

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Bakalářská práce

Olomouc

Petr Cápál

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



Cytogenetické aspekty protoplastových kultur

Bakalářská práce

Petr Cápál

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: prezenční

Olomouc 2009

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

Prohlášení:

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

V Olomouci dne 4. 5. 2010

Petr Cápal

Poděkování:

Rád bych poděkoval vedoucímu práce RNDr. Vladanovi Ondřejovi, PhD. Za jeho cenné rady a připomínky, bez nichž by tato práce zcela jistě nevznikla, stejně tak za jeho trpělivost. Mé díky patří i Bc. Ivě Protivánkové za pomoc při práci v laboratoři. Rovněž děkuji rodičům za psychickou a materiální podporu po celou dobu studia.

Shrnutí

Protoplasty jsou vhodným modelem pro studium buněčné dediferenciace a následného reprogramování. Toto téma je intenzivně zkoumáno u buněk živočišných. Ovšem reprogramování živočišných buněk je obtížné a potýká se s mnoha problémy. Dediferenciace předpokládá, že terminálně diferencované buňky neztrácejí jejich vývojové schopnosti a vlivem určitých podmínek (nejčastěji stres) jsou schopny dosáhnout stavu pluripotence, tj. stavu podobného kmenovým buňkám, předtím, než se vydají na novou dráhu (diferenciace, proliferace, smrt). Tato práce srovnává různé aspekty rostlinných a živočišných buněk vzhledem k jejich dediferenciaci a reprogramování. Dediferenciace je provázena reorganizací chromatinu, zahrnující jeho dekonenzaci, což je v této práci ověřeno pomocí metody FISH, sondami hybridizujícími se na repetice SAT I a 5S rDNA v jádrech protoplastů okurky (*Cucumis sativus* L.).

Summary

Protoplasts are suitable model for study of cellular dedifferentiation and subsequent reprogramming. This topic is intensively studied in animal cells. However reprogramming of animal cells is difficult and many problems have occurred. Dedifferentiation embodies the idea that differentiated cells don't lose their developmental capacities and, under certain conditions (commonly stress), are capable of acquiring a state of pluripotency, a stem cell-like state, before assuming a new fate (differentiation, proliferation, death). This work compares different aspects of animal and plant cells in relation to their dedifferentiation and reprogramming. Dedifferentiation is accompanied by reorganisation of chromatin, including its decondensation, which is in this work proved by FISH, using probes hybridising SAT I and 5S rDNA repeat sequences in nuclei of protoplasts of cucumber (*Cucumis sativus* L.).

Obsah

1 Cíle práce.....	9
2 Úvod	10
3 Současný stav řešené problematiky	11
3. 1 Protoplast.....	11
3. 2 Somatická variabilita rostlin a její zvýšení protoplastizací	11
3. 3 Pluripotentní buňky živočichů.....	11
3. 4 Chromatin	12
3. 4. 1 Euchromatin	12
3. 4. 2 Heterochromatin	12
3.5 Heterochromatin jako marker buněčné diferenciace	12
3. 6 Dekondenzace chromatinu	13
3. 6. 1 První fáze dekonzenzace chromatinu	13
3. 6. 2 Druhá fáze dekonzenzace chromatinu.....	14
3. 7 Rekondenzace chromatinu.....	14
3. 7. 1 Stupeň rekondenzace repetit je spojen s oxidativním stresem.....	14
3. 8 Vyšší řád organizace chromatinu	15
3. 8. 1 Pozice chromatinu je závislá na genové expresi	15
3. 8. 2 U rostlin je organizujícím elementem chromozómu chromocentrum	16
3. 8. 3 Ružicová struktura (rosette-like structure)	16
3. 8. 4 Struktura Rabl.....	16
3. 9 Chromozómová teritoria.....	17
3. 9. 1 Pozice CT	17
3. 9. 2 Transkripčně aktivní oblasti mohou tvořit smyčky	17
3. 10 Model interchromatinových domén.....	19
3. 11 Model interchromozomální sítě.....	20
3. 11. 1 Dekondenzace chromatinu zvyšuje frekvenci mísení CT	21
3. 12 Epigenetická regulace.....	21
3. 12. 1 Methylace DNA.....	21
3. 12. 2 Modifikace histonů	22
3. 13 Proteinové jaderné lešení.....	23
3. 13. 1 Laminy A a C	23
3. 13. 2 Jaderný aktin.....	23
3.14 Změna exprese v závislosti na reorganizaci chromatinu	24
3. 14. 1 Aktivace E2F-kontrolovaných genů.....	25
4 Materiál a metody.....	26
4.1 Biologický materiál	26
4.2 Seznam použitých roztoků a médií.....	26
4. 3 Vybavení laboratoře	27
4. 4 Pěstování pokusných rostlin	28
4. 5 Izolace a kultivace protoplastů	28
4. 5. 1 Kultivace v tekutém médiu.....	28
4. 5. 2 Kultivace v alginátu.....	28
4. 6 Izolace DNA	29
4. 7 Příprava sond	29
4. 7. 1 Příprava sondy SAT I	29
4. 7. 2 Příprava sondy na 5S rDNA	31
4. 8 Provedení FISH	31

4. 9 Detekce v mikroskopu	32
5 Výsledky	33
6 Diskuse.....	35
7 Závěr.....	37
8 Seznam použitých zkratk	38
9 Seznam použité literatury	39

1 Cíle práce

Cílem práce je shromáždit a zpracovat literaturu týkající se cytogenetiky protoplastových kultur rostlin. Rešerše se zabývá změnami organizace chromatinu v buněčném jádře během diferenciace a reprogramování protoplastových buněk a rovněž bude tyto změny porovnávat se současnou úrovní znalostí reprogramování buněk živočišných.

Praktická část zahrnuje izolaci a kultivaci protoplastů okurky seté (*Cucumis sativus* L.), přípravu prób pro metodu FISH (fluorescence *in situ* hybridisation) a samotné provedení této metody. Výsledky FISH analýzy jader protoplastů mají ukázat dekonduzaci repetitivních sekvencí u čerstvě izolovaných protoplastů (0 hodin po izolaci) a jejich zpětnou rekonduzaci v závislosti na době kultivace a kultivačních podmínkách.

2 Úvod

Je známo, že diferencované rostlinné buňky neztrácejí svůj vývojový potenciál během normálního vývoje. Většina rostlinných buněk může dosáhnout zpět svého stavu pluripotentnosti, podobně jako si jej udržují buňky meristematické. Po izolaci z rostlinného pletiva a následné kultivaci, mají možnost dediferencovat, vstoupit znovu do buněčného cyklu, proliferovat, regenerovat rostlinné orgány či dokonce dát vzniku novým rostlinám (Takebe et al., 1971, Ondřej et al., 2009). Jedním z nejlepších příkladů dediferenciace je protoplastizace. Naproti tomu u živočišných buněk je situace mnohem komplikovanější. Metody, jež mají vést k dediferenciaci buněk terminálně diferencovaných a navodit u nich stav podobný buňkám kmenovým mají velice malé procento úspěšnosti. Těmito metodami jsou například přenos jádra diferencované buňky do oocyty s uměle odstraněným jádrem nebo přenos určitých retrovirálních genů do genomu buňky hostitelské (Grafi, 2009).

Tato práce popisuje změny, jimiž projde chromatin rostlinných buněk při protoplastizaci. Zároveň popisuje obecné vlastnosti chromatinového vlákna, epigenetické modifikace a snaží se přiblížit organizaci chromatinu v interfázním jádře. Také se snaží srovnat vlastnosti buněk rostlinných a živočišných ve vztahu k získání pluripotence. Praktická část má metodou FISH ověřit dekonduzaci repetitivních sekvencí SAT I a 5S rDNA při izolaci protoplastů a jejich zpětnou rekonduzaci při následné kultivaci.

3 Současný stav řešené problematiky

3.1 Protoplast

Protoplast je rostlinná buňka zbavená buněčné stěny pomocí lytických enzymů. V současnosti je protoplastizace jednou z hlavních metod pro studium rostlinných buněk z hlediska cytologického, fyziologického a molekulárního. Uplatnění najde však i například při šlechtění rostlin, zejména při somatické hybridizaci, při níž se používá metody elektrofúze protoplastů nebo chemické fúze za účasti fúzogenů. Z jednoho jediného protoplastu je možné regenerovat celou rostlinu pomocí kultivace v médiích obsahujících růstové hormony (Takebe et al., 1971).

Trendem posledních let je výzkum dediferenciačních pochodů, které se odehrávají při protoplastizaci a následná diferenciaci, či spíše rediferenciaci, při kultivaci těchto protoplastů, souvislost se znovuzískáním totipotence a s dekonzenzací heterochromatinu.

3.2 Somatická variabilita rostlin a její zvýšení protoplastizací

Izolace protoplastů a jejich následná kultivace směřující k tvorbě nových rostlin je nejenom pro buňku samotnou, ale i pro její genom stresující situace. V těchto podmínkách dochází k reorganizaci chromatinu vyššího řádu. Rovněž dochází ke změnám v primární organizaci genomu – sekvenci. Tyto změny jsou často asociovány s cytologickými abnormalitami jako je změna ploidie buněk, přestavby chromozómů a zlomy v dvoušroubovici DNA vedoucí k různým aberacím (translokace, inverze delece a inserce). Zároveň může dojít k aktivaci transpozónů a retrotranspozónů, což může vést k mutacím, vloží-li se tyto elementy do oblastí kódujících proteiny (Grafi, 2009). Proto se i rostliny odvozené z *in vitro* kultur mohou lišit jedná od druhé, což v kontextu změn genomu označujeme termínem somatická variabilita.

