Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2014 Klára Smazová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky

Konstrukce a využití celochromozómových FISH prób

Bakalářská práce

Klára Smazová

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

Olomouc 2014

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

Prohlaġuji, ġe jsem bakaláŚskou práci na téma Konstrukce a vyuġití celochromozómových FISH prób vypracovala samostatnĎ s pomocí vedoucího práce doc. RNDr. Vladana OndŚeje, Ph.D., a ġe jsem citovala vġechny pouġité zdroje.

V Olomouci dne 9. 5. 2014 Podpis.....

Souhrn

Celochromozómovými próbami sestavenými z bakteriálních umělých chromozómů můžeme znaąit jednotlivé chromozómy rostlin s malými genomy. Využívá se při tom metody fluorescenční *in situ* hybridizace. Tato metoda se využívá ke sledování morfologie interfázních jader na nějž se také zaměřuje teoretická ąást práce. Tato bakalářská práce se také zabývá změnami chromatinu způsobenými vlivem stresu na protoplasty. Cílem práce bylo sestavení celochromozómové próby chromozómu 2 *Arabidopsis thaliana*. Podařilo se však naznaąit pouze ątvrtinu chromozómu 2. Tato ąást odpovídá organizátoru jadérka.

Summary

Whole chromosome probes prepared from BAC vectors may be used to individually paint chromosomes of plants with small genomes. Fluorescence *in situ* hybridization is used for this purpose. The theoretical part focuses on using this method to study the morphology of interphase nuclei. This thesis also deals with changes in chromatin caused by the stress on protoplasts. The objective of this work was to assemble the whole chromosome probe for chromosome 2 of *Arabidopsis thaliana*. But only a quarter of the chromosome was successfully hybridised. This part of the chromosome responds to the nucleolus organizer.

Poděkování

Chtěla bych tímto poděkovat svému vedoucímu doc. RNDr. Vladanu Ondřejovi, Ph.D. za vedení a cenné rady při zpracování mé bakalářské práce.

Obsah

1 Cíle práce 9

2 Úvod 10

3 Teoretická část 11

3.1 *Arabidopsis thaliana* 11

3.1.1 Genom 11

3.1.2 Chromocentra 13

3.1.3 Interfázní jádro *Arabidopsis thaliana* 13

3.1.4 Uspořádání teritorií *Arabidopsis thaliana* 14

3.1.5 Změna v teritoriích při expresi 15

3.2 Fluorescenční *in situ* hybridizace 16

3.2.1 BAC knihovny 16

3.2.2 Bacteriální umělý chromozóm (BAC) 17

3.2.3 Celochromozómové barvení 18

3.3 Organizace genomu a vztah ke genomové funkci 19

3.3.1 Primární organizace genomu 19

3.3.2 Sekundární organizace 20

3.3.3 Terciální organizace 20

3.3.4 Kompaktnost chromatinu 20

3.3.5 Pozice chromatinového vlákna v jádře 21

3.3.6 Teorie kompaktního chromozomálního vlákna 22

3.3.7 Variace od buňky k buňce 23

3.4 Chromozómová teritoria 23

3.5 Reakce rostlin na stres 25

3.5.1 Protoplasty 25

3.5.2 Dediferenciace 26

3.5.3 Reaktivní kyslíkové radikály (ROS) 26

3.5.4 Dekondenzace chromatinu 27

4 Praktická část 29

4.1 Biologický materiál 29

4.2 Přístroje 29

4.3 Chemikálie a roztoky 30

4.4 Metody 34

4.4.1 Množení bakterií 34
4.4.2 Izolace DNA 34
4.4.3 DOP PCR 35
4.4.4 Nick-Translace 35
4.4.5 Převedení próby do formamidu 35
4.4.6 Denaturace sondy 36
4.4.7 Elektroforéza 36
4.4.8 Sterilizace semen *Arabidopsis* 36
4.4.9 Vysazení semínek 37
4.4.10 Izolace protoplastů 37
4.4.11 FISH metoda 37
5 Výsledky 39
6 Diskuze 45
7 Závěr 47
8 Seznam zkratek a pojmů 48
9 Zdroje 49

1 Cíle práce

Teoretická ļást práce se zabývá genomem *Arabidopsis thaliana*, principem sestavení a pouģití FISH sondy a knihoven bakteriálních umĐlých chromozómŢ (BAC). ZamĐśuji se na organizaci genomu interfázního jádra a jeho uspoŚádání v chromozómových teritoriích. Teoretická ļást se dále zabývá zmĐnami v interfázním jádŚe protoplastŢ po prŢbĐhu diferenciace a moģným epigenetickým vlivem stresu na stavbu chromozómových teritorií.

Cílem práce bylo vyuģití BAC klonŢ k sestrojení celochromozómové próby chromozómu 2 *Arabidopsis thaliana*. NásledněsledovánístresovýchzmĐn pomocí FISH sondy v interfázních jádrech protoplastŢ.

2 Úvod

Arabidopsis thaliana je modelovým organismem genetiky. Celý genom byl osekvenován pomocí brzy (roku 2000) a krátce na to byly sestaveny knihovny umělých bakteriálních chromozómů (BAC). Bakteriální klony mohou sloužit jako sondy pro fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH). Touto metodou se pomocí fluorescenčně značené sondy zviditelní specifická sekvence DNA. Fluorescenční *in situ* hybridizaci jsme zvolili pro vizualizaci chromozómů v interfázním jádře protoplastů *A. thaliana*.

Studium chromozómových teritorií *Arabidopsis* je zajímavé, protože má odlišnou architekturu jádra než rostliny s velkými genomy, které zaujímají Rablovu konfiguraci. *Arabidopsis* je také rostlinou, která byla nabarvena celochromozomálními sondami sestavenými z BAC klonů (Lysak *et al.*, 2001) Tímto způsobem je možné nabarvit pouze rostliny s malými genomy. Protože se celochromozómové barvení u rostlin s většími genomy příliš nedaří, organizace genomu je u rostlinných buněk méně popsána než u živočišných buněk.

Celochromozómové barvení se využívá k analýzám uspořádání genomů a organizaci chromozómových teritorií v interfázních jádrech. Dále je možné tuto metodu použít i pro studium chromatinových změn u buněk protoplastů, které během své dediferenciace a při zpětném vstoupení do buněčného cyklu prodělávají rozsáhlou chromatinovou dekondenzaci a následnou rekondenzaci spojenou s přeprogramováním buňky.

3 Teoretická ļást

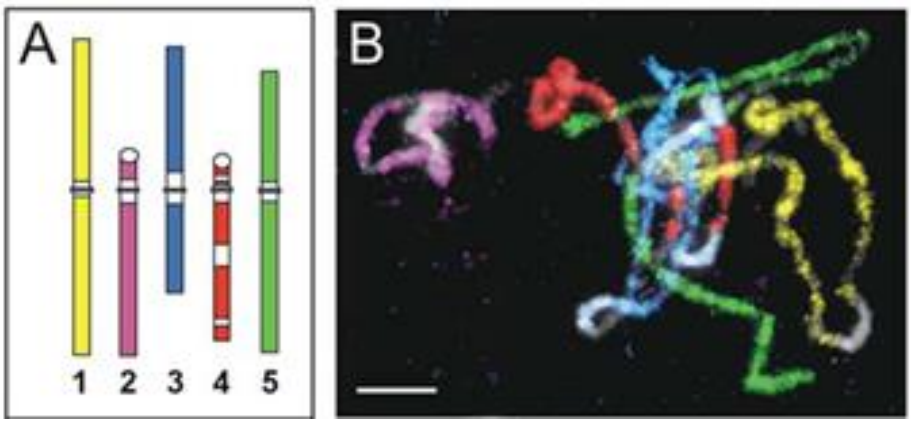
3.1 *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana je dŢleģitým modelovým organismem pro identifikaci genŢ a urļení jejich funkcí. Jedná se o první osekvenovanou rostlinu. Pro genomovou analýzu má mnoho výhod, zahrnující krátký ģivotní cyklus, malou velikost, velké mnoģství potomstva a relativnĎ malý jaderný genom. Tyto výhody umoģnily ģiroké vyuģité a charakterizaci mnoha genŢ (Meinke *et al*., 1998).

3.1.1 Genom

Genom *Arabidopsis thaliana* se skládá z pĎti chromozómŢ a jeho celková velikost je pŚibliģnĎ 135 Mb (Arabidopsis.org). Dva nejvĎtší chromozómy 1 a 5 jsou metacentrické a dva nejkratší chromozómy 2 a 4 jsou akrocentrické a na krátkých ramenech nesou subterminálnĎ organizátor jadérka. Zatímco chromozóm 3 je submetacentrický a stŚední velikosti (Fransz *et al*., 1998).

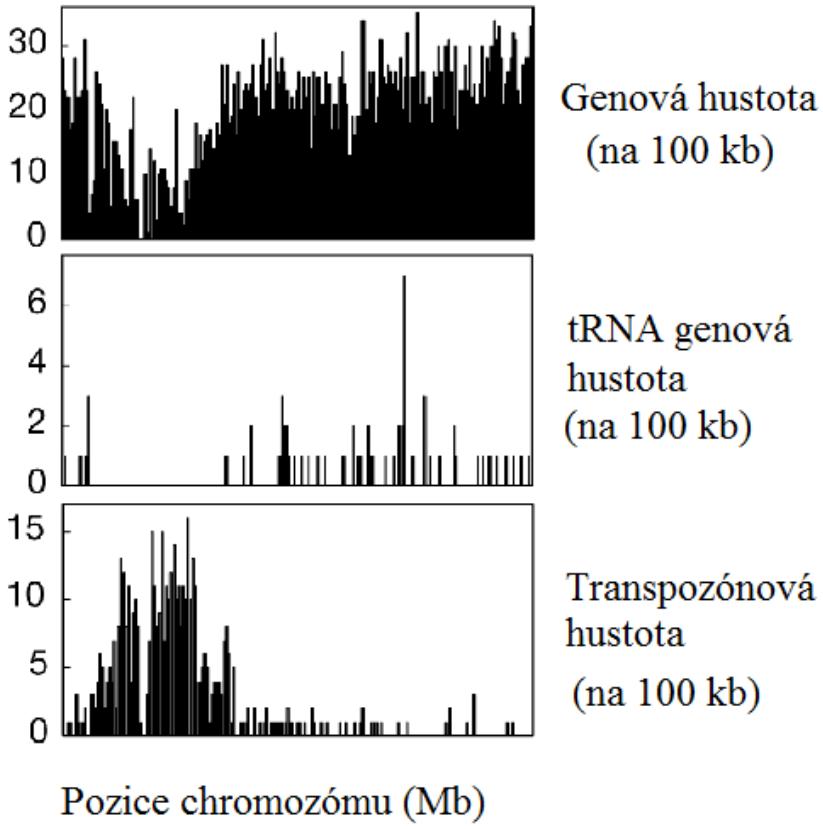
U *Arabidopsis thaliana* se v genomu nachází málo repetic, ty jsou shromáģdĎny hlavnĎ v pericentromerickém chromatinu a organizátoru jadérka (NOR). Organizátory jadérka obsahují soubory jednotlivých repetitivních sekvencích kódující 18S, 5,8S a 25S ribozomální RNA geny a jsou transkribovány RNA polymerázou I. Zatímco 5S RNA geny jsou pŚepisovány RNA polymerázou III a jsou v heterogenních souborech umístĎny v centromerických oblastech chromozómŢ 3, 4 a 5. Dohromady tato rRNA tvoŚí katalytické jádro cytoplazmatických ribozómŢ (Arabidopsis genome initiative).



Obr. ļ. 1 ï Barevné schéma chromozómŢ *Arabidopsis thaliana* a vizualizace chromozomálních párŢ pomocí celochromozómových prób. Podle Pecinka *et al*. 2004.

3.1.1.1 Chromozóm 2

Chromozóm 2 je druhý nejkratší chromozóm *Arabidopsis thaliana*. Je akrocentrický a na svém krátkém raménku nese oblast organizátoru jadérka. V této oblasti se nachází tandemové repetice pro rRNA geny, což jsou nejkonzervovanější a nejvíce transkribované geny. Geny kódující tRNA jsou rozmístěny nejvíce na dlouhém raménku chromozómu. Repetitivní sekvence jsou přibližně rovnoměrně distribuovány na celém chromozómu, kromě oblasti centromery. Rovněž hustota genů a exprese jsou konzistentní po celé délce chromozómu s výjimkou pericentromerické oblasti. V pericentromerické oblasti se nachází velmi malý počet genů, jedná se o oblast nízké exprese. Do této oblasti je také vlněno značné množství transpozónů, jak ukazuje obr. č. 2, ale také se zde nejvíce vyskytuje mitochondriální a chloroplastová DNA (Arabidopsis genome initiative, 2000).



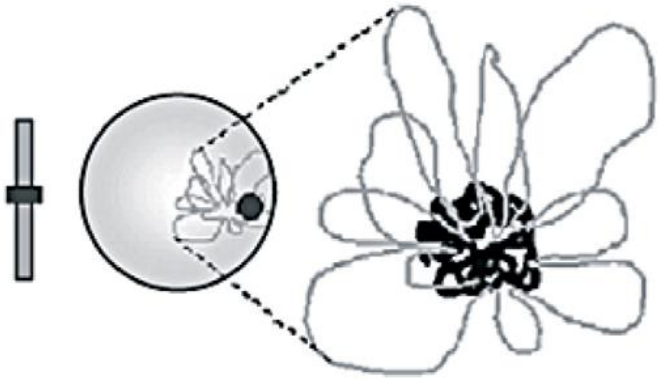
Obr. č. 2 – Graf hustoty distribuce transpozónů a genů na chromozómu 2 *Arabidopsis thaliana*. Upraveno podle Lin 1999.

3.1.2 Chromocentra

Chromocentra u *Arabidopsis thaliana* jsou oddělené jaderné domény hlavně z pericentrického heterochromatinu zahrnující tandemové a rozptýlené repetice. Chromocentra jsou složena z pericentrických oblastí všech chromozómů a u chromozómů 2 a 4 také obsahují subtelomerické 45S rDNA ribozomální repetitivní oblasti. Genově bohaté chromozomální části jsou méně kondenzované a uspořádané do smyček tvořících rozetovou strukturu (Fransz *et al*., 2002).

Reorganizace chromocenter v protoplastech *Arabidopsis* zajistila systém pro studování dynamiky a molekulárních mechanizmů heterochromatinového uspořádání ve vyšších eukaryotních organismech.

