

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## Vliv nanočástic stříbra na proces regenerace protoplastů

### DIPLOMOVÁ PRÁCE

<b>Autor:</b>	<b>Bc. Pavla Moricová</b>
<b>Studijní program:</b>	<b>N1406 Biochemie</b>
<b>Studijní obor:</b>	<b>Biochemie</b>
<b>Forma studia:</b>	<b>Prezenční</b>
<b>Vedoucí práce:</b>	<b>Doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.</b>
<b>Odborný konzultant:</b>	<b>Doc. RNDr. Vladan Ondřej, Ph.D.</b>
<b>Termín odevzdání práce:</b>	<b>26. 4. 2011</b>

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne .....

Ráda bych poděkovala Doc. RNDr. Lence Luhové, Ph.D. za milé a odborné vedení, cenné rady a připomínky, velké množství literatury a pomoc při konečném zpracování této diplomové práce.

Dále bych ráda poděkovala svému konzultantovi Doc. RNDr. Vladanovi Ondřejovi, Ph.D. a RNDr. Boženě Navrátilové, Ph.D. za všestrannou pomoc a ochotu při zpracování experimentální části a všem pracovníkům Katedry biochemie, Katedry botaniky a Katedry molekulární biologie a genetiky za vstřícný přístup během zpracování experimentální části diplomové práce.

### **Bibliografická identifikace**

Jméno a příjmení autora: Bc. Pavla Moricová  
Název práce: Vliv nanočástic stříbra na proces regenerace protoplastů  
Typ práce: Diplomová  
Pracoviště: Katedra biochemie  
Vedoucí práce: Doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.  
Rok obhajoby práce: 2011  
Abstrakt:

Protoplast je označení pro buňku zbavenou buněčné stěny. Důležitou vlastností protoplastů je schopnost dediferenciace a skutečnost, že se jedná o totipotentní buňky, které jsou schopné při správných podmínkách obnovovat novou buněčnou stěnu, zahájit buněčný cyklus a dělit se. K rekonstrukci buněčné stěny je důležitá kontrolovaná produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) a pro regenerující protoplasty je typická zvýšená aktivita katalasy a peroxidasy, které hrají roli v procesu polymerizačních reakcí při stavbě buněčné stěny. Nanočástice stříbra (Ag-nč) představují v současné době významnou skupinu bioaktivních látek. Díky širokospektrým antimikrobiálním vlastnostem jsou používány pro biomedicínské účely a s rychlým rozvojem nanotechnologií byly aplikace rozšířeny do mnoha spotřebitelských produktů. Široké použití Ag-nč v praxi má za následek zvýšený výskyt Ag-nč v ekosystému a jejich působení na člověka. V této práci byl sledován vliv Ag-nč a Ag<sup>+</sup> na regeneraci protoplastů *Cucumis sativus* mechanismem produkce ROS a reaktivních forem dusíku (RNS). Další experimenty byly zaměřeny na porovnání dvou genotypů rostlin s výrazně rozdílnou schopností regenerace protoplastů, *C. sativus* a *Brassica oleracea*. Byl sledován vliv Ag-nč, Ag<sup>+</sup> a antioxidantu askorbátu na proces regenerace. Byl detekován pozitivní vliv Ag<sup>+</sup> a Ag-nč v nízké koncentraci (0,05 mg/l) na životnost protoplastů *C. sativus* a následnou tvorbu mikrokalusů. Buňky *B. oleracea* vykazovaly vyšší citlivost na Ag<sup>+</sup>, Ag-nč i askorbát v kultivačním mediu v porovnání s *C. sativus*. Během regenerace protoplastů byly detekovány změny v hydroxymethylaci a methylaci DNA a rovněž v expresi antioxidantních enzymů.

Klíčová slova: Regenerace protoplastů, *C. sativus*, *B. oleracea*, Ag-nč, stříbrné ionty, askorbát, ROS a RNS, životnost, antioxidantní enzymy, 5-methylcytosin, 5-hydroxymethylcytosin  
Počet stran: 114  
Počet příloh: 0  
Jazyk: Český

### **Bibliographical identification**

Autor's first name and surname	Bc. Pavla Moricová
Title	Influence of silver nanoparticles on the process of regeneration of protoplasts
Type of thesis	Master
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
The year of presentation	2011
Abstract:	

Protoplast are plant cells devoid of cell wall. An important feature of protoplasts is their ability for dedifferentiation and the fact that they are totipotent cells that are capable in suitable conditions to restore new cell wall, initiate cell cycle and cell division. Controlled production of reactive oxygen species (ROS) is an important factor for the reconstruction of the cell wall and regenerating protoplasts are characterized by increased activity of catalase and peroxidases, which play a role in the process of polymerization reactions in the cell wall construction. Currently, silver nanoparticles (Ag-np) represent an important group of bioactive substances. They have broad-spectrum antimicrobial properties and they are used for biomedical purposes. Rapid development of nanotechnology applications have been extended into many consumer products. Wide use of Ag-np in practice has led to increased occurrence of Ag-np in the ecosystem and their effect on human health. In this study, the influence of Ag-np and Ag<sup>+</sup> on the regeneration of protoplasts of *Cucumis sativus* via the mechanism of production of ROS and reactive nitrogen species (RNS) was investigated. Further experiments were focused on the comparison of two plant genotypes with a significantly different ability of protoplasts regeneration, *C. sativus* and *Brassica oleracea*. It was found Ag<sup>+</sup> and Ag-np in low concentrations (0.05 mg/l) had a positive effect on the viability of protoplasts of *C. sativus* and subsequent formation of mikrocalli. *B. oleracea* cells were more sensitive than *C. sativus* to Ag<sup>+</sup>, Ag-np and ascorbate in the culture medium. Changes in DNA methylation and hydroxymethylation and in the expression of antioxidant enzymes were also detected during the regeneration of studied protoplasts.

Keywords	Protoplast regeneration, <i>C. sativus</i> , <i>B. oleracea</i> , Ag-np, silver ions, ROS and RNS, viability, antioxidant enzymes, 5-methylcytosine, 5-hydroxymethylcytosine
Number of pages	114
Number of appendices	0
Language	Czech

## OBSAH

CÍLE PRÁCE	- 9 -
TEORETICKÁ ČÁST	- 10 -
1. Úloha reaktivních forem kyslíku v procesu regenerace protoplastů	- 11 -
2. Antioxidační enzymový systém rostlin	- 12 -
3. Stříbrné ionty	- 16 -
3.1 Působení stříbrných iontů na rostlinný organismus	- 16 -
4. Nanočástice stříbra	- 18 -
4.1 Antimikrobiální účinky nanočástic stříbra	- 18 -
4.2 Mechanismus průniku a působení nanočástic stříbra v rostlinné buňce	- 20 -
4.3 Toxicita nanočástic stříbra	- 20 -
4.4 Potenciální účinky uměle vytvořených nanočástic na ekosystém	- 22 -
4.5 Mechanismus vzniku nanočástic stříbra redukcí v alkalickém prostředí	- 24 -
5. Epigenetické modifikace DNA	- 24 -
5.1 Základní informace o methyloaci DNA	- 25 -
5.2 Methyloace DNA u rostlin	- 26 -
5.3 Úloha 5-methylcytosinu v buňce	- 27 -
5.4 Základní informace o hydroxymethyloaci DNA	- 28 -
5.5 Úloha 5-hydroxymethylcytosinu v buňce	- 29 -
5.6 Přeměna 5-methylcytosinu na 5-hydroxymethylcytosin	- 30 -
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	- 33 -
6. Materiál a přístroje	- 34 -
6.1 Chemikálie	- 34 -
6.2 Rostlinný materiál	- 35 -
6.3 Přístroje a experimentální vybavení	- 35 -
7. Použité metody	- 36 -
7.1 Kultivace semen <i>in vitro</i>	- 36 -
7.2 Izolace a purifikace protoplastů	- 37 -
7.2 Stanovení hustoty protoplastů	- 39 -
7.3 Kultivace protoplastů	- 40 -
7.4 Stanovení životnosti	- 40 -
7.5 Stanovení produkce reaktivních forem kyslíku a dusíku	- 40 -
7.6 Stanovení produkce oxidu dusnatého	- 41 -
7.7 Stanovení peroxidasové aktivity	- 42 -
7.8 Stanovení buněčného průměru	- 43 -

7.9	Stanovení mikrokalusů	- 43 -
7.10	Histochemické stanovení	- 43 -
7.11	Kultivace a zpracování protoplastové suspenze pro izolaci DNA a RNA-	43 -
7.12	Izolace DNA z protoplastové suspenze	- 44 -
7.13	Měření koncentrace nukleových kyselin	- 45 -
7.14	Kvantifikace hydroxymethylované DNA specifickým stanovením 5-hydroxymethylcytosinu	- 45 -
7.15	Kvantifikace methylované DNA specifickým stanovením 5-methylcytosinu	- 46 -
7.16	Izolace RNA z protoplastové suspenze	- 47 -
7.17	Reverzní transkripce	- 48 -
7.18	Navržení primerů	- 48 -
7.19	Provedení real-time PCR	- 49 -
7.20	Hodnocení exprese mRNA	- 50 -
7.21	Statistické vyhodnocení	- 51 -
8.	Výsledky	- 51 -

9. Diskuze	- 88 -
10. Závěr	- 97 -
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	- 101 -
POUŽITÁ LITERATURA	- 103 -



# CÍLE PRÁCE

## I. Teoretická část

Vypracování literární rešerše na téma:

- Úloha ROS/RNS v procesu regenerace protoplastů
- Vliv stříbrných iontů a nanočástic stříbra na rostlinnou buňku
- Hydroxymethylace a methylace DNA

## II. Experimentální část

Studium vlivu

- kyseliny askorbové (antioxidant)
- stříbrných iontů
- nanočástic stříbra
- na proces regenerace mezofylových protoplastů
- na produkci ROS a RNS v procesu regenerace mezofylových protoplastů
- na hydroxymethylaci DNA v procesu regenerace mezofylových protoplastů
- na expresi antioxidantních enzymů v procesu regenerace mezofylových protoplastů

u modelových rostlin lišících se schopností regenerace rostlin z protoplastové kultury:

- *Cucumis sativus*
- *Brassica oleracea*

# **TEORETICKÁ ČÁST**

# 1. Úloha reaktivních forem kyslíku v procesu regenerace protoplastů

Pojmem protoplasty jsou označovány buňky zbavené buněčné stěny (Fowke & Constabel, 1986). Tento pojem se používá v souvislosti s buňkami rostlinnými, bakteriálními a houbovými, které mají buněčnou stěnu. Jedinou bariéru mezi vnějším prostředím a vnitřní cytoplazmou buňky tvoří u protoplastů cytoplazmatická membrána. Rostlinné protoplasty jsou schopné dediferenciace a vznikají aseptickou kultivací izolovaných částí rostlin za definovaných experimentálních podmínek (Petřek et al., 2006). Protoplasty lze izolovat z různých rostlinných pletiv a orgánů. Jedná se o totipotentní buňky, které jsou schopny při správných chemických a fyzikálních podnětech obnovovat novou buněčnou stěnu, zahájit buněčný cyklus a mitoticky se dělit nebo regenerovat do různých orgánů. Z nové dceřiné buňky se může za vhodných podmínek regenerovat celá rostlina (Davey et al., 2005).

Mezi základní požadavky na přežití a následné dělení protoplastů patří rekonstrukce buněčné stěny a kontrolovaná produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) (Meyer & Abel, 1975; Roubelakis-Angelakis, 1993). Pro regenerující protoplasty je typická zvýšená aktivita enzymů katalasy ( $\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}_2$  oxidoreduktasa CAT, EC 1.11.1.6) a peroxidasy (donor: $\text{H}_2\text{O}_2$ -oxidoreduktasa POX, EC 1.11.1.7) (Siminis et al., 1993; Siminis et al., 1994). Mezi ROS vyskytující se v rostlinách patří peroxid vodíku  $\text{H}_2\text{O}_2$ , singletový kyslík  $\text{O}_2$ , hydroxylový ion  $\text{OH}^-$ , superoxidový anion-radikál  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , hydroxylový radikál  $\text{HO}^\cdot$ , perhydroxylový radikál  $\text{O}_2\text{H}^\cdot$  (Scandalios, 1990). Produkce ROS v rostlinném organismu je lokalizována v chloroplastech, mitochondriích, peroxisomech, endoplazmatickém retikulu, plazmatické membráně, apoplastu a buněčné stěně (Mittler, 2002). Zdroji ROS u rostlin může být respirační a fotosyntetický elektronový transportní řetězec,  $\beta$ -oxidace mastných kyselin anebo aktivita enzymů xanthinoxidasy (xanthin: $\text{O}_2$ -oxidoreduktasa, EC 1.17.3.2), aminoxidasy (amin: $\text{O}_2$ -oxidoreduktasa obsahující flavin EC 1.4.3.4, obsahující meď EC 1.4.3.6 dělí se na: primární amin: $\text{O}_2$ -oxidoreduktasa EC 1.4.3.21, histamin: $\text{O}_2$ -oxidoreduktasa EC 1.4.3.22), NADPH-oxidasy (NAD(P)H: $\text{O}_2$ -oxidoreduktasa, EC 1.6.3.1), oxalát oxidasy (oxalát: $\text{O}_2$ -oxidoreduktasa, EC 1.2.3.4) a dalších (Mittler, 2002). ROS mají v biologických systémech dvě základní úlohy, vykazují signální funkci, která může vést až k expresi genů, nebo fungují jako toxické meziprodukty aerobního metabolismu způsobující poškození buňky případně její zánik (Neill et al., 2002). Produkce a degradace ROS musí být v rovnováze (Hernández et al., 2006). Peroxid vodíku a další ROS vznikající v extracelulárním prostoru se podílí na obranných

reakcích buňky, např. zapojením se v procesu lignifikace a následného zpevnění buněčné stěny chránící rostlinnou buňku (Olson & Varner, 1993; Wojtaszek, 1997). Rekonstrukce a zpevnění buněčné stěny u protoplastů vyžadují zvýšenou koncentraci peroxidu vodíku na vnější straně cytoplazmatické membrány, kde dochází k intenzivním polymerizačním reakcím, katalyzovanými enzymy s POX aktivitou. Peroxid vodíku vznikající spontánně nebo za katalýzy superoxidodismutasou (superoxid:superoxid-oxidoreduktasa SOD, EC 1.15.1.1) ze superoxidového anion-radikálu produkovaného v reakci katalyzované NADPH-oxidasou lokalizovanou v cytoplasmatické membráně nebo peroxid vodíku produkovaný přímo při oxidaci aminů v apoplastu může být využit POX buněčné stěny při lignifikaci a zesílení buněčné stěny jak během normálního růstu, tak v reakci na vnější podnět jako je např. poranění nebo napadení patogenem (Vranová et al., 2002; Bolwell & Wojtaszek, 1997). Vyšší koncentrace peroxidu vodíku byla prokázána také u kalusů s regeneračním potenciálem (Libik et al., 2005).

Zvýšená akumulace peroxidu vodíku uvnitř buňky působí toxicky a pro přežití je nutná aktivace antioxidačních systémů (de Marco & Roubelakis-Angelakis, 1996). Při nerovnováze mezi tvorbou a degradací ROS dochází k tzv. oxidačnímu stresu. Zvýšená tvorba ROS může být vyvolána během stresové situace jako je sucho, zvýšená salinita prostředí, vysoké a nízké teploty, UV záření, poranění, působení herbicidů nebo infekce patogenem (Papadakis & Roubelakis-Angelakis, 2002). Rostliny disponují celou škálou účinných antioxidačních systémů, které toxický vliv ROS eliminují.

## **2. Antioxidační enzymový systém rostlin**

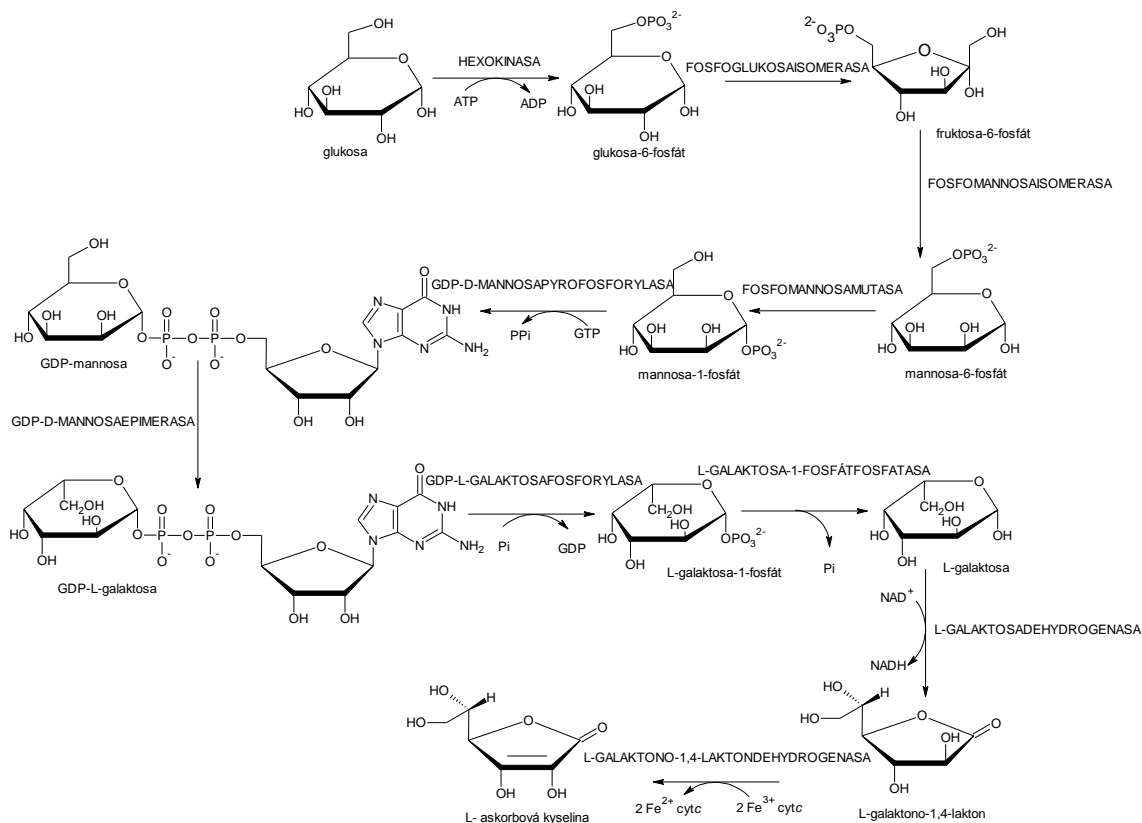
Aerobní organismy vyvinuly složité a vzájemně propojené reakce na ochranu před toxickými účinky ROS. U rostlin, podobně jako u řady dalších živých organismů, se jedná o obranné systémy enzymového a neenzymového charakteru (Mittler, 2002). Nízkomolekulární neenzymové antioxidyanty přítomné v buňkách se podílí na neutralizaci volných radikálů za vzniku nereaktivních sloučenin (Arrigoni & de Tullio, 2002). Mezi takto působící látky se řadí askorbát, glutathion, tokoferoly, karotenoidy, látky fenolické povahy a další (Baťková et al., 2008).

Jedním z nejvýznamnějších neenzymových antioxidyantů zapojených v obranné reakci rostlin je L-askorbát (vitamin C). Jeho přítomnost byla prokázána u většiny typů rostlinných buněk a organel a rovněž v apoplastu. Za fyziologických podmínek se vyskytuje L-askorbát většinou v redukované formě v listech a chloroplastech (v 90 %

převládá forma askorbátu) a jeho intracelulární koncentrace se pohybuje v milimolárních množstvích, např. koncentrace 20 mmol/l se vyskytuje v cytosolu a 20 - 300 mmol/l ve stroma chloroplastu (Smirnov, 1996; Foyer & Lelandais, 1996).

