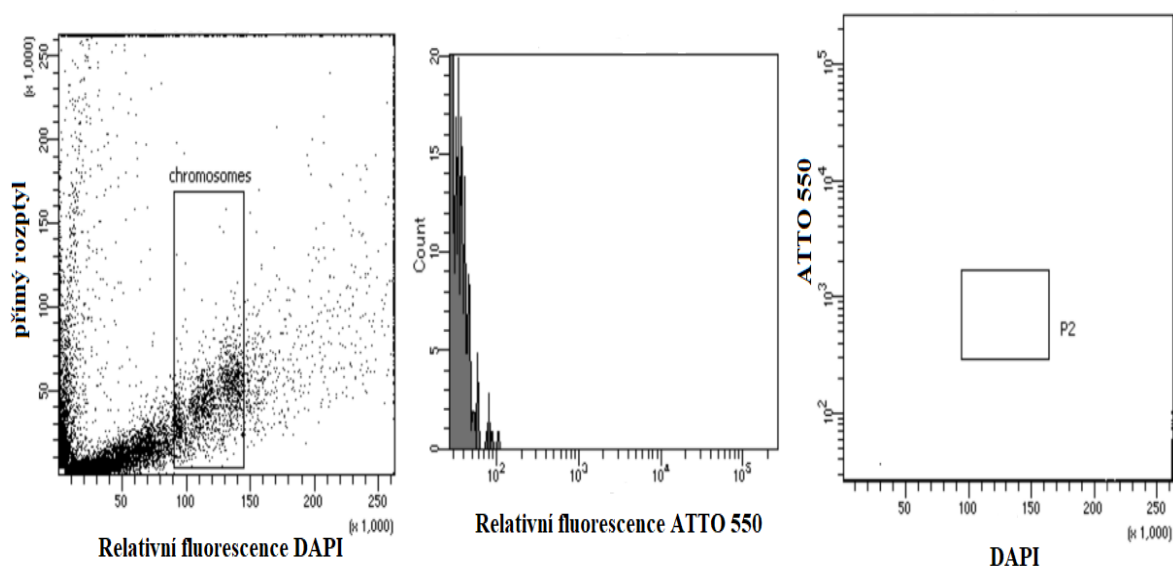
Obrázek 40: Chromozómy pšenice cv. *Chinese spring* se značenou sekvencí *afa* značenou dCas9-EGFP. Na obrázcích A a B jsou chromozómy se značenou sekvencí *afa* inkubovány při teplotě 26°C po dobu 1 hodiny a na obrázku C při 4°C přes noc. Zvětšení 400x.



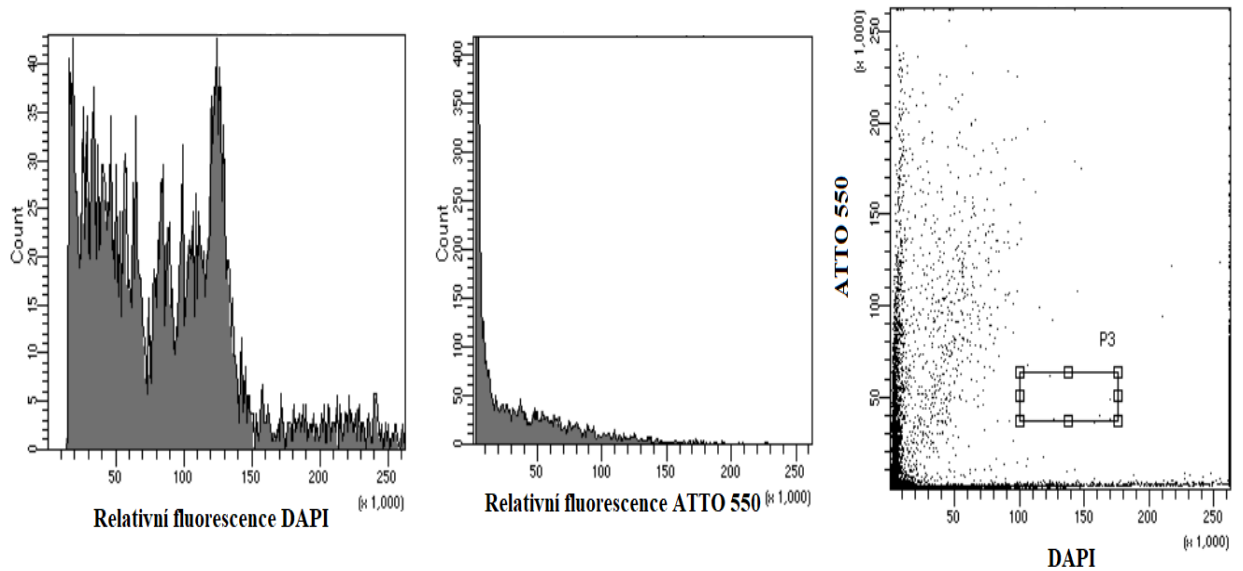
Obrázek 41: Chromozómy pšenice cv. *Chinese spring* se značenou telomerickou oblastí značenou dCas9-EGFP. Na obrázku A jsou chromozómy, inkubovány při teplotě 26°C 1 hodinu. Na obrázku B jsou chromozómy inkubovány při teplotě 4°C přes noc. Zvětšení 400x.