3.3 Pluripotentní buňky živočichů

Možnost dediferenciovat lze za určitých podmínek vyvolat i u somatických buněk savců. Příkladem toho mohou být přenosy jader ze somatických buněk do oocytů s uměle odstraněnými jádry, které dávají vzniknout buňkám podobným zygotám a následně žijícímu potomstvu - klonům. Ovšem oproti rostlinným buňkám je tu mnohem menší procento úspěšnosti (Grafi, 2009). Příčina nevelké úspěšnosti zatím není zcela známa.

Vědci se přiklání k tomu, že na vině je nesprávná epigenetická regulace, spíše než genetické odchylky zapsané v pořadí bazí (Rideout et al., 2001).

3. 4 Chromatin

Buněčné jádro je tvořeno z 30 až 40 % chromatinem. Chromatin je tvořen vláknem DNA a proteiny. V závislosti na stupni kondenzace jej dělíme na vysoce kondenzovaný heterochromatin a dekonenzovaný euchromatin, který je přístupný transkripci. Základní struktura chromatinu je nevětvené vlákno o průměru 11 nm, které je dále skládáno do kompaktnějších struktur o průměru 30 nm, 120 nm a 240 nm.

3. 4. 1 Euchromatin

Euchromatin představuje dekonenzovanou část chromatinu. Je bohatý na geny a transkripčně aktivní.

3. 4. 2 Heterochromatin

Heterochromatin dělíme na konstitutivní, obsahující hlavně geneticky neaktivní oblasti, a fakultativní, který je neaktivní pouze v určitých buněčných liniích, zatímco v jiných je aktivně exprimován. Heterochromatin se nachází hlavně v telomerických oblastech a v oblasti centromery, heterochromatinem je například i celý neaktivní chromozóm X savců (Park a Kuroda, 2001, Reik et al., 2001). U rostlin je možno heterochromatin nalézt navíc v oblasti organizátoru jadérka, či v B chromozómech (Fransz et al., 2000).

Velkým zdrojem informací o struktuře a funkci heterochromatinu jsou geny, které kódují proteiny a jejichž sekvence je umístěna v oblasti heterochromatinu (shrnutí v Avramova, 2007).

3.5 Heterochromatin jako marker buněčné diferenciaci

Diferencované buňky mají charakteristickou úroveň exprese genů a tomu odpovídá stav kondenzace chromatinu. Například u jader mezofylových buněk listů *Arabidopsis thaliana* se zvětšují chromocentra, tudíž se zvyšuje podíl heterochromatinu, během vývoje a stárnutí listu (Tessadori et al., 2004, Mathieu et al., 2003).

Dediferenciaci jader mezofylových buněk *Cucumis sativus*, která je doprovázena dekonenzací heterochromatinu, vedla k totálnímu vymizení (resp. rozvolnění)

chromocenter většiny jader (Ondřej et al., 2008). Stejný jev je popsán u izolace protoplastů mezofylových buněk *Arabidopsis thaliana* (Tessadori et al., 2007). Měřením relativního obsahu heterochromatinu (ROH) vzhledem k celkové ploše DNA obarvené DAPI dospěli Ondřej et al. (2008) též k dalším zajímavým výsledkům. ROH jader mezofylových buněk *Cucumis sativus* odpovídá 5 – 20 %, ihned po protoplastizaci se sníží na 0 – 5 % (koreluje s celkovou dekondenzací heterochromatinu). Další kultivací těchto protoplastů v médiu s vysokým obsahem mannitolu a snížením osmolarity po 14 dnech vedlo k ROH 15 – 20 %. Buňky v této kultuře zůstaly ve stádiu malých kalusů po 4 týdnech kultivace. Naproti tomu protoplasty kultivované v médiu s nízkým obsahem mannitolu a snížením osmolarity hned první den kultivace (po vytvoření buněčné stěny) vykazovaly při měření ROH ve stejném čase hodnoty mezi 10 – 15 %, které jsou téměř totožné s hodnotami zjištěnými u somatických embryí *Cucumis sativus*. Buňky z této kultury tvořily po 4 týdnech kultivace proembrya. Snížení osmolarity hned po vytvoření buněčné stěny tedy zabránilo překondenzování chromatinu pozorovanému v druhém médiu.

3. 6 Dekondenzace chromatinu

Dekondenzace chromatinu je jedním z hlavních aspektů buněčné dediferenciace. Byla zdokumentována u tabáku (Zhao et al., 2001), *Arabidopsis* (Tessadori et al., 2007) a okurky (Ondřej et al., 2009). Je provázána relaxací centromerických repetitivních sekvencí, repetitivních kódujících rDNA (Tessadori et al., 2007) a subtelomerických satelitních sekvencí (Ondřej et al., 2009). Otázkou zůstává, do jaké míry změny dekonzenzace chromatinu expresní profil protoplastů. Doposud je známo, že zvýšená exprese se týká genů zapojených do výstavby buněčné stěny a genů, jejichž produkty jsou nezbytné pro buněčný cyklus. Dekondenzovaná chromocentra, u nichž se dekonzenzace projeví nejvíce, jsou navíc téměř bez jakýchkoli genů (Avramova, 2002). Dekondenzovaný heterochromatin si také ponechává své specifické epigenetické znaky (Tessadori et al., 2007). Výsledky Zhao et al. (2001) popisují dvě po sobě následující fáze dekonzenzace chromatinu u protoplastů odvozených z mezofylových buněk tabáku předcházející vstupu do S fáze buněčného cyklu.

3. 6. 1 První fáze dekonzenzace chromatinu

První fáze dekonzenzace chromatinu byla zaznamenána hned po izolaci protoplastů. Tato fáze značí přechod z G0 do G1 fáze buněčného cyklu a je nezávislá na přítomnosti

ubiquitinu i růstových hormonů cytokininu a auxinu. Je přechodnou fází nutnou pro aktivaci genů, jejichž produkty jsou potřebné pro buňku, aby mohla se mohla diferencovat do jiných typů buněčných linií (Zhao et al., 2001).

3. 6. 2 Druhá fáze dekondezace chromatinu

Druhá fáze značí přechod do S fáze je už na výše uvedených faktorech závislá. Bez přítomnosti rostlinných hormonů protoplasty směřují do procesu podobnému buněčné smrti známé u živočišných buněk. Nutnost přítomnosti ubiquitinu byla otestována kultivací protoplastů v médiu s inhibitorem ubiquitinylacího proteázového systému MG132, v jeho přítomnosti protoplasty zůstaly v G1 fázi. Pokud byl MG132 přidán ve fázi, kdy již některé protoplasty dosáhly S fáze (48 hodin po izolaci), byl v této kultuře následně zjištěn i výskyt protoplastů v G2 fázi, ale žádné v S fázi, čili na přechod z S do G2 fáze tento inhibitor vliv nemá, stejně jako nemá žádný efekt na výskyt první fáze dekondezace chromatinu (Zhao et al., 2001).

3. 7 Rekondenzace chromatinu

Největší míry rozvolnění heterochromatinu je dosaženo hned po izolaci. Po 48 hodinách po izolaci je možné sledovat reorganizaci chromocenter. Jedná se o postupný proces, repetitivní sekvence kondenzují jedna po druhé, čímž tvoří nově vznikající chromocentrum (Tessadori et al., 2007). Toto postupné skládání naznačuje odlišné vlastnosti heterochromatinu tvořící různé specifické typy repetitivních sekvencí, není však jasné, který molekulární mechanismus je odpovědný za tuto posloupnost kondenzace repetitivních sekvencí.

3. 7. 1 Stupeň rekondenzace repetitivních sekvencí je spojen s oxidativním stresem

Společným znakem *in vitro* kultur je produkce volných kyslíkatých radikálů a jejich následné hromadění. Rozsah jejich škodlivého účinku je závislý na efektivitě antioxidantních mechanismů. Oxidativní stres může vést až k buněčné smrti stejným způsobem jako například hypersenzitivní reakce po napadení patogenem. Aplikace kyseliny askorbové (antioxidant) na kultivační médium urychlila rekondenzaci repetitivních sekvencí a formování chromocenter. Největší míra dekondezace chromatinu také koreluje s nejvyšší koncentrací volných kyslíkatých radikálů. V témže okamžiku (0 – 24 hodin po izolaci) byly také zjištěny nejnižší úrovně exprese genů antioxidantních

enzymů askorbát peroxidázy a katalázy, což naznačuje, že ochranný antioxidantní systém buňky je v tuto chvíli vypnut vlivem dekondezace chromatinu. Expresí těchto genů u protoplastů kultivovaných bez kyseliny askorbové se postupně zvyšovala v závislosti na kultivačním čase a dosáhla úrovně srovnatelné s úrovní zjištěnou v listech po 72 hodinách kultivace. U protoplastů kultivovaných s kyselinou askorbovou úroveň exprese těchto genů přesáhla úroveň zjištěnou v listech po 48 hodinách kultivace, výsledný „nedostatek“ volných kyslíkatých radikálů vedl k snížení exprese genů askorbát peroxidázy a katalázy 72 hodin po kultivaci (Ondřej et al., 2010).