Vedle důležité role askorbátu jako účinného antioxidantu podílejícího se na snížení oxidačního stresu má v rostlinách askorbát široké spektrum dalších funkcí. Podílí se na modulaci aktivity enzymů, působí jako enzymový kofaktor (v chloroplastech vystupuje jako kofaktor deepoxidasy - violaxanthin:askorbát-oxidoreduktasa, EC 1.10.99.3), která převádí violaxanthin a antheroxanthin na zeaxanthin v tzv. xantofylovém cyklu), účastní se syntézy buněčné stěny, jejího prodlužování a zesíťování, podílí se na regulaci buněčného dělení (postup buněčného cyklu z G1 do S fáze) a prodlužování buněk (Noctor & Foyer, 1998; Liso et al., 1988; Smirnov, 1996; Arrigoni, 1994; Cordoba & Gonzalez-Reyes, 1994; Navas & Gomez-Diaz, 1995; de Tullio et al., 1999).

Všechny rostliny mají schopnost *de novo* syntézy askorbátu přes GDP-D-mannosu a L-galaktosu v tzv. Smirnov-Wheelerově cestě (Obr. 1) (Smirnov et al., 2001; Wheeler et al., 1998). Wolucka & Van Montagu navrhli biosyntézu askorbátu přes L-gulosu vznikající z GDP-D-mannosy a GDP-L-gulosy. L-gulosa je konvertována na L-gulono-1,4-lakton a L-askorbovou kyselinu. Tato cesta bývá označována jako větev Smirnov-Wheelerovy cesty biosyntézy askorbátu (Wolucka & Van Montagu, 2003; Badejo et al., 2009).



Obr. 1: Znárodnění Smirnov-Wheelerovy cesty biosyntézy askorbátu. Výchozí surovinou pro tvorbu askorbátu u rostlin je glukosa. Enzymy katalyzující reakce jsou hexokinasa (ATP:D-hexosa-6-fosfotransferasa, EC 2.7.1.1), fosfoglukosaisomerasa (D-glukosa-6-fosfát-aldosa-ketosa-isomerasa, EC 5.3.1.9), fosfomannosaisomerasa (D-mannosa-6-fosfát-aldosa-ketosa-isomerasa, EC 5.3.1.8), fosfomannosamutasa ( $\alpha$ -D-mannosa-1,6-fosfomutasa, EC 5.4.2.8), GDP-D-mannosapyrofosforylasa (GTP: $\alpha$ -D-mannosa-1-fosfát-guanylyltransferasa, EC 2.7.7.13), GDP-D-mannosaepimerasa (GDP-mannosa-3,5-epimerasa, EC 5.1.3.18), GDP-L-galaktosafosforylasa (GDP: $\alpha$ -L-galaktosa-1-fosfátguanylyltransferasa, EC 2.7.7.69), L-galaktosa-1-fosfátfosfatasa (sacharidfosfát-fosfohydrolasa EC 3.1.3.23), L-galaktosadehydrogenasa (D-galaktosa:NAD<sup>+</sup>-oxidoreduktasa EC 1.1.1.48), L-galaktono-1,4-laktondehydrogenasa (L-galaktono-1,4-lakton:ferricytochrom c-oxidoreduktasa, EC 1.3.2.3) (přepřacováno z Hancock et al., 2003; Badejo et al., 2009).

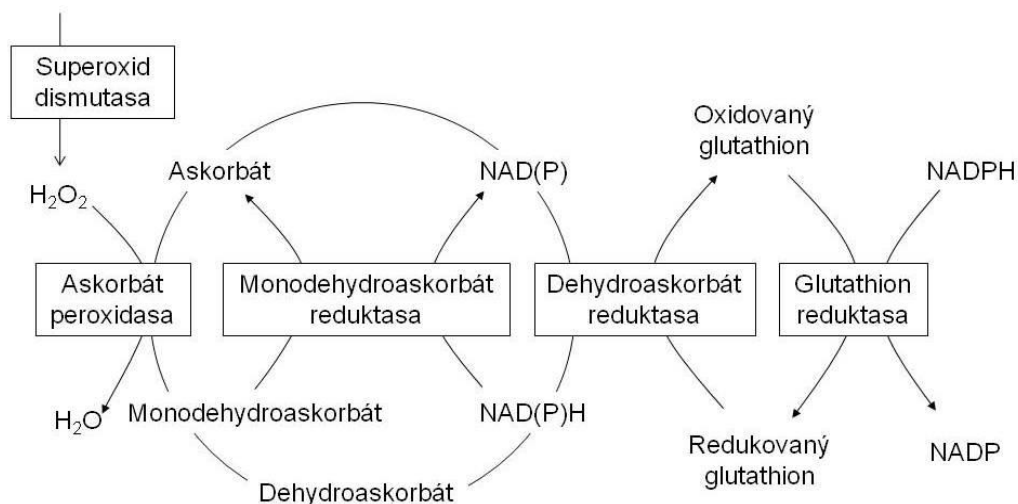
Na obranné reakci rostlin vedoucí ke snížení nebo plné eliminaci oxidativního stresu se podílí i řada enzymů jako je SOD, CAT, glutathionperoxidasa (glutathion:lipid-hydroperoxid-oxidoreduktasa GPX, EC 1.11.1.12), askorbátperoxidasa (L-askorbát:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-oxidoreduktasa APX, EC 1.11.1.11) a další enzymy (Tab. 1). CAT je lokalizována v peroxisomech, SOD v cytosolu, peroxisomech, plastidech, mitochondriích, APX v cytosolu, stromatu a membráně plastidů, mitochondriích,

peroxisomech, v apoplastu a GPX v cytosolu a chloroplastech (Piterková et al., 2005). SOD katalyzuje disproportionaci superoxidového aniontu na peroxid vodíku a kyslík. Peroxid vodíku je přeměněn CAT na vodu a molekulární kyslík. Číslo přeměny CAT je sice velmi vysoké, ale jeho afinita pro peroxid vodíku je relativně nízká. Z tohoto důvodu je důležité zapojení v procesu odbourání peroxidu vodíku dalších antioxidantních enzymů typu GPX a APX, které naopak vykazují vysokou afinitu pro peroxid vodíku. I mírně zvýšená koncentrace peroxidu vodíku může být potenciálně nebezpečná, protože peroxid vodíku v reakci se superoxidovým aniontem vytváří vysoce reaktivní hydroxylový radikál (Arrigoni & de Tullio, 2002).

Tab. 1: Enzymy podílející se na odstranění ROS (přepřacováno z Blokhina et al., 2003).

Enzym	Katalyzovaná reakce
Superoxiddismutasa	$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \leftrightarrow 2H_2O_2 + O_2$
Katalasa	$2H_2O_2 \leftrightarrow O_2 + 2H_2O$
Glutathionperoxidasa	$2GSH + PUFA-OOH \leftrightarrow GSSG + PUFA + 2H_2O$
Askorbátperoxidasa	$AA + H_2O_2 \leftrightarrow DHA + 2H_2O$
Monodehydroaskorbátreduktasa	$NADH + 2MDHA \leftrightarrow NAD^+ + 2AA$
Dehydroaskorbátreduktasa	$2GSH + DHA \leftrightarrow GSSG + AA$
Glutathionreduktasa	$NADPH + GSSG \leftrightarrow NADP^+ + 2GSH$

Mezi nejvýznamnější enzymy podílející se na katabolismu ROS patří SOD a enzymy askorbát-glutathionového cyklu, který zahrnuje enzymy APX, monodehydroaskorbátreduktasu (NADH:monodehydroaskorbát-oxidoreduktasa, EC 1.6.5.4), dehydroaskorbátreduktasu (glutathion:dehydroaskorbát-oxidoreduktasa, EC 1.8.5.1) a glutathionreduktasu (glutathion:NADP<sup>+</sup>-oxidoreduktasa GR, EC 1.8.1.7) (Piterková et al., 2005). Tyto enzymy katalyzují přeměnu toxického peroxidu vodíku na vodu a dochází k regeneraci askorbátu a glutathionu. Reakce askorbát-glutathionového cyklu jsou znázorněny na Obr. 2.



Obr. 2: Askorbát-glutathionový cyklus (přepřacováno z May et al., 1998).

### 3. Stříbrné ionty

Stříbro je ušlechtilý kov využívaný člověkem již od středověku. Z fyzikálního hlediska se stříbro vyznačuje nejvyšší tepelnou a elektrickou vodivostí ze všech kovů a zároveň vysokou poddajností a kujností. Díky těmto vlastnostem je stříbro využíváno v řadě aplikací. V současné době nachází mnoho uplatnění v elektrotechnice a nanotechnologických postupech (He & Li, 2001; Křížková et al., 2009).

#### 3.1 Působení stříbrných iontů na rostlinný organismus

Obecně působení těžkých kovů na organismus je založeno na jejich interakci s biopolymery, především proteiny a nukleovými kyselinami a na indukci vzniku ROS a s tím spojené aktivace detoxikačních mechanismů. Vystavení buněk působení oxidačního stresu má za následek poškození proteinů, nenasycených mastných kyselin a DNA. Tyto jevy způsobují poškození buňky a mohou vyústit v její smrt (Ogonczyk et al., 2005).

U rostlin dochází pravděpodobně k vazbě stříbrných iontů na polysacharidy buněčné stěny a následně k tvorbě ROS vedoucí k narušení membránové permeability s následnou buněčnou smrtí (Ogonczyk et al., 2005). Stříbrné ionty v rostlinách ovlivňují celou řadu procesů. Mezi nejvýznamnější patří vyvolání syntézy detoxikačních peptidů a proteinů (fytochelatinů, proteinů podobné metalothioninů), tvorba obranných proteinů (fytoalexinů a thioninů), ovlivnění příjmu vody a syntézy



membránových lipidů, inhibice enzymů a ovlivnění signálních drah (inhibice působení ethylénu, vliv na biosyntézu ethylénu, zvýšení hladiny kyseliny abscisové) (Křížková et al., 2009). Při submikromolárních koncentracích  $\text{Ag}^+$  dochází k interakci s enzymy dýchacího řetězce, jako je NADH-dehydrogenasa (NADH:ubiquinon-oxidoreduktasa, EC 1.6.5.3) a následně k rozpojení respirace a zastavení syntézy ATP.  $\text{Ag}^+$  se vážou na transportní proteiny, dochází k úniku protonů s následnou indukci kolapsu protonmotivní síly (Dibrov et al., 2002; Holt & Bard, 2005; Lok et al., 2006). Stříbro inhibuje příjem fosfátu a způsobuje snížení jeho obsahu v intracelulárním prostoru (Schreurs & Rosenberg, 1982). Interakce s respiračními a transportními proteiny je dána vysokou afinitou  $\text{Ag}^+$  k thiolovým skupinám cysteinu těchto proteinů (Holt & Bard, 2005; Liao et al., 1997; Petering, 1976).

Suchozemské rostliny jsou nejcitlivější na působení stříbra ve stadiu klíčení, kde byly negativní efekty  $\text{Ag}^+$  pozorovány při koncentraci 750  $\mu\text{g/l}$  v mediu u salátu hlávkového (*Lactuca sativa*) (Ratte, 1999), letální efekt na rostliny kukuřice seté (*Zea mays*) se projevil při koncentraci  $\text{Ag}^+$  9 800  $\mu\text{g/l}$  (Kai et al., 2006). Semena kukuřice, salátu, ovsa (*Avena sativa*), brukve (*Brassica rapa*), čínského zelí (*Brassica campestris*), soji (*Glycine max*) a špenátu (*Spinacia oleracea*) pěstovaná v půdě obsahující sulfid stříbrný se vyvíjela bez známek růstové deprese i při nejvyšším testovaném obsahu  $\text{Ag}_2\text{S}$  v půdě, který byl 106  $\mu\text{g/g}$  (Hsieh & Graham, 2001; Křížková et al., 2009).

V nedávné studii byl zkoumán vliv dusičnanu stříbrného na klíčící rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Experimenty prokázaly zvýšenou expresi asi poloviny proteinů spojených se senescencí, ale geny specifické pro senescenci indukované nebyly. To dokazuje, že k pravé senescenci působením stříbrných iontů u rostlin nedochází (Navabpour et al., 2003).

Vliv  $\text{Ag}^+$  na indukci oxidačního stresu u rostlin potvrzuje detekovaný zvýšený obsah peroxidovaných mastných kyselin a indukce genu kódujícího GPX. Pokud byly rostliny ošetřeny zhášeči volných radikálů, vliv  $\text{Ag}^+$  byl výrazně nižší. V exponovaných rostlinách byla prokázána přítomnost singletového kyslíku, superoxidového a hydroxylového radikálu (Navabpour et al., 2003).

Byl popsán vliv  $\text{Ag}^+$  na regeneraci protoplastové suspenze izolované z několika druhů a genotypů rodu *Brassica* (brukev) a některých vzdálených příbuzných tomuto rodu, např. řimducha fialová (*Orychophragmus violaceus*) (Hu et al., 1999). Vyzolované protoplasty byly kultivovány v regeneračním mediu obsahující dusičnan stříbrný. Testované koncentrace dusičnanu stříbrného byly 6 a 30  $\mu\text{mol/l}$  a jako kontrola sloužila protoplastová suspenze kultivovaná v mediu bez obsahu  $\text{AgNO}_3$ . Byl zaznamenán pozitivní vliv  $\text{Ag}^+$  na regeneraci protoplastů v obou testovaných

koncentracích. Dusičnan stříbrný přítomný v regeneračním mediu měl pozitivní vliv na tvorbu prýtů u některých genotypů, u kterých regenerace bez obsahu Ag<sup>+</sup> nebyla zaznamenána (Hu et al., 1999).

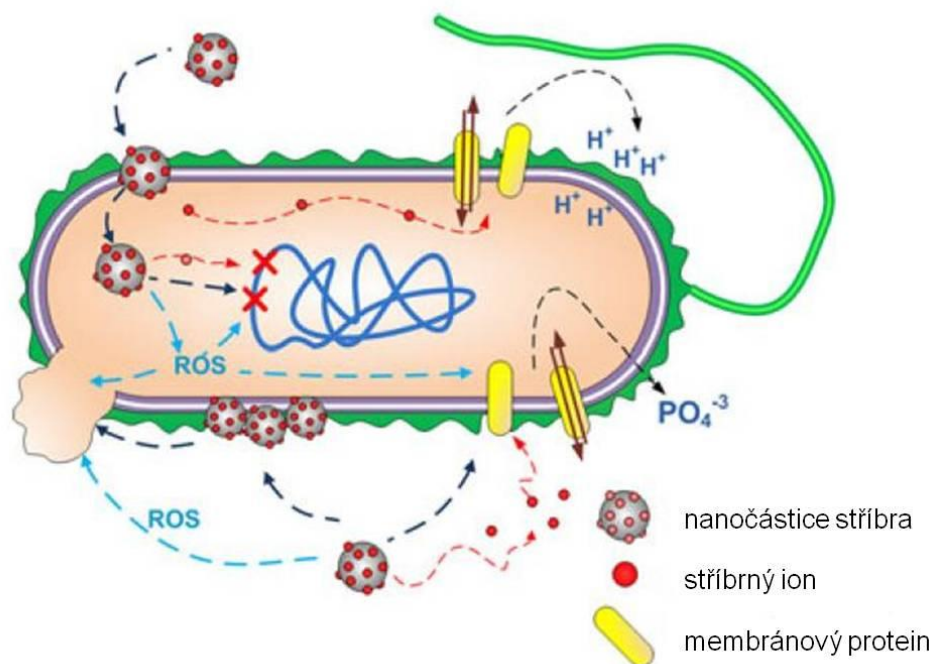
## 4. Nanočástice stříbra

Nanočástice kovů (nč) jsou v současné době díky svým výjimečným vlastnostem předmětem značného zájmu jak ze strany vědeckého výzkumu, tak i ze strany průmyslových aplikací. Nč o velikosti menší než 100 nm alespoň v jednom rozměru našly uplatnění v mnoha oblastech, např. v textilním průmyslu, elektrotechnice, farmacii, kosmetice či lékařství (Dunphy Guzman et al., 2006a). Nanočástice stříbra (Ag-nč) představují významnou skupinu látek zejména díky svým optickým, elektrickým a biologickým vlastnostem. V současné době patří Ag-nč mezi znovuobjevené látky vykazující antimikrobiální aktivitu při výrazně nižší toxicitě v porovnání se stříbrnými ionty (Lambert, 2005; Panáček et al., 2010). Širokospektré antimikrobiální vlastnosti Ag-nč podporují jeho používání v biomedicínských aplikacích, k čištění vody a vzduchu, k produkci potravin, kosmetiky, oblečení. S rychlým rozvojem nanotechnologií byly aplikace rozšířeny a nyní je stříbro jako nanomateriál běžně používáno ve spotřebitelských produktech.

### 4.1 Antimikrobiální účinky nanočástic stříbra

Ag-nč jsou často využívány pro své antimikrobiální účinky. Toxicky působí na řadu bakterií (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella mobilis*, *Klebsiella pneumonia* apod.) (Benn & Westerhoff, 2008; Chen & Chiang, 2008; Falletta et al., 2008; Hernandez-Sierra et al., 2008; Ingle et al., 2008; Jung et al., 2009; Kim, 2007; Kim et al., 2007, 2009a, b; Raffi et al., 2008; Ruparelia et al., 2008; Smetana et al., 2008; Sondi & Salopek-Sondi, 2004; Vertelov et al., 2008; Yang et al., 2009; Yoon et al., 2008a, b), hub (*Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichophyton mentagrophytes* a *Penicillium citrin*) (Kim et al., 2007, 2008a, b, 2009a, b; Roe et al., 2008; Vertelov et al., 2008; Zhang et al., 2008) a také virů (Hepatitis B, HIV-1, syncytial virus) (Elechiguerra et al., 2005; Lu et al., 2008; Sun et al., 2008; Zodrow et al., 2009). Antibakteriální účinky iontového stříbra jsou známy a prokázány. Předpokládá, že uvolněné ionty z Ag-nč v buňce jsou zodpovědné za část jejich antibakteriálních vlastností (Marambio-Jones & Hoek, 2010).

U bakterií byl navržen mechanismus působení Ag-nč (Obr. 3) spočívající v uvolňování iontů stříbra z Ag-nč vedoucí k tvorbě ROS (Hwang et al., 2008; Smetana et al., 2008; Kim et al., 2007) a poškození buněčné membrány (Choi et al., 2008; Raffi et al. 2008; Smetana et al. 2008; Sondi & Salopek-Sondi, 2004). V předpokládaném mechanismu existuje ale stále několik nesrovnalostí.



Obr. 3: Obrázek znázorňuje interakci Ag-nč s bakteriální buňkou. Ag-nč mohou uvolňovat stříbrné ionty, podporovat tvorbu ROS a interagovat s membránovými proteiny a ovlivňovat jejich správnou funkci. Uvolněné Ag<sup>+</sup> jsou schopny interagovat s membránovými proteiny. Ag-nč se mohou akumulovat v buněčné membráně ovlivněním její propustnosti nebo vstupovat do buňky a generovat ROS nebo Ag<sup>+</sup>. Ag-nč v buňce mohou ovlivňovat DNA samotné nebo prostřednictvím uvolněných Ag<sup>+</sup>. Tvorba ROS v buňce může ovlivnit DNA, buněčnou membránu a membránové proteiny (přepřacováno z Marabio-Jones & Hoek, 2010).

## **4.2 Mechanismus průniku a působení nanočástic stříbra v rostlinné buňce**

Průnik Ag-nč do buňky a mechanismus ovlivnění buňky je nejlépe prostudován u bakterií. S využitím transmisní elektronové mikroskopie bylo zjištěno, jakým způsobem se Ag-nč mohou dostat do rostlinné buňky. Ag-nč jsou schopny přilnout na buněčnou stěnu a proniknout do buněk prostřednictvím pórů v buněčné stěně. Průměr pórů v buněčné stěně se pohybuje v rozmezí 5 až 20 nm a k plazmatické membráně tak projdou částice menší než 20 nm. Ag-nč pravděpodobně vyvolávají vznik nových pórů o větší velikosti než je obvyklé a tím zvyšují a usnadňují vstup nč přes buněčnou stěnu (Choi et al., 2008; Raffi et al., 2008; Sondi a Salopek-Sondi, 2004; Morones et al., 2005). Podrobný mechanismus, jakým Ag-nč interagují s cytoplazmatickou membránou a jsou schopny proniknout do buněk, není zcela známý. Potenciální vstup Ag-nč přes dvojvrstvu lipidů tvořící membránu je předmětem řady studií. Možnými cestami vstupu Ag-nč přes plazmatickou membránu do buňky je endocytosa, účast transportních proteinů nebo iontových kanálků. Po vstupu do buňky se Ag-nč mohou vázat na různé typy organel jako je např. endoplazmatické retikulum, Golgiho komplex a tak interferovat s metabolickými procesy (Navarro et al., 2008a).