5.6 Značení pšenice značenou sgRNA/ATTO 550

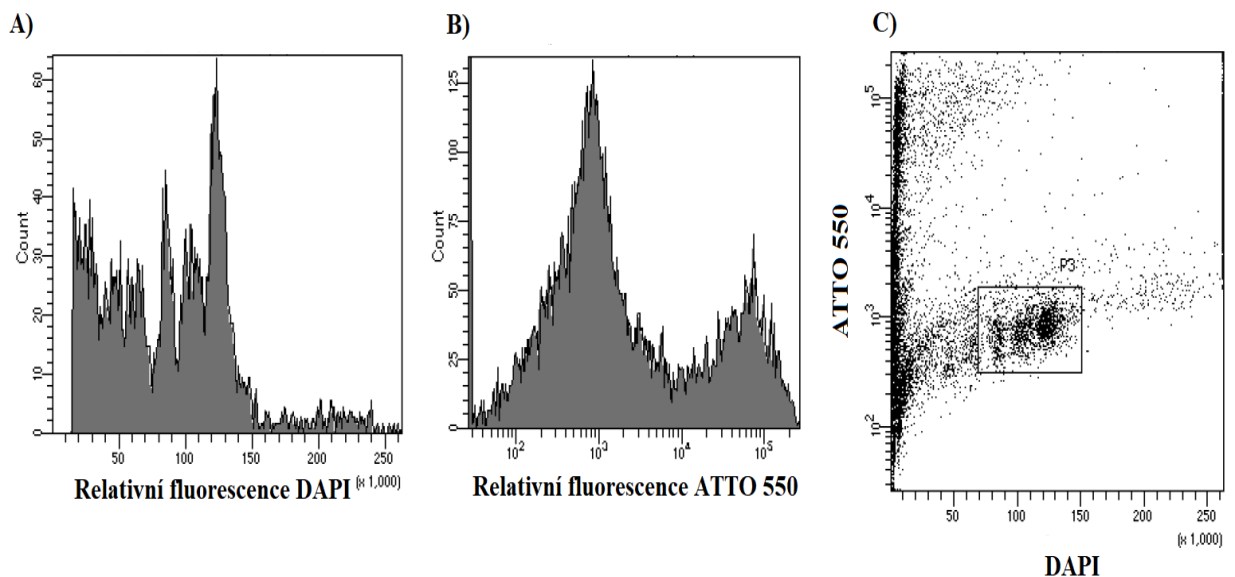
U chromozómů pšenice cv. *Chinese spring* byl testován vliv rozdílného množství značené sgRNA/ATTO 550. Při tvorbě RNP pro značení byly použity 1 μ l a 9 μ l značené sgRNA. V obou případech byl pozorován nespecifický signál, patrný z flow karyotypů na obrázcích 43 a 44.



Obrázek 42: Flow karyotyp chromozómů pšenice cv. *Chinese spring* bez značení.



Obrázek 43: Flow karyotyp zobrazující chromozómy pšenice cv. *Chinese spring*, ke kterým byl přidán 1 μ l značené sgRNA/ATTO 550.

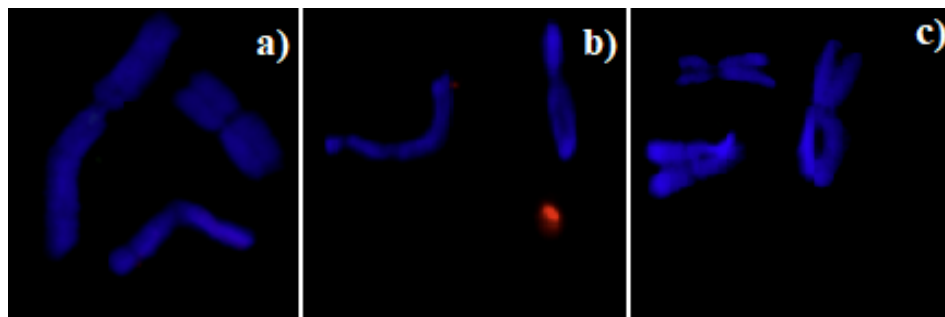


Obrázek 44: Flow karyotyp zobrazující chromozómy pšenice cv. *Chinese spring*, ke kterým bylo přidáno 9 μ l značené sgRNA/ATTO 550.

5.6.1 Chromozómy pšenice značené klasickou CASFISH značenou sgRNA

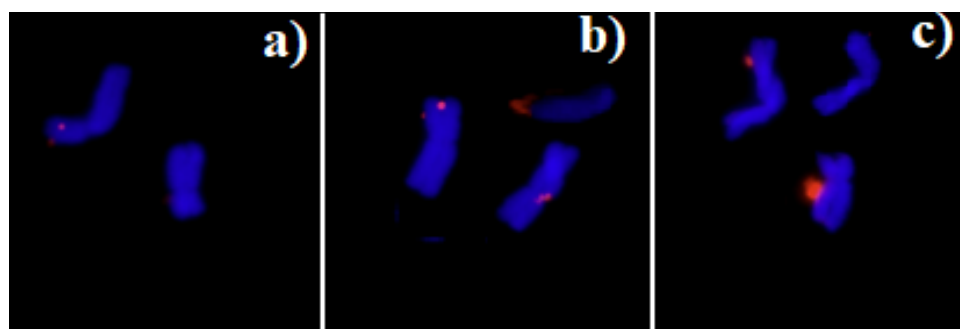
V dalších částech experimentu bylo prováděno značení cílových sekvencí *afa* a teloméry chromozómů pšenice cv. *Chinese spring* pomocí značené sgRNA/ATTO 550 na natříděných chromozómech na mikroskopickém sklíčku. Byly testovány 3 varianty inkubace. První variantou bylo značení cílové sekvence *afa*, u které inkubace probíhala při 26°C po dobu 1 hodiny. Dále byla provedena inkubace při 26°C po dobu 3 hodin a inkubace při teplotě 4°C přes noc. Ani u jedné z těchto variant nebyl detekován

specifický signál. Nedošlo k navázání značené sondy na cílovou sekvenci *afa* na chromozómech viz obrázek 45.



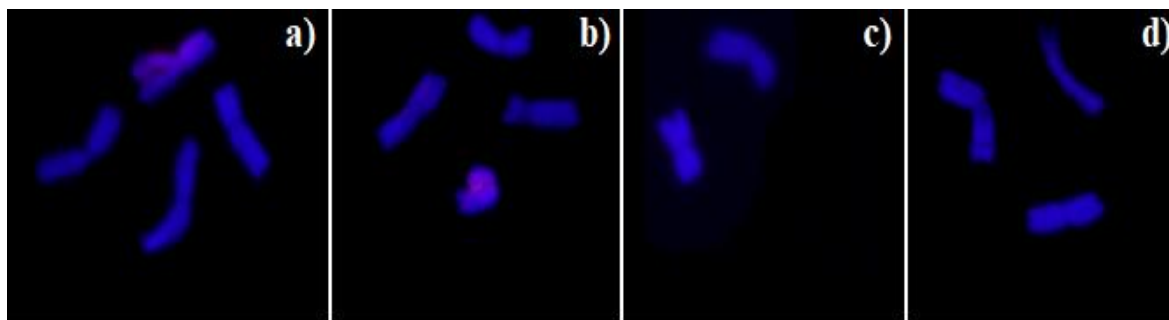
Obrázek 45: Chromozómy pšenice cv. *Chinese spring* se značenou sekvencí *afa* značenou sgRNA/ATTO 550. Na obrázku A probíhala inkubace při teplotě 26°C po dobu 1 hodiny, na obrázku B při 26°C po dobu 3 hodin a na obrázku C při 4°C přes noc. Zvětšení 400x.