Cytogenetické studie prokázaly, že chromocentra se mohou během vývojových stádií zvětšovat (Tessadori *et al*., 2004). Navzdory tomu, že jsou chromocentra oblasti v genomu chudé na geny je jejich přechodná disociace v protoplastech zapojená do správného organizování vývojového plánu (Fransz *et al*., 2006).

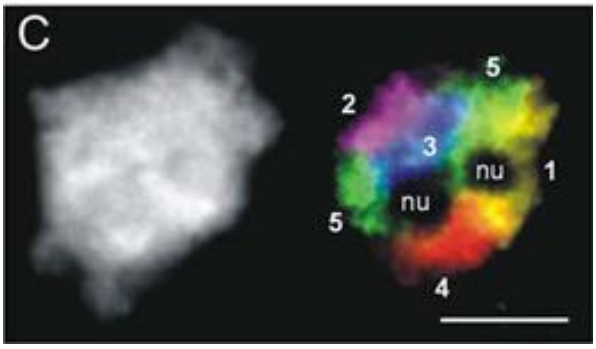


Obr. č. 3 – Model CT architektury buněčného jádra u *Arabidopsis thaliana*. Každé CT je tvořené chromocentrem, ze kterého vybíhají velké euchromatinové smyčky. Podle Cremer 2007.

3.1.3 Interfázní jádro *Arabidopsis thaliana*

Diferenciální barvení všech pěti chromozómových párů *Arabidopsis thaliana* poprvé odhalilo interfázní chromozómové uspořádání v euploidních rostlinách (Pecinka *et al*., 2004). Kdy zatímco jádra mnoha rostlinných druhů s velkými genomy a metacentrickými chromozómy vykazují takzvanou Rablovu orientaci s centromerickými oblastmi shromážděnými na jednom

pólu a telomerickými oblastmi shromážděnými na opačném pólu, interfázní jádro *Arabidopsis thaliana* Rablovu konfiguraci nezaujímá. Místo toho uvnitř jejich odlišných chromozómových teritorií jsou heterochromatinové centromerické oblasti náhodně umístěny na periferii jádra, telomery jsou nashromážděny okolo jadérka a chromozómová ramena formují euchromatinové smyčky rozdílné velikosti vycházející z heterochromatinových chromocenter (Fransz *et al*., 2002; Pecinka *et al*., 2004).



Obr. č. 4 - Interfázní jádro *Arabidopsis thaliana* s chromozómovými teritorii vizualizovanými celochromozómovými sondami. Podle Pecinka *et al.* 2004.

3.1.4 Uspořádání teritorií *Arabidopsis thaliana*

Z velké části náhodná poloha chromozómových teritorií a uspořádání heterochromatinových domén ve všech studovaných diferenciovaných i meristematických typech buněk ukazuje, že buněčná diferenciace nemá váţný vliv na tyto parametry jaderné organizace v rámci studovaných pletiv *Arabidopsis thaliana* (Berr *et al*., 2007).

V jádře *A. thaliana* byla nalezena znatelná a chromozómově specifická asociace homologických centromer (Fransz *et al*., 2002).

Frekvence asociace je pro teritoria homologních chromozómových ramen náhodná pro chromozómy 1, 3, 5 a vyšší je asociace chromozómů 2 a 4 u všech testovaných typů jader. Asociace celých homologických chromozómů 2 a 4 a úplná separace byla méně častá, než byla předpokládaná náhodná frekvence ve všech testovaných typech jader *Arabidopsis thaliana*. Znatelný nárůst v asociační frekvenci homologních teritorií celých a horních ramen chromozómů 2 a 4 je zřejmě kvůli častému přichycení organizátorů jadérka k jednomu určitému jadérku (ve více než 90% jader) ve způsobu zprostředkování asociace homologů (Pecinka *et al*., 2004).

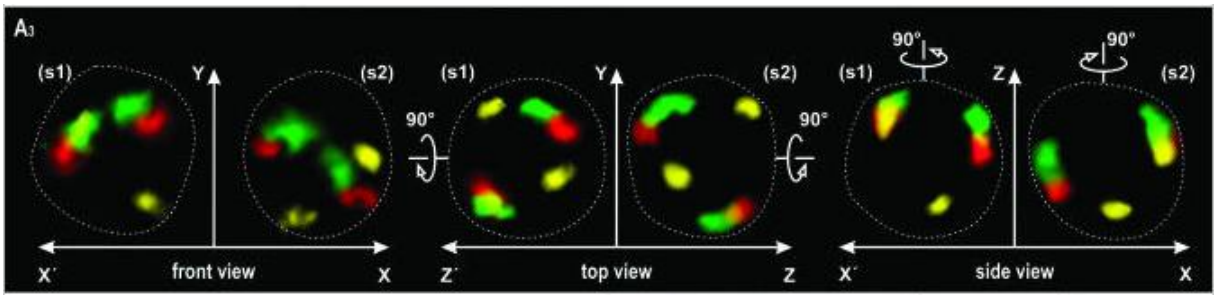
Sledováním dynamiky uspoŚádání chromozómových teritorií v sesterských buŔkách *A. thaliana*, byla nalezena zrcadlová symetrie homologních chromozómových teritorií ihned po probŊhnutí mitózy, toto uspoŚádání se ļasem rozpadá. Tato symetrie vģak není patrná mezi sousedními spojenými, ale nesesterskými jádry nebo mezi sesterskými jádry plnŊ diferenciovaných svŊracích bunŊk prŢduchŢ (Berr *et al*., 2007).

UspoŚádání chromozómových teritorií se víceménŊ neliģí u jader se stejným tvarem, i kdyģ jsou izolována z rŢzných orgánŢ (Pecinka *et al*., 2004) nebo v rámci nŊkolika odliģných diferenciovaných a meristematických bunŊļných typŢ neporuģených pletiv *A. thaliana*.

PoļetperifernŊ umístŊných centromerických heterochromatinových blokŢ se zvýģil v endoreduplikujících buŔkách, nejspíše protoģe prostorová centromerická asociace je zbrzdŊna zvyģujícím se poļtem identických chromatid (Schubert *et al*., 2006).

Bylo také zjištŊno, ģe signály NOR se spojují ļastŊji v diferencovaných buŔkách, coģ mŢģe být vysvŊtleno jejich nasedáním na stejné jadérko, které je u diferencovaných bunŊk menģí neģ u bunŊk meristematických (Berr *et al*., 2007).

Jaderná architektura se tak zdá být náhodná, jelikoģ není urļená morfologickými omezeními jako je tvar jádra, jaderný obsah nebo endopolyploidní stupeŔ. Chromozómová teritoria se od sebe neliģí u diferencovaných a meristematických bunŊk (Berr *et al*., 2007).



Obr. ļ. 5 - Porovnání zrcadlové symetrie sesterských bunŊk *Arabidopsis thaliana* podle Berr 2007.

3.1.5 ZmŊna v teritoriích pŚi expresi

Pro testování jestli transkripļní aktivita mŢģe mít vliv na organizaci CT, to znamená, jestli transkribovaný gen zabírá jinou pozici vzhledem ke svému CT neģ v umlļeném stavu, byla testována relativní pozice FWA genu (gen pro kvetení) u *Arabidopsis thaliana* pro jeho pŚítomnost uvnitŚ nebo vnŊ teritoria, umístŊného na spodním ramenu chromozómu 4, v aktivní a umlļeném stavu. Nenaģel se ģádný znatelný rozdíl. Relativní pozice genu FWA

uvnitř CT tedy nezáležela na transkripčním stavu (Pecinka *et al.*, 2004). Bylo však již prokázáno, že transkripční aktivace může pozici genů.

3.2 Fluorescenční *in situ* hybridizace

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je cytogenetická metoda lokalizace sekvencí nukleových kyselin hybridizací fluorescenčně značených sond. Tato metoda umožňuje lokalizaci a naznačení genů a specifických genomových oblastí na cílových chromozómech. Cílová nukleová kyselina hybridizuje s komplementární fluorescenčně značenou sondou. Hybridizace *in situ* znamená, že cílová nukleová kyselina je přítomna v biologickém materiálu, nemusí se izolovat.

FISH metoda znamenala pro cytogenetiku velký průlom. Hybridizační metody mají široké využití v molekulární biologii a medicíně. V prenatální diagnostice při zjišťování genetických poruch, při detekci genových i chromozomálních aberací. Značný význam má tato metoda při mapování genomů, k analýzám genové exprese a detekcím specifických transkriptů RNA (Kočárek, 2007).

Jako sondy se používají úseky klonované DNA izolovaných z vektorů, kdy se jako vektory používají plazmidy, vektory odvozené od bakteriofágů, kosmidy, fágomidy a umělé chromozómy (BAC, YAC, PAC), (Snustad *et* Simmons, 2009).

3.2.1 BAC knihovny

Rozlišujeme genomové a komplementární DNA (cDNA) knihovny. Genomové knihovny vznikly naštěpením celkové DNA. Zahrnují nejen kódující DNA, ale i introny, regulační oblasti genů a repetitivní sekvence. Výhodou cDNA knihoven je, že obsahují pouze kódující sekvence genů, mohou se využívat k určení pořadí aminokyselin nebo přímo k syntéze daného proteinu. Knihovny cDNA se sestavují přepisem mRNA reverzní transkriptázou do DNA sekvence. DNA se restrikční endonukleázou naštěpá na fragmenty, které se vkládají do vektorů (Alberts *et al.*, 2005).

Knihovny umělých bakteriálních chromozómů jsou důležitými nástroji pro mapování a analýzu genomů. BAC knihovny se výrazně podílely na projektech genomového sekvencování (Asakawa *et al.*, 1997; Dunham *et al.*, 1999) a na klonování genů způsobujících onemocnění (Kitada *et al.*, 1998).

Jestliġe je potŚeba získat velký poļet kopií fragmentu DNA, vyuġívá se k tomu klonování pomocí bakteriálních vektorŢ, do nichġ se vkládá inzert DNA pro amplifikaci. Bakteriálním vektorem je plazmid, který má vŊtġinou kolem nŊkolika tisíc párŢ bází. Jedná se kruhovou molekulu replikující se nezávisle na bakteriálním chromozómu. Kaġdý klonovací vektor musí mít poļátek replikace, dominantní selekļní marker a mnohoļetné klonovací místo.

Pro vnesení inzertu je dŢleġité, aby mŊl plazmid místo rozeznávané restrikļní endonukleázou, která plazmid i fragment DNA rozġtŊpí, za souļasného vytvoŚení kohezivních koncŢ. Následuje inzerce fragmentu DNA a ligace kohezivních koncŢ DNA ligázou. Tímto zpŢsobem se vytvoŚí rekombinantní molekula, která se vnáġí transformací do bakteriální buŔky. Pro transformaci se musí pouġívat kompetentní buŔky, kultivované tak, aby mŊly propustnou bunŊļnou stŊnu. Cytoplazmatická membrána se destabilizuje teplotním ġokem ļi elektroporací, poté se vektor transformuje do buŔky.

Podle selekļního markeru se odliġují buŔky s inzertem a bez inzertu. Jako selekļní marker se vyuġívá rezistence na antibiotikum, lacZ-gen nebo letální gen ccdB.

E. coli se dokáġe dŊlit kaġdých 30 minut, dennŊ tak mohou vznikat stovky miliónŢ kopií plazmidu. Transformované bakterie se lyzují a izoluje se DNA plazmidu, ze kterého mŢġeme získat pŢvodní fragment DNA (Alberts *et al.*, 2005).

DŚíve pouġívané vektory YAC, které se pouġívaly k vytváŚení map, jsou ļasto nestabilní chimérické povahy (Green *et al.*, 1991; Larinov *et al.*, 1994; Koupriva *et al.*, 1994). DNA klonovanou v YAC vektorech je obtíġné získat v ļisté formŊ. Bylo nutné najít nový vektor s velkým inzertem, který je stabilní a snadný pro manipulaci.

3.2.2 Bacteriální umŊlý chromozóm (BAC)

Byl vyvinut jako vektor k umoġnŊní klonování a stabilním uchování velkého inzertu DNA v *Escherichia coli*. BAC vektorem je jednokopiový plazmid F faktor, klony jsou velmi stabilní po mnoho generací. BAC systém je zaloġený na dobŚe prostudovaném F faktoru *E. coli*. Replikace F faktoru v *E. coli* je striktnŊ kontrolována (Willetts *et al.*, 1987). F plazmid je udrġován v jedné nebo dvou kopiích na buŔku, a tak sniġuje potenciál pro rekombinaci mezi DNA fragmenty nesenými v plazmidu (Shibuya *et al.*, 1992).

Tento vektor dokáġe uchovat i více neġ 300 kb. BAC klonovací systém má výhody velké klonovací úļinnosti, jednoduchou manipulací s klonovanou DNA, ve stabilním udrġení vloġené DNA a jednoduchou purifikací alkalickou lyzí (Katagiri *et al.*, 2001).

Jedním z dŧleţitých aspektŧ v kaţdém klonovacím systému je genetická stabilita klonované DNA. Výsledky prokázaly stabilní strukturu DNA v BAC vektoru, to znamená, ţe klonovaná DNA je stabilním zdrojem specifických fragmentŧ. (Shibuya *et al*., 1992)

U nŕkterých klonŧ v genomických knihovnách se mŧţe pŕedpokládat nestabilita v urţitém hostiteli a to kvŧli rekombinantní aktivitŕ specifických DNA sekvencí. Bakteriální systém má ty výhody, ţe cesta genetické rekombinace v *E. coli* byla podrobnŕ popsána a problémy nestability se mohou vyŕešit použitím vhodného bakteriálního mutanta, kterému chybí nŕkteré rekombinaţní funkce. (Shibuya *et al*., 1992)

Pro kvalitu BAC knihovny jsou dŧleţité urţité podmínky. Zaprvé velké procento klonŧ by mělo mít inzert, a podíl chimérických klonŧ by mŕl být nízký. Zadruhé by velikost inzertu mŕla být velká a homogenní. Nakonec by mŕla knihovna obsahovat velký poţet nezávislých klonŧ.

3.2.3 Celochromozómové barvení

Celochromozómové barvení se stalo silným nástrojem k identifikaci chromozómŧ a jejich aberací pro diagnostické úţely. Dále také k testování mutagenicity, stejnŕ jako studie karyotypických zmŕn v prŧbŕhu evoluce.