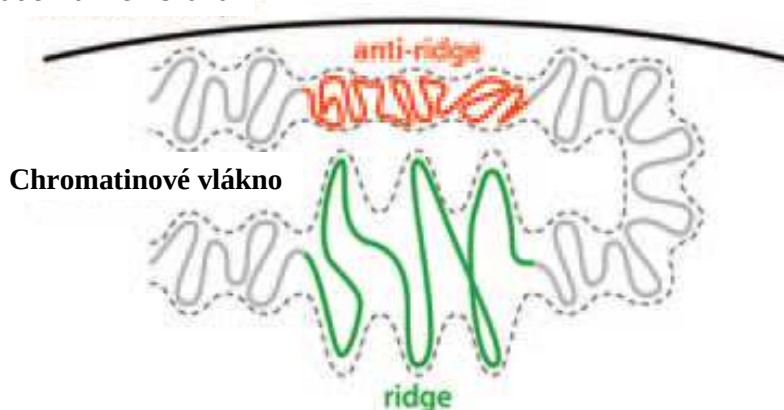
3. 8 Vyšší řád organizace chromatinu

3. 8. 1 Pozice chromatinu je závislá na genové expresi

Oblasti s vysokou genovou expresí, tzv. RIDGE (z anglického Regions of increased gene expression) jsou umístěny převážně blíže centru buněčného jádra, naopak oblasti anti-RIDGE s nízkou genovou expresí je možno nalézt na periférii jádra, blízko jaderné membrány (pro ilustraci viz obrázek č. 1). Anti-RIDGE mají také v průměru 1,4x kompaktnější strukturu chromatinu a v 3d prostoru jádra zabírají kulovitý tvar. Tyto znaky jsou konzervativní a vyskytují se u buněčných linií nezávisle na stádiu buněčného cyklu (kromě mitózy a meiozy), současné genové expresi a karyotypu (Goetze et al., 2007). Pozice oblastí s průměrnou genovou expresí je určena sousedstvím s oblastmi RIDGE nebo anti-RIDGE.

Obrázek č. 1:
Pozice RIDGE a anti-RIDGE vzhledem k jaderné membráně: Aktivně transkribované oblasti (s velkou genovou hustotou) mají tendenci být uprostřed buněčného jádra.

Jaderná membrána



Upraveno dle Goetze

3. 8. 2 U rostlin je organizujícím elementem chromozómu chromocentrum

Výskyt chromocenter byl pozorován u mnoha rostlinných druhů, ale například také u myší. U člověka chromocentra pozorována nebyla. Chromocentra sestávají hlavně z centromerického a pericentromerického chromatinu, proto jsou také intenzivně barvitelná DAPI a snadno sledovatelná ve světelném mikroskopu. Kromě nekódující DNA a transpozónů obsahují též inaktivní geny kódující rRNA. Z chromocetra vybíhají smyčky transkribovaného euchromatinu (Tessadori et al., 2004).

3. 8. 3 Růžicová struktura (rosette-like structure)

Každý chromozóm *Arabidopsis* může formovat strukturu připomínající růžici, jejímž středem je vysoce kondenzovaný pericentromerický heterochromatin, ze kterého vybíhají smyčky nekondenzovaného euchromatinu transkripčně aktivních oblastí (Fransz et al., 2002). Stejnou růžicovitou strukturu je možno pozorovat u myší. Studia na myších lymfocytech ukázaly, že transkripčně aktivní geny jsou umístěny dále od pericentromerického heterochromatinu, zatímco ty samé geny v diferenciačním stavu, kde nejsou exprimovány, jsou součástí heterochromatinu chromocentra (van Driel a Fransz, 2004). Euchromatinové smyčky se tedy odvíjejí či zmenšují v závislosti na transkripční aktivitě genů na nich umístěných. Výše uvedené modely také předpokládají struktury, které fyzicky připojují smyčky k chromocentrům. Jednou z takovýchto struktur je sekvence organizátoru jadérka na chromozomu 4 u *Arabidopsis* (Fransz et al., 2002). Další podobné sekvence zatím zůstávají neobjeveny. Lidské chromozómy se od těch myších nebo chromozómů *Arabidopsis* v tomto aspektu liší tím, že tvoří velký počet těchto malých růžicovitých struktur. Tato růžicovitá struktura je u rostlin rozvolněna protoplastizací.

3. 8. 4 Struktura Rabl

Rostliny s velkým genomem, jako pšenice, žito či cibule, které mají i mnohem větší obsah heterochromatinu oproti *Arabidopsis*, mají i typické uspořádání chromozómů v interfázním jádře. Toto uspořádání bylo nazváno struktura Rabl po jeho objeviteli Carlu Rablovi (1885). U rostlin s tímto uspořádáním je možné pozorovat ve světelném mikroskopu chromozómy s centromerami shromážděnými na jedné straně jádra a s telomerami na straně opačné. Na základě těchto pozorování také vyslovil myšlenku, že chromozómy

v jádře zabírají určité vymezené oblasti. Zpřesnění této hypotézy přinesli v 80. letech 20. století bratři Cremerové.

3. 9 Chromozómová teritoria

Chromozómy v interfázních jádrech rostlin i živočichů zabírají vymezené domény nazvané chromozómová teritoria (Cremer a Cremer., 2001). Chromozómová teritoria byla poprvé objevena již na přelomu 70. a 80. let dvacátého století (Zorn et al., 1979, Cremer et al., 1982), obě skupiny výzkumníků při objevu využili ozařování interfázních jader UV paprsky a následné studium reparačních procesů. To, že byly poškozeny jen některé chromozómy je vedlo k myšlence, že po mitóze nedekondenzují zcela, i v interfázním jádře si chromozómy uchovávají určitou míru kompaktnosti a zabírají v 3d prostoru jádra vymezenou oblast. Tyto oblasti nazvali chromozómová teritoria (CT).

3. 9. 1 Pozice CT

Ačkoli pozice CT uvnitř jádra živočišných buněk není pevně fixována, není ani zcela náhodná. CT obsahující velké množství genů jsou umístěna blíže středu jádra a geneticky chudá CT jsou blíže jaderné periférii. Chromozómy rostlin jsou podobně jako živočišné uspořádány do CT. Na rozdíl od savců, CT *Arabidopsis* jsou však uvnitř jádra umístěna náhodně (kromě homologních sekvencí NOR chromozómů 2 a 4, které jsou spojeny s jadérkem, ve více než 90 % jader je totiž jenom jedno) (Pečinka et al., 2004).

U *Arabidopsis* je tedy párování homologních chromozómů spíše výjimkou než pravidlem. Naproti tomu u *Drosophila melanogaster* bylo pozorováno párování homologů u 60-90 % jader. Toto srovnání *Drosophila* a *Arabidopsis* poukazuje na to, že podobnost ve velikosti genomu, organizaci sekvencí a počtu chromozómů nemusí vést k identické organizaci chromozómových teritorií (Pečinka et al., 2004).

3. 9. 2 Transkripčně aktivní oblasti mohou tvořit smyčky

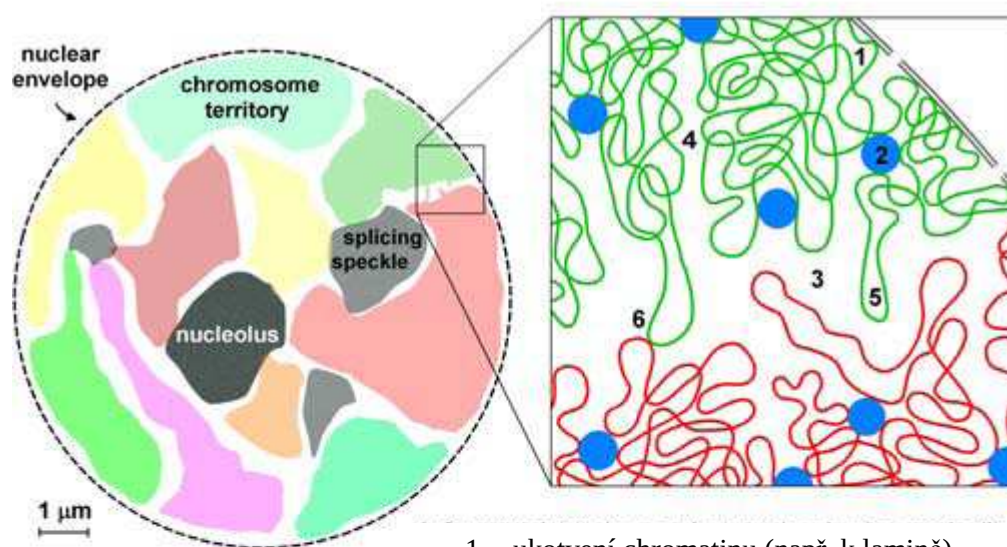
Byly pozorovány transkripčně velice aktivní oblasti, které se nacházely mimo oblast jejich vlastního chromozómového teritoria, jedná se o smyčky dlouhé až několik megabází (van Driel a Fransz, 2004). Příkladem může být lokus MHC (z anglického major histocompatibility complex) na lidském chromozomu 6, který je pozorovatelně vytlačován ze svého chromozómového teritoria potom, co je jeho exprese aktivována interferonem- γ

(Volpi et al., 2000). Tato dekondezace zřejmě není ovlivněna přímo transkripcí, ale vazbou silného transkripčního aktivátoru na promotory těchto sekvencí, protože smyčka je zformována ještě před začátkem samotné transkripce (Tumbar et al., 1999). Tyto smyčky se pravděpodobně mísí s chromatinem dalších chromozómů. Stejné struktury jako u lidských buněk, byly pozorovány i u rostlin, kde tyto smyčky začínají a končí na chromocentrech. Zajímavostí je, že například u *Arabidopsis* se mohou tyto oblasti formovat do jedné smyčky o velikosti 2 - 3 Mbp nebo do několika smyček menších (Fransz et al., 2002). Celkově lze však konstatovat, že chromozómy rostlin i savců mají z tohoto pohledu podobnou strukturu.

3. 10 Model interchromatinových domén

Model prosazovaný Thomasem Cremerem. Podle tohoto modelu, chromozómová teritoria i chromatinové domény (např. p a q raménko chromozómu) vykazují velice malou nebo žádnou míru mísení (Cremer et al., 2000). CT jsou prostorově odděleny interchromatinovými doménami (ICD). ICD tvoří síť mezer či kanálků, které umožňují přístup proteinům transkripční mašinerie k chromatinu. Tento model je podporovaný zjištěními, že aktivně transkribované geny se nacházejí na okraji CT, zatímco inaktivní geny jsou umístěny uvnitř CT, bez možnosti přístupu k transkripčnímu aparátu (shrnují Branco a Pombo, 2006a). Schématicky je model zakreslen v obrázku č. 2.