Při značení teloméru byly opět provedeny 3 varianty inkubace se značenou sgRNA/ATTO 550. Byla provedena inkubace při 26°C po dobu 1 hodiny, dále při 26°C po dobu 3 hodin a při teplotě 4°C přes noc. U žádné z těchto variant nebyl detekován specifický signál stejně jako u sekvence *afa* viz obrázek 46.



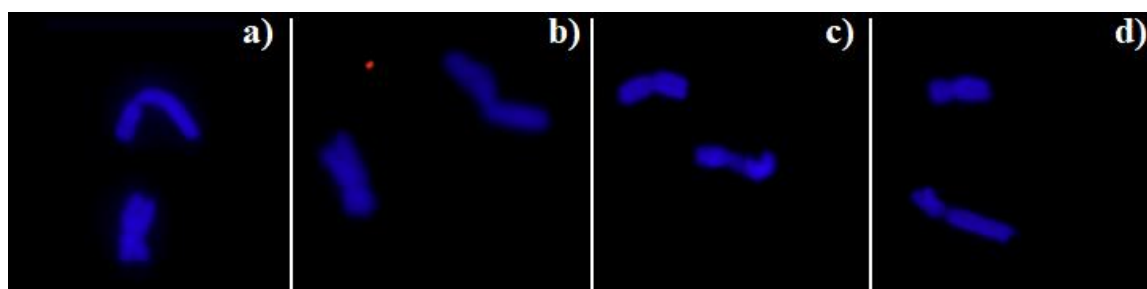
Obrázek 46: Chromozómy pšenice cv. *Chinese spring* se značenou telomérickou oblastí značenou sgRNA/ATTO 550. Na obrázku A probíhala inkubace při teplotě 26°C 1 hodinu, na obrázku B při teplotě 26°C 3 hodiny a na obrázku C při 4°C přes noc. Zvětšení 400x.

Dále bylo testováno množství značené sgRNA/ATTO 550. V případě použití 5 μ l nedošlo ke značení sekvence *afa*, nedošlo k detekci specifického signálu na chromozómech viz obrázek 47. Zatímco v případě použití 2 μ l došlo k obarvení chromozómů fluorescenčním barvivem ATTO 550 značící vazbu sgRNA. Toto značení však nebylo specifické, nedošlo k navázání sondy na cílovou sekvenci *afa*.



Obrázek 47: Chromozómy pšenice cv. *Chinese spring* se značenou sekvencí *afa* značenou sgRNA/ATTO 550. V případě obrázku A a B byla značena sekvence *afa*, pro značení byly použity 2 μ l značící sondy. V případě obrázku C a D bylo pro značení sekvence *afa* použito 5 μ l značící sondy. Podmínky inkubace probíhaly přes noc při teplotě 4°C. Zvětšení 400x.

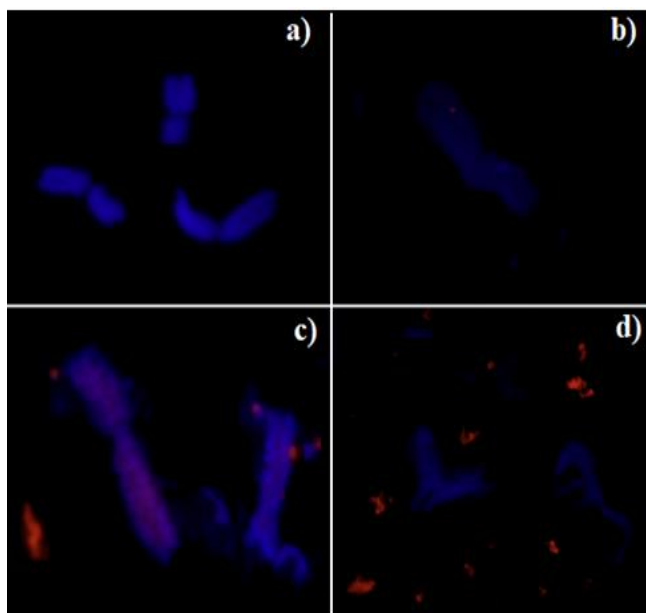
Při značení teloméry bylo také testováno množství značené sgRNA/ATTO 550. Byly použity 2 μ l a 5 μ l značené sondy. Ani v jednom případě nedošlo ke značení teloméry na chromozómech pšenice viz obrázek 48.



Obrázek 48: Chromozómy pšenice cv. *Chinese spring* se značenou telomerickou oblastí značenou sgRNA/ATTO 550. V případě obrázku A a B byly pro značení teloméry použito 2 μ l značené sondy, zatímco u obrázku D a E bylo použito 5 μ l značené sondy. Podmínky inkubace probíhaly přes noc při teplotě 4°C. Zvětšení 400x.

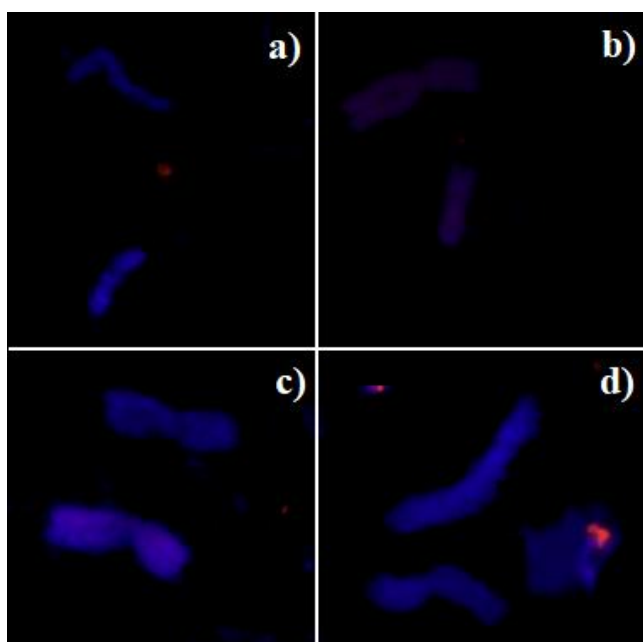
5.6.2 Chromozómy pšenice značené CASFISH v suspenzi značenou sgRNA