U rostlin však celochromozómové barvení selhalo, tato snaha nepŕinesla jednoznaţné a reprodukovatelné výsledky. Celochromozómové barvení se delší dobu nedaŕilo provést na rostlinách kvŧli velkému poţtu rozptýlených repetic. Pro potlaţení rozptýlených repetic nefungovala ani cotDNA ani genomická DNA (Fuchs *et al*., 1996).

Pomocí genomové *in situ* hybridizace bylo moţné naznaţit pouze celý genom rostliny, nikoliv jednotlivé chromozómy. FISH barvení bylo aţ pozdŕji úspŕšnŕ provedeno za použití BAC/YAC inzertŧ na rostlinách s malým genomem, bez velkého mnoţství repetitivních sekvencí v genomu (Fransz *et al*., 2000).

První nabarvený chromozóm u *Arabidopsis thaliana* byl chromozóm 4, který je nejkratší. Barvení je u *Arabidopsis thaliana* moţné díky malému výskytu repetitivních sekvencí a malému genomu. BAC klony byly pŕipraveny brzy poté, co byl osekvenován genom. Avšak není moţná mikrodisekce ani tŕídŕní chromozómŧ flow-cytometrií kvŧli jejich pŕíliš malé velikosti, i kdyţ by barvení pomocí celých chromozómŧ nejspíše bylo moţné (Lysak *et al*., 2001).

Nyní, kdyţ je barvení moţné pomocí BAC, umoţŕuje nám poprvé nabarvit celý autozóm pro studium rearangementu, homologických asociací, interfázních chromozómových teritorií

a identifikaci homologických chromozómů u příbuzných druhů. Můžeme také sledovat chromozóm během různých vývojových stádií (Lysak *et al.*, 2001).

Barvení chromozómů rostlin chromozomální *in situ* supresní hybridizací není jednoduše proveditelný, zjevně kvůli velkému počtu a komplexnosti interchromozomálně rozptýlených repetitivních sekvencí, který nemohou být účinně zablokovány, když jsou sekvence odvozené od chromozómů použity jako sondy (Schubert *et al.*, 2001). Zatím tak mohou být jednotlivá chromozomální teritoria v jádře rostlin sledována pouze u alien chromozómů vyskytujících se u mezidruhových hybridů pomocí genomické *in situ* hybridizace (Schwarzacher *et al.*, 1989). Avšak u sledování cizorodých chromozómů si nemůžeme být jisti, jestli se v jádře nechovají jiným způsobem než chromozómy původní (Goetze *et al.*, 2007).

3.3 Organizace genomu a vztah ke genomové funkci

Buňky vyšších eukaryot jsou schopny efektivně a spolehlivě kontrolovat transkripční aktivitu nejen desítek tisíc genů kódujících proteiny, ale i neznámého počtu genů s odlišnými funkcemi. Buňky regulují transkripci nejméně dvěma způsoby. Prvním jsou transkripční faktory kontrolující genovou aktivaci a represi, ty fungují kombinačním způsobem. Druhým způsobem kontroly genové exprese je prostorové uspořádání genomu v interfázním jádře. Zatímco první způsob regulace je intenzivně studován, o tom, jak se 3D genomová organizace podílí na regulaci transkripce, víme pomněnu málo (Goetze *et al.*, 2007).

3.3.1 Primární organizace genomu

Geny v 1D eukaryotickém genomu nejsou uspořádány náhodně. Geny kódující proteiny se stejnou nebo podobnou funkcí jsou příležitostně shlukovány jako geny pro beta globin (Sproul *et al.*, 2005), Hox proteiny (Garcia-Fernandez *et al.*, 2005) jaderné histony apod. Tyto a jiné genové clustery po transkripční aktivaci dekondenzují (Chambeyron *et al.*, 2005). Další genomické shlukování se vztahuje ke genové expresi, a bylo prokázáno lidskou mapou transkriptomu (Caron *et al.*, 2001). Geny se shlukují do oblastí zvýšené genetické exprese tzv. ridges (regions of increased gene expression), které jsou více ve vnitru jádra. Ridges jsou genově bohaté narozdíl od antiridges. Geny s nižší expresí vytvářejí antiridges, které se nalézají blíže jaderné periférii a jsou 1,4x kompaktnější než ridges a mají více sférický tvar.

Navzdory velké variaci od buňky k buňce, ridges a antiridges prokazatelně mají odlišnou chromatinovou strukturu. Tyto strukturní parametry se zdají být nezávislé na vzoru genové exprese, diferenciačním stavu a karyotypu (Goetze *et al.*, 2007b).

3.3.2 Sekundární organizace

Druhý stupeň genomové organizace je založený na interakcí DNA s proteiny, kdy reaguje s histony a proteiny nehistonové povahy. Nejvýznamnější je interakce DNA s histony za formování nukleozómu. Tato interakce vede k formování chromatinu. Mezi proteiny nehistonové povahy patří RNA-polymerázy, proteiny transkripčního aparátu a proteiny skupiny vysoké pohyblivosti tzv. HMG proteiny (high mobility group). Interakcí DNA vlákna s proteiny se formuje chromatinová struktura, která je důležitá pro transkripci, replikaci a opravy DNA. Postranslační modifikace histonů umožňuje vytvoření struktury pro transkripční přístup ke genovému lokusu. Většina hmoty chromatinu je tvořena právě proteiny.

Podle stupně kondenzace rozlišujeme dva stavy chromatinu. Euchromatin je v dekondenzovaném stavu a je transkripčně aktivní. Heterochromatin se ještě dále dělí na fakultativní a konstitutivní. Fakultativní heterochromatin se během ontogeneze organizmu může stát transkripčně aktivním, zatímco konstitutivní heterochromatin se nachází v kondenzovaném stavu po celý buněčný cyklus a ve všech buňkách organismu, jedná se o jednoduché repetitivní sekvence DNA (Rosypal, 1999).

3.3.3 Terciální organizace

Eukaryotické jádro je velmi členité. Každý chromozóm zabírá své místo v jádře a má preferovanou radiální pozici (Cremer *et al.*, 2001). Příkladem členění je také shlukování rRNA genů v jadérku, které se nacházejí na odlišných chromozómech.

Radiální pozice chromozómových teritorií chudých a bohatých na geny byla zjištěna, že se liší od buňky k buňce, i když průměrné hodnoty ukazují znatelnou korelaci s genovou hustotou. (Goetze *et al.*, 2007b)

3.3.4 Kompaktnost chromatinu

Kompaktní stav koreluje s transkripčními stupni (ridges, antiridges), avšak kompaktnost si ridges a antiridges udržují stále. Pro dekondenzovaný stav ridges není nutná probíhající transkripce. Tato otevřená struktura je zřejmě zapříčiněna relativně silnými interakcemi chromatinu pravděpodobně s proteinovými komplexy.

Odlišnosti v kompaktnosti ridges a antiridges přetrvávají i po biochemické frakcionaci (Gilbert *et al.*, 2004). Tyto rozdíly nejspíše způsobují odlišnosti v hustotě genů, délka mezigenových sekvencí nebo specifické ještě neidentifikované sekvenční elementy. Je zde

také možnost, že specifické sety proteinů a nekódující RNA mohou být vázány k funkčně odlišným typům genomických domén a tím způsobovat odlišné typy chromatinového skládání.

Struktury domén mohou dále ovlivňovat posttranslačně modifikované histony, kdy bylo zjištěno, že se transkripčně aktivní domény překrývají s histon H3 acetylovanými ostrovy. Genomická distribuce těchto acetylovaných ostrovů znatelně koreluje s ridges (Roh *et al.*, 2005).

Při analýze genových shluků HOXA a HOXB se ukázalo, že se po aktivaci znatelně dekondenzují (Chambeyron 2005). Zjištěna byla i dekondenzace chromatinového lokusu po navázání transkripčního aktivátoru i dokonce, pokud transkripce neprobíhá (Tumbar *et al.*, 1999).

Byla rovněž vyslovena hypotéza, že ridges a antiridges vytvářejí mikroprostředí vlastní nízké a vysoké genové exprese. Ta by se mohla otestovat vložením reportérového genu se slabým promotorem do jiné pozice v genomu. Hypotéza pak předpokládá, že reportérový gen bude mít vyšší aktivitu, pokud bude vložen do ridges než do antiridges (Gierman *et al.*, 2007).

3.3.5 Pozice chromatinového vlákna v jádře

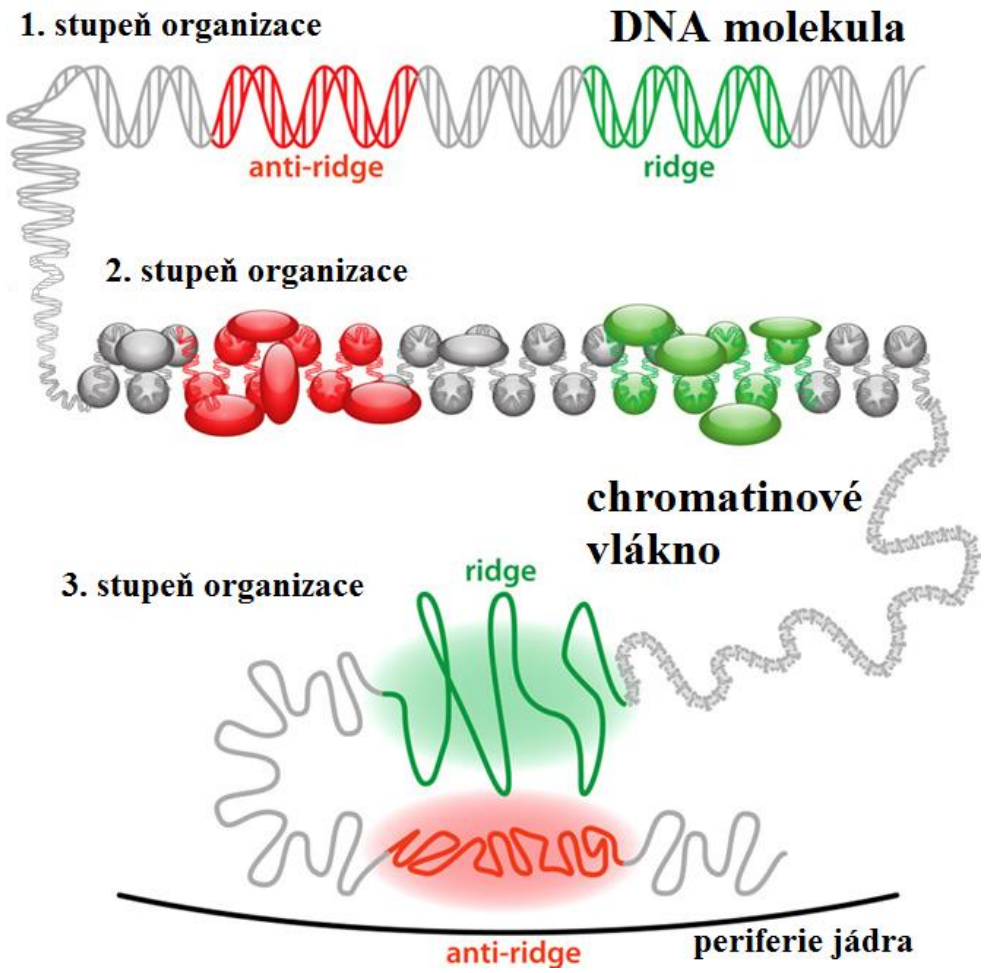
Prostorové uspořádání chromatinového vlákna v interfázním jádře či jaderná pozice. Korelace mezi transkripční aktivitou a pozicí v jádře byla popsána pro geny, shluky genů i celá chromozómová teritoria. Prokázáno bylo, že aktivní geny jsou umístěny blíže středu jádra než inaktivní geny, i když jsou známy i výjimky (Dietzel *et al.*, 2004). Například u kvasinek je transkripčně umlčený chromatin přípevněn k jaderné membráně pravděpodobně pomocí heterochromatinových faktorů (Taddei *et al.*, 2004). Pro chromozómová teritoria byla nalezena korelace mezi průměrnou pozicí v jádře a celkovou trankripční aktivitou a genovou hustotou, více aktivní chromozómy jsou preferenčně umístěny ve vnitru jádra, zatímco méně aktivní teritoria se vyskytují blíže periférii (Bridger *et al.*, 2000). Jiné studie tvrdí, že je korelace mezi velikosti chromozómového teritoria a radiální pozici v jádře (Bolzer *et al.*, 2005).

Transkripční status jednotlivých genů není ovlivněn pouze jejich pozicí v interfázním jádře, ale také blízkými geny a regulačními elementy, které ovlivňují 3D strukturu genomu a tak i funkční stav jednotlivých genů. Bylo prokázáno, že transkripční aktivace mění pozici genů. Příkladem takové co-determinace je uspořádání ridges, kdy ne všechny geny v ridges jsou aktivní, avšak ridges mají vyšší pravděpodobnost vyskytovat se v jaderném středu (Goetze *et al.*, 2007b).

3.3.6 Teorie kompaktního chromozomálního vlákna

Chromozomální vlákno v interfázi se samo se sebou nepromíchává. Výsledky ukazují, že odlišné části stejného chromozómového ramene vykazují velmi malý intermingling. Stejně nízký stupeň překrývání byl nalezen u ostatních genově chudých a genově bohatých domén (Shopland *et al.*, 2006) pro p a q rameno odlišných chromozómů (Dietzel *et al.*, 98) a pro kompletní chromozómová teritoria (Bolzer *et al.*, 2005).

Promíchávání mezi odlišnými chromozómovými teritorii může být tak vysoké jako 20% jaderného obsahu, kdy většinou dochází k překrývání na okrajích teritorií (Branco *et al.*, 2006). To je více než se zjistilo pro intrachromozomální mísení. Jestli je to pravda, pak promíchávání uvnitř CT více omezené než mezi odlišnými chromozómy. Chromozomální vlákno je silnější, více dekondenzované a více nepravidelně tvarované v genově bohatých doménách (ridges) a více kompaktní a tenčí v geneticky chudých oblastech (antiridges).



Obr. č. 6 - Schéma organizace DNA molekuly do chromatinového vlákna, vysoce exprimovaných oblastí a méně exprimovaných oblastí. Upraveno podle Goetze 2007b.

3.3.7 Variace od buňky k buňce

Předchozí teorie byla uvedená v průměru nebo v celkové rovině. Skládání chromatinu, jeho kompaktnost a pozice v jádře se však liší od buňky k buňce. Všechny tyto parametry ovlivňují genomovou funkci. Pro příklad radiální pozice genově bohatých a genově chudých chromozómových teritorií se podstatně lišila od buňky k buňce, zatímco průměrná čísla ukazují znalou závislost na genové hustotě (Boyle *et al*., 2001). Variabilita genových buněk zahrnuje také kompaktnost a radiální pozici ridges a antiridges (Goetze *et al*., 2007).