Obrázek č. 2: Model interchromatinových domén



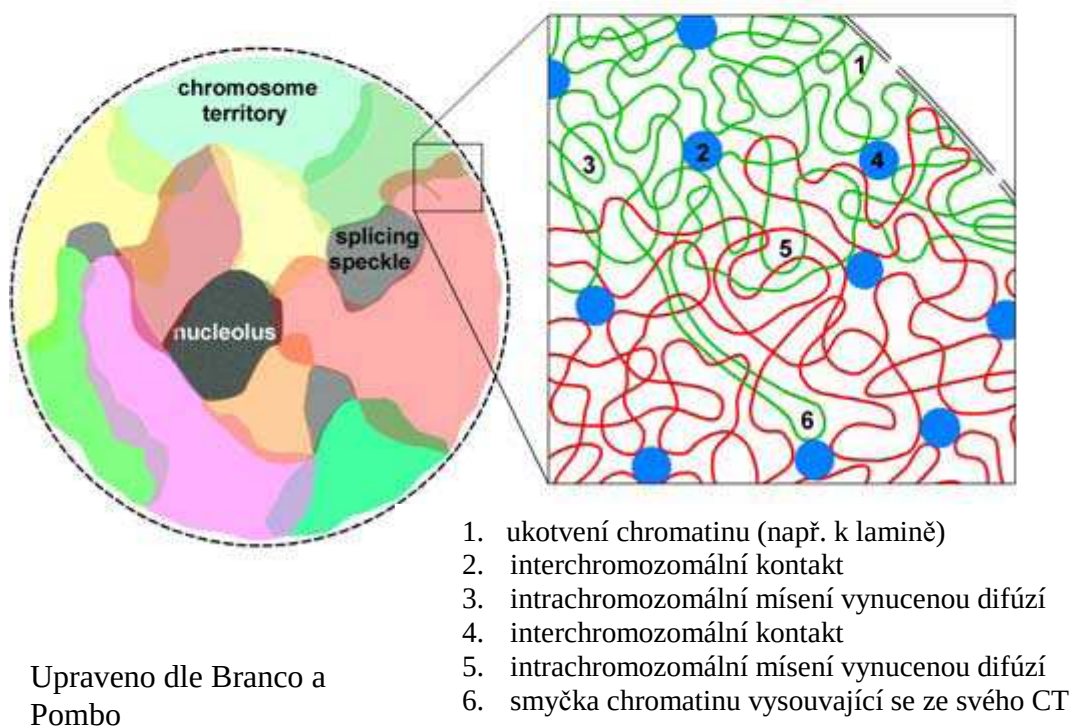
1. ukotvení chromatinu (např. k lamině)
2. interchromozomální kontakt
3. interchromatinová doména (ICD)
4. intrachromozomální kanálek
5. smyčka chromatinu vysouvající se ze svého CT
6. vzácná chromozomová interakce

Upraveno dle Branco a Pombo

3. 11 Model interchromozomální sítě

Navzdory dříve předkládanému modelu, Branco a Pombo (2006b) jasně prokázali užitím metody Cryo-FISH (velice citlivá metoda *in situ* hybridizace na tenkých zmrazených řezech buněk za stringentních podmínek), že CT se mísí a navzájem spolu interagují. Na základě porovnání s frekvencí translokací též dospěli k názoru, že právě toto mísení v interfázi je příčinou chromozómových zlomů a translokací, což samozřejmě nevylučuje vznik dvouvláknových zlomů jiným způsobem (Aten et al., 2004). Schématicky je model zakreslen v obrázku č. 3.

Obrázek č. 3: Model interchromozomální sítě



3. 11. 1 Dekondenzace chromatinu zvyšuje frekvenci mísení CT

Porovnáním intenzity mísení chromozómových teritorií s úrovní jejich kompaktnosti (hustoty vyjádřené v počtu párů bazí na jednotku objemu CT) u lidských lymfocytů se zjistilo, že méně kondenzovaná CT vykazují větší míru vzájemného promíchání (Branco a Pombo, 2006b). Chromatin, který po protoplastizaci masivně dekondukuje, by tedy měl také vykazovat větší míru mísení a tím pádem i větší procento translokací. Vyšší počet amitotických dělení při kultivaci protoplastů krátce po jejich izolaci koreluje s touto myšlenkou.

3. 12 Epigenetická regulace

Epigenetickou regulací rozumíme modifikace dědičné informace, které nejsou zapsány v pořadí bazí DNA. Regulace zapínání a vypínání genů během růstu a vývoje organismu je podrobena této regulaci. Odráží se na stupni kondenzace chromatinu i na expresním profilu buněk (Jenuwein a Allis, 2001).

3. 12. 1 Metylace DNA

Metylace DNA hraje důležitou roli při epigenetické represi genové exprese. Většina hustě metylovaných sekvencí se nachází u rostlin v oblasti chromocenter (Fransz et al., 2002, Probst et al., 2003). Otázkou zůstává, zda je metylace DNA příčinou zformování heterochromatinových domén nebo je jejím prostým následkem. FISH analýza mutantů *ddm1-2* a *met1-1*, kteří vykazují až o 30 % nižší úroveň metylace a mají malá chromocentra (Vong et al., 1993), prokázala, že snížení objemu heterochromatinu je způsobeno přemístěním pericentromerických sekvencí (ne-transpozónů) dále od chromocenter. Toto naznačuje, že lokalizace těchto sekvencí je řízena metylací DNA. Naproti tomu velké tandemové repetice a transpozóny zůstaly v oblastech heterochromatinu redukovaných chromocenter. Větší dekonduzace byla pozorována u mutantu *ddm1-5*, který vykazuje větší redukci metylace (Probst et al., 2003), zde již FISH analýza prokázala dekonduzaci pericentromerických i centromerických sekvencí a sekvenci organizátoru jadérka.

Změnu chromatinu po demetylaci provází i reaktivace dříve represovaných genů a aktivace transpozónů. Například region tvořený několika transgeny vznesenými do *Arabidopsis*, jež kódují hygromycin fosforyltransferázu (HPT), je v těchto rostlinách kondenzován a tvoří

malá neo-chromocentra, v mutantovi *ddm1-5* je tento transgen reaktivován a region v němž se nachází dekondenzován (Scheid. et al., 1998, Probst et al., 2003).

Zvláštností je, že malá část jader u výše popsaných mutantů *Arabidopsis* stále vykazuje jaderný fenotyp jako wild-type rostliny (Scheid et al., 1998). Proč tomu tak je, zůstává otázkou. Hypotéza je taková, že v těchto buňkách je hypometylace DNA kompenzována jiným, zatím neznámým, mechanismem.

3. 12. 2 Modifikace histonů

Kovalentní modifikace histonů jsou charakteristickým znakem epigenetické regulace. Jejich konce mohou být, mimo jiné, metylovány, acetylovány či fosforylovány. V literatuře je možno narazit na termín „histonový kód“ (shrnují Jenuwein a Allis, 2001).

Acetylce histonů je obecně spojována s transkripcí a replikací DNA. U ječmene a bobu je acetylce histonu H4 spojena s replikací (Jasenčáková et al., 2000), podobně jako je tomu u savců. Naproti tomu u *Arabidopsis* jsou histony acetylovány ve stejných pozicích (lysín 5 a 12) vždy pozorovány v genově hustém euchromatinu (Jasenčáková et al., 2003). Acetylce histonů na stejných pozicích má tedy u různých organismů různý význam, což naznačuje, že tento histonový kód může být druhově specifický (shrnuje Tessadori et al., 2004).

V eukaryotních organismech, od kvasinek po savce, je metylace histonu H3 v lysinu 9 (H3meK9) považována za zásadní pro organizaci heterochromatinu, naproti tomu metylace histonu H3 v lysinu 4 (H3meK4) je vždy spojena s transkripčně aktivními oblastmi euchromatinu (Soppe et al., 2002). Stejní autoři popsali i roli dimetylace H3K9 v umlčování genů. Další z řady nezodpovězených otázek je vztah mezi metylací H3K9 a methylací DNA. V určitých organismech je metylace DNA závislá na metylaci histonu H3, neboť bez přítomnosti příslušné metyltransferázy (KYP2) není metylován histon H3, což vyústí ve ztrátu metylace DNA (shrnuje Tessadori et al., 2004). Opačná situace byla popsána u *Arabidopsis*, kde mutanti *ddm1* a *met1* s nižší úrovní metylace DNA vykazují zároveň sníženou metylaci H3K9 (Soppe et al., 2002) v kontrastu s mutantem *Arabidopsis kyp2* defektním v genu pro H3 metyltransferázu, který má nižší úroveň metylace H3K9, ale metylace DNA v chromocentrech zůstává na úrovni srovnatelné s wild-type (Jasenčáková et al., 2003). Tato data naznačují, že u *Arabidopsis* metylace DNA řídí metylaci histonů.

3. 13 Proteinové jaderné lešení

Bylo zjištěno, že filamentární proteiny nejsou přítomny jen v cytoplazmě, ale i v buněčném jádře. Strukturní a funkční role jaderného lešení zatím nebyla zcela objasněna (McDonald et al., 2006). Bylo však nalezeno více než 1300 specifických domén chromatinového vlákna, které se váží k jaderné lamině (Guelen et al., 2008).

Níže jsou uvedeny filamentární proteiny, které jsou zapojeny v konstrukci tohoto lešení a dva postupy vedoucí k rozrušení sítě těchto proteinů uvnitř jader živočišných buněk za účelem sledování změn ve struktuře chromozómových teritorií.