Po optimalizaci fixáže bylo provedeno značení cílových sekvencí *afa* a teloméry. Při značení cílové sekvence *afa* bylo použito rozdílné množství značené sgRNA/ATTO 550. Při použití 1 μ l a 9 μ l nedošlo k nasednutí značené sondy na cílovou sekvenci. Značení bylo prováděno na chromozómech při 10 minutové fixáži viz obrázek 49a a 49b, u kterých nebyl zaznamenán specifický signál. Značení bylo prováděno i na chromozómech při 5 minutové fixáži v případě obrázku 49c došlo k obarvení chromozómu fluorescenčním barvivem ATTO 550, které značí vazbu sgRNA, ale nejednalo se o specifický signál. Nedošlo k navázání značené sondy na cílovou sekvenci *afa*.



Obrázek 49: Chromozómy pšenice cv. *Chinese spring* se značenou sekvencí *afa* značenou sgRNA/ATTO 550 v suspenzi. Na obrázku A byl použit 1 µl značené sgRNA, v případě obrázků B bylo použito 9 µl značené sgRNA při fixáži 10 minut. Zatímco na obrázku C bylo použito 9 µl značené sgRNA a u obrázku D byl použit 1 µl při fixáži 5 minut. Zvětšení 400x.

Značení bylo provedeno i pro teloméru. Byl použit 1 µl a 9 µl značené sgRNA/ATTO 550. U značených chromozómů při 10 a 5 minutové fixáži nedošlo ani v jednom případě k detekci specifického signálu viz obrázek 50.



Obrázek 50: Chromozómy pšenice cv. *Chinese spring* se značenou telomérou v suspenzi. Na obrázku A byl použit 1 µl značené sgRNA, v případě obrázku B bylo použito 9 µl značené sgRNA při fixáži 10 minut. Na obrázku C byl použit 1 µl značené sgRNA, v případě obrázku D bylo použito 9 µl značené sgRNA při fixáži 5 minut. Zvětšení 400x.

6 DISKUZE

Pro rostlinné genomy je příznačné, že jsou velmi komplexní. Jejich velikost je mezi různými rostlinnými druhy značně variabilní. K variabilitě přispívá rozdílný obsah repetitivních sekvencí DNA přítomných v rostlinných genomech, většina rostlin je rovněž ovlivněna hybridizacemi a následnou polyploidizací. Proto je v naší snaze analýzu takových komplexních genomů co nejvíce zjednodušit. Jedno z možných řešení je rozdělení rostlinného genomu na jednotlivé chromozómy pomocí průtokového cytometru. Problém však nastává v malých rozdílech obsahu DNA mezi jednotlivými chromozómy. Značení cílových sekvencí na chromozómech v suspenzi by mohlo pomoci k rozdělení chromozómů na dílčí subpopulace. V minulosti byly vyzkoušeny metody pro značení cílových sekvencí jako PRINS (Koch a kol. 1989), FISHIS (Giorgi a kol. 2013) a metody využívající polyamidových prób (Gigi a kol. 2012) a TALENů (Sekine a kol. 2014). I přes četné pokusy se tyto práce nepodařilo reprodukovat nebo je jejich využití limitováno na malý soubor mikrosatelitových lokusů.

Další alternativou jak dosáhnout značení cílových sekvencí na chromozómech v suspenzi by mohlo být použití systému CRISPR/Cas9 typu II z bakterie *Streptococcus pyogenes*. Tato metoda umožňuje značení cílových lokusů na chromozómech, ve kterém je používána deaktivovaná endonukleáza Cas9 sfúzovaná s fluorescenčním proteinem. Jedná se o metodu CASFISH, jejíž modifikace byla v této diplomové práci použita pro značení cílových sekvencí AGG a teloméry u chromozómů ječmene cv. *Morex* a na značení cílových sekvencí *afa* a teloméry u pšenice cv. *Chinese spring*.

Jednou z výhod metody CASFISH, kterou ve své práci popisuje Deng a kol. 2015 je sestavení RNP částice *in vitro* a není tak zapotřebí transformace živých buněk či organismů. Komplex dCas9/sgRNA má silnou a stabilní afinitu ke své cílové sekvenci DNA. Předpokládá, že lze RNP částici použít jako vysoce specifickou a účinnou sondu pro značení cílových sekvencí DNA bez denaturace chromozómů. Ishii a kol. 2019 popisují další vývoj metod založených na CRISPR/Cas9 systému pro značení genomových lokusů. Tím, že metoda RGEN-ISL nevyžaduje denaturaci, zachovává strukturu chromatinu, díky tomu poskytuje lepší rozlišení v porovnání s klasickou FISH. Navíc umožňuje simultanní *in situ* detekci DNA lokusů a proteinů, čili je kompatibilní i s imunozačením. Metoda RGEN-ISL byla použita i v práci Němečková a kol. 2019

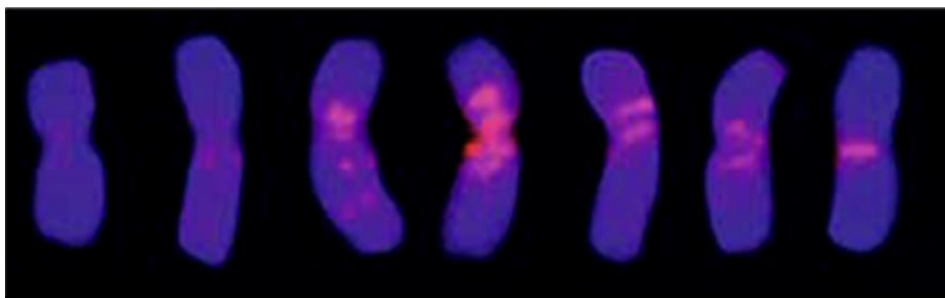
pro simultánní a specifickou vizualizaci proteinů, repetitivní DNA a k tomu navíc i míst replikace.