Co nám takovéto variace v genomové organizaci říkají? Očividně může být chromatin poskládán mnoha způsoby a stále být funkční. Termín chromatinová struktura označuje ve skutečnosti soubor různě poskládaných struktur chromatinového vlákna. Různí členové tohoto souboru se mohou znatelně lišit.

Co způsobuje variaci?

Důležité možné vysvětlení pozorované variace je nucená difúze chromatinu v interfázi. V časovém rozmezí minut se při pozorování fluorescenčně značeného lokusu v interfázním jádře zjistilo, že se může posunout o několik desetin mikrometrů nebo více. Difúze tedy může být jeden z hlavních důvodů variace od buňky k buňce (Goetze *et al*., 2007).

Pomocí difúze je přenos genů možný do odlišného prostředí, které může stimulovat nebo inhibovat transkripci. Je také možné, že přesná organizace chromatinu není tak důležitá pro buněčnou funkci a energetická bariéra mezi odlišnými stavy je malá.

3.4 Chromozómová teritoria

Na konci 19. století se vědci začali zajímat o problematiku chromozómového uspořádání v interfázním jádře a byly navrženy dva modely:

Rableho model – model říkající, že každý chromozóm zabírá určité teritorium a prolíná se pouze se sousedním teritoriem.

Špagetový model – předpokládal náhodné uspořádání chromozómů v prostoru, kde se chromozómy různě proplétaly a prolínají se navzájem bez nějaké organizace.

Po celých sto let nebyl nikdo schopen potvrdit nebo vyvrátit tyto teorie. Až roku 1980 se bratři Cremerové rozhodli experimentálně dokázat, která teorie je správná. Využili k tomu specializovaný laser, který byl nastaven na takovou vlnovou délku, aby ničil DNA v buňce. Pomocí tohoto laseru vypálili malé místo v jádře buňky. Podle jejich teorie by se Rablova

teorie potvrdila, kdyby bylo poškozeno pouze pár chromozómů, zatímco u špagetového modelu by bylo poškozeno chromozómů více na různých místech.
Když docházelo k reparaci DNA, zašlo do buňky radioaktivně označené nukleotidy. Ty se poté začlenily do poškozené DNA a tak ji označily. Poté co buňka vstoupila do mitózy a chromozómy se zkondenzovaly, byly radiograficky zviditelněny.
Bylo zjištěno, že poškození se týkalo pár chromozómů, takže se s nejvyšší pravděpodobností potvrdila teritoriální povaha chromozómů. Za pár let poté se tato teorie potvrdila úplně a to s vynalezením a použitím fluorescenční *in situ* hybridizace. Použila se specificky naznačená próba pro každý chromozóm a ty se zvlášť zviditelnily v nepoškozeném jádře. Chromozómy zaujímaly teritoriální postavení.
Když byl tedy model chromozómových teritorií potvrzen, vědci se začali zajímat o specifickou organizaci chromozómových teritorií, která ovlivňuje replikaci, reparaci a genovou expresi. Vzniklo tedy mnoho teorií o vnitřním uspořádání chromozómových teritorií (Misteli, 2008).

ICD model (interchromosomal domain)

Navrhoval, že mezi chromozómovými teritorii prochází interchromozómový prostor. Předpokládalo se, že geny se preferenčně transkribovaly v oblasti dekondenzovaného chromatinu na CT periferii a RNA transkripty by tak byly uvolňovány přímo do ICD prostoru (Cremer *et al.*, 1993). Ukázalo se však, že geny se transkribují, jak na periferiích, tak uvnitř chromozómových teritorií. Proto byl tento model nahrazen IC-CT modelem.

IC-CT model (chromosome territory-interchromatin compartment)
Jednotlivá chromozómová teritoria jsou tvořena subdoménami, mezi nž proniká interchromatinový prostor. Subdomény jsou tvořeny částečně dekondenzovaným chromatinem na periferii, který je transkripčně aktivní, a kondenzovaným chromatinem ve středu domény, kde se vyskytují nekódující sekvence, repetice apod. Organizace jednotlivých chromozómových teritorií není náhodná, subdomény se navzájem nepromíchávají. Interchromatinový prostor obsahuje makromolekulární komplexy potřebné pro replikaci, transkripci, sestřih a opravy. Ne všechna CT jsou však tímto prostorem ohraničena, proto může docházet k úzkému kontaktu jednotlivých teritorií, která mezi sebou nemají žádnou bariéru (Cremer *et* Cremer 2010).

Model IC-CT zatím nebyl vyvrácen, avšak byly navrženy další. Takzvaný ICN model a model Frasera a Bickmorové. Kdy ICN model vyvrací přítomnost interchromatinového prostoru mezi chromozómovými teritorii, zatímco model Frasera a Bickmorové je určitým kompromisem mezi těmito dvěma modely.

ICN model (interchromatin network)
U tohoto konceptu dochází k prolínání vláken a smyček chromatinu v rámci jednoho teritoria i mezi teritorii sousedními. Je zde velký počet smíšeného chromatinu. Mezi vlákny je dostatek prostoru pro jaderná tělíska avšak popírá se zde výskyt interchromatinového prostoru. Jednotlivá teritoria nejsou oddělená žádným prostorem.

Model Frasera a Bickmorové
Autoři tvrdí, že je v jádře kolokalizace genů pro expresi a koregulaci. Aktivní geny v dekondenzovaném chromatinu zasahují jako smyčka ven z teritoria a kolokalizují nebo se transkribují v transkripčních továrnách.

Zajímavé je zjištění, že během nemocí se chromozómová teritoria přeskupují. Což může souviset se změněnou expresí genů během onemocnění. Tento objev by mohl přinést nový náhled do mechanismu různých onemocnění (Misteli 2008).

3.5 Reakce rostlin na stres

3.5.1 Protoplasty

Protoplasty jsou rostlinné buňky kulovitého tvaru částečně nebo úplně postrádající buněčnou stěnu. Buněčná stěna se dá odstranit mechanicky nebo enzymatickým způsobem.
Díky tomu, že protoplasty byly umělě vytvořeny, mohou být využity k řadě biochemických a fyziologickým výzkumům. Může být u nich sledována syntéza buněčné stěny, dělení buněk, embryogeneze, ale hlavně representují původní přístup dediferenciace buňky. Po izolaci protoplastů a následné kultivaci mají schopnost dediferencovat a znovu vstoupit do buněčného cyklu a poté proliferovat nebo zregenerovat do různých orgánů. Také se mohou stát novými rostlinami stejně jako zygoty (Grafi 2004). To je jeden důvod, proč jsou protoplastové kultury tak cennými nástroji pro biotechnologické aplikace jako jsou somatická hybridizace, zvyšování genetické variability somaklonální variabilitou a genetická transformace (Debeaujon *et* Branchard, 1992; Rakoczy-Trojanowska, 2002;

Navrátilová *et al.*, 2006). Avšak v mnoha druzích rostlin, se objevuje vysoký stupeň protoplastové rekalcitrance - neschopnosti diferenciace (Papadakis *et* Roubelakis-Angelakis, 2002). Jako hlavní faktor zodpovědný za neschopnost diferenciace rostlinných protoplastů byl navržen oxidativní stres.

3.5.2 Dediferenciace

Fyzické a morfologické změny buňky vedoucí ke ztrátě specializace. Buňka se tak dostává do stavu pluripotence. Jedná se o proces kontrolovaný mnoha geny stejně jako epigenetickými mechanismy zahrnujícími strukturální změny chromatinu, DNA methylaci a rozdělení organel. Proces dediferenciace zahrnuje znovuvstoupení do buněčného cyklu. Rovnováha mezi heterochromatinem a euchromatinem, přeprogramování genetické exprese i epigenetická regulace spolu s distribucí fytohormonů hrají v tomto procesu důležitou roli.

V procesu dediferenciace jsou pak dva druhy dekondenzace, které se posuzují jako změny ve způsobu genové exprese (Zhao *et al.*, 2001). První fáze nastává, když se aplikuje enzymatický roztok během protoplastové izolace. Druhá fáze nastává, když je fytohormony navozeno opětovné vstoupení do buněčného cyklu (Jiang *et al.*, 2013).

3.5.3 Reaktivní kyslíkové radikály (ROS)

ROS fungují jako signální molekuly během biotických a abiotických stresů. Stejným způsobem jako během útoku patogenu, se ROS generuje během enzymatické macerace buněčné stěny během protoplastové izolace. ROS - superoxidový anionový radikál, peroxid vodíku a hydroxylové radikály jsou nevyhnutelně produkovány v buňkách vyšších rostlin během normálního metabolismu. Jejich produkce je zesílená během stresových situací jako jsou sucho, salinita, vysoké a nízké teploty, UV nebo ozónový stres stejně jako u patogenových infekcí. ROS sniřuje šíření patogenu zesílením buněčných stěn nebo přímým zabitím patogenu.

Rostliny vyvinuly mnoho obranných mechanizmů, které jim pomáhají bránit se působení patogenů a vyrovnat se s akutním a chronickým stresem. K tomu využívají mechanizmy krátkodobé odpovědi a systémy dlouhodobé obranné strategie. Rostlinné R-geny rezistence zajišťují rozeznávání parazitů a jsou extrémně polymorfní. Obranné mechanizmy jsou spouštěny skrze mnoho odlišných signálních molekul, jako jsou protein kinázy, adaptorové proteiny, iontové změny, reaktivní kyslíkové radikály a oxid dusnatý. Tato transkripční

aktivace obranných genů a programovaná buněčná smrt se označuje jako hypersenzitivní odpověď (Arabidopsis genome initiative 2000).

Studie podporují hypotézu, že je zde korelace mezi rekondenzací chromatinu v protoplastovém jádře se stupněm oxidativního stresu v protoplastových kulturách. Jak je obecně známo oxidativní stres, plynoucí z nerovnováhy mezi generováním reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) a antioxidativní schopností buněk, byl navrhnut jako přispívající k rekalcitranci rostlinných protoplastů (Papadakis *et* Roubelakis-Angelakis, 2002). Bylo dokázáno, že oxidativní stres mohl zapříčinit buněčnou smrt protoplastů způsobem podobným jako u hypersensitivní odpovědi během napadení rostlinnými patogeny.

Stres a aklimatizační odpovědi v rostlinách jsou zprostředkovány celogenomovými změnami v expresi genů, buněčným proteomem a metabolomem. V posledních letech byl zaznamenán pokrok v porozumění, jak epigenetické a smRNA cesty kontrolují a organizují tyto změny. Epigenetické značky modifikují vlastnosti chromatinu a mění transkripční stavy genu, buď jednoho specifického genu, nebo rovnou celého genomu. Tyto značky dovolují vnější plasticitu a adaptibilitu rostlinných genomů k měnícím se přírodním podmínkám. DNA methylace je dobře známá jako epigenetický mechanismus, který ve velkém měřítku kontroluje stresově indukované změny v rostlinném transkriptomu a hraje stěžejní roli ve změnách chromatinové struktury. Spolu s modifikacemi histonu hrají i malé RNA důležitou roli při odpovědích na stres (Boyko *et* Kovalchuk, 2013).

3.5.4 Dekondenzace chromatinu

Chromatinové změny způsobené oxidativním stresem byly přímo studovány v buněčném jádře. U protoplastů různých druhů se zaznamenalo, že heterochromatin organizovaný v chromocentrech prožel během protoplastové izolace intenzivní dekondezací (Tessadori *et al.*, 2007; Ondřej *et al.*, 2009). Bylo navrženo mnoho teorií, které by vysvětlovaly takto masivní dekondenzaci. Dekondenzace je často spojována s reprogamováním buňky a dediferenciací v tomto stádiu protoplastové regenerace (Exner *et* Hennig, 2008).

Dekondenzací byla hlavně ovlivněná chromocentra představující konstituční heterochromatin (genově prázdné a umlčené části genomu), (Avramova, 2002; van Driel *et* Fransz, 2004). Dramatická redukce heterochromatinu zahrnuje dekondenzaci všech hlavních repetitivních oblastí, zahrnující i centromerické 180 bp tandemové repetice. Pouze 45S rDNA repetice

zŢstávají v ļásteļnŋ kompaktním stavu. Dekondenzace pericentrického heterochromatinu nevedla k transkripļní reaktivaci umlļených genomických elementŢ.
Po prodlouģené kultivaci je dekondenzaļní proces vratný. Rekondenzace chromatinu do chromocenter je postupný proces. První rekondenzují 45S rDNA oblasti, tŋsnŋ poté centromerické 180 bp oblasti a 5S rDNA repetice a nakonec rozptýlené repetice, vļetnŋ transpozónŢ. Posloupnost zpŋtného sestavení koreluje s velikostí repetitivních oblastí. Výsledky ukazují odliģné formování pericentromerických repetic do rŢzných typŢ heterochromatinu, který se poté shlukuje a vytváŘí chromocentrum (Tessadori *et al*., 2007).
Bŋhemrozsáhlé chromatinové dekondenzace se nemŋní stupeŘ metylace DNA. To podtrhuje názor, ģe heterochromatinové rozvolnŋní není kontrolované DNA demethylací. Stejnŋ jako metylace ani modifikace histonŢ není dostateļná pro vyvolání zhutnŋní hetrochromatinu (Tessadori *et al*., 2007).

Chromatinová dekondenzace je vŋtšinou spojená se zvýšením genové aktivity. V protoplastech však nezpŢsobuje aktivaci umlļených elementŢ, dekondenzace sama o sobŋ nestaļí k transkripļní aktivaci. Po zformování protoplastu u *Arabidopsis* dochází k velké zmŋnŋ genové exprese. Zatímco umlļené repetice zŢstávají neaktivní, aktivují se transkripļní faktory zodpovŋdné za stresovou odpovŋĎ a formování kmenových bunŋk (Olsen *et al*., 2005). Zvýšená exprese je spojená s geny ovlivŘujícími rekonstrukci bunŋčné stŋny a s bunŋčným cyklem.
Avšak dochází k navození zmŋn v genomu, vedoucí k somaklonální variabilitŋ známé z rostlinných biotechnologií. Tyto zmŋny jsou ļasto spojeny s cytogenetickými abnormalitami, zahrnujícími zmŋny ve stupni ploidie, chromozomálním pŘeuspoŘádání, aktivaci transpozonŢ a retrotranspozonŢ, vedoucí k mutacím, pŘi pŘemístŋní do oblastí s geny (Grafi 2009).