3. 13. 1 Laminy A a C

Živočišné buňky mají pod jadernou membránou vrstvu zvanou jaderná lamina. Je tvořena intermediárními filamenty laminy. Rozlišujeme laminy typu A (sem patří laminy A a C vznikající z jednoho transkriptu, pouze alternativním sestřihem) a laminy typu B. U rostlin nebyla lamina pozorována, nebyl zjištěn ani žádný typ laminů. Laminy A a C váží kromě jaderného aktinu i emerinu. Emerin je zase schopný se vázat na protein BAF (barrier-to-autointegration factor), který se váže přímo na DNA. Laminy jsou takto tedy nepřímo spojeny s dvoušroubovicí DNA. Utlumením genů pro expresi laminů A/C pomocí specifických siRNA došlo k rozrušení jaderné laminy. Absencí laminů A/C došlo k rozrušení na laminu vázané vrstvy emerinu, což dokazuje důležitost laminů pro ukotvení emerinu v blízkosti jaderné periferie. Jelikož je ale emerin přes BAF spojen s DNA, došlo i ke změnám v prostorové organizaci chromatinu. Rozrušení laminy provázelo zmenšení objemu a plochy CT. Tato změna byla nejdramatičtější u CT, která mají nejvíce spojení s laminou přes emerin. Nejméně zasáhnuta byla CT, obsahující hodně transkripčně aktivních genů a tudíž nacházející se v blízkosti středu buněčného jádra, s minimem kontaktů s jadernou laminou (Ondřej et al., 2008).

3. 13. 2 Jaderný aktin

Jaderný aktin byl pozorován v jádře v monomerní i polymerní formě. Krátká aktinová filamenta se podobně jako emerin váží na laminy A, čili tvoří další spojník mezi jadernou periferií a chromatinem. Cytochalasin D je znám jako inhibitor polymerace aktinu. Jeho aplikace na buňky změní jak strukturu cytoplazmy, tak strukturu buněčného jádra. Zhruba 20 % jaderného aktinu je v jádře přítomno v polymerizovaném stavu. Také rozrušení tohoto proteinového lešení má vliv na strukturu CT. Oproti utlumení exprese genů pro

syntézu laminů A/C, vedla aplikace cytochalasinu D k rozvolnění struktury CT, tedy k zvětšení jejich objemu i povrchu a nejvíce markantní byla tato změna u CT s největším počtem aktivně transkribovaných genů (Ondřej et al., 2008). Pozorované změny však mohou ve velké míře souviset s depolymerizací cytoplazmatického aktinu. Depolymerizace aktinu také výrazně ovlivní genovou expresi (McDonald et al. 2006). U jader rostlinných buněk byl nukleární aktin pozorován zejména v aktivně transkribovaných doménách a v jadérku (na periferii jadérka a v prostoru mezi fibrilárními centry a denzními fibrilárními komponenty), ovšem i v místech s transkripcí nesouvisejících (Cajalova tělíska, interchromatinový prostor). Postupná extrakce různě koncentrovanými roztoky solí prokázala přítomnost několika forem jaderného aktinu s různou rozpustností. Aktin v polymerní formě u rostlin zatím pozorován nebyl, jaderný aktin rostlin se nebarví faloidinem, jež se váže pouze na vlákna aktinu delší než sedm podjednotek. Rostliny též postrádají homology aktin-vázajících proteinů, jako jsou emeriny, či laminy u jader buněk živočichů (Cruz et al., 2008).

3.14 Změna exprese v závislosti na reorganizaci chromatinu

Terminálně diferencované buňky mají svou danou genovou expresi, již se nedělí a tedy ani neprochází buněčným cyklem. Bývají proto také nazývány replikativně senescentní. Tuto replikativní senescenci mohou samy nad sebou buňky ustavit, aby zabránily malignímu poškození tkání, pokud mají buňky poškozenou DNA (zlomy, poškozené telomery atd.). Je ustavena a udržována pomocí dvou metabolických drah. Obě využívají nádory potlačujících proteinů, jedna protein p53, druhá pRb (retinoblastomový protein). Z hlediska této práce je zajímavější dráha využívající pRb, protože ta k udržování replikativní senescence využívá reorganizaci chromatinu. Dráha pRb je aktivována pomocí proteinu p16, jehož exprese je indukována stresovými faktory, jako je overexprese onkogenů či suboptimální podmínky kultivace. Aktivní (represivní) forma pRb je fosforylovaná, defosforylací se stává neaktivním.

Specifické mechanismy, jak nastolí p16/pRb replikativní senescenci nejsou známy. Avšak jisté je, že tato senescence je výsledkem reorganizace chromatinu. Replikativně senescentní buňky vytvoří domény heterochromatinu. Vznik těchto domén se shoduje s pRB-dependentní heterochromatinickou represí genů, kódujících cykliny a další pozitivní regulátory buněčného cyklu. Mnoho z těchto represovaných genů je cílem E2F transkripčních faktorů, z nichž některé jsou přeměněny na transkripční represory, když

vytvoří komplex s pRb. Zajímavé je, že jakmile je započata dráha pRb, následné zamezení proliferace nemůže být zvráceno následným utlumením exprese p16, či inaktivací pRb. Takže jakmile jednou pRb ustanoví represivní heterochromatin na E2F cílových genech (a možná i jiných lokusech), udržování těchto utlumených heterochromatinových bloků nevyžaduje aktivitu p16 nebo pRb. To vysvětluje pozorovanou stabilitu zamezení proliferace. Dráha pRb je nezbytná pro transkripční utlumení těchto lokusů, avšak její role v indukci buněčné exprese v senescenci je zatím neznámá. Komplexy pRb/E2F jsou většinou represivní, předpokládá se, že tedy namísto přímé stimulace exprese genů, tlumí represor těchto genů. Je zajímavé, že spousta genů, které jsou up-regulované v replikativně senescentních buňkách, jsou umístěny ve vláknu DNA fyzicky za sebou. To naznačuje, že reorganizace chromatinu může být zodpovědná i za zvýšenou expresi v senescentních buňkách, v těchto případech však pomocí rozvolnění struktury chromatinu na otevřenější (euchromatinovou) strukturu (shrnuje Campisi, 2005).

3. 14. 1 Aktivace E2F-kontrolovaných genů

Experimenty na protoplastech tabáku dokázaly, že dediferenciace rostlinných buněk je spojena s fosforylací pRb. Exprese E2F spolu s výskytem hypofosforylované formy pRb v diferencovaných listových buňkách naznačuje, že tyto proteiny mohou spolupracovat v utlumení genů kontrolovaných E2F. Dva geny rostlin kontrolované E2F jsou down-regulovány v diferencovaných buňkách listů. Tyto geny nevykazují významou expresi v protoplastech 0 hodin po izolaci, ale jsou up-regulovány až v protoplastech 72 hodin po izolaci (před vstupem do S fáze), což se shoduje s fosforylací pRb. Shromažďování dalších experimentálních dat naznačuje, že přechod od diferenciace k proliferaci je řízen pRb. Inaktivace pRb (fosforylací, overexpresí virových onkogenů, cyklinem D/Cdk) vede diferencované buňky k (znovu)vstupu do S fáze. Faktor pRb funguje jako molekulární spínač mezi diferenciací a proliferací a (alespoň částečně) tak činí skrze interakci s rodinou E2F transkripčních faktorů. Ty regulují expresi různých genů zapojených v DNA replikaci a průchodu buněčného cyklu. E2F regulované geny jsou v diferencovaných buňkách kontrolovány (utlumeny) na úrovni chromatinu heterochromatinizací. Jejich aktivace během buněčné dediferenciace se objevuje postupně. Stanou se dekonenzovanými, ale ještě ne aktivovanými (0 hodin po izolaci), transkripčně se aktivují až před vstupem do S fáze současně s fosforylací pRb (Williams et al., 2003).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Semena Cucumis sativus L. (odrůda Marketer, SEMO Ltd., Smržice, Česká republika).

4.2 Seznam použitých roztoků a médií

CTAB: 20 g cetyltrimethylamonium bromidu; 10 g polyvinylpyrrolidonu; 1 litr destilované vody.

PGly: 0,0272 g KH_2PO_4 ; 0,101 g KNO_3 ; 1,1176 g CaCl_2 ; 0,246 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,00016 g KI; 0,000025 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$; 11,15 g glycinu; 18,016 g glukózy; 0,5857 g MES; 65,58 g manitolu; 1 litr destilované vody; pH 5,8; sterilizováno filtrací.

20% sacharóza: 200 g sacharózy; 1 litr destilované vody; pH 5,8; sterilizováno autoklávováním.

Enzymatický roztok PGly: 0,5 g celulázy Onozuka (Duchefa Biochemie); 0,15 g macerozymu R-10 (Duchefa Biochemie); 50 ml PGly; pH 5,8; sterilizováno filtrací.

5% FBS: 5 ml fetal bovine serum; 10 ml 10x PBS; 1 ml 1% (w/v) azidu sodného; 85 ml destilované vody.

50% formamid: 35 ml formamidu; 7 ml 20x SSC; 28 ml destilované vody; pH 7.

10x PBS: 80 g NaCl; 2 g KCl; 7,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 2g KH_2PO_4 ; 1 litr destilované vody; pH 7,5.

5x TBE: 54 g Tris-HCl; 27,5 g HBO_2 ; 20 ml 0,5 M EDTA (disodná sůl ethylendiaminteraoctové kyseliny); 1 litr destilované vody; pH 8.

20x SSC: 175,3 g NaCl; 88,2 g citrát sodný $\cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 1 litr destilované vody; pH 7.

Triton: 0,25 ml TritonX-100; 0,25 g saponinu; 50 ml 1x PBS; pH 7.