V průběhu značení cílových sekvencí ječmene (AGG a téloméra) a pšenice (*afa* a téloméra) byla optimalizována doba fixáže, která ovlivňuje morfologii chromozómů a přístupnost chromatinu. Při běžné 20 minutové fixáži zůstala morfologie chromozómů zachována. To mohlo mít za následek špatnou přístupnost pro navázání značené sondy na cílovou sekvenci. Z tohoto důvodu byla během experimentu vyzkoušena 10 minutová a 5 minutová fixáž. Avšak při 5 minutové fixáži došlo k výraznému poškození chromozómů, které byly pro značení nepoužitelné. Proto byla pro značení cílových sekvencí u ječmene a pšenice vybrána 10 minutová fixáž.

Pro značení cílových sekvencí na chromozómech ječmene – AGG a teloméry a pšenice – *afa* a teloméry byly použity dvě značící varianty. Jednou z nich byla značena dCas9, která je přímo značena fluorescenčním proteinem EGFP. Druhou variantou bylo značení pomocí značené sgRNA nesoucí fluorochrom ATTO 550.

Při značení chromozómů pomocí značené sgRNA/ATTO 550 byly provedeny dvě možnosti značení. Jednou z variant bylo značení klasickou CASFISH na natříděných chromozómech na mikroskopickém sklíčku. Spolu s optimalizací doby fixáže byly během experimentu optimalizovány různé varianty značení, které se lišily v podmínkách inkubace se značenou sondou. Testovány byly teplota a doba inkubace, dále bylo vyzkoušeno postupně se zvyšující množství RNA nesoucí fluorescenční značku.

Při značení cílové sekvence AGG na chromozómech ječmene cv. *Morex* bylo dosaženo značení chromozómů viz výsledky - obrázek 25. Signály odpovídaly dříve publikovaným nebo pozorovaným výsledkům viz obrázek 51, kdy značení této sekvence bylo provedeno metodou nenedaturující FISH (Cuadrado a kol. 2009, 2010 a nepublikováno). Autoři využili fluorescenčně značené sondy dlouhé 15-20 nukleotidů s opakovanými mono-, di-, tri nebo tetranukleotidovými motivy. Avšak metodu ND-FISH se nepodařilo optimalizovat pro značení chromozómů v suspenzi (nepublikováno). Pro značení lokusů AGG byly použity i rozdílné objemy značené sondy a to 1 μ l, 2 μ l a 5 μ l. Pro vyloučení nespecifického značení pouze fluorescenčně značenou RNA, bylo provedeno značení bez enzymu dCas9. V tomto případě nebyly pozorovány žádné signály. Při použití 5 μ l byly pozorovány nespecifické signály, sonda se vážala i mimo cílovou sekvenci na chromozómech viz výsledky - obrázek 27.



Obrázek 51: Specificky značená cílová sekvence AGG na chromozómech ječmene cv. *Morex*. V práci Cuadrado a kol. 2009, 2010 a dále nepublikováno. Sekvence nacházející se v pericentromerické oblasti chromozómu.

Dále bylo provedeno značení cílových sekvencí télomery ječmene a sekvencí *afa* a télomery pšenice na natříděných chromozómech za stejných podmínek jako u sekvence AGG. Avšak u tohoto značení nebyl ani v jednom případě zaznamenán specifický signál na cílových sekvencích. Z tohoto důvodu bylo další značení zaměřeno pouze na sekvenci AGG na chromozómech ječmene, které bylo následně optimalizováno pro značení v suspenzi. Značení v suspenzi probíhalo při 4°C přes noc, 37°C po dobu 1 hodiny, 37°C po dobu 1 hodiny na rotátoru, a nebo při pokojové teplotě na rotátoru přes noc. Pro značení v suspenzi byl používán 1 μ l a 9 μ l značené sgRNA/ATTO 550. Avšak v případě značení sekvence AGG v suspenzi nebyl ani v jednom případě detekován specifický signál, který by značil vazbu použité RNP. Příčinou neúspěšného značení může být s velkou pravděpodobností jiný reakční objem než v případě natříděných chromozómů na mikroskopickém sklíčku. Chromozómy se pohybují ve vodním prostředí, ve kterém nemusí dojít k dostatečnému kontaktu se značenou sondou. Do budoucna je plánováno využití detergentů, které snižují povrchové napětí či zahušťujících činidel (z anglického „crowding agent“) které zvyšují četnost kontaktu molekul v suspenzi.

Další experimenty byly prováděny pouze v suspenzi se značenou dCas9-EGFP na všech cílových sekvencích: AGG (ječmen), *afa* (pšenice) a téloméra (ječmen a pšenice). Podmínky inkubace u tohoto značení probíhaly při teplotě 26°C po dobu 1 hodiny a při 4°C přes noc. Ani u jedné cílové sekvence nebyl detekován specifický fluorescenční signál. Stejně jako u značené sgRNA/ATTO 550 může být jedním z důvodů neúspěšného značení samotná suspenze.

7 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala možnostmi značení mitotických chromozómů v suspenzi. V experimentální části byla využita modifikace metody CASFISH, která používá systém CRISPR/Cas9 typu II z bakterie *Streptococcus pyogenes* a nevyžaduje denaturaci chromozómů. Cílem bylo dosáhnout rozdělení chromozómů na dílčí subpopulace ve flow karyotypu, což by zjednodušilo analýzu komplexních genomů hospodářsky významných plodin jako je ječmen a pšenice. Pro značení cílových sekvencí na lokusech byly použity dvě varianty značení a to pomocí dCas9 sfúzované přímo s fluofochromem EGFP a značené sgRNA nesoucí fluorochrom ATTO 550. Pro značení byly použity sekvence AGG a teloméry na chromozómech ječmene cv. *Morex* a sekvence *afa* a teloméry na chromozómech pšenice cv. *Chinese spring*. Značení bylo provedeno i na tříděných chromozómech průtokovým cytometrem značenou sgRNA/ATTO 550.