Rozsáhlá dekondenzace chromatinu uvnitŘ protoplastových jader a následné znovusestavení je spojené se stupnŋm oxidativního stresu a úļinností antioxidativních systémŢ. Bylo prokázáno, ģe oģetŘení protoplastŢ kyselinou askorbovou snižuje úroveŘ oxidativního stresu, ale také pozitivnŋ stimuje expresi askorbátperoxidázy a katalázy. Také vede k vŋtší rekondenzaci chromatinu, v porovnání s neoģetŘeným protoplastem, a k podpoŘení proliferace buŘky (OndŘej *et al*., 2010). Znovusestavení chromocenter a adekvátní dávka antioxidantŢ mohou znovu spustit vstoupení do bunŋčného cyklu a následnou proliferaci (OndŘej *et al*., 2009).

4 Praktická ļást

4.1 Biologický materiál

Arabidopsis thaliana wild type

BAC ï Databáze TAIR. [online]. Dostupné z: www.arabidopsis.org.

Escherichia Coli, název kmenu - DH10B

4.2 PŚístroje

Analytické váhy ï HR-120, AND, Japonsko

CCD kamera ï DP 72, Olympus, Japonsko program: CoolSnap, Photometrics

Centrifuga ï Mikro200, Hettich Zentrifugen, NĎmecko

Centrifuga ï Rotofix 32, Hettich Zentrifugen, NĎmecko

DigestoŚï Merci, ĻR

Flowbox ï AH 100, Telstar, ĠpanĎsko

Flowbox ï PV 100, Telstar, ĠpanĎsko

Fluorescenļní mikroskop ï BX 60, Olympus, Japonsko

Fytotron

Horizontální elektroforéza ï AGAGEL STANDARD, Biometra, NĎmecko

Chlazená centrifuga ï Centrifuge 5804R, Eppendorf, NĎmecko

Inkubátor ï Termostat BT 120, Labo-MS, ĻR

Kamera ï Kodak Edas290, Program Kodak1D, USA, program: Scientific Imaging systems

Ledovaļ ï BF80WS, BarLine. Itálie

Magnetická míchaļka ï MR Hei-Standard, Heidolph, NĎmecko

Mikroskop reverzní ï CK 40, Olympus, Japonsko

Mikrovlnka ï ETA 3203, ĻR

Minicentrifuga ï MCF2360, LMS, NĎmecko

Nanodrop ï Nanodrop 1000, ThermoScientific, NĎmecko

Parní sterilizátor, autokláv ï WiseClave, Vitrum. ĻR

PŚesvágky ï 572-35, Kern. NĎmecko

Stolní pH metr ï FE20-Kit, Mettler Toledo, ĻR

Sugárna ï Binder FD53, NĎmecko

Termocyklér ï TCXP, XP, Bioer, Ļína

Transluminátor ï Herolab UV, NÌmecko

TŚepaļka ï Vibrax VXR basic, IKA, Ļína

Varná plotýnka ï SW85, Adamas, Nizozemí

Vodní lázeŔ ï 1003, GFL, NÌmecko

Vortex ï MS2 Minishaker, IKA, Ļína

Výbojka ï BH2-RFL-T3, Olympus, Japonsko

Zdroj stejnosmÌrného proudu ï PowerPackBasic, Biorad, NÌmecko

4.3 Chemikálie a roztoky

Chemikálie

2, 4 ï D, (dichlorfenoxyoctová kyselina), OlChemIm Ltd

2 ï merkaproethanol, Sigma ï Aldrich, GmbH

2 ï propanol, Sigma ï Aldrich, GmbH

agar, Duchefa Biochemie, b.v.

agaróza, Lonza Biotec, s.r.o.

celuláza, Duchefa Biochemie, b.v.

destilovaná voda

dextran sulfát, Sigma ï Aldrich, GmbH

dihydrát citrátu sodného, Lachema, a.s.

dihydrát hydrogenfosforeļnanu disodného, Lachema, a.s.

dihydrogenfosforeļnan draselný, Lach ï Ner, s.r.o.

ethanol, Lach ï Ner, s.r.o.

extrakt z kvasnic, Duchefa Biochemie, b.v.

formamid, Sigma ï Aldrich, GmbH

glycerol, Sigma ï Aldrich, GmbH

hydroxid sodný, Lach ï Ner, s.r.o.

chloramfenikol, Duchefa Biochemie, b.v.

chlorid draselný. Lachema, a.s.

chlorid sodný, Lach ï Ner, s.r.o.

IAA, (kyselina indol-3-octová), OlChemIm Ltd

iPR (isopentenyladenosin), OlChemIm Ltd

kanamycin, Duchefa Biochemie, b.v.

kyselina boritá, Lachema, a.s.

EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina), Sigma ï Aldrich, GmbH
kyselina chlorovodíková, Lach ï Ner, s.r.o.
kyselina octová, Lach ï Ner, s.r.o.
macerozym, Duchefa Biochemie, b.v.
mannitol, Duchefa Biochemie, b.v.
octan sodný, Sigma ï Aldrich, GmbH
paraformaldehyd, Sigma ï Aldrich, GmbH
sacharóza, Penta, s.r.o.
saponin Sigma ï Aldrich, GmbH
tris (hydroxymethyl) aminomethanu, Sigma ï Aldrich, GmbH
triton Sigma ï Aldrich, GmbH
trypton, Duchefa Biochemie, b.v.
Tween 20 (polyoxyethylen sorbitan monolaurát) ï Serva Electrophoresis GmbH

Roztoky

0,1mol/l HCl (1l)
8,84 ml 35% HCl doplníme destilovanou vodou na 1l.

0,45mol/l mannitol (1l)
81,98 g mannitolu rozpustíme ve 1l destilované vody.

0,45mol/l sacharóza (1l)
154, 04 g sacharózy rozpustíme v 1l destilované vody.

0,5% Triton (100 ml)
5 ml 10% tritonu, 0,5 g saponinu, doplnit 1x PBS do 100 ml.
0,5mol/l EDTA (100 ml)
14,6 g EDTA, 100 ml destilované vody a upravíme pH na 8.

0,5x BM (500 ml)
1,1 g MS, 7,5 g sacharózy, 500 ml destilované vody. Vyklávujeme.

BM médium (500 ml)
15 g sacharózy a 2,2 g MS médium (podle Murashige a Skoog 1962) rozpustíme a zvlášť rozvaříme 4 g agaru, doplníme destilovanou vodou na 500 ml.

10x TBE (1 l)

108 g tris a 55 g borité kyseliny, 40 ml 0,5mol/l EDTA (pH 8) a doplníme destilovanou vodou na 1 l.

10x PBS (1 l)

80 g NaCl, 2 g KCl, 2 g KH_2PO_4 a 7,6 g Na_2HPO_4 . $2H_2O$ doplníme objem na 1 l. Upravíme pH na 7,5. Na FISH metodu ředíme 10x.

20x SSC (1l)

175,3 g NaCl a 88 g $C_6H_5Na_3O_7$. $2H_2O$, doplnit destilovanou vodou na 1 l. Upravíme pH na 7. Na FISH metodu ředíme 10x.

3mol/l octan sodný (10 ml)

2,46 g octanu, 10 ml destilované vody.

4% paraformaldehyd (10 ml)

0,4 g paraformaldehydu, 10 ml destilované vody.

5% FBS (10 ml)

9,5 ml 1x PBS, 0,5 ml fetálního bovinního séra.

50% formamid, iontová síla 2x SSC (100 ml)

50 ml formamidu a 10 ml 20x SSC smícháme se 40 ml destilované vody a upravíme pH na 7.

enzymatický roztok (100 ml)

Do PM média 1 g celulázy a 0,25 g macerozymu. Přefiltrujeme.

fixáž ethanol:kyselina octová 3:1 (20 ml)

15 ml 96% ethanolu, 5 ml ledové kyseliny octové.

LB médium (1 l)

10 g tryptonu, 5 g výtažku z kvasnic a 10 g NaCl, a doplníme destilovanou vodou na 1 l. Upravíme pH na 7. Vyklávujeme.
Do 1 l LB média přidáme 50 mg kanamycinu nebo chloramfenikolu.

Master Mix pro FISH, iontová síla 2x SSC (2 ml)

0,4 g dextran sulfátu rozpustíme v 0,8 ml destilované vody, přefiltrujeme. Poté přidáme 200 µl 20x SSC a doplníme destilovanou vodou na 2 ml.

PM médium (1 l)

2 g IAA, 0,5 mg 2,4 ï D a 0,5 mg IPAR rozpustíme v 1 l 0,5x PM médiu.

Ostatní chemikálie:

5x DNA Loading Buffer Blue, Bioline, GmbH

Biotin-Nick translation Mix, Roche Diagnostics, GmbH

Cot DNA, Roche Diagnostics, GmbH

Cy3-IgG Fraction Monoclonal Mouse Anti-Digoxin, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.

DAPI, Vector Laboratories, Inc.

DIG-Nick translation Mix, Roche Diagnostics, GmbH

DOP primery 1 ï 3, Generi Biotech, s.r.o.

DOP1: CCGACTCGAGNNNNNNCTAGAA

DOP2: CCGACTCGAGNNNNNNTAGGAG

DOP3: CCGACTCGAGNNNNNNTTCTAG

Extravidin, Roche Diagnostics, GmbH

Gel Red, Biotinum, Inc.

PCR Master Mix, Roche Diagnostics, GmbH

PhasePrep^{TM} BAC DNA Kit, Sigma ï Aldrich, GmbH

standard molekulové hmotnosti DNA, BioSystems, a. s., 100 bp DNA ladder

4.4 Metody

Chromozóm 2 *Arabidopsis thaliana* pŚevedený do BAC knihovny se skládal ze ļtyŚsetŢ BAC klonŢ tzv. platŢ. KaģdýplatebyltedysestavenýzBAC klonŢ. Ty byly rozdĽleny do osmi skupin oznaļených A-H po 12 klonech.

4.4.1 Mnoģení bakterií

Z jednotlivých BAC klonŢ se odebralo 30 µl zvláģŠ do kultivaļních destiļek s 2 ml LB média s antibiotiky.

Destiļky s napipetovanými BAC klony se pŚenesly na tŚepaļku a vloģily do inkubaļní komory a nechaly se mnoģit pŚi 37 °C pŚes noc (asi 8 hodin). Po inkubaci se pozorováním zákalu zjistilo, jestli se bakterie rozmnoģily. Do mikrozkumavek se poté odebralo po 1 ml bakteriální suspenze z jednotlivých jamek. Zbylá suspenze se dala zamrazit.

4.4.2 Izolace DNA

Odebraný 1 ml bakteriální suspenze v mikrozkumavky se poté stoļil 6 minut pŚi 5000 rpm. Supernatant se vylil. Pelet se resuspendoval v 250 µl resuspendaļním roztoku a napipetoval se do mikrozkumavky.

Dále se pŚidalo 250 µl lytického roztoku a ihned se promíchal pŚevracením zkumavky. Lyzovalo se po dobu 4 minut a poté se pŚidalo 250 µl neutralizaļního roztoku. PŚeklápĽním byl roztok ihned promíchán.

Centrifugovalo se 5 minut pŚi 14 000 rpm a 4 °C. Supernatant se poté pŚepipetoval do nové mikrozkumavky.

Poté se pŚidalo 450 µl 2-propanolu a znovu se centrifugovalo 25 minut pŚi 14 000 rpm a 4 °C. Po stoļení se odpipetoval supernatant a pŚidalo se 100 µl 70% ethanolu. Centrifugovalo se 5 minut pŚi stejných otáļkách a teplotĽ Odpipetoval se supernatant a mikrozkumavky se nechaly oschnout na papíŚe. Poté se DNA rozpustila v 50-150 µl dH_2O. Na nanodropu se dále zmĽŚila koncentrace jednotlivých produktŢ, aby se ovĽŚila úspĽģnost izolace. Dále se provedla agarózová elektroforéza pro zjiģtĽní kvality izolace.

4.4.3 DOP PCR

Pro vytvoření prób je nezbytné zmnožení segmentů DNA. K tomuto účelu byla použita metoda DOP PCR (degenerate oligonucleotide-primed PCR). Připravil se premix, který se vložil do cykléru.

Složení PCR premixu:

- 10,5 µl dH_20
- 12,5 µl PCR Mastermix
- 1 µl DNA (200 ng) naředěné
- 1 µl Primery

Celkový objem 25 µl

Časový a teplotní profil PCR reakce byl následující:

1x	95 °C	počátek denaturace
35x	95 °C	denaturace
	43 °C	nasedání primeru (annealing)
	72 °C	prodlužování primerů (extension)
1x	72 °C	finální prodlužování (extension)

Poté se na nanodropu změřila koncentrace PCR produktu pro další ředění.

4.4.4 Nick-Translace

Pro Nick-translaci se zředila DNA tak, abychom v 16 µl měli množství přibližně 2000 ng DNA. Výsledná koncentrace byla 62,5 ng/ µl.

K 16 µl zředěné DNA byly přidáno 4 µl DIG Nick translation Mixu. Mikrozkumavky se vložily do cykléru na 85 minut při 15 °C. Reakce se zastavila přidáním 1 µl EDTA a opět se vložily do cykléru na 10 minut při 65 °C. Mikrozkumavky se poté daly na 5 minut na led inkubovat.

Velikost prób se ověřila na elektroforéze. Z 21 µl byly použity 3 µl na elektroforézu. Zbylých 18 µl bylo převedeno do formamidu.

4.4.5 Převedení próby do formamidu

Po odebrání 3 µl z 21 µl znalé próby o 2000 ng DNA jsme dostali 18 µl, to znamená, že množství DNA je 1700 ng.

K 18 µl znaļené próby se pŚidalo 2 µl 3mol/l octanu sodného (10 % pŢvodního objemu, výsledná koncentrace byla pak 0,3 M) Pro inhibici repetic se pouģila 2 µl Cot DNA. Dále se pŚidalo 36 µl 96% ethanolu pro UV (dvojnásobné mnoģství pŢvodního objemu). Inkubovalo se 30 minut v -20°C a následnĎ se centrifugovalo 30 minut pŚi 4°C a 13 000 rpm. Supernatant se odpipetoval a mikrozkumavky s próbami se nechaly oschnout na papíŚe.

Dále se próby pŚevedly do formamidu, tak aby výsledná koncentrace byla 40 ng/ µl. Pokud tedy bylo pŢvodní mnoģství 1700 ng DNA próby, rozpustilo se v 42,5 µl formamidu.