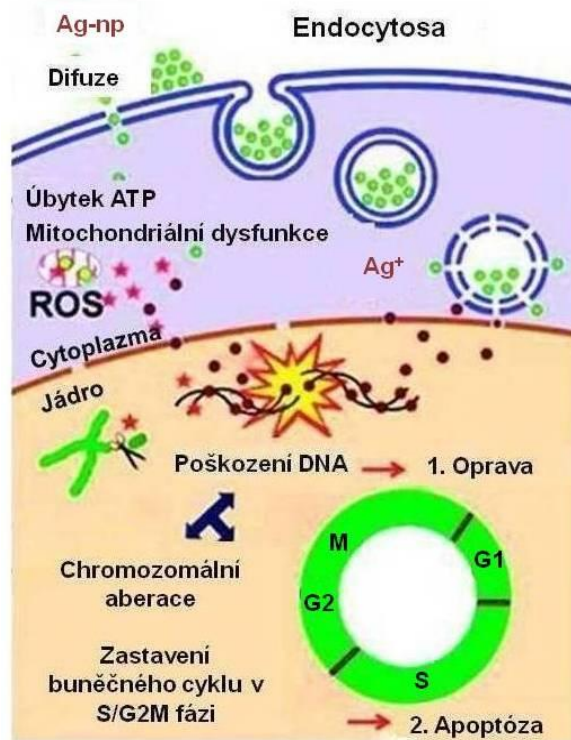
Obecně kovy mohou působit jako katalyzátory a vytvářet ROS v přítomnosti kyslíku (Stohs & Bagchi, 1995). V této souvislosti mohou Ag-nč katalyzovat reakce s kyslíkem, což vede k nadměrné produkci volných radikálů. Studie provedené v eukaryotických buňkách naznačují, že Ag-nč brání působení antioxidantních obranných systémů interakcí s redukováným glutationem (GSH), vazbou na GR a podobné enzymy (Carlson et al., 2008). To by mohlo snížit poměr GSH/GSSG a následně zvýšit množství ROS v buňce.

## **4.3 Toxicita nanočástic stříbra**

Navzdory výborným antimikrobiálním vlastnostem je nutno podotknout, že vývoj v oblasti nanotechnologií a široké použití Ag-nč v praxi má za následek zvýšenou četnost Ag-nč v ekosystému a jeho působení na člověka. Možné toxické dopady Ag-nč zatím nejsou známy. Ag-nč mohou být uvolněny do prostředí z místa jejich produkce nebo erozí z materiálů příslušných výrobků (např. antibakteriální nátěry, stříbrem impregnované vodní filtry) (Benn & Westerhoff, 2008). Objevily se studie, které naznačují, že stříbro uvolněné z těchto systémů může mít dopad na nejnižší trofickou úroveň, tedy bakterie.

Byl prokázán toxický vliv Ag-nč na ryby, např. dánío pruhované (*Danio trio*) (Asharani et al., 2008; Yeo & Kang, 2008; Yeo & Yoon, 2009), dvoukřídlý hmyz, např. octomilku obecnou (*Drosophila melanogaster*) (Ahamed et al., 2010) a na savčí buněčné linie myši (Braydich-Stolle et al., 2005; Hussain et al., 2005), krysy (Kim et al., 2008a, b; Sung et al., 2008) a lidí (Asharani et al., 2009; Braydich-Stolle et al., 2005.; Hsin et al., 2008; Hussain et al., 2005). Experimenty prováděné u hlodavců poukazují na možnost kumulace Ag-nč po vstupu do těla, kde následně dochází k poškození tkáně, např. játra, plíce, čichové buňky (Arora et al., 2009; Braydich-Stolle et al., 2005; Hussain et al., 2005; Sung et al., 2008).

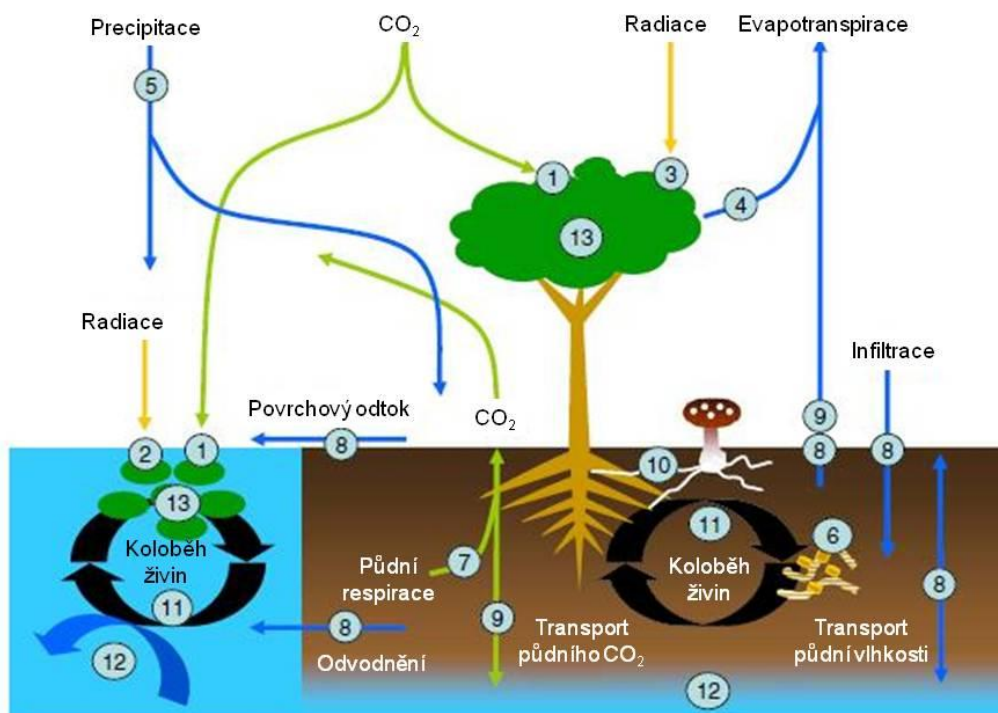
Ve studii Asharani et al. byl sledován vliv Ag-nč na lidské plicní buňky fibroblastů (IMR-90) a lidské buňky glioblastomu (U251). Testované koncentrace Ag-nč byly 25, 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g/ml}$ , v kontrolních experimentech byly buňky inkubované v mediu bez obsahu Ag-nč. Toxicita nanočástic byla hodnocena pomocí změn v buněčné morfologii, životaschopnosti buněk, metabolické aktivity a oxidačního stresu. Pomocí elektronové mikroskopie byla lokalizována přítomnost endosomů s nanočásticemi v cytosolu. Byla prokázána koncentračně a časově závislá cytotoxicita, genotoxicita a zastavení buněčného cyklu u buněk ošetřených Ag-nč. Ag-nč snižovaly obsah ATP v buňce, což způsobuje poškození mitochondrií a zvýšenou produkci ROS v závislosti na koncentraci Ag-nč. Ag-nč způsobily zastavení buněčného cyklu v G2/M fázi možná kvůli opravě poškozené DNA. Experimenty však neprokázaly masivní apoptózu. Transmisní elektronová mikroskopie poukázala na přítomnost Ag-nč uvnitř mitochondrie a jádra, což může být spojeno s jejich přímým zapojením do mitochondriální toxicity a poškozením DNA. Možným mechanismem toxicity je přerušení mitochondriálního respiračního řetězce Ag-nč vedoucího k produkci ROS a přerušení syntézy ATP, které způsobuje poškození DNA, což vede k zastavení buněčného cyklu (Obr. 4) (Asharani et al., 2009). Další rozsáhlé *in vitro* studie poukazují na toxicitu Ag-nč na savčí buňky odvozené od kůže, jater, plic, mozku, vaskulárního systému, reprodukčních orgánů. Toxicita Ag-nč se může projevit na buněčné membráně, mitochondriích či genetickém materiálu (Ahamed et al., 2010).



Obr. 4: Znárodnění pravděpodobného průniku Ag-nč do lidské buňky a jejich možné působení uvnitř (přepřacováno z Asharani et al., 2009).

#### 4.4 Potenciální účinky uměle vytvořených nanočástic na ekosystém

Vývoj v oblasti nanotechnologií vede k intenzivní produkci a rychlému šíření nových materiálů, které jsou zdrojem nč působících na okolní prostředí. Jejich možné ekotoxikologické dopady zatím nejsou známy. Očekává se, že se nč budou uvolňovat do atmosférického, pozemního i vodního prostředí (Nowack & Bucheli, 2007), kde je jejich chování do značné míry neznámé. Jedinečné vlastnosti nč, jako je vysoký specifický povrch, četná reaktivní místa na povrchu a jejich pohyblivost, by mohly vést k neočekávaným zdravotním rizikům a negativním důsledkům na životní prostředí (Maynard et al., 2006; Wiesner et al., 2006). Proto organismy a především ty, které interagují s bezprostředním okolím, jako jsou řasy, rostliny a houby by mohly být nejvíce postiženy působením nč. Potenciální nežádoucí účinky mohou mít nč na člověka, stejně jako na celý ekosystém (Obr. 5). Je potřeba tyto důsledky zkoumat v rané fázi rozvoje nanotechnologií (Colvin, 2003; Dunphy Guzman et al., 2006b; Nel et al., 2006; Oberdörster et al., 2005).



Obr. 5: Zjednodušené schéma některých procesů ekosystému. Zkonstruované nč obecně (tedy ne ty přirozeně se vyskytující v přírodě) mohou mít vliv na fotosyntetické organismy. Mohou redukovat fixaci oxidu uhličitého (1), nč adsorbované (2) nebo přichycené (3) na fotosynteticky aktivních plochách by mohly snížit dostupnost světla nebo výměnu plynů (4) a tak ovlivnit intenzitu fotosyntézy. Nč přítomné v atmosféře mohou fungovat jako nukleační jádra a zvyšovat tvorbu dešťových kapek (5). Nč mohou mít dopad na bakterie, houby a jiné edafické živočichy (6), mohou ovlivnit dýchání v půdě (7) a další procesy, jako je transport kapalin (8) nebo plynů (9) v půdě a také modifikovat symbiotické vztahy (10). To by mohlo vést k poškození tří klíčových procesů ekosystému, tj. koloběh živin (11), vylučování vody (12) a produkce biomasy (13) (přepřacováno z Navarro et al., 2008b).

#### 4.5 Mechanismus vzniku nanočástic stříbra redukcí v alkalickém prostředí

Základní metodou přípravy velkého množství Ag-nč je redukce rozpustné stříbrné soli vhodným redukčním činidlem v komplexujícím prostředí. Metoda je založena na modifikované Tollensově reakci (Kvítek et al., 2010). Redukce  $\text{Ag}^+$  probíhá v amoniakálním prostředí za vzniku komplexního kationtu  $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+]$  ( $\text{pK}_{\text{dis}}=7,03$ ), který se redukuje pomocí redukujících cukrů (glukosa, fruktosa, maltosa, laktosa) v alkalickém prostředí hydroxidu sodného (pH 10 a vyšší). Řízení velikosti částic lze realizovat právě výběrem vhodného reakčního prostředí, redukčního činidla a komplexotvorného činidla. Tímto způsobem je možné připravit částice stříbra o velikosti 25 - 75 nm. Takto vzniklé částice je možné modifikovat a stabilizovat z důvodu agregační nestability, která vzniká zejména po přidavku elektrolytů. Vysokou schopnost stabilizace mají např. anionický tenzid dodecylsírán sodný, z polymerů želatina či kasein (Kvítek et al., 2005; Kvítek et al., 2010; Yin et al., 2002).

### 5. Epigenetické modifikace DNA

Epigenetika byla definována a dnes je obecně přijímána jako studium změn v genové expresi (a tedy obvykle i ve fenotypu), které nejsou způsobeny změnou nukleotidové sekvence DNA. Jedná se o výjimku z obecného pravidla, že dědičné fenotypické změny jsou způsobeny změnami v genech. Epigenetické jevy mohou být děděny z buňky na buňku a z generace na generaci, tedy jak při mitóze, tak při meióze. Genom včetně epigenetických změn se označuje jako epigenom (Wu & Morris, 2001). Epigenetické modifikace popsané v současné literatuře zpravidla zahrnují modifikace histonových proteinů posttranslačními modifikacemi aminokyselin na aminokoncové části histonů, dále může docházet ke kovalentní modifikaci bází DNA. Typickým příkladem je methylace DNA. Methyly navázané na určitých místech molekuly DNA mají významný vliv na diferenciaci buněk a umožňují exprimovat genom v různých buňkách odlišně. Může to vést až k úplné odlišnosti jedinců se stejným jaderným genomem (Dupont et al., 2009).



## 5.1 Základní informace o methylaci DNA

Methylace DNA patří mezi důležité a nejlépe charakterizované epigenetické znaky. Jedná se o kovalentní modifikaci pyrimidinové báze DNA, konkrétně cytosinu (pouze u prokaryot se methylace objevuje i u adeninu). Zpravidla je cytosin methylován v pozici 5 a představuje nejčastěji se vyskytující epigenetický znak ve spojitosti s dinukleotidy CpG v savčích buňkách. Akumulované CpG dinukleotidy se vyskytují hojně v repetitivních sekvencích, které se často nachází v oblasti promotoru. Asi 60 % genů má promotory asociované s těmito CpG ostrůvky. Ty jsou nemethylovány u aktivních genů, kde se váží transkripční faktory. Methylace této oblasti je spojena s inaktivací genů. Buď methylace brání vazbě transkripčních faktorů, nebo umožňuje vazbu inhibičních komplexů, obsahujících histondeacetylasy a další faktory, které vedou k přestavbě chromatinu do inaktivní podoby (Robertson, 2005; Low et al., 2001; Jones & Baylin, 2007). Methylace DNA je dědičná a reversibilní beze změny primární sekvence DNA bazí vedoucí v možné epigenetické modulace fenotypu a genové exprese (Holliday & Pugh, 1975; Riggs, 1975).

U prokaryot se methylace DNA vyskytuje v pozici C5 a N4 cytosinu, nebo v pozici N6 adeninu. Byly identifikovány enzymy, které jsou schopné methylovat DNA a jsou označovány jako DNAmethyltransferasy (DNA-MTasy, DNMT). Proces alkylace je umožněn prostřednictvím S-adenosyl-L-methioninu, přenašečem methylové skupiny. U bakterií byla nalezena N4 cytosin specifická DNA-MTasa (S-adenosyl-L-methionin:DNA-cytosin-N4-methyltransferasa EC 2.1.1.113) a N6 adenin specifická DNA-MTasa EC 2.1.1.72 (Noyer-Weidner & Trautner, 1993).

Eukaryotické genomy jsou methylovány prostřednictvím cytosin specifické DNA-MTasy (S-adenosyl-L-methionine:DNA-cytosin-5-methyltransferasa, EC 2.1.1.37) nejednotně, obsahují specifické methylované regiony (Bird 1986; Bird & Taggart, 1980). Methylace cytosinu je regulována dvěma odlišnými a vzájemně se doplňujícími enzymovými aktivitami. Jde o *de novo* a „udržující“ DNA-MTasy spolu s DNA demethylasami, histon-modifikačními enzymy, složkami chromatin remodelingu a mechanismem interference RNA (RNAi). *De novo* methylace znamená syntézu methylových skupin u dříve nemethylovaných cytosinových zbytků. Udržení methylace je proces, kterým dříve existující vzor methylace je po replikaci DNA udržen (Chen & Li, 2004).

Hladina methylací v genomické DNA se pohybuje u obratlovců od 3 do 8 %, u rostlin od 6 do 30 % (Chen & Li, 2004). Methylace cytosinu jsou evolučně zachovány v symetrických CpG dinukleotidech DNA, které se nachází v různých organismech včetně obratlovců, rostlin a některých hub (Bird, 2002). Nápadný rozdíl v methylaci

u rostlin a zvířat je v jejich lokalizaci. U rostlin byly methylyce na DNA nalezené v sekvencích CpG nebo CpNpG, nebo v sekvencích CpNpN (kde N může být adenin A, cytosin C nebo thymin T) a jsou zapojeny do normálního vývoje a regulace transkripce a transpozice (Finnegan et al., 1998; Zilberman et al., 2007).

V savčích buňkách se methylová skupina na DNA nachází především na dinukleotidech CpG, v pluripotentních kmenových buňkách byly nalezené v sekvencích CpG a CpNpG. Methylyce DNA je u těchto organismů spojena s regulací transkripce a udržením genomické stability. U savců byly nalezeny tři hlavní enzymy, které jsou nezbytné pro *de novo* methylyce (DNMT3A a DNMT3B) nebo její udržení (DNMT1) (Chen & Li, 2004). 5-methylcytosin (5-mC), methylovaná báze DNA, představuje u savců 1% všech bazí DNA. Kromě 5-mC obsahuje savčí DNA velmi nízké hladiny dalších modifikovaných bazí. K methylaci a demethylaci DNA dochází dynamicky během časně embryogeneze a tyto procesy hrají klíčovou roli ve vývoji savců (Reik, 2007; Ooi et al., 2009; Weber & Schubeler, 2007; Klose & Bird, 2006; Goll & Bestor, 2005).

Methylyce DNA je vysoce zastoupena u rakovinných buněk (Esteller, 2008; Gal-Yam et al., 2008; Smith et al., 2007) a deregulace methylyce DNA může souviset s celou řadou nemocí (Gupta et al., 2010; Jones & Baylin, 2007). Změny v methylaci mohou být podnětem pro inaktivaci tumorových supresorů a aktivaci onkogenů, což přispívá ke vzniku nádorů (Gal-Yam et al., 2008).

## 5.2 Methylyce DNA u rostlin

Methylyce DNA u rostlin se vyskytují v sekvencích CpG, CpNpG nebo CpNpN (kde N může být A, C, T) a většina methylových frakcí genomu byla v modelové rostlině *Arabidopsis thaliana* lokalizovaná v tandemových nebo obrácených repeticích, transpozonech a také v okolí centromery. Některé regiony se vyskytují velmi methylované (až okolo 80 %), jako jsou transkripčně neaktivní heterochromatické regiony, včetně centromery a pericentromery u *Arabidopsis*. Euchromatické regiony, které zahrnují geny a neopakující se intergenové regiony, vykazují nižší, ale stále významnou úroveň methylyce cytosinu. V těchto regionech, pseudogenech a neexprimovaných genech se vyskytuje vyšší úroveň methylyce než v regionech s aktivně exprimovanými geny. To je v souladu s tvrzením, že methylyce cytosinu je spojována s transkripčním umlčováním. Ze všech exprimovaných genů je asi 5 % methylováno v promotorech a 33 % je methylováno v transkripčních regionech (Zhang et al., 2010).

V rostlinách bylo nalezeno pět hlavních rodin DNA-MTas rozdělených na základě jejich lineárního uspořádání. První skupinu představuje methyltransferasa 1 (MET1), což je homologní enzym savčích DNMT1. Funguje především jako udržovací enzym a je zodpovědný za umlčování oblastí heterochromatinu rostlinného genomu (Suzuki & Bird, 2008). Další skupinu představuje chromomethyltransferasa 3 (CMT3), enzym unikátní pro rostliny důležitý pro udržení methylace DNA. Třetí skupinu tvoří methyltransferasa přeskupující domény (DRM) podobná savčím DNMT3 zajišťující *de novo* methylace (Finnegan & Kovac, 2000). Rodina enzymových proteinů zvaná DNMT2 má prozatím v procesu methylace DNA neznámou funkci.