Specifického značení bylo dosaženo pouze u cílové sekvence AGG při značení na natříděných chromozómech ječmene značenou sgRNA/ATTO. Při značení v suspenzi nebylo dosaženo specifických signálů ani u jedné z použitých prób jak pomocí značené sgRNA/ATTO 550 tak i značenou dCas9-EGFP. V průběhu značení nebylo pozorováno žádné rozlišení populace chromozómů. Závěrem lze říci, že se tuto metodu nepodařilo po mnohých pokusech optimalizovat.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Adams K. L., Wendel J. F. (2005) Polyploidy and genome evolution in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 8(2):135-141.

Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2005) *Základy buněčné biologie*. Espero Publishing, ISBN: 80-902906-2-0.

Anders C., Niewoehner O. a kol. (2014) Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*, 513(7519):569–573.

Annunziato A. (2008) DNA Packaging: Nucleosomes and Chromatin. *Nature education*, 1 (1):26.

Arora L., Narula A. (2017) Gene Editing and Crop Improvement Using CRISPR-Cas9 System. *Front Plant Sci*, 8:1932.

Bannikov A.V., Lavrov A.V. (2017) CRISPR/CAS9, the King of Genome Editing Tools. *Mol Biol (Mosk)*, 51(4):582-594.

Bennett, P. (2000) Demystified ...: Microsatellites. *Mol Pathol*, 53(4):177-183.

Bennett M. D., Leitch I. J. (1997) Nuclear DNA Amounts in Angiosperms—583 New Estimates. *Ann Bot*, 80: 169–196.

Bennetzen J. L., Ma J., Devos K. M. (2005) Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants. *Ann Bot*, 95: 127–132.

Bitinaite, J., Wah, D., Aggarwal, A., Schildkraut, I. (1998) FokI dimerization is required for DNA cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(18): 10570-10575.

Briggs D., Walters S.M. (2001) *Proměnlivost a evoluce rostlin*. Olomouc: Univerzita Palackého. ISBN 80-244-0186-X.

Comai L. (2005) The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nat Rev Genet*, 6(11):836-846.

- Cuadrado A., Golczyk, H. a Jouve N. (2009) A novel, simple and rapid nondenaturing FISH (ND-FISH) technique for the detection of plant telomeres. Potential used and possible target structures detected. *Chromosome Res*, 17(6):755-762.
- Cuadrado A., Jouve N. (2010) Chromosomal detection of simple sequence repeats (SSRs) using nondenaturing FISH (ND-FISH). *Chromosoma*, 119(5):495-503.
- Chambers G.K., MacAvoy, E.S. (2000) Microsatellites: consensus and controversy. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 126(4):455-476.
- Christian M., Cermak T., Doyle E. L., Schmidt C., Zhang F., Hummel A., Bogdanove A. J., Voyatas D. F. (2010) Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 186(2): 757–761.
- Cong, L., Ran, F., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L., Zhang, F. (2013) Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science*, 339(6121): 819-823.
- Cooper G.M. (1996) *The cell: a molecular approach*. Washington: ASM Press, ISBN 0-87893-119-8.
- Coyne, J. A. a H. A. Orr (2004) *Speciation*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. ISBN 08-789-3089-2.
- Dahm R. (2008) *Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research*. *Hum Genet*, 122(6):565-81.
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., Eckert, M. R., Vogel, J., Charpentier, E. (2011) CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471 (7340): 602–607.
- Deng W., Shi X., Tjian R., Lionnet T., Singer R.H. (2015) CASFISH: CRISPR/Cas9-mediated in situ labeling of genomic loci in fixed cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112(38):11870-5.
- Dickerson R.E, Drew H.R. (1981) Structure of a B-DNA dodecamer: II. Influence of base sequence on helix structure. *J Mol Biol*, 149(4):761–786.

Dodsworth S., Leitch A. R., Leitch I. J. (2015) Genome size diversity in angiosperms and its influence on gene space. *Curr Opin Genet Dev*, 35:73-78.

Doležel J., Lucretti S., Macas J. (1997) Analýza a třídění chromozomů rostlin pomocí průtokové cytometrie. *Biologické listy*, 62(2): 131-160.

Doležel J., Bartoš J. (2005) Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Ann Bot*, 95(1): 99-110.

Doležel J., Greilhuber J., Suda J. (2007) Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nat Protoc*, 2(9):2233-2244.

Doležel J., Vrána J., Šafář J., Bartoš J., Kubaláková M, šimková H (2012) Chromosomes in the flow to simplify genome analysis. *Funct Integr Genomics*, 12 (3): 397-416.

Doudna J.A., Charpentier E. (2014) Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213):1258096.

Dumbovic, G., Forcales, S., Perucho, M. (2017) Emerging roles of macrosatellite repeats in genome organization and disease development. *Epigenetics*, 12(7):515-526.

Feldman M., Liu B., Segal G., Abbo S. Levy A. A., Vega J. M. (1997) Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploid wheat: A possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosomes. *Genetics*, 147 (3): 1381–1387.

Franklin R., Gosling R. (1953) Molecular Configuration in Sodium Thymonucleate. *Nature*, 171(4356): 740-741.

Goldstein, D. B., Schlötterer, C. (1999) *Microsatellites: Evolution and applications*. Oxford University Press, Oxford.

Gygi M.P., Ferguson, M.D., Mefford H.C., Lund K.P., O'Day C, Zhou P. a kol. (2002) Use of fluorescent sequence-specific polyamides to discriminate human chromosomes by microscopy and flow cytometry. *Nucleic Acids Res*, 30 (13): 2790-2799.

Giorgi D, Farina A, Grosso V, Gennara A, Ceoloni C, Lucretti S (2013) FISHIS: fluorescence in situ hybridization in suspension and chromosome flow sorting made easy. PLoS ONE, 8 (2): e57994.

Grant V. (1981) Plant speciation. Columbia University Press, New York. GRULICH V. (2012) Red List of vascular plants of the Czech Republic, 3rd edition. – Preslia, 84: 631–645.

Heitz E. (1928) "Das Heterochromatin der Moose." Jahrb Wiss Botanik, 69: 762-818.

Hřibová E., Neumann P., Matsumoto T., Roux N., Macas J., Doležel J. (2010) Repetitive part of the banana (*Musa acuminata*) genome investigated by low-depth 454 sequencing. BMC Plant Biology, 10: 204.

International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC). Lukaszewski a kol. (2014) A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. Science, 345(6194):1251788.