Mastermix: 0,4 g dextranulfátu; 0,8 ml destilované vody → přefiltrovat; přidat 200 μl 20x SSC a doplnit destilovanou vodou do 2 ml.

Ostatní chemikálie: HCl; chloroform : izoamylalkohol (poměr 24:1); 3M octan sodný; izopropanol; agaróza (elektroforetická); fixáž - ethanol:kyselina octová (3:1); 70% a 96% ethanol; glycerol; 4',6-diamidino-2-fenylindole (DAPI); ethidium bromid; EDTA (disodná sůl ethylendiaminteraoctové kyseliny).

Komerční kity: FastStart PCR Master (Roche); PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche); Biotin-Nick Translation Mix (Roche).

Ca-agar: 2,22 g CaCl_2 ; 154 g sacharózy; 10 g agaru (Duchefa); 1 litr destilované vody.

Alginát: 10 g alginátu sodného; 4,405 g Murashige a Skoog média (Duchefa Biochemie), 154 g sacharózy; 1 litr destilované vody.

LCM1 médium: Gamborg B5 médium (Duchefa); 0,9 g inositolu; 0,002 g kyseliny askorbové; 0,008 g glycinu; 0,02 g glutaminu; 0,1 g kasein hydrolyzátu; 0,586 g morfolinethansulfonové kyseliny (MES); 70 g manitolu; 10 g sacharózy; 5 g glukózy; 0,001 g NAA; 0,0005 g 2,4-D; 0,0005 g BAP; 0,004 g alaninu; 0,02 g prolinu; 1 litr destilované vody; pH 5,8; sterilizováno filtrací (Debeaujon a Branchard, 1992).

LCM2 médium: Gamborg B5 médium (Duchefa); 0,9 g inositolu; 0,002 g kyseliny askorbové; 0,008 g glycinu; 0,02 g glutaminu; 0,1 g kasein hydrolyzátu; 0,586 g morfolinethansulfonové kyseliny (MES); 70 g manitolu; 10 g sacharózy; 5 g glukózy; 0,00075 g BAP; 0,004 g alaninu; 0,01 g prolinu; 1 litr destilované vody; pH 5,8; sterilizováno filtrací (Ganapol et al., 1999).

OK médium: 4,405 g Murashige a Skoog média (Duchefa Biochemie); 20 g sacharózy; 8 g agaru; 0,1 mg IBA; 0,1 mg BAP; 1 litr destilované vody; pH 5,8; sterilizováno autoklávováním (Ondřej a Navrátilová, 2000).

4. 3 Vybavení laboratoře

Chlazená centrifuga 5804 R (Eppendorf), centrifuga 5415D (Eppendorf), cytologická centrifuga, XP cycler (Bioer), Transluminátor UVT-20M (Herolab) s digitálním fotoaparátem Kodak 290, fluorescenční mikroskop (Olympus BX 60) s CCD kamerou (Cool Snap, Photometrics), světelný mikroskop, biologický termostat BT120, autokláv, laminární box, digestoř, elektroforetická aparatura, spektrofotometr Nanodrop (Thermo Fisher Scientific), mikrovlnná trouba, vodní lázeň, termoblok, mraznička, lednička, analytické váhy, váhy, magnetické míchadlo, pH metr, Pasteurovy pipety, Petriho misky, parafilm, mikrozkuhavky, PCR mikrozkuhavky, dávkovací mikropipety, sterilní špičky, ochranné rukavice, kahan, skalpel, pinzeta, podložní a krycí skla.

4. 4 Pěstování pokusných rostlin

Semínka *Cucumis Sativus* L. (cv. Marketer, SEMO Smržice Ltd., CZ) byla vysterylizována v 2,5% roztoku chloraminu po dobu 20 minut a následně byla vysázena do Petriho misek na vlhký filtrační papír. Po naklíčení (5 dní v inkubátoru při teplotě 25 °C ve tmě) byla semínka přesazena na OK médium do plastových boxů. Ty byly umístěny do růstové místnosti s režimem 16 hodin světlo/ 8 hodin tma o světelné intenzitě 32-36 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ a teplotě 22 °C na 14 dní.

4. 5 Izolace a kultivace protoplastů

Apikální mladé lístky byly z rostlin ostříhány nůžkami a nasekány sterilizovaným skalpelem v enzymatickém roztoku obsahujícím 1% roztok celulózy Onozuka R-10 a 0,25% roztok macerozymu R-10 a takto ponechány po dobu 18 hodin v inkubátoru při 25 °C. Tato hrubá protoplastová suspenze byla přefiltrována přes uhelonové sítko 72 μm s následným promytím 2 ml roztoku PGly. Poté zcentrifugována při 80g (=800 ot/min) po dobu 5 minut. Supernatant byl odstraněn a sediment resuspendován ve 4 ml 20% sacharózy, převrstven 2 ml PGly tak, aby nedošlo k promíchání obou vrstev a zcentrifugován při 80g 5 minut. Flotující protoplasty na rozhraní obou kapalin byly odebrány pasteurovou pipetou, resuspendovány v 4 ml PGly a centrifugovány za stejných podmínek. Dále byly protoplasty kultivovány dvěma způsoby.

4. 5. 1 Kultivace v tekutém médiu

Supernatant byl odstraněn a sediment resuspendován v 2 ml média LCM1 a tato suspenze přenesena pasteurovou pipetou do Petriho misek. Ty byly zajištěny parafilmem a umístěny do inkubátoru (25 °C, ve tmě), po dvou dnech byly přemístěny do růstové komory. Po 14 dnech byl do každé Petriho misky přidán 1 ml LCM2 média.

4. 5. 2 Kultivace v alginátu

Supernatant byl odstraněn a sediment resuspendován ve vychlazeném roztoku alginátu (alginát byl převařen v mikrovlnné troubě, před použitím však musel vychladnout na cca 30 °C) a pasteurovou pipetou ve formě malých kapek přenesen na Petriho misku s vrstvou Ca agaru. Po ztuhnutí byly jednotlivé kapky přeneseny do kultivačních lahvíček a zality 5 ml LCM1 média a umístěny do inkubátoru (25 °C, ve tmě), po dvou dnech byly

přemístěny do růstové komory. Po 14 dnech bylo z každé kultivační lahvičky odebráno 2,5 ml LCM1 média a nahrazeno 2,5 ml média LCM2.

4. 6 Izolace DNA

Ve třetí misce bylo v tekutém dusíku pomocí tloučku rozetřeno 200 mg listů *Cucumis sativus* L. Do třetí misky byl napipetován 1 ml CTAB obohacený o 2 µl 2-merkapt ethanolu o teplotě 65 °C. Roztok z třetí misky byl napipetován do 2ml mikrozkuhavky a inkubován 1,5 hodiny při 65 °C v termobloku. Po inkubaci bylo k roztoku přidáno 600 µl směsi chloroform : izoamylalkohol (poměr 24:1) a po promíchání byl roztok centrifugován 15 min v chlazené centrifuze (4 °C) při 11 000 otáčkách/min, následně byl tento krok ještě jednou zopakován se supernatantem. Po centrifugaci bylo k supernatantu přidáno 60 µl 3M octanu sodného a 500 µl izopropanolu. Po promíchání byl roztok inkubován při -20 °C v mrazničce přes noc. Druhý den ráno byl roztok centrifugován 30 min v chlazené centrifuze (4 °C) při 11 000 otáčkách/min. Po centrifugaci byl supernatant odstraněn a ke sraženině DNA bylo přidáno 200 µl 70% ethanolu a roztok byl opět centrifugován 15 min v chlazené centrifuze (4 °C) při 11 000 otáčkách/min. Po centrifugaci byl ethanol slit a sražená DNA se nechala vysušit. K vysušené DNA bylo přidáno 200 µl sterilní vody. Koncentrace DNA byla stanovena pomocí přístroje Nanodrop. Nakonec byl vzorek v mikrozkuhavce zamražen na -20 °C.

4. 7 Příprava sond

Pro lokalizaci sekvencí byly připraveny 2 sondy. Jedna hybridizující na satelitní repetice typu I (v blízkosti telomery) (GenBank access. no. X03769), druhá hybridizující na 5S rDNA.

4. 7. 1 Příprava sondy SAT I

Sonda byla připravena PCR amplifikací genomické DNA *Cucumis sativus* L. s použitím primerů forward: 5'-CTGGGTGGCCTCATTTTG-3' a reverse: 5'-GACCTTTGGCACCGTTGT-3'. Podmínky PCR reakce a složení reakční směsi popisují tabulky č. 1 a 2. Produkt byl pomocí kitu pro biotin-nick translaci označen biotinem, jednotlivé složky byly napipetovány dle tabulky č. 3, mikrozkuhavka byla umístěna do termocykléru nastaveného na 15 °C na 90 minut, poté bylo do mikrozkuhavky

připipetováno 0,5 µl EDTA na zastavení štípání DNA a takto ponecháno 10 minut při 65 °C. Výsledný nick-rozstříhaný vzorek byl přečištěn vysrážením pomocí octanu sodného o konečné koncentraci 0,3M. Poté byl do mikrozkušavky k danému objemu přidán dvojnásobný objem 96% ethanolu a mikrozkušavka umístěna na 30 minut do mrazničky. Následně byl vzorek centrifugován na chlazené centrifuze (4 °C) při 11 000 otáčkách/min po dobu 30 minut. Supernatant byl slit a vzorek převrstven 50% formamidem (pH=7) na konečnou koncentraci sondy 50 ng/µl.