4.4.6 Denaturace sondy

Na 1 sklíļko na FISH bylo potŚeba nanést mnoģství sondy mezi 100-200 ng. Naneslo se mnoģství 10 µl roztoku, kdy polovinu tvoŚí Master Mix (5 µl) a dalģích 5 µl sondy ve formamidu (40 ng x5 = 200 ng). V cykléru se denaturovala 10 minut pŚi 80 °C a pak se ihned umístila na led, aby próby zŢstaly v denaturovaném stavu.

4.4.7 Elektroforéza

Naváģilo se 0,8 g agarózy, která se rozpustila v TBE pufru na 80 ml, aby vznikl 1% roztok agarózy. Roztok v kádince jsme rozvaŚili v mikrovlnné troubĎ Nechali jsme mírnĎ zchladit a pŚidali jsme 3,2 µl GelRed.

Do vaniļky se zasunul hŚebínek a byl do ní nalit roztok. Gel se nechal ztuhnout a opatrnĎ se vyjmul hŚebínek. Do vaniļky se nalil TBE pufr tak, aby byly ponoŚeny jamky a gel byl jeģtĎ asi 1 cm pod hladinou.

Poté se pŚipravili vzorky pro nanáģení a standard molekulové hmotnosti. Do jamek se pipetovalo od kaģdého vzorku 6 µl smĎsi.

Elektroforéza probíhala 45 minut pŚi 110 V. Bromfenolová modŚ doputovala pŚibliģnĎ do 2/3 své dráhy. Fotografie gelu zviditelnĎného UV transiluminátorem a se poŚídila pomocí programu Kodak1D.

4.4.8 Sterilizace semen *Arabidopsis*

Pracovalo se ve flowboxu. K semínkŢm v mikrozkumavce se pŚipipetoval 1 ml 70% ethanolu. NáslednĎ se s mikrozkumavkou 2 minuty protŚepávalo a dala se na 2 minuty zcentrifugovat pŚi 3000 rpm. Slil se supernatant, pŚidal se 1 ml 0,8% NaOCl a 8 minut se opĎt protŚepávalo. OpĎt se centrifugovalo, slil se supernatant a pŚidala se sterilní voda. OpĎt se centrifugovalo

a odpipetovala se voda, ve vodě se promývalo 2-5x. Semínka se přenesla do Petriho misky na filtrační papír a nechala se vyschnout.

4.4.9 Vysazení semínek

Do Petriho misek se nalilo BM médium a nechalo se zatuhnout. Poté byla laboratorní jehlou nasazena semínka na médium. Petriho misky se zajistily parafilmem a semínka se nechala kultivovat ve fytotronu (den 16 hodin při 24 °C/ noc 8 hodin 20±2 °C).

4.4.10 Izolace protoplastů

První den izolace se napipetovalo do Petriho misek asi 5 ml enzymatického roztoku. Poté se natrhaly lístky *Arabidopsisu* a přemístily se do roztoku. Skalpelem se lístky rozřezaly na malé kousky, aby se protoplasty uvolnily do roztoku a nechaly se inkubovat přes noc v termoboxu při 26 °C.

Druhý den se s Petriho miskami lehce zakroužilo a 30 minut jejich probíhala inkubace, během níž se lehce protřepávaly. Protoplastová suspenzi se dále přecedila přes jemné síto do nové Petriho misky. Roztok se přepipetoval do zkumavky a centrifugoval se při 500 rpm 5 minut. Převrstvil se 0,45mol/l mannitolem a opět se dal zcentrifugovat. Protoplasty se spolu s mannitolem přepipetovaly do nové zkumavky, opět se převrstvily mannitolem a stočily. Nakonec se protoplasty se přepipetovaly do mikrozkumavky.

K protoplastům se připipetovalo 0,5 ml 4% paraformaldehydu. Inkubovaly se při pokojové teplotě 5-8 minut a následně se centrifugovaly 3 minuty při 500 rpm. Odpipetoval se paraformaldehyd a přidal se 1 ml PBS a znovu se stočilo. Poté, co se odpipetoval PBS se přidal fixážní roztok a inkubovalo se po dobu 10 minut.

Asi 200 µl protoplastové suspenze se přeneslo na jednotlivé vymražené podložní sklíčko. Sklíčka se nechala oschnout v digestoři.

4.4.11 FISH metoda

Následovalo proplachování ve vyvíjecích komůrkách. První se 1 minutu nechala inkubovat v 0,1mol/l HCl, dále 10 minut v Tritonu a 3x po 5 minutách v 1x PBS. Dalším krokem bylo promývání v 50% formamidu po dobu 30 minut. Na osušená sklíčka se napipetovalo po 10 µl denaturované sondy. Zakrylo se krycím sklíčkem, které se oblepilo lepidlem. Sklíčka se dala vyvíjet na varnou ploténku na 1,5 minuty při 78 °C.

Sklíčka se vložila do Petriho misky s navlhčeným papírem a dala se inkubovat přes noc do termoboxu při 37 °C.

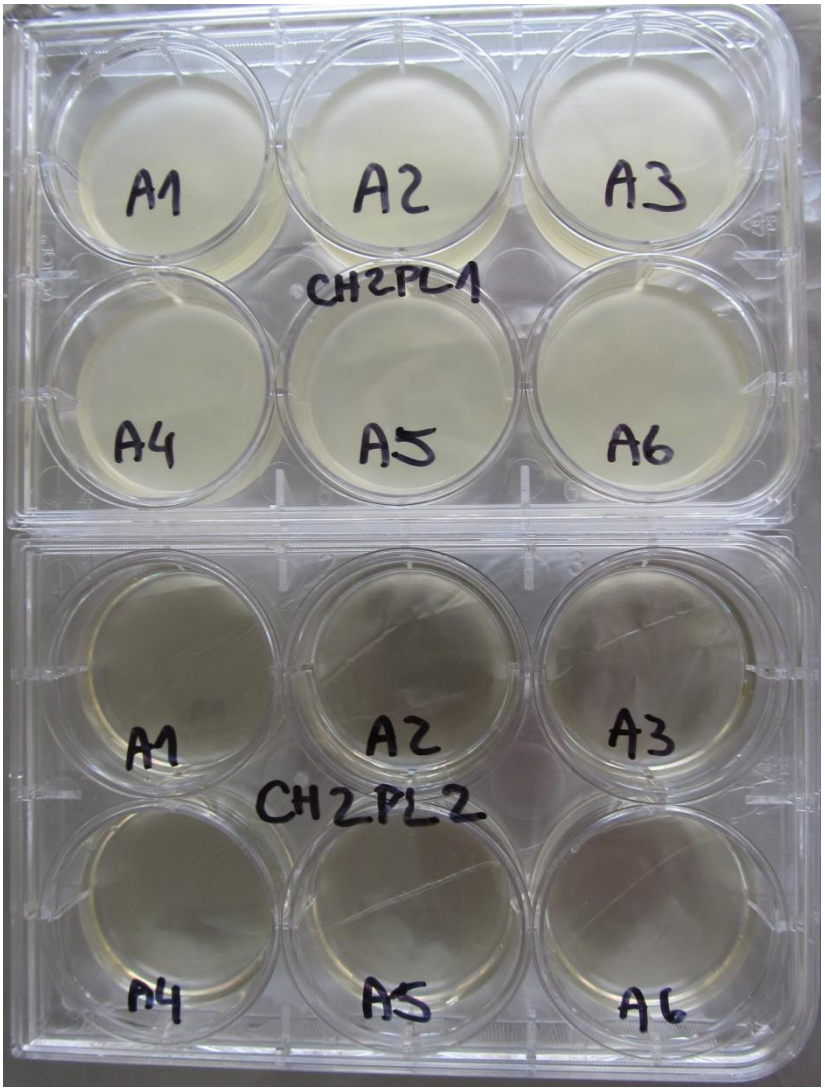
Následně se z preparátů se odstranila krycí sklíčka. Do vyvíjecí nádobky s 2xSSC, umístěné ve vodní lázni předehřáté na 45 °C, se vložila na 5 minut a jeden jednou se opakovalo. Na osušená sklíčka se napipetovalo na každé 200 µl 5% FBS, překrylo se parafilmem a inkuboval se 30 minut. Poté se sundal parafilm, FBS se nechalo stéct a napipetovalo se 100 µl 5% FBS s protilátkou (1 µl na 100 µ FBS). Opět se překrylo parafilmem a nechalo se inkubovat ve tmě, aby se protilátka nevysvítila.

Po inkubaci se sklíčka namáčela 5 minut v 2xSSC a jeden jednou se zopakovalo v novém 2xSSC. Poté se opláchla v 1xPBS a osušila. Nakonec se na sklíčka napipetovalo po 2 µl DAPI ve Vectashieldu, překryla se krycím sklíčkem a byla zkoumána pod mikroskopem.

5 Výsledky

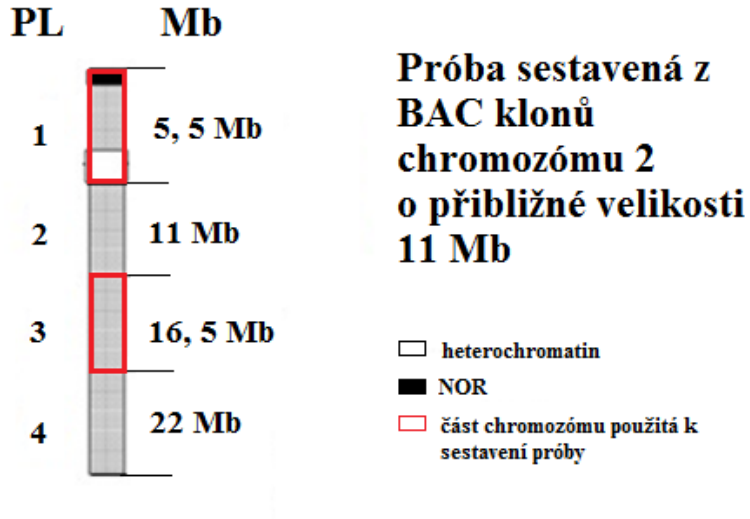
Chromozóm 2 je sestaven ze 4 ļástí, takzvaných platŢ klonŢ po 96 jamkách. Bakteriální umĽlý chromozóm byl objednán z databáze TAIR dostupné na Arabidopsis.org.

V antibioticích se rozmnoģovaly pouze bakteriální vektory z platu 1 a 3. Plate 1 byl namnoģen v kanamycinu a plate 3 ve chloramfenikolu vģdy o koncentraci 50 mg/l LB média. Platy 2 a 4 se v antibioticích nemnoģily, jak mŢģeme pozorovat na obr. ļ. 7. Na destiļce platu 1 vidíme zŚetelný zákal znaļící, ģe se bakterie rozmnoģily. Zatímco na destiļce platu 2 není viditelný zákal, je zŚejmé, ģe k namnoģení bakterií v antibiotiku nedoģlo.



Obr. ļ. 7 - Destiļky porovnávající bakteriálními suspenze rozmnoģených platu 1 a nerozmnoģených klonŢ platu 2.

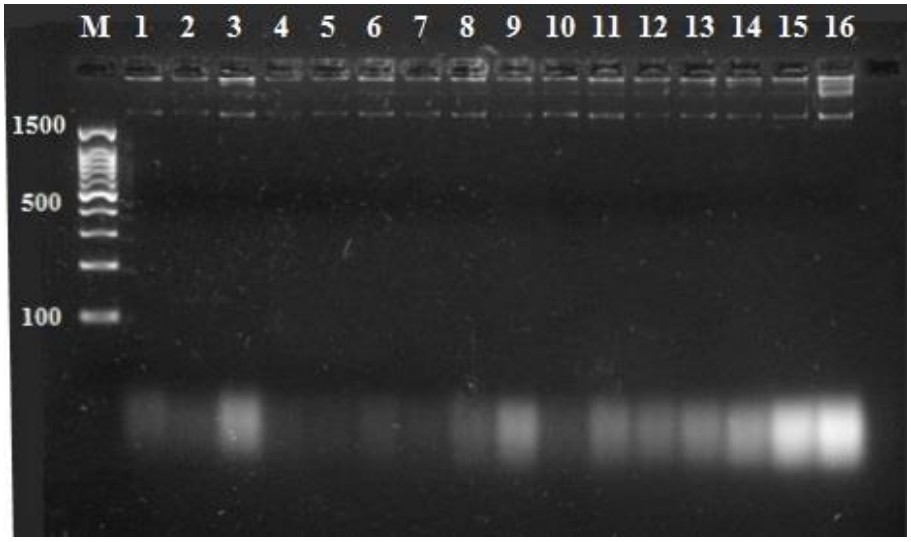
Protože se bakteriální klony v platech 2 a 4 nerozmnožovaly v antibioticích, musely být ze sestavování sondy vyřazeny. Při množení bez antibiotik by nebylo prokazatelné, že vektory, které používáme na hybridizaci, mají naligovaný inzert. Próba byla sestavena pouze z platů 1 a 3 viz obr. č. 8 o přibližné délce 11Mb.



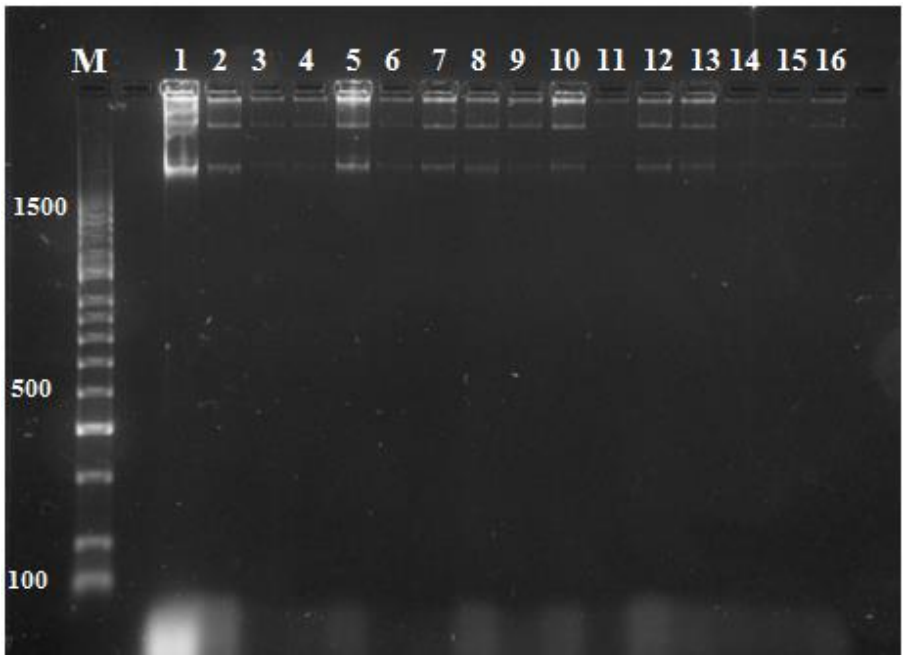
Obr. č. 8 - Schématické znázornění sestavení próby chromozómu 2 *Arabidopsis thaliana* z rozmnožených setů BAC klonů.