Skupina enzymů DRM funguje prostřednictvím methylace DNA řízené malými RNA (RdDM). Dochází k modifikaci DNA pomocí malých RNA, tedy k *de novo* methylaci v oblastech homologních siRNA, které vznikají např. z invertované repetice a dosahují délky 24 nukleotidů. Dojde k vytvoření komplexu siRNA s proteinem argonaut 4, což je katalytická složka RNA indukujícího komplexu umlčení genů (RISC), a k rozeznání komplementární sekvence na transkriptu, který vytváří polymerasa V (Pol V). Komplex následně váže další proteiny a řídí methylaci DNA. Pol V pravděpodobně transkribuje celý genom a k RdDM dochází v těch místech, kde k transkriptu Pol V existují příslušné komplementární siRNA. Proces je zodpovědný asi za 30 % methylovaného cytosinu v genomu *Arabidopsis* (Lister et al., 2008). Tento druh mechanismu methylace je důležitý v buněčné obraně proti virům a transpozonům, které často vytváří dsRNA a mohou být mutagenní. Methylací těchto úseků DNA dochází k vypnutí genů a k chránění genomu před mutagenními účinky (Zhang et al., 2006).

### 5.3 Úloha 5-methylcytosinu v buňce

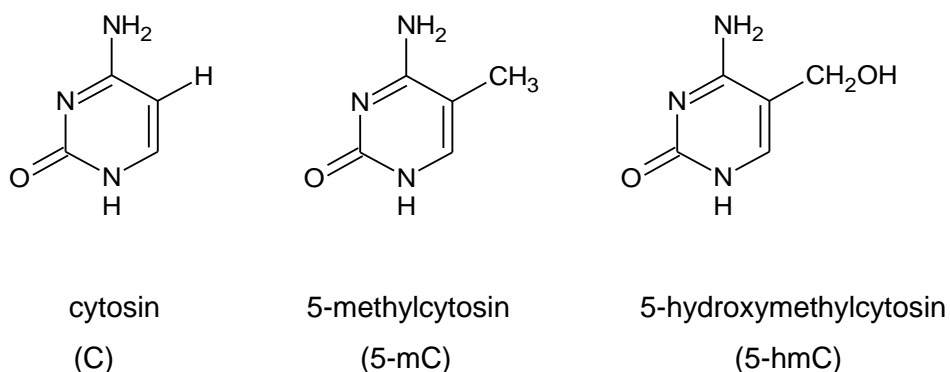
5-mC má důležitý význam v mnoha biologických procesech. Jeho primární role ve vyšších eukaryotních organismech byla navržena jako ochrana genomové integrity před vlastní DNA (převážně transposibilními elementy) a exogenní virální invazí (Yoder et al., 1997; Zilberman, 2008). Většina methylovaných sekvencí se nachází v repetitivních elementech DNA, což též naznačuje, že methylace cytosinu se vyvinula jako obrana proti transpozonům a dalším parazitickým elementům (Goll & Bestor, 2005). Kromě toho methylace cytosinu u rostlin hraje roli v regulaci genové exprese při vývoji organismu a během stresových situací (Bird, 2002; Zhang et al., 2006; Zilberman et al., 2007). Pravděpodobná souvislost mezi stavem methylace DNA a genovou expresí je taková, že promotery tzv. umlčených genů se nachází ve vyšším

methylačním stavu, zatímco promotery aktivních genů jsou methylované málo. Methylovaný cytosin je schopný přilákat methylvazebné proteiny, které postupně posilují histonovou deacetylaci a chromatin remodeling proteiny k tvorbě komplexu, který brání vazbě transkripčních faktorů a dochází tak k ovlivnění genové exprese (Fransz & de Jong, 2002).

## 5.4 Základní informace o hydroxymethylaci DNA

Hydroxymethylací na DNA se rozumí přítomnost 5-hydroxymethylcytosinu (5-hmC, Obr. 6) jako jedné z bází DNA. Jedná se o modifikovaný pyrimidin poprvé nalezený v DNA fága T4 napadajícího buňky *Escherichia coli* (Wyatt & Cohen, 1953). U obratlovců může z přirozeně se vyskytující báze 5-mC vznikat 5-hmC *in situ* oxidací methylové skupiny 5-mC (Shapiro, 1970). *In vitro* bylo zjištěno, že 5-mC může být na 5-hmC konvertován reakcí s hydroxylovým radikálem, působením gama záření a UV záření (Cier, 1962; Khattak & Green, 1966; Privat & Sowers, 1996).

Již v roce 1970 byl 5-hmC identifikován jako epigenetická značka v mozku a játrech potkanů, v mozku žab a myší (Penn et al., 1972). Přítomnost 5-hmC byla prokázána rovněž u DNA rostlin. Bližší informace o hydroxymethylaci rostlinné DNA nejsou dosud známy. Vysoká hladina 5-hmC byla detekována v savčích embryonálních kmenových buňkách a Purkyňových a zrnitých buňkách nervové soustavy (Purkyňové a zrnité buňky tvoří 50 % všech neuronů v centrálním nervovém systému). Bylo zjištěno, že v mozkové tkáni je ze všech cytosinových bází 0,4 až 0,7 % přeměněno na 5-hmC (Kriaucionis & Heintz, 2009).



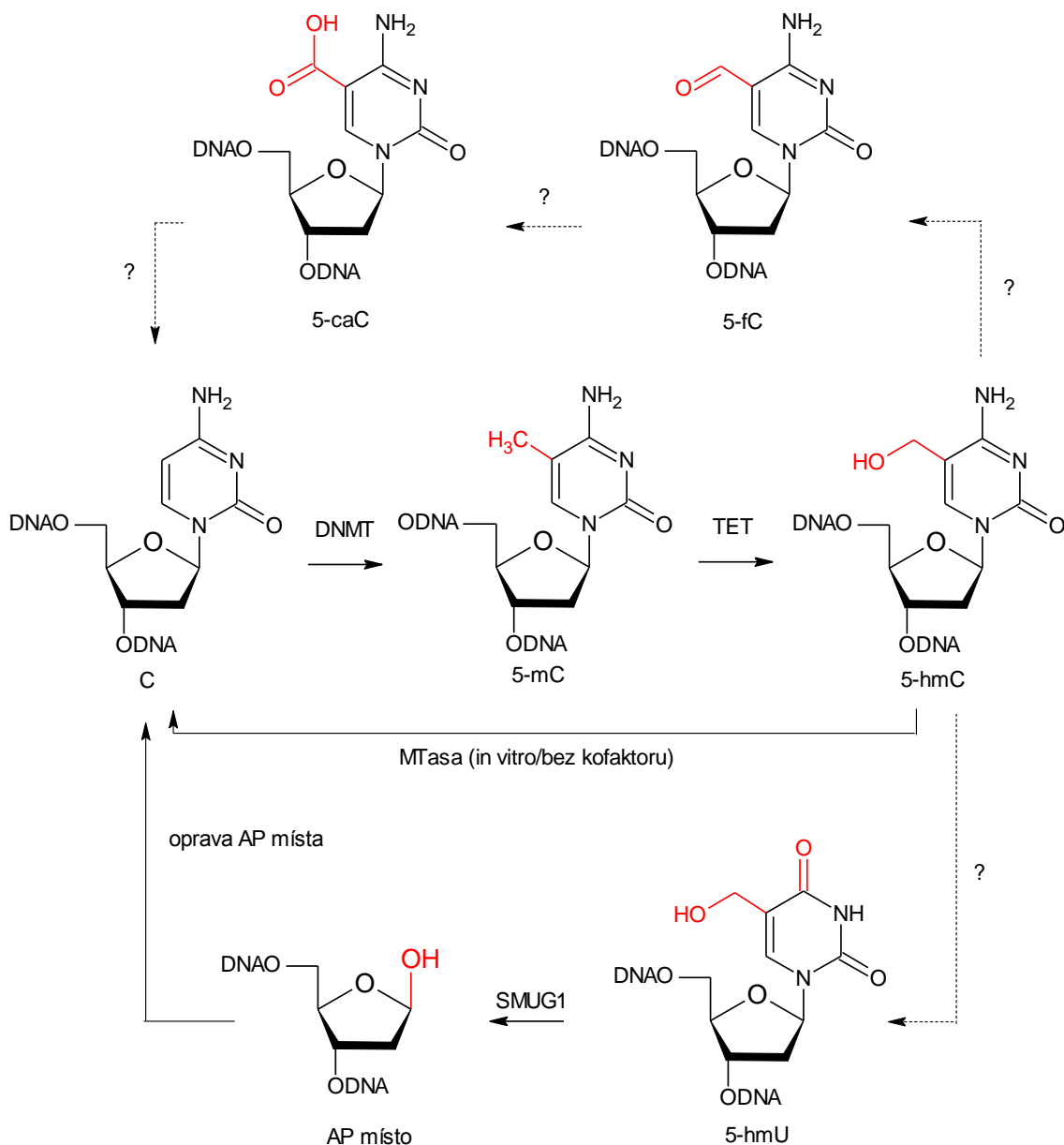
Obr. 6: Struktury cytosinu, 5-methylcytosinu, 5-hydroxymethylcytosinu (přepřacováno z Tardy-Planechaud et al., 1997).

## 5.5 Úloha 5-hydroxymethylcytosinu v buňce

Funkce této báze není přesně známa. 5-hmC může mít svou biologickou úlohu nebo může sloužit jako meziprodukt v přímé demethylaci DNA. Pravděpodobně se podílí na epigenetické regulaci dějů nebo na procesu aktivní demethylace (Liutkeviciute et al., 2009; Miller & Sweatt, 2007; Popp et al., 2010; Reik et al., 2001). Vzhledem k vysokému výskytu 5-hmC v embryonálních kmenových buňkách, které jsou vysoce proliferační a v neuronech, které jsou naopak postmitotické, se může biologický význam 5-hmC lišit v závislosti na typu buňky. U embryonálních buněk se ukazuje, že 5-hmC hraje klíčovou úlohu ve zprostředkování vnějších signálů, které řídí buněčný vývoj. Tyto značky jsou připojeny nebo odstraněny z genetické sekvence v závislosti na přijatých signálech a dochází k vypínání či zapínání genů. 5-hmC je epigenetický znak spojený s pluripotentním stavem embryonálních buněk (Koh et al., 2011).

Přeměnou 5-mC na 5-hmC dochází k přesunu vazebného místa proteinu z methylované DNA, např. dochází k inhibici methyl-CpG-vazebné domény (MBD) methyl-CpG-vazebného proteinu 2 (MeCP2), což je transkripční represor. Tak dochází k regulaci genové exprese (Valinluck et al., 2004). 5-hmC může podporovat demethylaci DNA. Nahrazení 5-mC za 5-hmC může interferovat s udržení methylace katalyzovanou enzymem DNMT1 během buněčného dělení a docházet tak k demethylaci DNA. 5-hmC může být rozpoznán jako anomální báze DNA opravným systémem, kdy dojde k nahrazení 5-hmC za cytosin, nebo je rozpoznán určitými vazebnými proteiny, které posilují specializované chromatin-modifikující partnery a mění strukturu chromatinu a stav methylace DNA. Deaminací 5-hmC dochází k vzniku 5-hydroxymethyluracilu (5-hmU) a vytváří se mismatch mezi 5-hmU a guaninem, což podporuje demethylaci DNA opravným systémem. 5-hmC a jeho deaminační produkt 5-hmU mohou fungovat jako substráty specializovaných DNA glykosylas (Cannon et al., 1988; Boorstein et al., 1992; Rusmintratip & Sowers 2000; Boorstein et al., 2001).

5-hmC může v buňce podléhat několika reakcím (Obr. 7). Odstranění hydroxyskupiny a deaminace na 5-hmU byly již uvedeny. Oxidace hydroxymethylové skupiny na formyl skupinu vede ke vzniku 5-formylcytosinu (5-fC), který uvolní kyselinu mravenčí a vzniká cytosin. Další oxidací se tvoří 5-karboxycytosin (5-caC), který podléhá okamžité dekarboxylaci a dochází k regeneraci cytosinu. Podobné oxidační a dekarboxylační reakce jsou známy u thyminu v pyrimidinové záchranné cestě určitých eukaryotních organismů (Liutkeviciute et al., 2009; Shaffer et al., 1975; Palmatier et al., 1970).



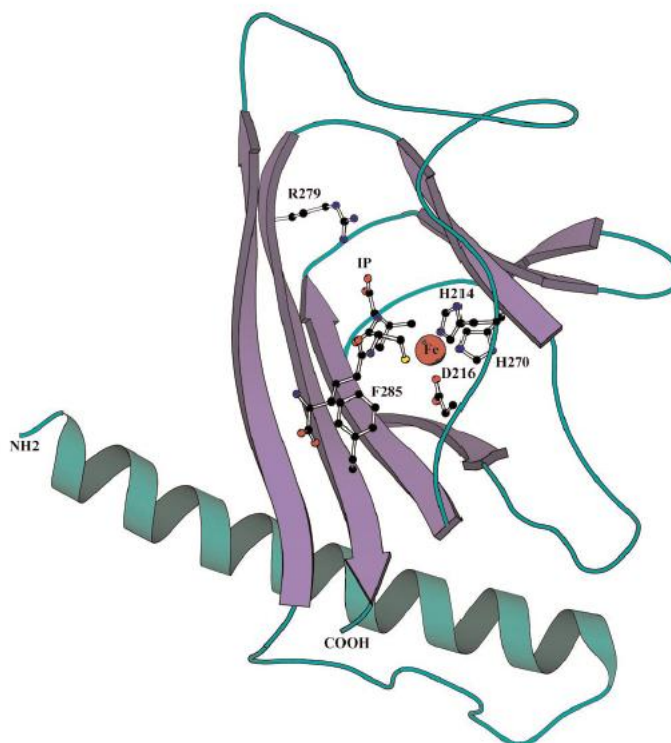
Obr. 7: Zobrazení známých modifikací cytosinu, 5-mC a 5-hmC a případných meziproduktů 5-fC a 5-caC. Oprava vyříznuté báze je další cesta možné demethylace přes 5-hmU (přepřacováno z Globisch et al., 2010).

## 5.6 Přeměna 5-methylcytosinu na 5-hydroxymethylcytosin

Nukleové báze byly jednoznačně identifikovány jako 5-hmC pomocí hmotnostní spektrometrie. Funkce 5-hmC není přesně známa, ale jisté je, že báze je tvořena z 5-mC (Globisch et al., 2010). S využitím moderních přístupů se podařilo určit enzymy, které mohou modifikovat 5-mC a katalyzovat přeměnu 5-mC na 5-hmC v DNA savců, tzv. TET proteiny (Tahiliani et al. 2009). Jedná se o homology proteinů vyskytujících se u prvků trypanosomy, které jsou nazývány jako J vazebné proteiny

(JBP1 a JBP2) a katalyzují přeměnu thyminu na bázi  $\beta$ -D-glukosylhydroxymethyluracil, která byla objevena v roce 1993 v DNA afrických prvoků trypanosoma způsobujících spavou nemoc (Borst et al., 1993). Tato neobvyklá báze se označuje jako J báze. Jedná se o modifikovaný thymin vytvořený postupnou hydroxylací a glykosylací methylové skupiny thyminu. Biosyntéza báze J vyžaduje proteiny JBP1 a JBP2, což jsou enzymy, které jsou součástí 2-oxoglutarát a Fe(II) dependentní oxygenasové rodiny. JBP1 a JBP2 katalyzují první krok biosyntézy J báze (Tahiliani et al, 2009; Yu et al., 2007; Cliffe et al., 2009).

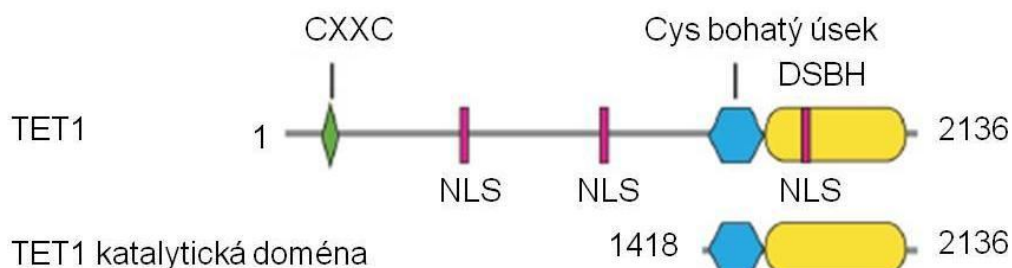
U *Sapiens* byly v některých tkáních identifikovány TET proteiny (TET1, TET2, TET3), které mají homologní oblasti s enzymy JBP1 a JBP2. TET enzymy využívají molekulárního kyslíku k hydroxylaci methylové skupiny báze 5-mC. TET proteiny nebo jejich ortology byly nalezeny ve všech mnohobuněčných organismech a homologní domény také u hub a řas. Sekundární struktura ukazuje přítomnost N-terminální alfa šroubovice, na kterou navazuje kontinuální série beta-skládaných listů tvořící typický dvoušroubovicovitý beta helix (DSBH, Obr. 8) 2-oxoglutarát-Fe(II)-oxygenasy [2OG-Fe(II)] (Aravind & Koonin, 2001). U myších embryonálních kmenových buněk bylo zjištěno, že TET1 a TET2 udržují hladinu 5-hmC v těchto buňkách a jsou indukovány současně s 5-hmC během reprogramování fibroblastů na pluripotentní kmenové buňky (Koh et al., 2011).



Obr. 8: Strukturální model střední části DSBH 2OG-Fe(II)-oxygenasové rodiny. Jsou zobrazeny postranní řetězce aminokyselinových zbytků zapojených v katalýze

a ve vazbě substrátu. Fe(II) ion je označen červeným kroužkem (převzato z Aravind & Koonin, 2001).

TET proteiny vyskytující se u mnohobuněčných organismů obsahují unikátní konzervovaný úsek bohatý na cystein přiléhající k N konci DSBH regionu (Obr. 9) (Allen et al., 2006).



Obr. 9: Předpokládané domény lidských TET1 proteinů zobrazující CXXC-zinek vazebnou doménu (aminokyseliny 584 - 624), úsek bohatý na cystein (aminokyseliny 1418 - 1610), doménu DSBH (aminokyseliny 1611 - 2074) a tři bipartitní jaderné lokalizační sekvence (NLS) (přepřacováno z Tahiliani et al., 2009).

2OG-Fe(II)-oxygenasy jsou obecně široce zastoupeny v eukaryotech i bakteriích a katalyzují reakce typu oxidace organického substrátu s využitím molekulárního kyslíku (Prescott, 1993; Hegg & Que, 1997). A zatímco bakteriální 2OG-Fe(II)-oxygenasy katalyzují široký rozsah reakcí zahrnující epimerizace, cyklizace, denaturace a halogenace, u mnohobuněčných organismů je funkce omezena na hydroxylace a demethylace prostřednictvím hydroxylace (Loenarz & Schofield, 2009).