Tabulka č. 1: Složení PCR mixu pro přípravu SAT I sondy

Reakční složky	Objem [µl]
FastStart PCR master mix	25
Forward primer (c=0,3 µM)	0,5
Reverse primer (c=0,3 µM)	0,5
Sterilní destilovaná voda	23,5
Genomická DNA o koncentraci 200 ng/µl	0,5
Celkový reakční objem	50

Tabulka č. 2:

Časový a teplotní profil PCR reakce pro přípravu SAT I sondy

1 cyklus	Počáteční denaturace	95 °C	4 min
35 cyklů	Denaturace	95 °C	30 s
	Hybridizace primerů (annealing)	55 °C	45 s
	Prodlužování primerů (extension)	72 °C	45 s
1 cyklus	Konečné prodloužení primerů	72 °C	7 min

Tabulka č. 3:

Složení NICK-translačního mixu pro přípravu SAT I sondy

Reakční složky	Objem [µl]
1 µg amplifikované DNA	5
NICK kit	4
Sterilní destilovaná voda	11
Celkový reakční objem	20

4. 7. 2 Příprava sondy na 5S rDNA

Sonda byla připravena PCR amplifikací genomické DNA *Cucumis sativus* L. pomocí kitu s DIG-značenými nukleotidy s primery forward: 5'-GATCCCATCAGAACTCC-3' a reverse: 5'-GGTGCTTTAGTGCTGGTAT-3' (Koo a kol., 2002). Podmínky PCR reakce a složení reakční směsi popisují tabulky č. 4 a 5.

Tabulka č. 4:

Složení PCR mixu pro přípravu sondy na 5S rDNA

Reakční složky	Objem [μl]
PCR DIG probe synthesis mix	5
Forward primer (c=0,3 μM)	0,5
Reverse primer (c=0,3 μM)	0,5
PCR reakční pufr	5
Enzymatický mix	0,75
Sterilní destilovaná voda	37,75
Genomická DNA o koncentraci 200 ng/μl	0,5
Celkový reakční objem	50

Tabulka č. 5:

Časový a teplotní profil PCR reakce pro přípravu sondy na 5S rDNA

1 cyklus	Počáteční denaturace	95 °C	4 min
35 cyklů	Denaturace	95 °C	30 s
	Hybridizace primerů (annealing)	55 °C	1 min
	Prodlužování primerů (extension)	72 °C	45 s
1 cyklus	Konečné prodloužení primerů	72 °C	10 min

4. 8 Provedení FISH

Protoplasty ihned po izolaci a protoplasty kultivované 72 hodin po izolaci byly zafixovány roztokem ethanol:kyselina octová v poměru 3:1. Poté byly nakapány pasteurovou pipetou na vymražená podložní sklíčka a vysušeny. Následně byla sklíčka inkubována v digestoři, proces je popsán v tabulce č. 6.

Tabulka č. 6: Inkubace buněk před vlastní hybridizací sondy

0,1M HCl	1 minutu
Triton	8 minut
1x PBS	5 minut
1x PBS	5 minut
1x PBS	5 minut
50% formamid, pH 7	30 minut

Do mikrozkušavky byly napipetovány sondy, množství v závislosti na koncentraci 50 – 100 ng sondy na jedno podložní sklíčko (odpovídá 2 - 4 μ l) a formamid, o celkovém objemu 5 μ l a doplněny 5 μ l mastermixu (20% dextransulfát, 2x SSC, Roche) do konečného objemu 10 μ l reakční směsi na jedno podložní sklíčko.

Sondy byly denaturovány v termobloku při 80 °C 10 minut, poté ihned umístěny na led, aby se zabránilo renaturaci. Na jedno podložní sklíčko bylo napipetováno 10 μ l denaturované sondy a překryto krycím sklíčkem. To bylo oblepeno lepidlem a vše umístěno do termocykléru na 78 °C po dobu 1,5 minuty přesně. Následovala inkubace přes noc při 37 °C.

Druhý den byla podložní skla inkubována ve vodní lázni při 45 °C podle tabulky č. 7.

Tabulka č. 7: Inkubace před aplikací protilátek

50% formamid	15 minut
2x SSC	5 minut
2x SSC	5 minut

Po inkubaci bylo na každé sklo napipetováno 300 μ l 5% FBS, kvůli vyblokování nespecifických vazebných míst a ponecháno 30 minut při pokojové teplotě. Do mikrozkušavky bylo napipetováno 5% FBS a protilátky konjugované s fluorescenční značkou v množství odpovídající počtu podložních skel určených k analýze, na jedno podložní sklo 100 μ l FBS s 0,5 μ l každé protilátky. Roztok 5% FBS s protilátkami bylo nutné uchovávat ve tmě, kvůli photobleachingu fluorochromů konjugovaných s protilátkami. Na podložní skla byl nanesen roztok s protilátkami a ponechán inkubaci ve tmě 1 hodinu při pokojové teplotě. Po inkubaci byla skla propláchnuta třikrát v 2x SSC. Nakonec bylo na vzorek napipetováno 1,5 μ l roztoku DAPI v mounting médiu Vectashield (Vector Laboratories) o koncentraci 2 mg/ml, k vizualizaci chromatinu.

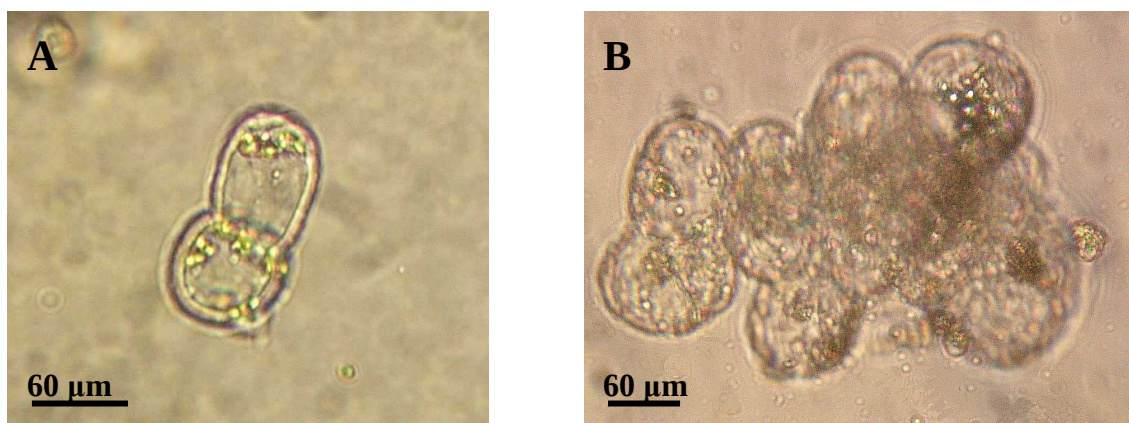
4. 9 Detekce v mikroskopu

Snímky byly pořízeny CCD kamerou spojenou s fluorescenčním mikroskopem Olympus BX60 pomocí programu Cool Snap (Photometrics), konečná úprava byla provedena v programu GIMP 2.06 (<http://www.gimp.cz>).

5 Výsledky

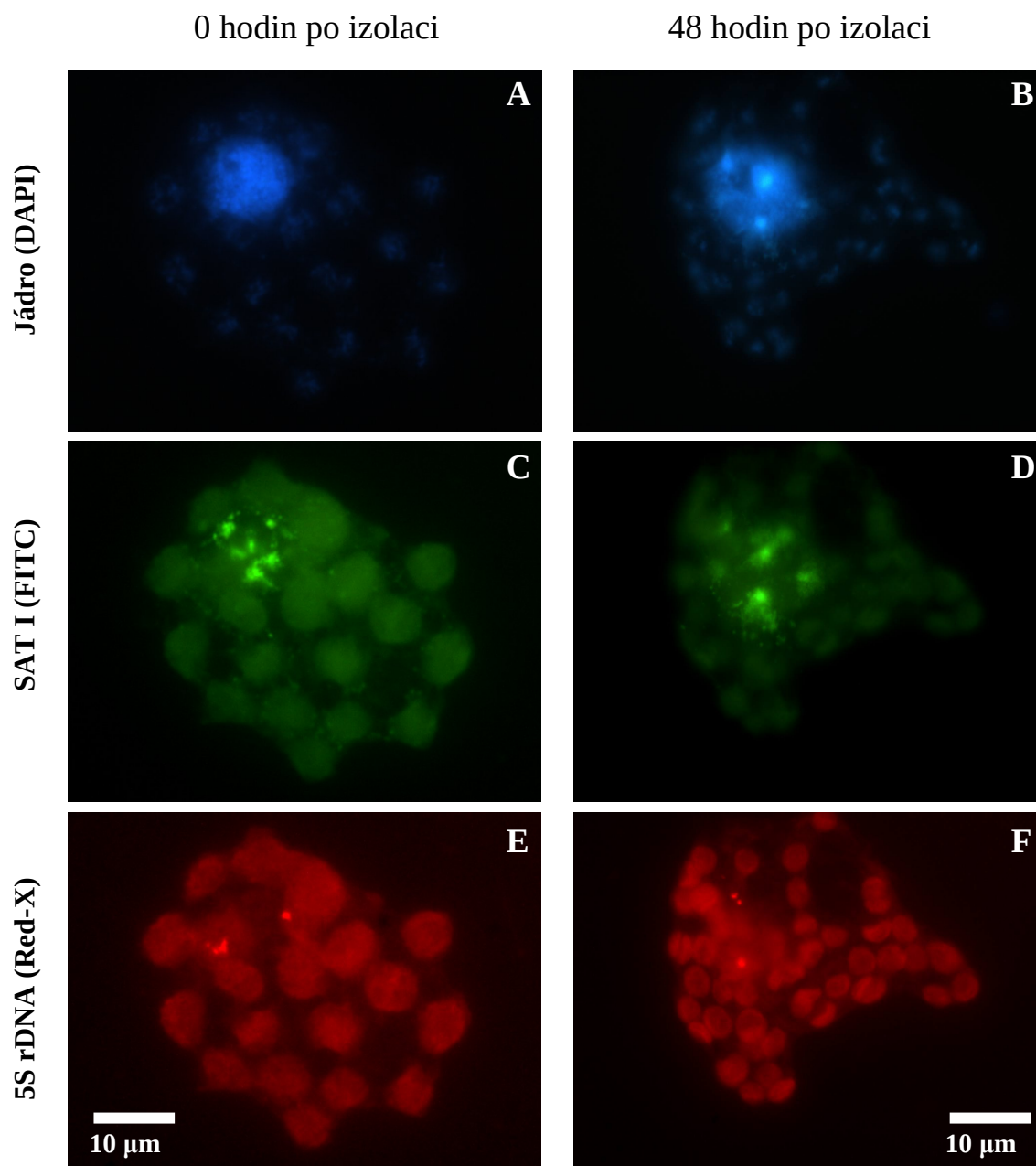
Donorovým pletivem pro izolaci protoplastů byly čtrnáctidenní lístky *in vitro* pěstovaných rostlin *Cucumis sativus*. Dělení buněk odvozených z protoplastů bylo možné pozorovat 5 dní po izolaci. Regenerace nových rostlin dosaženo nebylo (ovšem to ani nebylo cílem experimentu). Větší míru dělení bylo možné pozorovat v tekutém LCM médiu, buňky kultivované v alginátu se dělily méně (obrázek č. 4). Vzhledem k náročnějšímu provedení lze jako vhodnější pro kultivaci protoplastů okurky označit metodu kultivace v tekutém LCM médiu. Dekondenzaci chromatinu po izolaci a následnou rekondenzaci lze pozorovat na obrázku č. 5.