Z bakteriální suspenze z rozmnožených platů 1 a 3 jsme vyizolovali DNA. Koncentraci DNA jsme poté změřili na nanodropu, abychom poté mohli zředit DNA na DOP PCR. Na DOP PCR bylo potřeba naředit DNA přibližně na koncentraci 200 ng/µl.

Po izolaci DNA jsme provedli kontrolní agarózovou elektroforézu zvlášť pro plate 1 a pro plate 3. Na elektroforetogramech na obr. č. 9 a 10 můžeme pozorovat, že izolace z bakteriální suspenze proběhla úspěšně u každého klonu.



Obr. ļ. 9 - Elektroforetogram DNA izolované z bakteriální suspenze z platu 1 v 1% agarózovém gelu



Obr. ļ. 10 - Elektroforetogram DNA izolované z bakteriální suspenze z platu 3 v 1% agarózovém gelu

Legenda:
M: standard molekulové hmotnosti DNA ï BioSystems, a.s., 100 bp DNA ladder
1-16: vzorky DNA

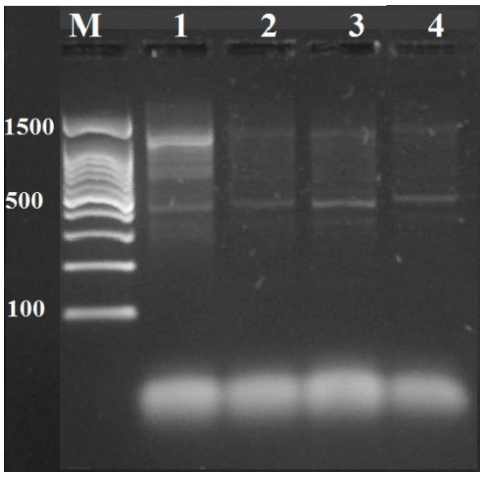
Podmínky elektroforézy:

1 % AGSA/TBE, barveno GelRed ï 4 ε l/100 ml gelu

vzorek: 2 ε l vzorku DNA + 3 µl H_20 + 1 ε l BFM, do jamky 6 ε l

pouģité napĐtí 110 V

Pro DOP PCR bylo potřeba optimalizovat annealing teplotu, kdy se optimální teplota pohybovala okolo 45°C. Reakci jsme nechali probíhat při 43, 44, 46 a 47°C annealing teplotách a účinnost jsme ověřili agarózovou elektroforézou. K nejvyšší účinnosti reakce došlo při annealing teplotě 43°C. Na obr. č. 11 v jamce 1 je nanesen PCR produkt množený při annealing teplotě 43°C, došlo zde k nejvyššímu zmnožení fragmentů DNA. Délky fragmentů se pohybují kolem 200 až 1600 bp.



Obr. č. 11 - Elektroforetogram DOP PCR produktu,
ověřování optimální annealing teploty pro DOP PCR
reakci v 1% agarózovém gelu

Legenda:

M: standard molekulové hmotnosti DNA – BioSystems, a.s., 100 bp DNA ladder

1-4: vzorky DNA, jamka 1: 43°C, 2: 44°C, 3: 46°C, 4: 47°C

Podmínky elektroforézy:

1 % AGSA/TBE, barveno GelRed – 4 µl/100 ml gelu

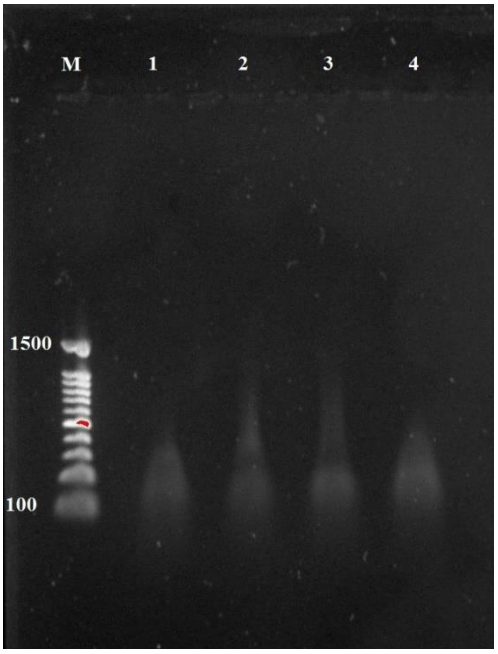
vzorek: 3 µl vzorku DNA + 2 µl H_20 + 1 µl BFM, do jamky 6 µl

použité napětí 110 V

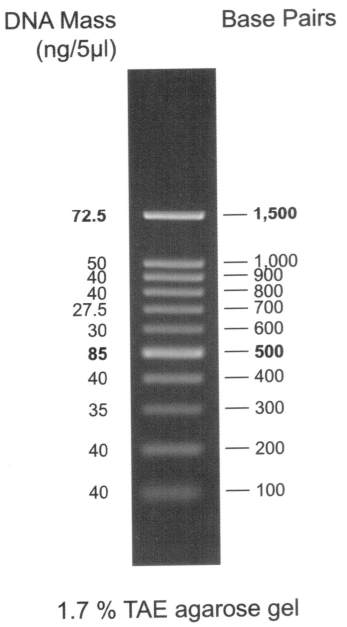
Provedli jsme amplifikaci DNA pomocí DOP PCR. Koncentraci próby po DOP PCR jsme poté změřili na nanodropu, abychom mohli DNA zředit na Nick translaci.

Pro Nick translaci je optimální koncentrace 62,5 ng/µl, abychom v 16 µl měli množství přibližně 2000 ng DNA.

K 16 µl zředěné DNA byly přidáno 4 µl DIG Nick translation Mixu. Poté jsme Nick translací naznačili próby digoxigeninem. Při Nick translaci dělá DNáza do vlákna DNA zářezy náhodně a vytváří se tak fragmenty o různé délce. U jamky 3 a 4 vidíme próbu sestavenou z platů 1 a 3 naznačenou DIGem.



Obr. č. 12 - Elektroforetogram z DNA próby po značení DIGem v Nick translaci v 1% agarózovém gelu



Obr. č. 13 - Použitý standard molekulové hmotnosti DNA, BioSystems, a.s., 100 bp DNA ladder

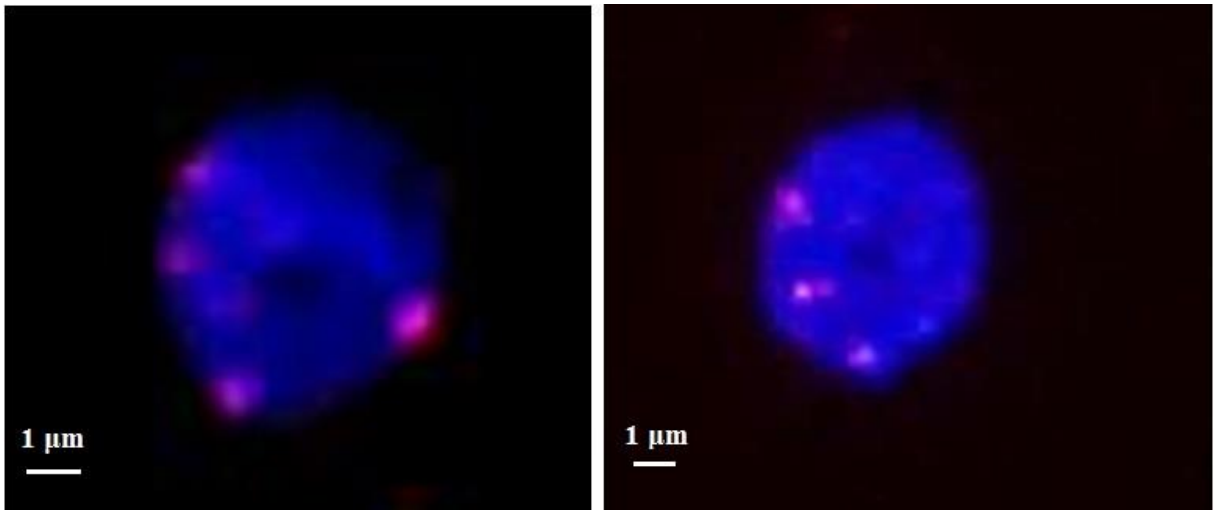
Legenda:

M: standard molekulové hmotnosti DNA – BioSystems, a.s., 100 bp DNA ladder
1-4: vzorky DNA, 3 a 4: vzorky prób značené DIGem
Podmínky elektroforézy:
1 % AGSA/TBE, barveno GelRed – 4 µl/100 ml gelu
vzorek: 3 µl vzorku DNA + 2 µl H_20 + 1 µl BFM, do jamky 6 µl
použité napětí 110 V

Celkové množství DNA ve 21 µl bylo okolo 2000 ng. Odebrali jsme 3 µl na elektroforézu. Zbylo nám tedy asi 1700 ng DNA v 18 µl. Dále se próby převedly do formamidu, tak aby

výsledná koncentrace DNA byla 40 ng/ µl. Pokud bylo tedy pŢvodní mnoģství DNA kolem 1700 ng, próba se rozpustila ve 42,5 µl formamidu.

Próby pŚevedené do formamidu se nahybridizovaly na sklíļka s vyizolovanými protoplasty. Poté probíhala inkubace s 1 µl anti-Digoxinu. Nakonec jsme napipetovali 1,5 µl DAPI, pŚikryli jsme krycím sklíļkem a pozorovali jsme pod fluorescenļním mikroskopem.



Obr. ļ. 14 - Interfázní jádra protoplastu *Arabidopsis thaliana* znaļená DAPI a monoklonální myģí protilátkou anti-Digoxin konjugovanou s Cy3. Hybridizace 5, 5 Mb úseku p raménka chromozómu 2 získaného izolací BAC klonŢ z platu 1.

6 Diskuze

Protoplastové kultury jsou pozoruhodným příkladem dediferenciace rostlinné buňky. Během dediferenciace protoplastů dochází ke změnám v genomové organizaci. Nejvýraznější změnou je rozsáhlá chromatinová dekondenzace.

Heterochromatinová dekondenzace u protoplastů *Arabidopsis thaliana* je doprovázená strukturální relaxací centromerických, pericentromerických a 5S rDNA repetitivních sekvencí, stejně jako transpozónů umístěných v chromocentrech (Ondřej et al. 2010). Dediferenciace je charakterizována novou rovnováhou mezi méně kondenzovanou částí genomu a kondenzovaným heterochromatinem, jehož transkripce je omezena.

Pro vizualizaci chromozómů, v interfázním jádře protoplastů *A. thaliana*, jsme sestavili próbu z poloviny setů BAC klonů. Z druhé poloviny setů se vzhledem k jejich kvalitě nepodařilo vyizolovat dostatečné množství BAC. Ani po druhém objednání setů BAC klonů, dodaných databází TAIR, se polovina bakteriálních klonů nemnožila v médiu s antibiotiky. Z tohoto důvodu se nezdařila konstrukce celochromozómové sondy pro chromozóm 2.

Celochromozómovou próbu z BAC klonů pro chromozóm 2 úspěšně sestavil Lysák 2003, avšak pro konstrukci sondy použil bakteriální klony z databáze IGF a TAMU.

Próbu sestavenou z poloviny setů BAC klonů, jsme následně hybridizovali na zafixované protoplasty *A. thaliana*. K hybridizaci však došlo pouze u čtvrtiny chromozómu, konkrétně u BAC izolovaných z platu 1. Hybridizovala oblast horního raménka chromozómu 2, která má vysokou hustotu repetitivních sekvencí. Pod fluorescenčním mikroskopem jsme sledovali 4 poměrně velké signály. Velká plocha hybridizovaných signálů byla nejspíše způsobena dekondenzovaných stavem chromatinu. V daném stádiu vývoje protoplastu je dekondenzovaný stav chromatinu typický a je spojený s reprogramováním genomové organizace protoplastů. Vzhledem k diploidnímu stavu *A. thaliana* bychom však očekávali pouze dva signály. Pozorované 4 signály znamenají, že próba musela hybridizovat nespecificky.

Je možné, že oblast organizátoru jadérka chromozómu 2 mohla nespecificky hybridizovat s NOR oblastí chromozómu 4. Lysák 2003 z tohoto důvodu vyřadil při kontrukci celochromozómové próby specifické BAC klony z pericentromerických a NOR oblastí.

Chromozómy *Arabidopsis thaliana* je moţné vizualizovat celochromozómovými sondami, protoţe se u nich nevyskytuje velké mnoţství rozptýlených repetitivních sekvencích. Také u jiných rostlin s malými genomy byly touto metodou úspěšně vizualizovány chromozómy (Dong *et al*., 2000; Song *et al*., 2000). Sondy se dále vyuţívají k analýzám evolučního vývoje karyotypů příbuzných druhů.

S vyuţitím konstrukce celochromozómové próby z bakteriálních klonů bude v budoucnu moţné studovat organizaci genomu během vývoje rostliny. Po dostatečné optimalizaci metody by mohly být dokonce sledovány chromatinové modifikace, jako methylace DNA nebo histonové modifikace. Změny v organizaci chromatinu by mohly být poté studovány v souvislosti s replikací a transkripčními procesy u jednotlivých chromozómových teritorií. (Lysak *et al*., 2001).

7 Závěr

Z BAC klonů z databáze TAIR nebylo, vzhledem k jejich kvalitě, možné vyizolovat dostatečné množství BAC pro sestavení celochromozómové próby chromozómu 2. V antibioticích se množila pouze polovina bakteriálních vektorů. Podařilo se vyizolovat 2 platy, ale hybridizoval pouze jeden. Tímto způsobem byla vizualizována čtvrtina chromozómu získaná z platu 1. Výsledný signál nahybridizované próby byly 4 naznačené oblasti. Signály byly většinou slabé, kdy se patrně jednalo o důsledek dekondenzace chromatinu protoplastů. Mohlo však také jít o špatný postup při konstrukci próby nebo nedostatečně optimalizované metodě FISH, která nevycházela vždy.