# **EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

## 6. Materiál a přístroje

### 6.1 Chemikálie

ABsolute QPCR SYBR Green ROX Mix (Thermo Scientific, USA), agar (Duchefa, Nizozemsko), alanin (Duchefa, Nizozemsko), aminofenylfluorescein (APF, Sigma Aldrich, USA), 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetát (DAF-FM DA, Alexis, USA), askorbová kyselina (Duchefa, Nizozemsko), 6-benzylaminopurin (BAP, Sigma Aldrich, USA), cellulasa Onozuka R 10 (Duchefa, Nizozemsko), 4,5-diaminofluorescein diacetát (DAF-2 DA, Alexis, USA), dihydrogenfosforečnan draselný (Lachema, Česká republika), 2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina (2,4-D, Serva, USA), 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetát (H<sub>2</sub>DCF DA, Sigma Aldrich, USA), dusičnan draselný (Lachema, Česká republika), ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA, Sigma Aldrich, USA), ethanol (Merck, Německo), fluorescein diacetát (FDA, Serva, USA), glukosa (Lach-ner, Česká republika), hydrogenfosforečnan draselný (Lachema, Česká republika), Gamborg B5 medium včetně vitamínů (B5 medium, Duchefa, Nizozemsko), glukosa (Lachema, Česká republika), glutamin (Serva, USA), glycin (Serva, USA), guajakol (Sigma Aldrich, USA), hexadecyltrimethylamoniumbromid (CTAB, Sigma Aldrich, USA), hydroxyfenylfluorescein (HPF, Cayman, USA), chloramin B (Bochemie, Česká republika), chlorid draselný (Lachema, Česká republika), chlorid sodný (Lachema, Česká republika), chlorid vápenatý bezvodý (Lach-Ner, Česká republika), chloroform (Lach-Ner, Česká republika), 3-indolylmáselná kyselina (IBA, Serva, USA), jodid draselný (Lach-Ner, Česká republika), 2-(4-karboxyfenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid (cPTIO, Sigma Aldrich, USA), kasein hydrolyzát (Duchefa, Nizozemsko), macerozym R 10 (Duchefa, Nizozemsko), mannitol (Duchefa, Nizozemsko), 2-mercaptoethanol (Fluka, Švýcarsko), 2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina (MES, Duchefa, Nizozemsko), 3-methyl-1-butanol (Lach-Ner, Česká republika), MethylFlash Hydroxymethylated DNA Quantification Kit Colorimetric (Epigentek, USA), MethylFlash Methylated DNA Quantification Kit Colorimetric (Epigentek, USA), Murashige a Skoog medium (MS medium, Duchefa, Nizozemsko), myo-inositol (Duchefa, Nizozemsko),  $\alpha$ -naftyloctová kyselina (NAA, Sigma Aldrich, USA), nanočástice stříbra a nanočástice stříbra stabilizované želatinou nebo kaseinem (Katedra fyzikální chemie UP v Olomouci, Česká republika), NukleoSpin RNA Plant (Macherey-Nagel, Německo), octan sodný (Lachema, Česká republika), peroxid vodíku (Lach-Ner, Česká republika), primery APX, CAT, GPX (Invitrogen, USA), primery glyceraldehyd-3-

fosfátdehydrogenasa (GAPDH, EC 1.2.1.12) (Generi Biotech, Česká republika), prolin (Duchefa, Nizozemsko), sacharosa (Duchefa, Nizozemsko), savo (Bochemie, Česká republika), síran hořečnatý heptahydrát (Lach-Ner, Česká republika), stříbrné ionty - dusičnan stříbrný (Katedra fyzikální chemie UP v Olomouci, Česká republika), Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, Švýcarsko), tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS, Sigma Aldrich, USA), želatina z kůže ryb (Sigma Aldrich, USA).

## 6.2 Rostlinný materiál

*Cucumis sativus* cv. *Marketer* (CZ 09 H39 00121).

*Brassica oleracea* var. *botrytis* cv. *SIRIA*, homozygotní dihaploidní linie DH01 odvozená od Siria F1.

Semena obou rostlin byla poskytnuta Výzkumným ústavem rostlinné výroby Praha - Ruzyně.

## 6.3 Přístroje a experimentální vybavení

Analytické váhy (Sartorius, Německo), automatické pipety (Eppendorf, Německo) centrifuga Rotofix 32A (Hettich Zentrifugen, Německo) centrifuga 5414 D (Eppendorf, Německo), centrifuga 5804 R (Eppendorf, Německo), digitální předvážky (KERN, Německo), digitální pH metr MV-87 (Practictronic, Německo), elektromagnetická míchačka (IKA, Německo), flowbox Holten Lamin Air HH 1.2 Plus (Heto-Holten, Dánsko), inkubátor MELAG 306 (P-Lab a.s, Česká republika), lázeň ultrazvuková K5 (Thermo Fisher Scientific, USA), mikrodestičkový spektrofotometr Reader Synergy HT (BioTek Instruments, USA), minicentrifuga MCF 2360 (Vitrum, Česká republika), multifunkční modulární reader Infinite M200 (Tecan, Švýcarsko), nanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologist, USA), real-time PCR systém Mx3000P (Stratagene, USA), skříň termostatovaná ET 618 (Lovibond, Německo), světelný mikroskop Olympus CX21 (Olympus Optical, Japonsko), světelný a fluorescenční mikroskop Olympus BX50 (Olympus Optical, Japonsko), světelný mikroskop Olympus IX51 (Olympus Optical, Japonsko), termoblok CHB-202 (BIOER technology, Čína), termocykler XP (BIOER technology, Čína), třepačka Mixing Block MB-102 (BIOER technology, Čína), vortex mixer SA8 (Stuart, UK).

## 7. Použité metody

### 7.1 Kultivace semen *in vitro*

Nepoškozená semena byla povrchově sterilizována 70% ethanolem 20 s a 8% chloraminem po dobu 30 min (*C. sativus*), nebo 70% ethanolem 20 s a 30% savem po dobu 30 min (*B. oleracea*). Poté byla semena v aseptickém prostředí flowboxu propláchnuta 5x sterilní vodou a přenesena do Petriho misek obsahujících asi 10 ml media ½ MS (Tab. 2). Klíčení probíhalo ve tmě při 27 °C. Naklíčené rostliny *C. sativus* byly po 5 - 7 dnech od výsevu zbaveny kořínků a přeneseny do kultivačních plastových boxů obsahujících 100 ml media OK (Tab. 2) a kultivace probíhala další 2 - 3 týdny.

Naklíčené rostliny *B. oleracea* byly po 5 - 7 dnech od výsevu uloženy na dalších 7 - 10 dnů na světlo. Poté byly rostliny zbaveny kořínků a přeneseny do Erlenmayerových baněk obsahujících 100 ml media OK (Tab. 2). Kultivace probíhala dalších 4 - 5 týdnů. Po této době bylo několik listů z rostlin *B. oleracea* odebráno a přeneseno na nové medium a kultivováno po dobu 4 týdnů a proces byl opakován. Kultivace rostlin probíhala v kultivační místnosti s teplotou 22 ± 2 °C, světelným režimem 16 h den a 8 h noc a s osvětlením 32 - 36 μmol/(m<sup>2</sup>.s).

Tab. 2: Složení media ½ MS (Murashige & Skoog, 1962) a media OK (modifikováno dle Gajdová et al., 2007).

Roztok	Složení	Množství (g/l)
<b>Medium ½ MS</b>	MS medium	2,2
	sacharosa	15
	agar	8
	pH 5,8	
	autoklávováno	
<b>Medium OK</b>	MS medium	4,4
	kyselina askorbová	0,02
	sacharosa	20
	IBA	0,00001
	BAP	0,00001
	agar	8
	pH 5,8	
autoklávováno		

## 7.2 Izolace a purifikace protoplastů

Zdrojem pro izolaci mezofylových protoplastů byly 3 až 4týdenní *in vitro* rostoucí rostliny *C. sativus* a 6 až 8týdenní *in vitro* rostoucí rostliny *B. oleracea*. Z rostlin byly odebrány plně vyvinuté mladé listy (0,5 g), které byly vloženy do 5 ml enzymatického roztoku v Petriho misce a nařezány na 1mm proužky. Vzniklé segmenty listů v enzymatickém roztoku byly inkubovány v termostatu 18 h ve tmě při 27 °C. Takto vzniklá hrubá protoplastová suspenze byla sterilně filtrována přes síťovinu uhelon 72 µm, promyta a doplněna promývacím roztokem PGly (*C. sativus*) nebo W5 (*B. oleracea*) na objem 6 ml. Suspenze byla pomocí Pasteurovy pipety přenesena do centrifugační zkumavky a centrifugována při 80 x g (*C. sativus*) nebo 70 x g (*B. oleracea*) po dobu 5 min. Vzniklý supernatant byl odstraněn a sediment resuspendován ve 4 ml 20% sacharosy. Suspenze byla převrstvena příslušným promývacím roztokem a centrifugována při 80 x g po dobu 10 min (*C. sativus*) nebo 70 x g po dobu 5 min (*B. oleracea*). Po centrifugaci se protoplasty nacházely na rozhraní roztoků sacharosy a promývacího roztoku. Pasteurovou pipetou byla vrstva protoplastů odebrána do čisté centrifugační zkumavky a resuspendována ve 4 ml promývacího roztoku. Protoplastová suspenze byla centrifugována při 80 x g (*C. sativus*) nebo 70 x g (*B. oleracea*) po dobu 5 min, supernatant byl poté odstraněn a protoplasty v sedimentu byly resuspendovány v 1 ml kultivačního media LCM1 (*C. sativus*) nebo media B (*B. oleracea*). Složení roztoků potřebných k izolaci mezofylových protoplastů je uvedeno v Tab. 3.

Tab. 3: Složení enzymatického roztoku pro *C. sativus* (Debeaujon & Branchard, 1992) a enzymatického roztoku pro *B. oleracea* (Potrykus & Shillito, 1986), promývacího roztoku PGly (Debeaujon & Branchard, 1992) a W5 (Potrykus & Shillito, 1986), roztoku sacharosy, kultivačního roztoku LCM1 (modifikováno dle Debeaujon & Branchard, 1992) a B media (Pelletier et al., 1983).

Roztok	Složení	Množství (g/l)
<b>Enzymatický roztok</b>	cellulasa Onozuka R 10	10
<i>C. sativus</i>	macerozym R 10	2,5
	v promývacím roztoku PGly	
	pH 5,8	
	sterilizace filtrací	

Roztok	Složení	Množství (g/l)
<b>Enzymatický roztok</b>	cellulasa Onozuka R 10	10
<i>B. oleracea</i>	macerozym R 10	2,5
	v promývacím roztoku W5	
	pH 5,8	
	sterilizace filtrací	
<b>PGly</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,027
(promývací roztok <i>C. sativus</i> )	KNO <sub>3</sub>	0,101
	CaCl <sub>2</sub> (bezvodý)	1,117
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,246
	KI	0,0016
	glycin	11,15
	glukosa	18
	MES	0,586
	mannitol	65,58
	pH 5,8	
	sterilizace filtrací	
<b>W5</b>	NaCl	9
(promývací roztok <i>B. oleracea</i> )	KCl	0,8
	CaCl <sub>2</sub> (bezvodý)	13,89
	glukosa	1
	glycin	1
	pH 5,8	
	sterilizace filtrací	
<b>Sacharosa</b>	sacharosa	200
	pH 5,8	
	autoklávováno	

Roztok	Složení	Množství (g/l)
<b>LCM1 medium</b>	B5 medium	3,164
(kultivační roztok <i>C. sativus</i> )	inositol	0,9
	kyselina askorbová	0,002
	alanin	0,004
	glycin	0,008
	glutamin	0,02
	prolin	0,02
	kasein hydrolyzát	0,1
	MES	0,586
	mannitol	70
	sacharosa	10
	glukosa	5
	NAA	0,001
	2,4-D	0,0005
	BAP	0,00075
	pH 5,8	
	sterilizace filtrací	
<b>B medium</b>	B5 medium	3,16
(kultivační roztok <i>B. oleracea</i> )	mannitol	70
	glukosa	20
	BAP	0,001
	2,4-D	0,00025
	NAA	0,001
	pH 5,8	
	sterilizace filtrací	

## 7.2 Stanovení hustoty protoplastů

Hustota protoplastů v mediu byla stanovena mikroskopicky pomocí Bürkerovy komůrky. Bylo počítáno celkem 20 čtverců pro každý vzorek a určen počet protoplastů v 1 ml kultivačního media.

### 7.3 Kultivace protoplastů

Po stanovení hustoty protoplastů byla buněčná suspenze naředěna na výslednou hustotu  $1,5 \times 10^5$  buněk v 1 ml kultivačního media. Pouze pro histochemická stanovení byla použita koncentrace  $1 \times 10^6$  buněk v 1 ml kultivačního media. Protoplasty byly kultivovány v Petriho miskách v termostatu ve tmě při 27 °C po dobu 1 až 14 dnů. K protoplastové suspenzi v Petriho misce byl přidán roztok  $\text{Ag}^+$ , Ag-nč bez stabilizace nebo stabilizovaných želatinou případně kaseinem ve výsledných koncentracích 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10 mg/l nebo roztok askorbátu ve výsledných koncentracích 50 a 100 mg/l. Kontrolní vzorek obsahoval pouze protoplastovou suspenzi v kultivačním mediu.

### 7.4 Stanovení životnosti

Životnost byla stanovována mikroskopicky a spektrofluorimetry s využitím fluorescenční sondy FDA. Mikroskopické stanovení životnosti bylo realizováno vždy po izolaci protoplastů. K 50  $\mu\text{l}$  buněčné suspenze na podložním sklíčku bylo přidáno 5  $\mu\text{l}$  FDA o koncentraci 25  $\mu\text{g/ml}$ . Po 5min inkubaci bylo vyhodnoceno 10 zorných polí. Nejdříve byly počítány všechny buňky v procházejícím světle, živé buňky zeleně fluoreskující byly počítány s využitím hranolu U-MWB2 fluorescenčního mikroskopu. Životnost byla stanovena jako procentuální podíl živých buněk a celkového počtu buněk.

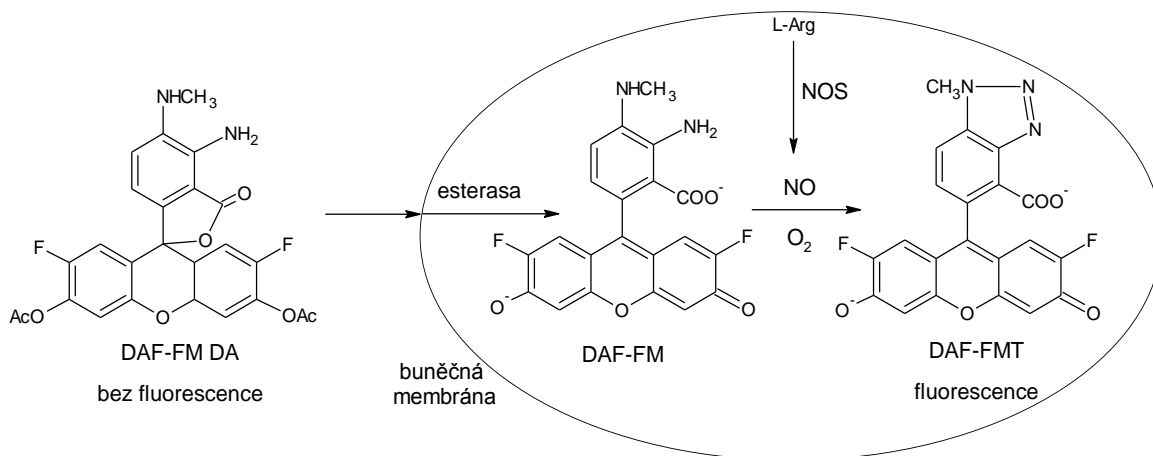
Spektrofluorimetrické stanovení bylo prováděno v mikrodestičkovém uspořádání. Ke 100  $\mu\text{l}$  protoplastové suspenze v jamce na destičce bylo přidáno 5  $\mu\text{l}$  sondy FDA o koncentraci 25  $\mu\text{g/ml}$ . Fluorescenční signál (excitace 485 nm, emise 515 nm) byl měřen ihned po přidavku detekční sondy k buněčné suspenzi a po 10min inkubaci ve tmě při 27 °C. Stanovení bylo prováděno v triplikátu.

### 7.5 Stanovení produkce reaktivních forem kyslíku a dusíku

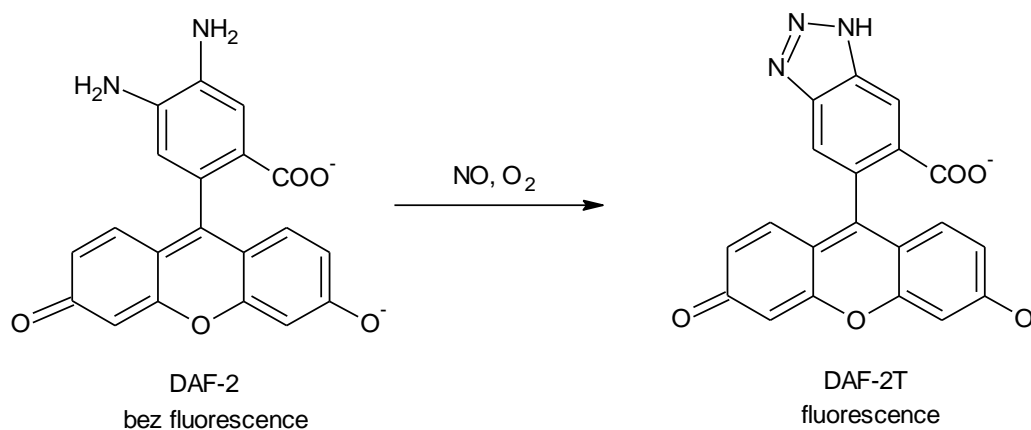
Produkce ROS a RNS byla detekována pomocí tří fluorescenčních sond, APF, HPF (Obr. 10) a  $\text{H}_2\text{DCF DA}$  (Obr. 11). Ke 100  $\mu\text{l}$  buněčné suspenze v jamce bylo přidáno 5  $\mu\text{l}$  0,2 mmol/l detekční sondy. Byl měřen fluorescenční signál (excitace 485 nm, emise 515 nm) okamžitě po přidavku sondy a po 1h inkubaci ve tmě při 27 °C. Stanovení bylo prováděno v triplikátu.







Obr. 12: Schéma průniku sondy DAF-FM DA do buňky a její reakce s NO za vzniku fluorescenčního produktu.



Obr. 13: Reakce fluorescenční sondy DAF-2 s oxidem dusnatým za přítomnosti kyslíku.

## 7.7 Stanovení peroxidasové aktivity

Aktivita POX byla stanovena spektrofotometricky modifikovanou metodou s guajakolem (1-hydroxy-2-methoxybenzen) (Angelini et al, 1990). Po oxidaci guajakolu vzniká žlutohnědý tetraguajakolchinon, jehož molární absorpční koeficient je  $\epsilon = 4\,500 \text{ l}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$  a byl měřen nárůst absorbance při 436 nm po 1 min při 30 °C. Reakční směs obsahovala 150  $\mu\text{l}$  0,1 mol/l K-fosfátového pufru, pH 6, 40  $\mu\text{l}$  50 mmol/l guajakolu, 50  $\mu\text{l}$  homogenizované protoplastové suspenze a 50  $\mu\text{l}$  10 mmol/l peroxidu vodíku, jehož přidávkem byla reakce startována. Stanovení bylo prováděno v triplikátu.

## 7.8 Stanovení buněčného průměru

Velikost buněk byla stanovena mikroskopicky pomocí měřítka vloženého v okuláru jako průměrná hodnota 20 buněk.

## 7.9 Stanovení mikrokalusů

Vyhodnocení tvorby mikrokalusů bylo provedeno 14. den po izolaci protoplastů mikroskopicky. Pro každý vzorek byl stanoven průměrný počet mikrokalusů ve 20 zorných polích a průměrná velikost plochy 20 mikrokalusů s využitím programu QuickPHOTO MICRO 2.3.

## 7.10 Histochemické stanovení

Histochemická detekce byla stanovena mikroskopicky. K 50  $\mu$ l protoplastové suspenze na podložním sklíčku bylo přidáno 5  $\mu$ l fluorescenční sondy (APF, HPF, H<sub>2</sub>DCF DA, DAF-FM DA o koncentraci 0,1 mmol/l nebo FDA o koncentraci 12,5  $\mu$ g/ml). Po inkubaci ve vlhkém prostředí (H<sub>2</sub>DCF DA a FDA 5 min, DAF-FM DA 20 min, APF a HPF 40 min) byly buňky pozorovány v procházejícím světle, detekce fluorescence byla pozorována s využitím hranolu U-MWB2 fluorescenčního mikroskopu. Selektivnost stanovení produkce NO a ROS byla potvrzena v kontrolních experimentech: 50  $\mu$ l buněčné suspenze na podložním sklíčku bylo preinkubováno ve vlhkém prostředí po dobu 10 min s 5  $\mu$ l roztoku cPTIO o koncentraci 25 mmol/l (lapač NO) nebo po dobu 5 min s 5  $\mu$ l roztoku askorbátu o koncentraci 100 mmol/l (lapač ROS). Poté bylo k suspenzi přidáno 5  $\mu$ l příslušné fluorescenční sondy a po inkubaci byly buňky pozorovány.