International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC); IWGSC RefSeq principal investigators: Appels R. a kol. (2018) Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. Science, 361(6403):eaar7191.

Ishii T., Schubert V., Khosravi S., Dreissig S., Metje-Sprink J., Sprink T., Fuchs J., Meister A., Houben A. (2019) RNA-guided endonuclease - in situ labelling (RGEN-ISL): a fast CRISPR/Cas9-based method to label genomic sequences in various species. New Phytol, 222(3):1652-1661.

Ishino Y., Krupovic M., Forterre P. (2018) History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. J Bacteriol, 200(7):e00580-17.

Jansen R., Embden J. D. A. van, Gaastra W., Schouls L. M. (2002) Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. Mol Microbiol, 43: 1565–1575.

Jeffreys A. J., Brookfield, J. F., Semeonoff, R. (1985) Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature*, 317(6040):818-819.

Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J., Charpentier E. (2012) A Programmable Dual-RNAGuided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, 337(6096): 816-821.

Kelly L. J., Leitch I. J. (2011) Exploring giant plant genomes with next-generation sequencing technology. *Chromosome Res*, 19(7): 939-953.

Kihara H, Ono T. (1926) Chromosomenzahlen und systematische Gruppierung der RumexArten. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 4: 475–481.

Kočárek E. (2007) *Molekulární biologie v medicíně*. Brno, Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, ISBN 978-80-7013-450-4.

Koch, J. E., Kolvraa, S., Petersen, K. B., Gregersen, N., and Bolund, L. (1989) Oligonucleotidepriming methods for the chromosome-specific labeling of alpha-satellite DNA In situ. *Chromosoma*, 98 (4): 259-265.

Kubaláková M., Macas J., Doležel J. (1997) Mapping of repeated DNA sequences in plant chromosomes by PRINS and C-PRINS. *Theor Appl Genet*, 94: 758–763.

LaFontaine J.S., Fathe K., Smyth H.D. (2015) Delivery and therapeutic applications of gene editing technologies ZFNs, TALENs, and CRISPR/Cas9. *Int J Pharm*, 494(1):180-94.

Lino C.A., Harper J.C., Carney J.P., Timlin J.A. (2018) Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Deliv*, 25(1):1234-1257.

Liu B., Wendel J. F. (2003) Epigenetic phenomena and the evolution of plant allopolyploids. *Mol Phylogenet Evol*, 29: 365–379.

- Macas J., Doležel J., Gualberti G., Pich U., Schubert I., Lucretti S. (1995) Primer-induced labeling of pea and field bean chromosomes in situ and in suspension. *Biotechniques*, 19(3):402-408.
- Mahfouz M.M., Piatek A., Stewart C.N. Jr. (2014) Genome engineering via TALENs and CRISPR/Cas9 systems: challenges and perspectives. *Plant Biotechnol J*, 12(8):1006-1014.
- Mayer K.F., Martis M., Hedley P.E., a kol. (2011) Unlocking the barley genome by chromosomal and comparative genomics. *Plant Cell*, 23(4):1249-1263.
- Miescher F. (1869a) Letter I; to Wilhelm His; Tübingen, February 26th, 1869. In *Die Histochemischen und Physiologischen Arbeiten von Friedrich Miescher – Aus dem Wissenschaftlichen Briefwechsel von F. Miescher, His W a kol. (eds)*. Leipzig, Germany FCW Vogel, Vol 1 pages: 33–38.
- Němečková A., Wäsch C., Schubert V., Ishii T., Hřibová E., Houben A. (2019) CRISPR/Cas9-Based RGEN-ISL Allows the Simultaneous and Specific Visualization of Proteins, DNA Repeats, and Sites of DNA Replication. *Cytogenet Genome Res*, 159(1):48-53.
- Leitch A.R., Leitch I.J. (2008) Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. *Science*, 320(5875):481-483.
- Loureiro J., Rodriguez E., Doležel J., Santos C. (2006) Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. *Ann Bot*, 98(3):679-689.
- Makarova K.S., Aravind L., Grishin N.V., Rogozin I.B., Koonin E.V. (2002) A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic Acids Res*, 30(2):482-496.
- Miller J.C., Tan S., Qiao G., a kol. (2011) A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*, 29(2):143-148.
- Nemudryi A.A., Valetdinova K.R., Medvedev S.P., Zakian S.M. (2014) TALEN and CRISPR/Cas Genome Editing Systems: Tools of Discovery. *Acta Naturae*, 6(3): 19–40.
- McKinnon K.M. (2018) Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*, 120:5.1.1-5.1.11.

- Ocalewicz K., Woznicki P., Jankun M. (2008) Mapping of rRNA genes and telomeric sequences in Danube salmon (*Hucho hucho*) chromosomes using primed in situ labeling technique (PRINS). *Genetica*, 134 (2): 199-203.
- O'Connell M.R., Oakes B.L., Sternberg S.H., East-Seletsky A., Kaplan M., Doudna J. (2015) Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9. *Nature*, 516(7530): 263–266.
- Ohmido N., Fukui K., Kinoshita T. (2010) Recent advances in rice genome and chromosome structure research by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 86(2):103-116.
- Oliveira, E. J., Pádua, J. G., Zucchi, M. I., Vencovsky, R., Vieira, M. L. C. (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29: 294–307.
- Passarge E. (1979) Emil Heitz and the concept of heterochromatin: longitudinal chromosome differentiation was recognized fifty years ago. *Am J Hum Genet*, 31(2): 106–115.
- Pich U., Meister A., Macas J., Doležel J., Lucretti S., Schubert I. (1995) Primed in situ labelling facilitates flow sorting of similar sized chromosomes. *Plant J*, 7:1039–1044.
- Ramel C. (1997) Mini and Microsatellites. *Environ Health Perspect* 105: 781-789.
- Ramsey J., Schemske D.W. (1998) Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annu Rev Ecol Systemat* , 29: 467–501.
- Ran, F., Hsu, P., Lin, C., Gootenberg, J., Konermann, S., Trevino, A., Scott, D., Inoue, A., Matoba, S., Zhang, Y., Zhang, F. (2013) Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. *Cell*, 154(6): 1380-1389.
- Renny-Byfield S., Chester M., Kovařík A., a kol. (2011) Next generation sequencing reveals genome downsizing in allotetraploid *Nicotiana tabacum*, predominantly through the elimination of paternally derived repetitive DNAs. *Mol Biol Evol*, 28(10):2843-2854.
- Renny-Byfield S., Wendel J.F. (2014) Doubling down on genomes: Polyploidy and crop plants. *Am J Bot*, 101(10):1711–1725.