8 Seznam zkratek a pojmŢ

AGSA - agaróza

BAC ï bakteriální umĽlý chromozóm

BFM ï bromfenolová modŚ

Clustery ï shluky

DAPI ï 4',6-diamidin-2-fenylindol

DIG ï digoxigenin

FISH ï fluorescenļní *in situ* hybridizace

HMG ï skupina vysoké pohyblivosti

Intermingling ï promíchávání

ICD model ï interchromozomální doména

IC-CT model ï chromozomální teritorium-interchromatinové domény

ICN model ï interchromatinová síŠ

Loop - smyļka

MS - Murashi a Skoog médium

NOR ï organizátor jadérka

Rekalcitrance - neschopnost diferenciace

Ridges ï oblasti zvýġené genové exprese

ROS ï reaktivní kyslíkové radikály

TBE ï Tris borátový pufr

9 Zdroje

Alberts, B., Bray, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2005): Základy buňčné biologie ï Úvod do molekulární biologie buňky. Espero Publishing. Ústí nad Labem. 740s.

Asakawa, S., Abe, I., Kudoh, Y., Kishi, N., Wang, Y., Kubota, R., Kudoh, J., Kawasaki, K., Minoshima, S., *et* Shimizu, N. (1997): Human BAC library: construction and rapid screening. Gene 191: 69±79.

Avramova, Z. J. (2002): Heterochromatin in animals and plants. Similarities and differencies. Plant Physiology 129: 40ï 49.

Berr, A., Schubert, I. (2007): Interphase chromosome arrangement in *Arabidopsis thaliana* is similar in differentiated and meristematic tissues and shows a transient mirror symmetry after nuclear division. Genetics 176 : 853-863.

Bode, J., Goetze, S., Heng, H., Krawetz, S. A., Benham, C. (2003): From DNA structure to gene expression: mediators of nuclear compartmentalization and dynamics. Chromosome Research 11: 435ï 45.

Bolzer, A., Kreth, G., Solovei, I., Koehler, D., Saracoglu, K., Fauth, C., Müller, S., Eils, R., Cremer, C., Speicher, M. R., Cremer, T. (2005): Threedimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. PLoS Biology 3: 157.

Boyko, A., Kovalchuk, I. (2013): Epigenetic regulation of genome stability in plants in Response to stress. In: Grafi, G., Ohad, N. Epigenetic memory and control in plants 41-56, Springer, Heidelberg.

Boyle, S., Gilchrist, S., Bridger, J. M., Mahy, N.. L., Ellis, J. A., Bickmore, W. A. (2001): The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. Human Molecular Genetics 10: 211ï 9.

Branco, M. R., Pombo, A. (2006): Intermingling of chromosome territories in interphase suggests role in translocations and transcription-dependent associations. PLoS Biology 4: 138.

Bridger, J. M., Boyle, S., Kill I. R., Bickmore, W. A. (2000): Re-modelling of nuclear architecture in quiescent and senescent human fibroblasts. Current Biology 10: 149ï 52.

Caron, H., van Schaik, B., van der Mee, M., Baas, F., Riggins, G., van Sluis, P., Hermus, M. C., van Asperen, R., Boon, K., Voute, P. A., Heisterkamp, S., van Kampen, A., *et* Versteeg, R. (2001): The human transcriptome map: clustering of highly expressed genes in chromosomal domains. Science 291: 1289ï 1292.

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

Cremer, T., Cremer, M. (2010): Chromosome territories. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2: a003889.

Cremer, T., Kurz, A., Zirbel, R., Dietzel, S., Rinke, B., Schrock, E., Speicher, M. R., Mathieu, U., Jauch, A., Emmerich, P., Scherthan, H., Ried, T., Cremer, C., *et* Lichter, P. (1993): Role of chromosome territories in the functional compartmentalization of the cell nucleus. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 58: 777ï 792.

Databáze TAIR. The Arabidopsis Information Resource [online]. [Cit. 8. 5. 2014] Dostupné z: www.arabidopsis.org.

Debeaujon, I., Branchard, M. (1992): Induction of somatic embryogenesis and callogenesis from cotyledons and leaf protoplasts derived colonies of melon (*Cucumis melo* L.). Plant Cell Reports 12: 37ï 40.

Dietzel, S., Zolghadr, K., Hepperger, C., Belmont, A. S. (2004): Differential largescale chromatin compaction and intranuclear positioning of transcribed versus non-transcribed transgene arrays containing beta-globin regulatory sequences. Journal of Cell Science 117: 4603ï 14.

Dimitri, P., Corradini, N., Rossi, F., Verni, F. (2005): The paradox of functional heterochromatin. Bioessays 27: 29ï 41.

Dunham, I., Shimizu, N., Roe, B. A., *et* Chissoe S. (1999): The DNA sequence of human chromosome 22. Nature 402: 489±95.

Exner, V, Hennig, L. (2008): Chromatin rearrangements in development. Current Opinion in Plant Biology 11: 64ï 69.

Fransz, P., Armstrong, S., Alonso-Blanco, C., Fischer, T. C., Torres-Ruiz, R. A., Jones, G. (1998): Cytogenetics for the model plant *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal. 13: 867ï 876.

Fransz, P. F., Armstrong, S., De Jong, J. H., Parnell, L. D., Van Drunen, C., Dean, C., Zabel, P., Bissing, T., Jones, G. H. (2000): Integrated cytogentic map of chromosome arm 4S of *A. thaliana*: structural organization of heterochromatic knob and centromere region. Cell, 100: 367***ï*** 376.

Fransz, P., de Jong, J. H., Lysak, M. A., Ruffini-Castiglione, M, Schubert, I. (2002): Interphase chromosomes in *Arabidopsis* are organized as well defined chromocenters from which euchromatin loops emanate. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 99: 14584ï 14589.

Fransz, P., ten Hoopen, R. *et* Tessadori, F. (2006): Composition and formation of heterochromatin in *Arabidopsis thaliana*. Chromosome Research 14: 71-82.

Fuchs, J., Kloos, D. U., Ganal, M. W., Schubert, I. (1996): *In situ* localization of yeast artificial chromosome sequences on tomato and potato metaphase chromosomes. Chromosome Research 4: 277***ï*** 281.

Garcia-Fernandez, J. (2005): The genesis and evolution of homeobox gene clusters. Nature. Review Genetics 6: 881ï 892.

Gierman, H. J., Indemans, M. H. G., Koster, J., Goetze, S., Seppen, J., Geerts, D., van Driel, R., *et* Versteeg, R. (2007): Domain-wide regulation of gene expression in the human genome. Genome Research 17: 1286ï 1295.

Gilbert, N., Boyle, S., Fiegler, H., Woodfine, K., Carter, N. P., Bickmore, W. A. (2004): Chromatin architecture of the human genome: gene-rich domains are enriched in open chromatin fibers. Cell 118: 555ï 66.

Goetze, S., Mateos-Langerak, J., Gierman, H. J., de Leeuw, W., Giromus, O., Indemans, M. H. G., Koster, J., Ondrej, V., Versteeg, R., van Driel, R. (2007a): The 3D structure of human interphase chromosome is related to the transcriptome map. Molecular and Cellular Biology, 27: 4475-4487.

Goetze, S., Mateos-Langerak, J., *et* van Driel, R. (2007b): Three-dimensional genome organization in interphase and its relation to genome function. In Seminars in cell & developmental biology 18: 707-714.

Grafi, G. (2004): How cells dedifferentiate: a lesson from plants. Developmental Biology 268: 1ï 6.

Grafi, G. (2009): The complexity of cellular dedifferentiation: implications for regenerative medicine. Trends in Biotechnology 27: 329ï 332.

Green, E. D., Riethman, H. C., Dutchik, J. E., *et* Olson, M. V. (1991): Detection and characterization of chimeric yeast artificial chromosome clones. Genomics 11: 658ï 669.

Heng, H. H., Goetze, S., Christine, J. Y., Liu, G., Stevens, J. B., Bremer, Wykes S. M., Bode J., *et* Krawetz, S. A. (2004): Chromatin loops are selectively anchored using scaffold/matrix-attachment regions. Journal of Cell Sciences 117: 999ï 1008.

Chambeyron, S., Da Silva, N. R., Lawson, K. A., *et* W. A. Bickmore. (2005): Nuclear re-organisation of the Hoxb complex during mouse embryonic development. Development 132: 2215ï 2223.

Jiang, F., Zhu, J., *et* Liu, H. L. (2013): Protoplasts: a useful research system for plant cell biology, especially dedifferentiation. Protoplasma, 250: 1231-1238.

Katagiri, T., Asakawa, S., Minagawa, S., Shimizu, N., Hirono, I., *et* Aoki, T. (2001): Construction and characterization of BAC libraries for three fish species; rainbow trout, carp and tilapia. Animal Genetics, 32: 200-204.

Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima S., Yokochi M., Mizuno, Y., *et* Shimizu N. (1998): Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. Nature 392: 605±8.

Kolářek, E. (2007): Molekulární biologie v medicíně. 1. vyd. Brno: Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, 218 s.

Kouprina, N., Eldarov, M., Moyzis, R., Resnick, M., *et* Larionov, V. (1994): A model system to assess the integrity of mammalian YACs during transformation and propagation in yeast. Genomics 21: 7ï 17.

Larionov, V., Kouprina, N., Nikolaishvili, N., *et* Resnick, M. A. (1994): Recombination during transformation as a source of chimeric mammalian artificial chromosomes in yeast (YACs). Nucleic Acids Research 22: 4154ï 4162.

Lin, X., Kaul, S., Rounsley, S., Shea, T. P., Benito, M. I., Town, C. D., Fujii, C. Y., Mason, T., Bowman, C. L., Barnstead, M., Feldblyum, T. V., Buell, C. R., Ketchum, K. A., Lee, J., Ronning, C. M., Koo, H. L., Moffat, K. S., Cronin, L. A., Shen, M., Pai, G., Van Aken, S., Umayam, L., Tallon, L. J., Gill, J. E., Adams, M. D., Carrera, A. J., Creasy, T. H., Goodman, H. M., Somerville, C. R., Copenhaver, G. P., Preuss, D., Nierman, W. C., White, O., Eisen, J. A., Salzberg, S. L., Fraser, C. M., Venter, J. C. (1999): Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. Nature. 402: 761-8.

Lysak, M. A., Fransz, P. F., Ali, H. B., Schubert, I. (2001): Chromosome painting in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal, 28: 689-697.

Lysak, M. A., Pecinka, A., Schubert, I. (2003): Recent progress in chromosome painting of *Arabidopsis* and related species. Chromosome Research, 11: 195-204.

Misteli, T. (2008): Chromosome territories: The arrangement of chromosomes in the nucleus. Nature Education 1: 167.

Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D. & Koornneef, M. (1998): *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. Science 282: 662±665.

Navrátilová, B., Greplová, M., Vyvadilová, M., Klíma, M., Gajdová, J., Skálová, D. (2006): Electrofusion of protoplasts in selected vegetables of *Brassica, Cucumis, and Solanum genera*. Acta Horticulturae 725: 801ï 805.

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

OndŚej, V., Navrátilová, B., Protivánková, I., Piterková, J., SedláŚová, M., Lebeda, A. (2010): Recondensation level of repetitive sequences in the plant protoplast nucleus is limited by oxidative stress. Journal of Experimental Botany 61: 2395-2401.

Papadakis, A. K., Roubelakis-Angelakis, K. A. (2002): Oxidative stress could be responsible for the recalcitrance of plant protoplasts. Plant Physiology and Biochemistry 40: 549ï 559.

Pecinka, A., Schubert, V., Meister, A., Kreth, G., Klatte, M., Lysak, M. A., Fuchs, J., Schubert, I. (2004): Chromosome territory arrangement and homologous pairing in nuclei of *Arabidopsis thaliana* are predominantly random excerpt for NOR-bearing chromosomes. Chromosoma 113: 258ï 269.

Rakoczy-Trojanowska, M. (2002): Alternative methods of plant transformation: a short review. Cellular and Molecular Biology Letters 7: 849ï 858.

Roh, T. Y., Cuddapah, S., *et* Zhao, K. (2005): Active chromatin domains are defined by acetylation islands revealed by genome-wide mapping. Genes & Development 19: 542ï 552.

Rosypal, S. (1999): Úvod do molekulární biologie. 2. díl, (Molekulární biologie eukaryot). 3. vyd., inovované Brno: Stanislav Rosypal, 600 s.

Shopland, L. S., Lynch, C. R., Peterson, K. A., Thornton, K., Kepper, N., Hase, J., Stein, S., Vincent, S., Molloy K. R., Kreth, G., Cremer, C., Bult, C. J., O´Brien T. P. (2006): Folding and organization of a contiguous chromosome region according to the gene distribution pattern in primary genomic sequence. Journal of Cell Biology 174: 27ï 38.

Schubert, V., Klatte M., Pecinka, A., Meister, A., Jasencakova, Z., Schubert, I. (2006): Sister chromatids are often incompletely aligned in meristematic and endopolyploid interphase nuclei of *Arabidopsis thaliana*. Genetics 172: 467ï 475.

Schwarzacher, T., Leitch, A. R., Bennett, M. D., Heslop-Harrison, J. S. (1989)*: In situ* localization of parental genomes in a wide hybrid. Annals of Botany 64: 315***ï*** 324.

Snustad, D. P., *et* Simmons, M. J. (2009): Genetika. Nakladatelství Masarykovy univerzity. Brno. 870s.

Sproul, D., N. Gilbert, *et* W. A. Bickmore (2005): The role of chromatin structure in regulating the expression of clustered genes. Nature Review Genetics 6: 775ï 781.

Taddei, A., Hediger, F., Neumann, F. R., Bauer, C., Gasser, S. M. (2004): Separation of silencing from perinuclear anchoring functions in yeast Ku80, Sir4 and Esc1 proteins. The EMBO Journal 23: 1301ï 12.

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

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

The Arabidopsis genome initiative. (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. Nature. Dec 14; 408(6814):796-815.

Tumbar, T., Sudlow, G., Belmont, A. S. (1999): Large-scale chromatin unfolding and remodeling induced by VP16 acidic activation domain. Journal of Cell Biology 145: 1341ï 54.

van Driel, R., Fransz, P. (2004): Nuclear architecture and genome functioning in plants and animals: what can we learn from both? Experimental Cell Research 296: 86ï 90.

Willetts, N., *et* Skurray, R. (1987): in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology, 2: 1110-1133.

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