## 7.11 Kultivace a zpracování protoplastové suspenze pro izolaci DNA a RNA

Protoplastová suspenze izolovaná z listů *C. sativus* a *B. oleracea* o hustotě  $1,5 \times 10^5$  buněk v 1 ml kultivačního media byla kultivována v příslušných mediích v kultivačních lahvích v termostatu ve tmě při 27 °C. K protoplastové suspenzi v kultivačních lahvích byl ihned po izolaci přidán roztok Ag<sup>+</sup>, Ag-nč nebo askorbátu. Výsledné koncentrace Ag<sup>+</sup> a Ag-nč byly 0,05 a 0,5 mg/l a výsledné koncentrace

askorbátu byly 50 a 100 mg/l. Kontrolní vzorek obsahoval pouze suspenzi protoplastů v kultivačním mediu. V časech 0, 24, 48 a 72 h od izolace protoplastů byla protoplastová suspenze přenesena do centrifugačních zkumavek a centrifugována při 80 x g 5 min. Supernatant byl odstraněn a sediment protoplastů byl přepipetován do mikrozkuvek. S využitím tekutého dusíku byly vzorky zmrazeny a uchovány v -70 °C.

## 7.12 Izolace DNA z protoplastové suspenze

Ke zmrazené protoplastové suspenzi v mikrozkuvce byla přidána směs 1 ml pufru pro extrakci DNA (Tab. 4) s 2 µl 2-merkptoethanolu předem zahřátá na 65 °C. Protoplastová suspenze spolu s extrakčním pufrem byla následně zahřívána na 65 °C po dobu 90 min. Poté bylo do mikrozkuvky přidáno 600 µl roztoku chloroformu:isoamylalkoholu (v poměru 24:1). Směs byla protřepána a centrifugována při 13 500 x g a 4 °C po dobu 15 min. Do čisté mikrozkuvky byla odebrána horní vodní vrstva, ke které bylo přidáno 60 µl octanu sodného o koncentraci 3 mol/l. Směs byla protřepána a bylo k ní připipetováno 500 µl chlazeného isopropanolu. Směs byla po dobu 30 min uložena v -20 °C a poté 30 min centrifugována při 13 500 x g a 4 °C. Supernatant byl odstraněn a do mikrozkuvky bylo přidáno 200 µl 70% chlazeného ethanolu. Směs byla centrifugována 15 min při 13 500 x g při 4 °C. Ethanol byl odstraněn a vzorek se nechal mírně vyschnout volně na vzduchu. K peletě DNA bylo přidáno 50 µl sterilní vody. Po změření koncentrace byla DNA v mikrozkuvce uchována v -20 °C.

Tab. 4: Složení pufru pro extrakci DNA a příslušných roztoků nezbytných k jeho přípravě (Kump & Javornik, 1996).

Roztok	Složení	Množství
<b>Pufr pro extrakci DNA</b>	CTAB	20 g/l
	NaCl	81,8 g/l
	EDTA 0,5 mol/l pH 8	40 ml/l
	TRIS 1 mol/l pH 8	100 ml/l
	sterilizace filtrací (filtr o velikosti pórů 0,22 µm)	

Roztok	Složení	Množství (g/l)
<b>EDTA 0,5 mol/l pH 8</b>	EDTA pH 8 autoklávováno	186,1
<b>TRIS 1 mol/l pH 8</b>	TRIS pH 8 autoklávováno	121,1

### 7.13 Měření koncentrace nukleových kyselin

Koncentrace dsDNA, ssDNA a RNA byla stanovena spektrofotometricky. Byla měřena absorbance při vlnových délkách 260 a 280 nm. Stupeň čistoty nukleových kyselin byl stanoven z poměru absorbancí změřených při uvedených vlnových délkách (260/280 nm). Koncentrace byla vypočtena na základě předpokladu, že roztok dsDNA o absorbanci 1 při vlnové délce 260 nm má koncentraci 50 ng/μl, pro ssDNA za daných podmínek platí koncentrace 33 ng/μl, pro RNA 40 ng/μl.

### 7.14 Kvantifikace hydroxymethylované DNA specifickým stanovením 5-hydroxymethylcytosinu

Kvantifikace 5-hmC byla provedena pomocí MethylFlash Hydroxymethylated DNA Quantification Kit (Colorimetric), postup byl proveden dle přiloženého návodu. Stanovení bylo provedeno v jamkách dodávaných spolu s chemikáliemi výrobcem. Do jamek bylo napipetováno 80 μl roztoku HC2 (vazebný roztok). Do jedné jamky byl přidán 1 μl HC3 (negativní kontrola v koncentraci 20 μg/ml), do druhé 1 μl HC5 (pozitivní kontrola v koncentraci 20 μg/ml) předem zředěné v poměru 1 μl HC5 a 3 μl sterilní vody a do dalších jamek bylo pipetováno 1 až 8 μl vzorku DNA, aby bylo v jamce vždy 200 ng DNA. Jamky byly inkubovány po dobu 90 min při 37 °C ve tmě. Před inkubací byly jamky vždy přikryty parafilmem. Po inkubaci byl roztok odstraněn a jamky byly 3x promyty 150 μl roztoku HC1 (promývací pufr, ve všech krocích byl použit 10x ředěný sterilní vodou). Do jamek bylo napipetováno 50 μl HC6 (vazebná protilátka v koncentraci 1000 μg/ml, ředěna 1:1000 ředěným HC1) a inkubovány po dobu 60 min při pokojové teplotě ve tmě. Zředěný HC6 byl odstraněn a jamky byly promyty 3x 150 μl HC1. Do jamek bylo napipetováno 50 μl HC7 (detekční protilátka

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

Výpočet relativní kvantifikace:

$$5\text{-hmC (\%)} = [(vzorek OD - HC4 OD) / S] / [(HC5 OD - HC4 OD) * 5 / P] * 100$$

OD je hodnota absorbance při 450 nm

S je množství přidané DNA v ng

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

P je množství pozitivní kontroly (HC5) v ng

## **7.15 Kvantifikace methylované DNA specifickým stanovením 5-methylcytosinu**

Kvantifikace 5-mC byla provedena pomocí MethylFlash Methylated DNA Quantification Kit (Colorimetric), postup byl proveden dle přiloženého návodu. Stanovení bylo provedeno v jamkách dodávaných spolu s chemikáliemi výrobcem. Do jamek bylo napipetováno 80 µl roztoku ME2 (vazebný roztok). Do jedné jamky byl přidán 1 µl ME3 (negativní kontrola v koncentraci 20 µg/ml), do druhé 1 µl ME4 (pozitivní kontrola v koncentraci 20 µg/ml) předem zředěné v poměru 1 µl ME4 a 3 µl sterilní vody a do dalších jamek bylo pipetováno 1 až 8 µl vzorku DNA, aby bylo v jamce vždy 100 ng DNA. Jamky byly inkubovány po dobu 90 min při 37 °C ve tmě. Před inkubací byly jamky vždy přikryty parafilmem. Po inkubaci byl roztok odstraněn a jamky byly 3x promyty 150 µl roztoku ME1 (promývací pufr, ve všech krocích byl použit 10x ředěný sterilní vodou). Do jamek bylo napipetováno 50 µl ME5 (vazebná protilátka v koncentraci 1000 µg/ml, ředěna 1:1000 ředěným ME1) a byly inkubovány po dobu 60 min při pokojové teplotě ve tmě. Zředěný ME5 byl odstraněn a jamky byly

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

Výpočet relativní kvantifikace:

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

OD je hodnota absorbance při 450 nm

S je množství přidané DNA v ng

2 je faktor, který normalizuje hodnotu 5-hmC v pozitivní kontrole na 100 %, protože pozitivní kontrola obsahuje pouze 50 % 5-hmC

P je množství pozitivní kontroly (ME4) v ng

## 7.16 Izolace RNA z protoplastové suspenze

Izolace RNA byla provedena pomocí NukleoSpin RNA Plant komerčního kitu.

Lýze buněk: Ke zmrazené protoplastové suspenzi bylo přidáno 350 µl RA1 roztoku (lyzační pufr) a 3,5 µl 2-merkptoethanolu a směs byla prudce vortexována.

Filtrace lyzátu: Do sběrné zkumavky byl umístěn filtr (NucleoSpin RNA plant Filter) a do něj byla aplikována lyzační směs a centrifugována 1 min při 11 000 x g. Poté byl filtrát přemístěn do nové mikrozkušavky.

Úprava podmínek vázání RNA: K získanému filtrátu bylo přidáno 350 µl 70% ethanolu a směs byla vortexována.

Vázání RNA: Lyzát byl přenesen na kolonu mikrozkušavky (NucleoSpin RNA Plant Column) a centrifugován 30 s při 8 000 x g.

Vysušení silikátové membrány: Na kolonu bylo přidáno 350 µl MDB (pufr odsolující membránu) a centrifugována 1 min při 11 000 x g.

Štípání DNA: Na střed silikátové membrány kolony bylo aplikováno 95  $\mu\text{l}$  reakční směsi DNasy (ta byla připravena smícháním 10  $\mu\text{l}$  DNasyI a 90  $\mu\text{l}$  reakčního pufru pro rDNasu).

Promytí a vysušení silikátové membrány: Na kolonu bylo aplikováno 200  $\mu\text{l}$  RA2 (promývací pufr) roztoku a směs byla centrifugována 30 s při 11 000 x g. Kolona byla umístěna do nové zkumavky a bylo na ni aplikováno 600  $\mu\text{l}$  RA3 (promývací pufr). Směs byla centrifugována 30 s při 11 000 x g a následně bylo na kolonu přidáno 250  $\mu\text{l}$  RA3 a centrifugováno 2 min při 11 000 x g.

Vymytí vysoce čisté RNA: Kolona byla umístěna do nové mikrozukavky a bylo na ni aplikováno 50  $\mu\text{l}$  RNase-free vody a centrifugována 1 min při 11 000 x g. Po změření koncentrace byla RNA uchována při  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 7.17 Reverzní transkripce

K přepisu genetické informace z mRNA do cDNA byl použit Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit. Do mikrozukavek bylo napipetováno:

10,4  $\mu\text{l}$  RNA o koncentraci 20 - 50 ng/ $\mu\text{l}$ ,

1  $\mu\text{l}$  Anchored-oligo (dT)<sub>18</sub> primer.

Směs byla inkubována 10 min při  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  a poté byly mikrozukavky ihned umístěny do ledu. Ke směsi bylo dále pipetováno:

4  $\mu\text{l}$  reakčního pufru,

0,5  $\mu\text{l}$  protector RNase inhibitoru 40 U/ $\mu\text{l}$ ,

2  $\mu\text{l}$  směsi deoxynukleotidů každý v koncentraci 10 mmol/l,

1  $\mu\text{l}$  DTT 0,1 mol/l,

1,1  $\mu\text{l}$  reverzní transkriptasy 20 U/ $\mu\text{l}$ .

Směs byla inkubována 30 min při  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  a poté 10 min při  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po inkubaci byly mikrozukavky umístěny ihned do ledu a byla změřena koncentrace DNA. Mikrozukavky byly uloženy v  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 7.18 Navržení primerů

Primery GAPDH byly navrženy v programu Primer 3, sekvence genu byla zjištěna z databází (EMBL, GenBank). Sekvence primerů a další údaje jsou uvedeny v Tab. 5.



Tab. 5: Přehled primerů použitých pro sledování exprese referenčního genu (GAPDH) a cílových genů (APX, CAT, GPX).

Sledovaný gen	Sekvence primeru	Počet bazí	Velikost produktu (bp)
<b>GAPDH</b>	Forward primer 5'-ACATCATTCTAGCAGCACT-3'	20	221
	Reverse primer 5'-TTCAGTGTACCCCAAATTC-3'		
<b>APX</b>	Forward primer 5'-CTCTGGTGGTCACACATTGG-3'	20	209
	Reverse primer 5'-CCTCATCGGCAGCATATTTT-3'		
<b>CAT</b>	Forward primer 5'-TTGACGATATTGGCATCC-3'	18	153
	Reverse primer 5'-TAGCATCTTCCTCCAGCA-3'		
<b>GPX</b>	Forward primer 5'-CAGCGCTTACAAAGCAAAGG-3'	20	198
	Reverse primer 5'-GTGCAAGCAAAGTGCACAAT-3'		

### 7.19 Provedení real-time PCR

Real-time PCR byla provedena s využitím interkalačního barviva SYBR Green I. Pro přípravu reakční směsi byl použit ABSOLUTE QPCR SYBR Green ROX Mix. Do mikrozkušavek bylo pipetováno:

ABSOLUTE QPCR SYBR Green ROX Mix	12,5 µl,
forward primer 50 µmol/l	1,75 µl,
reverse primer 50 µmol/l	1,75 µl,
cDNA v koncentraci 900 ng/µl	4 µl.

Spolu se vzorky byla přidána do termocyklu i negativní kontrola (reakční směs obsahující místo cDNA vodu pro real-time PCR). Přehled použitých primerů je v Tab. 5. a real-time PCR probíhala podle programu, který je uvedený v Tab. 6.

Tab. 6: Časový a teplotní profil pro nastavení termocyklu.

	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů
Aktivace enzymu	95	15 min	1
Denaturace	95	15 s	40
Navázání primerů	50	30 s	40
Elongace	72	30 s	40

Real-time PCR byla prováděna v termocyklu, který byl napojen na počítač a ovládán softwarem Mx3000P. K ověření vzorků a detekci nespecifických produktů byla použita analýza křivek tání PCR produktů. Po proběhnutí real-time PCR software provedl analýzu vzorků a automaticky určil  $C_t$  hodnoty pro jednotlivé vzorky. Vzorky byly do cyklu dávány v duplikátech a pro výpočet byl udělán průměr těchto hodnot.

## 7.20 Hodnocení exprese mRNA

Pro výpočet násobku indukce byl použit parametr prahového cyklu  $C_t$  (threshold cycle) pro kontrolní gen GAPDH a sledované geny APX, CAT a GPX. V tomto případě je základním předpokladem, že exprese kontrolního genu GAPDH je konstantní ve všech buňkách za různých situací, tedy že se chová jako „house-keeping“ gen. Pro výpočet násobku indukce byla normalizována hodnota  $C_t$  sledovaného genu pro příslušný vzorek vzhledem ke kontrolnímu genu GAPDH podle rovnice (1) a násobek indukce dopočítán dle rovnice (2):

$$(1) \quad C_t(x_{inorm}) = C_t(x_i) / C_t(GAPDH) * C_t(x_{do})$$

$$(2) \quad N = 2^{[C_t(x_{do}) - C_t(x_{inorm})]}$$

$x_{inorm}$  je normalizovaná hodnota  $C_t$  pro sledovaný gen v čase  $i$ , normalizovaná hodnota  $C_t$  pro příslušnou koncentraci  $Ag^+$ ,  $Ag-nč$ , askorbátu

$x_i$  je hodnota  $C_t$  sledovaného genu v čase  $i$ , hodnota  $C_t$  pro příslušnou koncentraci  $Ag^+$ ,  $Ag-nč$ , askorbátu

$x_{do}$  je hodnota  $C_t$  sledovaného genu v kontrolních buňkách (protoplasty kultivované bez  $Ag$  a askorbátu)

i je čas kultivace v rozsahu 0 - 72 h, Ag<sup>+</sup> a Ag-nč v koncentracích 0,05 a 0,5 mg/l, askorbát v koncentracích 50 a 100 mg/l

N je násobek indukce vůči negativní kontrole (protoplasty kultivované bez Ag a askorbátu v čase 0 h)

### **7.21 Statistické vyhodnocení**

Většina experimentů byla provedena ve třech opakováních, pokud není uvedeno jinak. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrná hodnota ± směrodatná odchylka. Vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí programu Microsoft Excel 2007.

## **8. Výsledky**

















































































## 9. Diskuze





















## **10. Závěr**

- I. V rámci teoretické části byla vypracována literární rešerše zaměřená na úlohu ROS a RNS v procesu regenerace protoplastů a antioxidační enzymovou ochranu rostlin. Teoretická část dále obsahuje informace o  $Ag^+$  a Ag-nč a jejich působení na rostlinný organismus a poznatky o methylaci a hydroxymethylaci DNA.

II. Z experimentální práce vyplývají následující poznatky a závěry:

1. Na životnost protoplastů má významný vliv stáří rostliny použité pro izolaci. Pro izolaci mezofylových protoplastů *C. sativus* jsou vhodné 3 - 4týdenní rostliny. Pro izolaci protoplastů *B. oleracea* jsou vhodné 4 - 8týdenní rostliny.
2. Při regeneraci buněk z protoplastů dochází zpočátku k poklesu životnosti, ale následně v souvislosti s procesem dělení životnost vzrůstá, u *C. sativus* bylo první dělení detekováno od 48 h po izolaci, u *B. oleracea* od 72 h.
3. Zapojení POX v regeneračním procesu tvorby buněčné stěny a následného dělení buněk potvrzuje několikanásobný nárůst aktivity již od 24 h po izolaci protoplastů obou rostlin *C. sativus* i *B. oleracea*.
4. Zvýšená produkce peroxidu vodíku detekovaná sondou H<sub>2</sub>DCF DA v procesu regenerace protoplastů je spojena s procesem dělení protoplastů a intenzivní tvorbou buněčné stěny.
5. APF a HPF jsou selektivní fluorescenční sondy pro detekci hROS a byla prokázána jejich zvýšená produkce u *C. sativus* časně po izolaci protoplastů jako reakce na stres.
6. Detekce produkce NO s využitím dvou fluorescenčních sond DAF-FM DA a DAF-2 DA potvrdila cca desetinásobně vyšší citlivost sondy DAF-FM DA.
7. Zvyšující se produkce NO během regenerace protoplastů u obou studovaných organismů *C. sativus* a *B. oleracea* poukazuje na možné zapojení NO v procesu regenerace.
8. Byl detekován významný rozdíl v produkci ROS a NO a zvýšení POX aktivity u buněk *C. sativus* a *B. oleracea* lišících se schopností plné regenerace v časovém intervalu 0 - 72 h po izolaci protoplastů. Je možné, že se vyšší nárůst POX aktivity u *B. oleracea* podílí na schopnosti plné regenerace protoplastů (např. tvorba buněčné stěny, regulace hladiny ROS). U *C. sativus* výrazně vyšší produkce ROS a RNS může negativně ovlivnit regenerační proces (např. v důsledku nitrace a nitrosylace proteinů a lipidů apod.). Nastíněné možnosti je nutné experimentálně ověřit.
9. Zvýšená produkce NO vlivem Ag-nč stabilizovaných kaseinem 7. den po izolaci protoplastů *C. sativus* koreluje s výrazně zvýšenou životností buněk a produkcí ROS. Ovlivnění je způsobeno pravděpodobně kaseinem, jak je zřejmé z kontrolních experimentů po aplikaci pouze Ag-nč. Bylo by vhodné ověřit vliv samotného kaseinu na schopnost regenerace protoplastů s možností praktického využití (např. modifikace kultivačního media).

10. Ag-nč stabilizované želatinou a želatina samotná působila na životnost buněk *C. sativus* již od 3 h po izolaci negativně. Není vhodné v daných experimentech používat takto stabilizované Ag-nč.
11. Ag<sup>+</sup> vykazují toxický vliv na buňky v koncentraci o řád nižší v porovnání s Ag-nč. Buňky *B. oleracea* vykazovaly vyšší citlivost na přítomnost Ag v porovnání s *C. sativus* (Tab. 8). Koncentrace 5 mg/l Ag<sup>+</sup> i Ag-nč byla neslučitelná s životem protoplastů.

Tab. 8: Shrnutí vlivu Ag<sup>+</sup> a Ag-nč na životnost protoplastů.

Testovaná látka	Koncentrace (mg/l)	<i>C. sativus</i>	<i>B. oleracea</i>
Ag <sup>+</sup>	0,05	0	-
	0,5	-	-
Ag-nč	0,05	0	0
	0,5	0	-

Vliv na životnost: 0 žádný nebo slabě pozitivní, - negativní.

12. Pro studie vlivu Ag na regeneraci protoplastů (z pohledu ovlivnění životnosti buněk) je vhodné použít Ag v koncentraci 0,05 mg/l, v případě *C. sativus* i Ag-nč v koncentraci 0,5 mg/l.
13. Buňky *B. oleracea* vykazovaly vyšší citlivost na přítomnost askorbátu v porovnání s buňkami *C. sativus* (Tab. 9).

Tab. 9: Shrnutí vlivu askorbátu na životnost protoplastů.