- Shapiro H. M. (2003) Practical flow cytometry. 4th ed. New York: Wiley-Liss. ISBN 978-0-471-41125-3.
- Sekine K., Takebe T., Taniguchi H. (2014) Fluorescent labeling and visualization of human induced pluripotent stem cells with the use of transcription activator-like effector nucleases. *Transplant Proc*, 46(4):1205-1207.
- Snustad, D. P. a M. J. Simmons (2009) Genetika. Brno: Masarykova univerzita, 2009. ISBN 978-80-210-4852-2.
- Soltis D. E., Albert V. A., Leebens-Mack J., Bell C. D., Paterson A. H., a kol. (2009) Polyploidy and angiosperm diversification. *Am J Bot*, 96 (1): 336–348.
- Soltis D. E., Soltis P. S. (1993) Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *Crit Rev Plant Sci*, 12(3): 243–273.
- Soltis P. S., Soltis D. E. (2009) The role of hybridization in plant speciation. *Annu Rev Plant Biol* , 60: 561-588.
- Stebbins G. L. (1950) Variation and evolution in plants. In: Soltis D. E., Soltis P. S., Tate J. A. [eds.] *Advances in the study of polyploidy since plant speciation*. *New phytologist*, 161 (1): 173-191.
- Stebbins G. L. (1971) *Chromosomal Evolution in Higher Plants*. London: Edward Arnold, 216.
- Sternberg S.H., Redding S., Jinek M., Greene E.C., Doudna J.A. (2014) DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, 507(7490):62-7.
- Suda J. (2005) Co se skrývá za rostlinnou průtokovou cytometrií. *Živa*, 1: 46-48.
- Swift H. H. (1950) The constancy of desoxysibose nucleic acid in plant nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA*, 36(11):643-654.
- Šafář J., Šimková H., Doležel J. (2016) Construction of BAC Libraries from Flow-Sorted Chromosomes. *Methods Mol Biol*, 1429:135-49.
- Šafář J., Šimková H., Kubaláková M., Číhalíková J., Suchánková P., Bartoš J., Doležel J. (2010) Development of Chromosome-Specific BAC Resources for Genomics of Bread Wheat. *Cytogenet Genome Res*, 129(1-3):211-223.

Šafarová D. (2011) Kapitoly z obecné genetiky. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2011. ISBN 978-80-244-2822-2.

Šimková H., Číhalíková J., Vrána J., Lysák M.A., Doležel J. (2003) Preparation of HMW DNA from plant nuclei and chromosomes isolated from root tips. *Biol Plant*, 46:369-373.

van Holde K.E. (1989) Chromatin. Series in molecular biology. Springer-Verlag, New York, page: 497.

Viegas-Pequignot E., Dutrillaux B., Magdelenat H., Coppey-Moisan M. (1989) Mapping of single-copy DNA sequences on human chromosomes by in situ hybridization with biotinylated probes: enhancement of detection sensitivity by intensified-fluorescence digital-imaging microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 582–586.

Vrána J., Cápál P., Šimková H., Karafiátová M., Čížková J., Doležel J. (2016) Flow Analysis and Sorting of Plant Chromosomes. *Curr Protoc Cytom.*, 78:5.3.1-5.3.43.

Thomas Jr, C. A. (1971) The genetic organization of chromosomes. *Annu Rev Genet* 5(1): 237-256.

Tóth, G., Gáspári, Z., Jurka, J. (2000) Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. *Genome Res*, 10 (7): 967–981.

Trewick S. A., Morgan-Richards M., Russell S. J., Henderson S., Rumsey F. J., Pinter I. & Vogel J. C. (2002) Polyploidy, phylogeography and Pleistocene refugia of the rockfern *Asplenium ceterach*: evidence from chloroplast DNA. *Mol Ecol*, 11 (10): 2003-2012.

Vergnaud G., Denoeud F. (2000) Minisatellites: mutability and genome architecture. *Genome Res*, 10(7):899-907.

Wako T., Fukui K. (2010) Higher organization and histone modification of the plant nucleus and chromosome. *Cytogenet Genome Res*, 129(1-3):55-63.

Watson J.D., Crick F.H. (1953) Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356):737-738.

Wendel J. F. (2000) Genome evolution in polyploids. *Plant Mol Biol*, 42(1):225-249.

Wicker T., Taudien S., Houben A., Keller B., Graner A., Platzer M., Stein N. (2009) A whole-genome snapshot of 454 sequences exposes the composition of the barley

genome and provides evidence for parallel evolution of genome size in wheat and barley. *Plant J*, 59(5):712-722.

Wiedenheft B., van Duijn E., Bultema J.B., Waghmare S.P., Zhou K., Barendregt A., Westphal W., Heck A. J. R., Boekema E. J., Dickman M. J., Doudna J. A. (2011) RNA-guided complex from a bacterial immune system enhances target recognition through seed sequence interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108 (25): 10092-10097.

Wnuk, M., Lewinska, A., Bugno, M., Bartosz, G., and Slota, E. (2009) Rapid detection of yeast rRNA genes with primed in situ (PRINS) labeling. *FEMS Yeast Res*, 9(4):634-640.

Wu L. L., Cui X. K., Milne R. I., Sun Y. S. & Liu J. Q. (2010) Multiple autopolyploidizations and range expansion of *Allium przewalskianum* Regel. (Alliaceae) in the Qinghai-Tibetan Plateau. *Mol Ecol*, 19 (8): 1691-1704.

Young S. (2014) CRISPR and Other Genome Editing Tools Boost Medical Research and Gene Therapy's Reach". MIT Technology Review. Cambridge, Massachusetts: Massachusetts Institute of Technology.

Zane L., Bargelloni L. a Patarnello T. (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol Ecol*, 11(1):1-16.

Zhu P., Li G. (2016) Higher-order structure of the 30-nm chromatin fiber revealed by cryo-EM. *IUBMB Life*, 68(11):873-878.