Testovaná látka	Koncentrace (mg/l)	<i>C. sativus</i>	<i>B. oleracea</i>
Askorbát	50	+	-
	100	-	-

Vliv na životnost: + pozitivní, - negativní.

14. Orientačně byl detekován vliv testovaných látek Ag<sup>+</sup>, Ag-nč a askorbátu na schopnost tvorby mikrokalusů. Pozitivní vliv byl detekován v případě Ag-nč v koncentraci 0,05 mg/l, případně u askorbátu 50 mg/l.
15. Během regenerace protoplastů byl detekován pokles methylace a naopak nárůst hydroxymethylace DNA.
16. Přídavek Ag, s výjimkou Ag-nč v koncentraci 0,05 mg/l u *B. oleracea* a 0,05 a 0,5 mg/l u *C. sativus*, způsobil intenzivnější pokles methylace DNA v průběhu regenerace protoplastů. V přítomnosti Ag v koncentraci 0,5 mg/l

nebyl zaznamenán nárůst hydroxymethylace u obou typů protoplastů (s výjimkou Ag-nč u *C. sativus*, kdy byl detekován mírný nárůst) a v případě *B. oleracea* stejný efekt vyvolala i přítomnost askorbátu v mediu v koncentraci 100 mg/l (Tab. 10). Tyto výsledky potvrzují význam hydroxymethylace a methylace DNA v procesu regenerace protoplastů.

Tab. 10: Shrnutí vlivu Ag<sup>+</sup>, Ag-nč a askorbátu na stav hydroxymethylace a methylace DNA u protoplastů.

Modifikace DNA	Testovaná látka	Koncentrace (mg/l)	<i>C. sativus</i>	<i>B. oleracea</i>	
Hydroxymethylace	Ag <sup>+</sup>	0,05	0	↑	
		0,5	↓	↓	
	Ag-nč	0,05	0	0	
		0,5	↓	↓	
		askorbát	50	0	↓
			100	0	↓
Methylace	Ag <sup>+</sup>	0,05	0	↓	
		0,5	↓	↓	
	Ag-nč	0,05	0	0	
		0,5	↑	↓	
		askorbát	50	↓	↓
			100	↓	↓

Vliv: ↑ nárůst změn, 0 žádná změna, ↓ pokles změn.

17. Ag<sup>+</sup> v koncentraci 0,5 mg/l významně zvýšily expresi antioxidantních enzymů APX, CAT a GPX v čase 24 h po izolaci protoplastů. U Ag-nč bylo toto maximum při koncentraci 0,5 mg/l a v čase 48 h. Ag<sup>+</sup> a Ag-nč v uvedených koncentracích působí na protoplasty toxicky a nárůst exprese antioxidantních enzymů je spojen s obrannou reakcí buněk na stres.
18. Pro následující studie lze doporučit použití Ag-nč v koncentraci 0,05 mg/l v kultivačním mediu pro pozitivní ovlivnění procesu regenerace protoplastů.
19. Rozdíl ve schopnosti regenerace rostlin z protoplastů izolovaných z mezofylového pletiva *B. oleracea* a *C. sativus* může být ovlivněn již v první fázi regenerace (regenerace buněčné stěny, dělení buněk) a to na úrovni produkce ROS (hROS) a RNS a exprese antioxidantních enzymů a jejich

aktivity. Rozdíl byl pozorován i na úrovni změn hydroxymethylace a methylace DNA.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2,4-D	2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina
2OG-Fe(II)	2-oxoglutarát Fe(II)
5-caC	5-karboxylcytosin
5-fC	5-formylcytosin
5-hmC	5-hydroxymethylcytosin
5-hmU	5-hydroxymethyluracil
5-mC	5-methylcytosin
A	adenin
APF	aminofenylfluorescein, 2-[6-(4'-amino)fenoxy-3H-xanten-3-on-9-yl]benzoová kyselina
Ag	stříbro (myšleno souhrnně stříbrné ionty i nanočástice stříbra)
Ag-nč	nanočástice stříbra
Ag-nč+želatina	nanočástice stříbra stabilizované želatinou
Ag-nč+kasein	nanočástice stříbra stabilizované kaseinem
APX	askorbátperoxidasa
ATP	adenosintrifosfát
B5 medium	Gamborg B5 medium včetně vitamínů
BAP	benzylaminopurin
cPTIO	2-(4-karboxyfenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid
C	cytosin
CAT	katalasa
CMT3	chromomethyltransferasa 3
C <sub>t</sub> hodnota	prahový cyklus
CTAB	hexadecyltrimethylamoniumbromid, cetyltrimethylamoniumbromid
Cys	cystein
Cytc	cytochrom c
DAF-2	4,5-diaminofluorescein
DAF-2 DA	4,5-diaminofluorescein diacetát
DAF-FM DA	4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetát
DHA	dehydroaskorbát

DNA-MTasa	DNA-methyltransferasa
DNMT	DNA-methyltransferasa
DRM	methyltransferasy přeměňující domény
DSBH	dvoušroubovicový beta helix
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FDA	fluorescein diacetát
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa
GDP	guanosindifosfát
GPX	glutathionperoxidasa
GTP	guanosintrifosfát
GR	glutathionreduktasa
GSH	redukováný glutathion
GSSG	oxidováný glutathion
H <sub>2</sub> DCF DA	2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetát
HPF	hydroxyfenylfluorescein, 2-[6-(4'-hydroxy)fenoxy-3H-xanten-3-on-9-yl]benzoová kyselina
hROS	vysoce reaktivní formy kyslíku
IBA	indolylmáselná kyselina
J báze	β-D-glukosylhydroxymethyluracil
JBP1, JBP2	J vazebný protein 1, 2
L-Arg	L-arginin
MBD	methyl-CpG-vazebná doména
MDB	pufr odsolující membránu
MDHA	monodehydroaskorbát
MeCP2	methyl-CpG-vazebný protein 2
MES	2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina
MET1	methyltransferasa 1
MS medium	Murashige a Skoog medium
MTasy	methyltransferasy
NAA	naftylactová kyselina
NAD(P) <sup>+</sup>	nikotinamid adenin dinukleotid (fosfát) oxidováný
NAD(P)H	nikotinamid adenin dinukleotid (fosfát) redukováný
Nč	nanočástice
NLS	jaderné lokalizační sekvence
NO	oxid dusnatý
NOS	NOsyntasa
Pol V	polymerasa V

POX	peroxidasa
RdDM	methylace DNA řízená malými RNA
RISC	RNA indukující komplex umlčení genů
ROS	reaktivní formy kyslíku
RNS	reaktivní formy dusíku
Real-time PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
SMUG1	selektivní monofunkční uracil-DNA-glykosylasa
SOD	superoxididismutasa
T	thymin
TET	proteiny konvertující 5-mC na 5-hmC

## POUŽITÁ LITERATURA

Ahamed M., Posgai R., Gorey T. J., Nielsen M., Hussain S. M., Rowe J. J. (2010) Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Toxicology and Applied Pharmacology* **242**, 263-269.

Allen M. D., Grummitt C. G., Hilcenko C., Min S. Y., Tonkin L. M., Johnson C. M., Freund S. M., Bycroft M., Warren A. J. (2006) Solution structure of the nonmethyl-CpG-binding CXXC domain of the leukaemia-associated MLL histone methyltransferase. *The EMBO Journal* **25**, 4503-4512.

Angelini R., Manes F., Federico R. (1990) Spatial and functional correlation between diamine-oxidase and peroxidase activities and their dependence upon de-etiolation and wounding in chick-pea stems. *Planta* **182**, 89-96.

Aravind L., Koonin E. V. (2001) The DNA-repair protein AlkB, EGL-9, and Iprecan define new families of 2-oxoglutarate- and iron-dependent dioxygenases. *Genome Biology* **2**(3), 0007.1-0007.8.

Arrigoni O. (1994) Ascorbate system in plant development. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **26**, 407-419.

Arrigoni O., De Tullio M. C. (2002) Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta* **1569**, 1-9.

Arora S., Jain J., Rajwade J. M., Paknikar K. M. (2009) Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* **236**, 310-318.

Asharani P. V., Mun G. L. K., Hande M. P., Valiyaveetil S. (2009) Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* **3**, 279-290.

Asharani P. V., Wu Y., Gong Z., Valiyaveetil S. (2008) Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology* **19** (25), 255102.

Badejo A. A., Fujikawa Y., Esaka M. (2009) Gene expression of ascorbic acid biosynthesis related enzymes of the Smirnov-Wheeler pathway in acerola (*Malpighia glabra*). *Journal of Plant Physiology* **166**, 652-660.

Baťková P., Pospíšilová J., Synková H. (2008) Production of reactive oxygen species and development of antioxidative systems during *in vitro* growth and *ex vitro* transfer. *Biologia Plantarum* **52** (3), 413-422.

- Beligni M. V., Lamattina L. (2000) Nitric oxide stimulates seed germination and deetiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* **210**, 215-221
- Benn T., Westerhoff P. (2008) Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. *Environmental Science & Technology* **42**, 4133-4139.
- Benson E. E., Roubelakis-Angelakis K. A. (1992) Fluorescent lipid peroxidation products and antioxidant enzymes in tissue cultures of *Vitis vinifera* L. *Plant Science* **84**, 83-90.
- Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K. V. (2003) Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Annals of Botany* **91**, 179-194.
- Bird A. P. (1986) CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* **321**, 209-213.
- Bird A. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development* **16**, 6-21.
- Bird A. P., Taggart M. H. (1980) Variable patterns of total DNA and rDNA methylation in animals. *Nucleic Acids Research* **8**, 1485-1497.
- Bolwell G. P., Wojtaszek P. (1997) Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence - a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **51**, 347-366.
- Borst P., Gommers-Ampt J. H., Ligtenberg M. J., Rudenko G., Kieft R., Taylor M. C., Blundell P. A., van Leeuwen F. (1993) Control of antigenic variation in African trypanosomes. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology Series, DNA and Chromosomes* **58**, 105-115.
- Boorstein R. J., Cummings A., Marenstein D. R., Chan M. K., Ma Y. L., Neubert T. A., Brown S. M., Teebor G. W. (2001) Definitive identification of mammalian 5-hydroxymethyluracil DNA N-glycosylase activity as SMUG1. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 41991-41997.
- Boorstein R. J., Chiu L. N., Teebor G. W. (1992) A mammalian cell line deficient in activity of the DNA repair enzyme 5-hydroxymethyluracil-DNA glycosylase is resistant to the toxic effects of the thymidine analog 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine. *Molecular and Cellular Biology* **12** (12), 5536-5540
- Braydich-Stolle L., Hussain S., Schlager J., Hofmann M. (2005) In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicological Sciences* **88**, 412-419.
- Cannon S. V., Cummings A., Teebor G. W. (1988) 5-Hydroxymethylcytosine DNA glycosylase activity in mammalian tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **151**, 1173-1179.
- Carlson C., Hussain S. M., Schrand A. M., Braydich-Stolle L. K., Hess K. L., Jones R. L., Schlager J. J. (2008) Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *The Journal of Physical Chemistry B* **112**, 13608-13619.
- Cier A., Lefier A., Ravier M., Nofre C. (1962) Action du radical libre hydroxyle sur les bases pyrimidiques (The action of free hydroxyl radicals on the pyrimidine bases). *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de L'Academie des Sciences* **254**, 504-506.
- Cliffe L. J., Kieft R., Southern T., Birkeland S. R., Marshall M., Sweeney K., Sabatini R. (2009) JBP1 and JBP2 are two distinct thymidine hydroxylases involved in J biosynthesis in genomic DNA of African trypanosomes. *Nucleic Acids Research* **37**, 1452-1462.
- Colvin V. L. (2003) The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nature Biotechnology* **21**, 1166-1170.



- Cordoba F., Gonzalez-Reyes J. A. (1994) Ascorbate and plant cell growth. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **26**, 399-405.
- Davey M. R., Anthony P., Power J. B., Lowe K. C. (2005) Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnical Advances* **23**, 131-171.
- 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**, 37-40.
- Dedičová B. (1995) Rastlinné protoplasty. *Biologické listy* **60**, 241-257.
- De Marco A., Roubelakis-Angelakis K. A. (1996) The complexity of enzymic control of hydrogen peroxide concentration may affect the regeneration potential of plant protoplasts. *Plant Physiology* **110**, 137-145.
- De Tullio M. C., Paciolla C., Dalla Vecchia F., Rascio N., D'Emérico S., De Gara L., Liso R., Arrigoni O. (1999) Changes in onion root development induced by the inhibition of peptidyl-prolyl hydroxylase and influence of the ascorbate system on cell division and elongation. *Planta* **209**, 424-434.
- Dibrov P., Dzioba J., Gosink K., Hase C. (2002) Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag<sup>+</sup> in *Vibrio cholerae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 2668-2670.
- Dupont C., Armant D. R., Brenner C. A. (2009) Epigenetics: Definition, Mechanisms and Clinical Perspective. *Seminars in Reproductive Medicine* **27** (5), 351-357.
- Dunphy Guzman K. A., Finnegan M. P., Banfield J. F. (2006a) Influence of surface potential on aggregation and transport of titania nanoparticles. *Environmental Science & Technology* **40**, 7688-7693.
- Dunphy Guzman K. A., Taylor M. R., Banfield J. F. (2006b) Environmental risks of nanotechnology: national nanotechnology initiative funding, 2000–2004. *Environmental Science & Technology* **40**, 1401-1407.
- Elechiguerra J., Burt J., Morones J., Camacho-Bragado A., Gao X., Lara H., Yacaman M. (2005) Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *Journal of Nanobiotechnology* **3** (6), 1-10.
- Esteller M. (2008) Epigenetics in cancer. *The New England Journal of Medicine* **358**, 1148-1159.
- Falletta E., Bonini M., Fratini E., Lo Nostro A., Pesavento G., Becheri A., Lo Nostro P., Canton P., Baglioni P. (2008) Clusters of poly(acrylates) and silver nanoparticles: structure and applications for antimicrobial fabrics. *The Journal of Physical Chemistry C* **112**, 11758-11766.
- Finnegan E. J., Genger R. K., Peacock W. J., Dennis E. S. (1998) DNA methylation in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**, 223-247.
- Finnegan E. J., Kovac K. A. (2000) Plant DNA methyltransferases. *Plant Molecular Biology* **43**, 189-201.
- Fowke L., Constabel F. (1986) Plant Protoplasts, pp. 2-15, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Foyer C. H., Lelandais M. (1996) A comparison of the relative rates of transport of ascorbate and glucose across the thylakoid, chloroplast and plasmalemma membranes of pea leaf mesophyll cells. *Journal of Plant Physiology* **148**, 391-398.
- Fransz P. F., de Jong J. H. (2002) Chromatin dynamics in plants. *Current Opinion in Genetics & Development* **5**, 560-567.

- Gajdová J., Navrátilová B., Smolná J., Lebeda A. (2007) Factors affecting protoplast isolation and cultivation of *Cucumis* spp. *Journal of Applied Botany and Food Quality* **81**, 1-6.
- Gal-Yam E. N., Saito Y., Egger G., Jones P. A. (2008) Cancer epigenetics: modifications, screening, and therapy. *Annual Review of Medicine* **59**, 267-280.
- Globisch D., Münzel M., Müller M., Michalakis S., Wagner M., Koch S., Brückl T., Biel M., Carell T. (2010) Tissue Distribution of 5-Hydroxymethylcytosine and Search for Active Demethylation Intermediates. *Plos one* **5** (12), e15367.
- Goll M. G., Bestor T. H. (2005) Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annual Review of Biochemistry* **74**, 481-514.
- Gupta R., Nagarajan A., Wajapeyee N. (2010) Advances in genome-wide DNA methylation analysis. *BioTechniques* **49** (4), iii–xi.
- Hancock R. D., McRae D., Haupt S., Viola R. (2003) Synthesis of L-ascorbic acid in the phloem. *BMC Plant Biology* **3** (7), 1-13.
- He Y. K., Li J. Y. (2001) Differential expression of triplicate phosphoribosylanthranilate isomerase isogenes in the tryptophan biosynthetic pathway of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* **212**, 641-647.
- Hegg E. L., Que L. J. (1997) The 2-His-1-carboxylate facial triad-an emerging structural motif in mononuclear non-heme iron(II) enzymes. *European journal of Biochemistry* **250**, 625-629.
- Hernandez J. A., Escobar C., Creissen G., Mullineaux P. M. (2006) Antioxidant enzyme induction in pea plants under high irradiance. *Plant Biology* **50**, 395-399.
- Hernandez-Sierra J., Ruiz F., Pena D., Martinez-Gutierrez F., Martinez A., Guillen A., Tapia-Perez H., Castanon G. (2008) The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus* mutants to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **4**, 237-240.
- Holliday R., Pugh J. E. (1975) DNA modification mechanism and gene activity during development. *Science* **187**, 226-232.
- Holt K., Bard A. (2005) Interaction of silver(I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag. *Biochemistry* **44**, 13214-13223.
- Hsieh M. C., Graham T. L. (2001) Partial purification and characterization of a soybean  $\beta$ -glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. *Phytochemistry* **58**, 995-1005.
- Hsin Y., Chena C., Huang S., Shih T., Lai P., Chueh P. (2008) The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicology Letters* **179**, 130-139.
- Hu Q., Andersen S. B., Hansen L. N. (1999) Plant regeneration capacity of mesophyll protoplasts from *Brassica napus* and related species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **59**, 189-196.
- Huang Y., Pastor W. A., Shen Y., Tahiliani M., Liu D. R., Rao A. (2010) The behaviour of 5-hydroxymethylcytosine in bisulfite sequencing. *Plos one* **5** (1), e8888.
- Hussain S., Hess K., Gearhart J., Geiss K., Schlager J. (2005) In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in Vitro* **19**, 975-983.

Hwang E., Lee J., Chae Y., Kim Y., Kim B., Sang B., Gu M. (2008) Analysis of the toxic mode of action of silver nanoparticles using stress-specific bioluminescent bacteria. *Small* **4**, 746-750.

Chen T., Li E. (2004) Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases. *Current Topics in Developmental Biology* **60**, 55-89.

Chen C., Chiang C. (2008) Preparation of cotton fibers with antibacterial silver nanoparticles. *Materials Letters* **62**, 3607-3609.

Choi O., Deng K., Kim N., Ross L., Surampalli R., Hu Z. (2008) The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Research* **42**, 3066-3074.

Chromá L., Macková M., Macek T., Martínek V., Stiborová M. (2001) Rostlinné cytochromy P450 a peroxidasy a jejich úloha při degradaci kontaminantů životního prostředí. *Chemické listy* **95**, 212-222.

Ingle A., Gade A., Pierrat S., Sonnichsen C., Rai M. (2008) Mycosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium acuminatum* and its activity against some human pathogenic bacteria. *Current Nanoscience* **4**, 141-144.

Jones P. A., Baylin S. B. (2007) The epigenomics of cancer. *Cell* **128** (4), 683-692.

Jung R., Kim Y., Kim H., Jin H. (2009) Antimicrobial properties of hydrated cellulose membranes with silver nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **20**, 311-324.

Kai G. Y., Jiang J. H., Zhao D. L., Zhao L. X., Zhang L., Li Z. G., Guo B. H., Sun X. F., Miao Z. Q., Tang K. X. (2006) Isolation and expression profile analysis of a new cDNA encoding 5-alpha-taxadienol-10-beta-hydroxylase from *Taxus media*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* **15**, 1-5.

Katsirdakis K. C., Roubelakis-Angelakis K. A. (1992) Ultrastructural and biochemical aspects of cell wall regeneration in recalcitrant and regenerating leaf protoplasts. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* **28**, 90-97.

Kaur N. D., Vyvadilová M., Klíma M., Bechyně M. (2006) A simple procedure for mesophyll protoplast culture and plant regeneration in *Brassica oleracea* L. and *Brassica napus*. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* **42**, 103-110.

Khattak M. N., Green J. H. (1966) Gamma-irradiation of Nucleic-acid Constituents in De-aerated Aqueous Solutions II. 5-methyl Cytosine. *International Journal of Radiation Biology* **11**, 137-143.

Kim J. (2007) Antibacterial activity of Ag<sup>+</sup> ion-containing silver nanoparticles prepared using the alcohol reduction method. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **13**, 718-722.

Kim J., Kuk E., Yu K., Kim J., Park S., Lee H., Kim S., Park Y., Hwang C., Kim Y., Lee Y., Jeong D., Cho M. (2007) Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **3**, 95-101.

Kim J., Lee J., Kwon S., Jeong S. (2009a) Preparation of biodegradable polymer/silver nanoparticles composite and its antibacterial efficacy. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **9**, 1098-1102.

Kim K., Sung W., Suh B., Moon S., Choi J., Kim J., Lee D. (2009b) Antifungal activity and mode of action of silver nanoparticles on *Candida albicans*. *BioMetals* **22**, 235-242.

Kim K., Sung W., Moon S., Choi J., Kim J., Lee D. (2008a) Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **18**, 1482-1484.

- Kim Y., Kim J., Cho H., Rha D., Kim J., Park J., Choi B., Lim R., Chang H., Chung Y., Kwon I., Jeong J., Han B., Yu I. (2008b) Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhalation Toxicology* **20**, 575-583.
- Klose R. J., Bird A. P. (2006) Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends in Biochemical Sciences* **31**, 89-97.
- Koh K. P., Yabuuchi A., Rao S., Huang Y., Cunniff K., Nardone J., Laiho A., Tahiliani M., Sommer C. A., Mostoslavsky G., Lahesmaa R., Orkin S. H., Rodig S. J., Daley G. Q., Rao A. (2011) Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* **8** (2), 200-213.
- Kriaucionis S., Heintz N. (2009) The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in purkinje neurons and the brain. *Science* **324**, 929-930.
- Křížková S., Adam V., Kizek R. (2009) Fytotoxicita stříbrných iontů. *Chemické listy* **103**, 559-568.
- Kump B., Javornik B. (1996) Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) populations by RAPD markers. *Plant Science* **114**, 149-158.
- Kvítek L., Pucek R., Panáček A., Novotný R., Hrbáč J., Zbořil R. (2005) The influence of complexing agent concentration on particle size in the process of SERS active silver colloid synthesis. *Journal of Materials Chemistry* **15**, 1099-1105.
- Kvítek L., Pucek R., Panáček A., Vandlíčková M., Zbořil R. (2010) Mechanismus vzniku nanočástic stříbra při redukci v alkalickém prostředí. *Chemické listy* **104**, 10L-05, 587.
- Lambert P. A. (2005) Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **57** (10), 1471-1485.
- Liau S., Read D., Pugh W., Furr J., Russell A. (1997) Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions. *Letters in Applied Microbiology* **25**, 279-283.
- Libik M., Konieczny R., Pater B., Ślesak I., Miszalski Z. (2005) Differences in the activities of some antioxidant enzymes and in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content during rhizogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of the ice plant. *Plant Cell Reports* **23**, 834-841.
- Liso R., Innocenti A. M., Bitonto M. B., Arrigoni O. (1988) Ascorbic acid-induced progression of quiescent centre cells from G to S phase. *New phytologist* **110**, 469-471.
- Lister R., O'Malley R. C., Tonti-Filippini J., Gregory B. D., Berry C. C., Millar A. H., Ecker J. R. (2008) Highly Integrated Single-Base Resolution Maps of the Epigenome in *Arabidopsis*. *Cell*, **133** (3), 523-536.
- Liutkeviciute Z., Lukinavicius G., Masevicius V., Daujotyte D., Klimasauskas S. (2009) Cytosine-5-methyltransferases add aldehydes to DNA. *Nature Chemical Biology* **5**, 400-402.
- Loenarz C., Schofield C. J. (2009) Oxygenase Catalyzed 5-Methylcytosine Hydroxylation. *Chemistry & Biology* **16**, 580-583.
- Lok C., Ho C., Chen R., He Q., Yu W., Sun H., Tam P., Chiu J., Che C. (2006) Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *Journal of Proteome Research* **5**, 916-924.
- Low D. A., Weyand N. J., Mahan M. J. (2001) Roles of DNA adenine methylation in regulating bacterial gene expression and virulence. *Infection and Immunity* **69**, 7197-7204.

Lu L., Sun R., Chen R., Hui C., Ho C., Luk J., Lau G., Che C. (2008) Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication. *Antiviral Therapy* **13**, 253-262.

Marambio-Jones C., Hoek E. M. V. (2010) A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research* **12**, 1531-1551.

May M. J., Vernoux T., Leaver C., Van Montagu M., Inze D. (1998) Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *Journal of Experimental Botany* **49**, 649-667.

Maynard A. D., Aitken R. J., Butz T., Colvin V., Donaldson K., Oberdörster G., Philbert M. A., Ryan J., Seaton A., Stone V., Tinkle S. S., Tran L., Walker N. J., Warheit D. B. (2006) Safe handling of nanotechnology. *Nature* **444**, 267-269.

Meyer Y., Abel W. O. (1975) Importance of the wall for cell division and in the activity of the cytoplasm in cultured tobacco protoplasts. *Planta* **123**, 33-40.

Miller C. A., Sweatt J. D. (2007) Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron* **53**, 857-869.

Mittler R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**, 405-410.

Mliki A., Jardask R., Reustle G. M. (2003) Isolation and culture of leaf protoplasts from *Tunisian grapes*. *Journal international des sciences de la vigne et du vin* **37**, 145-153.

Morones J., Elechiguerra J., Camacho A., Holt K., Kouri J., Ramirez J., Yacaman M. (2005) The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* **16** (10), 2346-2353.

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

Nagano T. (2009) Biomaging probes for reactive oxygen species and reactive nitrogen species. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* **45**, 111-124.

Navabpour S., Morris K., Allen R., Harrison E., Mackerness S. A-H., Buchanan-Wollaston V. (2003) Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* **54**, 2285-2292.

Navarro E., Piccapietra F., Wagner B., Marconi F., Kaegi R., Odzak N., Sigg L., Behra R. (2008a) Toxicity of Silver Nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science & Technology* **42**, 8959-8964.

Navarro E., Baun A., Behra R., Hartmann N. B., Filser J., Miao A. J., Quigg A., Santschi P. H., Sigg L. (2008b) Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology* **17**, 372-386.

Navas P., Gomez-Diaz P. (1995) Ascorbate free radical and its role in growth control. *Protoplasma* **184**, 8-13.

Navrátilová B. (2003) Konstrukce a biologická charakteristika mezirodového somatického hybridu *Armobrassica*. Doktorská disertační práce, pp 9-14, Olomouc, Česká republika.

Navrátilová B. (2004) Protoplast culture and protoplast fusion focused on *Brassicaceae*. *Horticultural Science* **31**, 140-157.

Neill S. J., Desikan R., Clarke A., Hurst R. D., Hancock J. T. (2002) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1237-1247.

- Nel A., Xia T., Madler L., Li N. (2006) Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* **311**, 622-627.
- Noctor G., Foyer C. H. (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**, 249-279.
- Nowack B., Bucheli T. D. (2007) Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution* **150**, 5-22.
- Noyer-Weidner M., Trautner T. A. (1993) Methylation of DNA in prokaryotes. *EXS* **64**, 39-108.
- Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J. (2005) Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives* **113**, 823-839.
- Ogonczyk D., Tymecki L., Wyzkiewicz I., Koncki R., Glab S. (2005) Screen-printed disposable urease-based biosensors for inhibitive detection of heavy metal ions. *Sensors and Actuators B* **106**, 450-454.
- Olson P. D., Varner J. E. (1993) Hydrogen peroxide and lignification. *Plant Cell* **4**, 887-892.
- Ooi S. K., O'Donnell A. H., Bestor T. H. (2009) Mammalian cytosine methylation at a glance. *Journal of Cell Science* **122**, 2787-2791.
- Otvos K., Pasternak T. P., Miskolczi P., Domoki M., Dorjotov D., Szucs A., Bottka S., Dudits D., Fehér A. (2005) Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures. *The Plant Journal* **43**, 849-860.
- Palmatier R. D., McCroskey R. P., Abbott M. T. (1970) Enzymatic conversion of uracil 5-carboxylic acid to uracil and carbon dioxide. *The Journal of Biological Chemistry* **245**, 6706-6710.
- Panáček A., Kvítek L., Pucek R., Kolář M., Zbořil R. (2010) Biologická aktivita stříbra. *Chemické listy* **104**, 10L-08, 588.
- Papadakis A. K., Roubelakis-Angelakis K. A. (2002) Oxidative stress could be responsible for the recalcitrance of plant protoplasts. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**, 549-559.
- Papadakis A. K., Siminis C. I., Roubelakis-Angelakis K. A. (2001) Reduced activity of antioxidant machinery is correlated with suppression of totipotency in plant protoplasts. *Plant Physiology* **126**, 434-444.
- Penn N. W., Suwalski R., O'Riley C., Bojanowski K., Yura R. (1972) The presence of 5-hydroxymethylcytosine in animal deoxyribonucleic acid. *Biochemical Journal* **126**, 781-790.
- Pelletier G., Primard C., Vedel F., Chetrit P., Remy R., Rousselle P., Renard M. (1983) Intergeneric cytoplasmic hybridization in *Cruciferae* by protoplast fusion. *Molecular Genetics and Genomics* **191**, 244-250.
- Petering H. (1976) Pharmacology and toxicology of heavymetals-silver. *Pharmacology & Therapeutics* **1**, 127-130.
- Petřek J., Vlašínová H., Havel L., Adam V., Babula P., Víteček J., Bartůček K., Potěšil D., Kizek R. (2006) Organizace embryí ve shlucích raných somatických embryí smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) Karst.), pp. 104-109, Sborník MendelNet04Agro MZLU Brno, Česká republika.
- Piterková J., Tománková K., Luhová L., Petřivalský M., Peč P. (2005) Oxidativní stres: lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. *Chemické listy* **99**, 455-466.

- Popp C., Dean W., Feng S. H., Cokus S. J., Andrews S., Pellegrini M., Jacobsen S. E., Reik W. (2010) Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature* **463**, 1101-1126.
- Potrykus I., Shillito R. D. (1986) Protoplasts: Isolation, culture, plant regeneration. *Methods in Enzymology* **118**, 549-578.
- Prescott A. G. (1993) A dilemma of dioxygenases: or where molecular biology and biochemistry fail to meet. *Journal of Experimental Botany* **44**, 849-861.
- Privat E., Sowers L. C. (1996) Photochemical deamination and demethylation of 5-methylcytosine. *Chemical Research in Toxicology* **9** (4):745-750.
- Raffi M., Hussain F., Bhatti T., Akhter J., Hameed A., Hasan M. (2008) Antibacterial characterization of silver nanoparticles against *E. coli* ATCC-15224. *Journal of Materials Science and Technology* **24**, 192-196.
- Ratte H. T. (1999) Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: A review. *Environmental Toxicology and Chemistry* **18**, 89-108.
- Reik W. (2007) Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* **447**, 425-432.
- Reik W., Dean W., Walter J. (2001) Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* **293**, 1089-1093.
- Riggs A. D. (1975) X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenetics and Cell Genetics* **14**, 9-25.
- Robertson K. D. (2005) DNA methylation and human disease. *Nature Reviews Genetics* **6**, 597-610.
- Roe D., Karandikar B., Bonn-Savage N., Gibbins B., Roulet J. (2008) Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **61**, 869-876.
- Roubelakis-Angelakis K. A. (1993) An assessment of possible factors contributing to recalcitrance of plant protoplasts, pp 201-219, Morphogenesis in Plants: Molecular Approaches. Plenum Publishing Co, New York, USA.
- Ruparella J., Chatterjee A., Duttagupta S., Mukherji S. (2008) Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomaterialia* **4**, 707-716.
- Rusmintrati V., Sowers L. C. (2000) An unexpectedly high excision capacity for mispaired 5-hydroxymethyluracil in human cell extracts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 14183-14187.
- Scandalios J. G. (1990) Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. *Advances in Genetics* **28**, 1-41.
- Shaffer P. M., Hsu C. A., Abbott M. T. (1975) Metabolism of pyrimidine deoxyribonucleosides in *Neurospora crassa*. *The Journal of Bacteriology* **121**, 648-655.
- Shapiro H. S. (1970) In Sober H. A. (ed.), CRC Handbook of Biochemistry, pp. 96-108, CRC Press Cleveland, Ohio, USA.
- Schreurs W., Rosenberg H. (1982) Effect of silver ions on transport and retention of phosphate by *Escherichia coli*. *The Journal of Bacteriology* **152**, 7-13.

- Sigareva M. A., Earle E. D. (1997) Direct transfer of a cold-tolerant *Ogura* male-sterile cytoplasm into cabbage (*Brassica oleracea ssp. capitata*) via protoplast fusion. *Theoretical and Applied Genetics* **94**, 213-220.
- Siminis C. I., Kanellis A. K., Roubelakis-Angelakis K. A. (1993) Differences in protein synthesis and peroxidase iso-enzymes between recalcitrant and re-generating protoplasts. *Plant Physiology* **87**, 263-270.
- Siminis C. I., Kanellis A. K., Roubelakis-Angelakis K. A. (1994) Catalase is differentially expressed in dividing and nondividing protoplasts. *Plant Physiology* **105**, 1375-1383.
- Smetana A., Klabunde K., Marchin G., Sorensen C. (2008) Biocidal activity of nanocrystalline silver powders and particles. *Langmuir* **24**, 7457-7464.
- Smith L. T., Otterson G. A., Plass C. (2007) Unraveling the epigenetic code of cancer for therapy. *Trends in Genetics* **23**, 449-456.
- Smirnoff N. (1996) The functional and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany* **78**, 661-669.
- Smirnoff N., Conklin P. L., Loewus F. A. (2001) Biosynthesis of ascorbic acid in plants: A Renaissance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 437-467.
- Sondi I., Salopek-Sondi B. (2004) Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science* **275**, 177-182.
- Stohs S. J., Bagchi D. (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal-ions. *Free Radical Biology & Medicine* **18**, 321-336.
- Sun L., Singh A., Vig K., Pillai S., Singh S. (2008) Silver nanoparticles inhibit replication of respiratory syncytial virus. *Journal of Biomedical Nanotechnology* **4**, 149-158.
- Sung J., Ji J., Yoon J., Kim D., Song M., Jeong J., Han B., Han J., Chung Y., Kim J., Kim T., Chang H., Lee E., Lee J., Yu I. (2008) Lung function changes in Sprague-Dawley rats after prolonged inhalation exposure to silver nanoparticles. *Inhalation Toxicology* **20**, 567-574.
- Suzuki M. M., Bird A. (2008) DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nature Reviews Genetics* **9**, 465-476.
- Tahiliani M., Koh K. P., Shen Y., Pastor W. A., Bandukwala H., Brudno Y., Agarwal S., Iyer L. M., Liu D. R., Aravind L., Rao A. (2009). Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science* **324**, 930-935.
- Tardy-Planechaud S., Fujimoto J., Lin S. S., Sowers L. C. (1997) Solid phase synthesis and restriction endonuclease cleavage of oligodeoxynucleotides containing 5-(hydroxymethyl)-cytosine. *Nucleic Acids Research* **25** (3), 553-558.
- Valinluck V., Tsai H. H., Rogstad D. K., Burdzy A., Bird A., Sowers L. C. (2004) Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Research* **32**, 4100-4108.
- Vertelov G., Krutyakov Y., Efremenkova O., Olenin A., Lisichkin G. (2008) A versatile synthesis of highly bactericidal Myramistin stabilized silver nanoparticles. *Nanotechnology* **19** (35), 355707.
- Von Bohlen und Halbach O. (2003) Nitric oxide imaging in living neuronal tissues using fluorescent probes. *Nitric Oxide* **9**, 217-228.



- Vranová E., Inzé D., Van Breusegem F. J. (2002) Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1227-1236.
- Weber M., Schubeler D. (2007) Genomic patterns of DNA methylation: targets and function of an epigenetic mark. *Current Opinion in Cell Biology* **19**, 273-280.
- Wendehenne D., Gould K., Lamotte O., Durner J., Vandelle E., Lecourieux D., Courtois C., Barnavon L., Bentéjac M., Pugin A. (2005) NO signaling functions in the biotic and abiotic stress response. *BMC Plant Biology* **5**, 35-36.
- Wheeler G. L., Jones M. A., Smirnov N. (1998) The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* **393**, 365-369.
- Wiesner M. R., Lowry G. V., Alvarez P., Dionysiou D., Biswas P. (2006) Assessing the risks of manufactured nanomaterials. *Environmental Science & Technology* **40**, 4336-4345.
- Wojtaszek P. (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal* **322**, 681-692.
- Wolucka B. A., Van Montagu M. (2003) GDP-D-mannose 3',5'- epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the *de novo* biosynthesis of vitamin C in plants. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 47483-47490.
- Wu C. T., Morris, J. R. (2001) Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science* **293** (5532), 1103-1105.
- Wyatt G. R., Cohen, S. S. (1953) The bases of the nucleic acids of some bacterial and animal viruses: the occurrence of 5-hydroxymethylcytosine. *Biochemical Journal* **55**, 774-782.
- Yang W., Shen C., Ji Q., An H., Wang J., Liu Q., Zhang Z. (2009) Food storage material silver nanoparticles interfere with DNA replication fidelity and bind with DNA. *Nanotechnology* **20** (8), 085102.
- Yasuda K., Watanabe M. (2007) Generation of intracellular reactive oxygen species during the generation of intracellular reactive oxygen species during the isolation of *Brassica napus* leaf protoplasts. *Plant Biotechnology* **24**, 361-366.
- Yeo M., Kang M. (2008) Effects of nanometer sized silver materials on biological toxicity during zebrafish embryogenesis. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **29**, 1179-1184.
- Yeo M., Yoon J. (2009) Comparison of the effects of nano-silver antibacterial coatings and silver ions on zebrafish embryogenesis. *Molecular & Cellular Toxicology* **5**, 23-31.
- Yin Y., Li Z. Y., Zhong Z., Gates B., Xia Y., Venkateswaran S. (2002) Synthesis and characterization of stable aqueous dispersions of silver nanoparticles through the Tollens process. *Journal of Materials Chemistry* **12** (3), 522-527.
- Yoder J. A., Walsh C. P., Bestor T. H. (1997) Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends in Genetics* **13**, 335-340.
- Yoon K., Byeon J., Park C., Hwang J. (2008a) Antimicrobial effect of silver particles on bacterial contamination of activated carbon fibers. *Environmental Science & Technology* **42**, 1251-1255.
- Yoon K., Byeon J., Park J., Ji J., Bae G., Hwang J. (2008b) Antimicrobial characteristics of silver aerosol nanoparticles against *Bacillus subtilis* bioaerosols. *Environmental Engineering Science* **25**, 289-293.
- Yu Z., Genest P. A., ter Riet B., Sweeney K., DiPaolo C., Kieft R., Christodoulou E., Perrakis A., Simmons J. M., Hausinger R. P., van Luenen H. G., Rigden D. J., Sabatini R., Borst P. (2007)

The protein that binds to DNA base J in trypanosomatids has features of a thymidine hydroxylase. *Nucleic Acids Research* **35**, 2107-2115.

Zhang M., Kimatu J. N., Xu K., Liu B. (2010) DNA cytosine methylation in plant development. *Journal of Genetics and Genomics* **37**, 1-12.

Zhang X., Yazaki J., Sundaresan A., Cokus S., Chan S. W. L., Chen H., Henderson I. R., Shinn P., Pellegrini M., Jacobsen S. E., Ecker, J. (2006) Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell* **126**, 1189-1201.

Zhang Y., Peng H., Huang W., Zhou Y., Yan D. (2008) Facile preparation and characterization of highly antimicrobial.colloid Ag or Au nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science* **325**, 371-376.

Zilberman D. (2008) The evolving functions of DNA methylation. *Current Opinion in Plant Biology* **11**, 554-559.

Zilberman D., Gehring M., Tran R. K., Ballinger T., Henikoff S. (2007) Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nature Genetics* **39**, 61-69.

Zodrow K., Brunet L., Mahendra S., Li D., Zhang A., Li Q. L., Alvarez P. J. J. (2009) Polysulfone ultrafiltration membranes impregnated with silver nanoparticles show improved biofouling resistance and virus removal. *Water Research* **43**, 715-723.