Obrázek č. 4: Dělicí se protoplasty



Rozdíl v četnosti dělení je markantní a hovoří ve prospěch užití tekutého LCM média pro kultivaci protoplastů okurky (B), míra dělení buněk kultivovaných v alginátu byla podstatně nižší (A). V tekutém médiu bylo možno po 14 dnech pozorovat vznik mikrokalusů, z nichž vznikaly kalusy, bylo dosaženo i regenerace v proembrya.

Obrázek č. 5: Dekondenzace a rekondenzace chromatinu



Okamžitě po izolaci je možné pozorovat vymizení chromocentru (A), která se začínají postupně znovu objevovat po 48 hodinách kultivace (B). Názorná je též rekondenzace satelitní repetice SAT I (D). Sekvence pro 5S rDNA kondenzují v pozdějších fázích kultivace (E a F).

6 Diskuse

Byla pozorována dekondezace chromatinu reprezentována rozvolněním chromocenter a dekondezací repetitivních sekvencí. Postupnost rekondenzace repetice je ve shodě s výsledky, které zveřejnil Tessadori et al. (2007) u *Arabidopsis*, kde u všech zkoumaných jader satelitní repetice kondenzovaly dříve než 5S rDNA, následovány krátkými rozptýlenými repeticemi a transpozóny, které vykazovaly rozptýlené signály dokonce 5 dní po kultivaci. 45S rDNA u *Arabidopsis* zůstala po protoplastizaci dokonce v mírně kondenzovaném stavu, také jako první rekondenzovala. Tyto výsledky nasvědčují tomu, že postupnost rekondenzace závisí na délce repetice, nejdelší kondenzují nejrychleji. Řídící mechanismus tohoto procesu však není znám.

Znovuformování chromocenter je pomalejší proces, než jejich dekondezace. Většina buněk při kultivaci prošla mitózou, která je provázena kondenzací chromozómů během metafáze. Tato kondenzace však nevedla k navrácení pericentromerického heterochromatinu k normální úrovni (Tessadori et al., 2007).

Jednou z hlavních otázek, jež si klade teoretická část této práce je, proč rostlinné buňky snázejí reprogramování lépe, než buňky živočišné.

Rostliny jsou životaschopné i s polyploidní sádkou chromozómů či v případě, že některý chromozom chybí či přebývá (aneuploidní konstituce). Během dediferenciace projde chromatin drastickými změnami. U rostlin po rekondenzaci a úspěšné kultivaci vedou tyto změny ke zvýšení somatické variability a k jiným genotypům. U živočišných buněk rovněž dochází k aktivaci transpozónů, které, pokud jsou následně vmezeřeny do oblastí kódujících proteiny mohou vést k mutacím, změnám v epigenetických markerech, ale i k narušení pozic chromozómových teritorií, která jsou v jádrech živočišných buněk, na rozdíl od rostlinných jader, umístěná nenáhodně. Tato organizace CT v jádře živočišné buňky brání změnám v ploidii či počtu chromozómů – takové genetické variability známé u rostlin, a tyto změny jsou u živočichů zpravidla letální (Grafi, 2009).

Dalším významným rozdílem, co se týče pozice CT živočišných buněk, je jejich ukotvení k jaderné lamině pomocí specifických sekvencí (Ondřej et al., 2009, Guelen et al., 2008), jaderná lamina tedy může být podstatným organizujícím elementem živočišných buněk.

U rostlin také zatím nebyla prokázána přítomnost polymerního jaderného aktinu (Cruz et al., 2008, McDonald et al., 2006).

Párování homologních chromozómů je u rostlin též spíše dílem náhody, než pravidlem, u *Arabidopsis* se párují pouze homologní sekvence NOR chromozómů 2 a 4. Živočišné buňky i v tomto aspektu vykazují vyšší míru organizace, např. u *Drosophila melanogaster* dosahuje párování homologních chromozómů v průměru 60 až 90 % u zkoumaných jader (Pečinka et al., 2004), čili další „nenáhodný“ prvek jaderné architektury živočišných buněk.

7 Závěr

Dediferenciace rostlinných buněk během protoplastizace je provázena strukturními změnami chromatinu. Tyto změny jsou pozorovatelné díky fluorescenční mikroskopii a jsou zdokumentované u několika rostlinných druhů. Kultivace buněk vzniklých z protoplastů v přítomnosti rostlinných hormonů může vést k regeneraci rostlinných orgánů i celých nových rostlin s poměrně vysokou úspěšností v porovnání s buňkami živočišnými. Chromatin v jádrech živočišných buněk vykazuje větší míru organizovanosti. Ať už se jedná o nenáhodnost pozice chromozómových teritorií, jejich uchycení k jaderné lamině pomocí specifických sekvencí a přítomnost polymerizovaného jaderného aktinu, či daleko větší míra párování homologních sekvencí i celých oblastí. Poznatky shromážděné v této práci naznačují, že tato organizace je důležitá pro správné fungování živočišné buňky a její porušení vede ke abnormálnímu vývoji těchto buněk, zpravidla končící letálně.

8 Seznam použitých zkratek

BAF	Faktor zabraňující autointegraci (angl. barrier-to-autointegration factor)
CT	Chromozómové teritorium (angl. chromosome territory)
CTAB	Cetyltrimethylamonium bromid
DAPI	4,6 –diamidino-2-fenyindol
FBS	Zárodečné hovězí sérum (angl. fetal bovine serum)
FISH	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (angl. fluorescence in situ hybridisation)
ICD	Interchromatinová doména (angl. interchromatin domain)
pRb	Retinoblastomový faktor
RIDGE	Oblast s vysokou genovou expresí (angl. region of increased gene expression)
ROH	Relativní obsah heterochromatinu

9 Seznam použité literatury

Aten, J.A., Stap, J., Krawczyk, P. M., van Oven, C. H., Hoebe, R. A., et al. (2004): Dynamics of DNA double-strand breaks revealed by clustering of damaged chromosome domains. *Science* 303: 92–95

Avramova, Z. V. (2002): Heterochromatin in Animals and Plants: Similarities and Differences. *Plant Physiology* 129: 40-49

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

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

Campisi, J. (2005): Senescent cells, tumor suppression and organismal aging: Good citizens, bad neighbors. *Cell* 120: 513-522

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

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

Cremer, T., Kreth, G., Koester, H., Fink, R. H. A., Heintzmann, R., Cremer, M., Solovei, I., Zink, D., Cremer, C. (2000): Chromosome territories, interchromatin domain compartment, and nuclear matrix: An integrated view of the functional nuclear architecture. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 10: 179–212

Cruz, J. R., de la Espina, S. M. D. (2008): Subnuclear compartmentalization and function of actin and nuclear Myosin I in plants. *Chromosoma* 118: 193-207

Debeaujon, I., Branchard, M. (1992): Induction of somatic embryogenesis and caulogenesis from cotyledon and leaf protoplast-derived colonies of melon (*Cucumis melo* L.). Plant Cell Reports 12: 37 - 40.

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

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

Ganapol, B. D., Johnson, L. F., Hlavka, C. A., Peterson, D. L., Bond, B. (1999): LCM2: A coupled leaf/canopy radiative transfer model. Remote Sensing of Environment 70: 153-166

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

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

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

Jasenčáková, Z., Meister, A., Walter, J., Turner, B. M., Schubert, I. (2000): Histone H4 acetylation of euchromatin and heterochromatin is cell cycle dependent and correlated with replication rather than with transcription. Plant Cell 11: 2087-2100

Jasenčáková, Z., Soppe, W. J. J., Meister, A., Gernand, D., Turner, B. M., Schubert, I. (2003) Histone modifications in *Arabidopsis* - high methylation of H3 lysine 9 is dispensable for constitutive heterochromatin. Plant Journal 33: 471-480

Jenuwein, T., Allis, C. D. (2001) Translating the histone code. *Science* 293: 1074-1080

Koo, D.-H., Hur, Y., Jin, D.-Ch., Bang, J.-W. (2002): Karyotype analysis of a Korean cucumber cultivar (*Cucumis sativus* L. cv. Winter Long) using C-banding and bicolor fluorescence *in situ* hybridization. *Molecules and Cells* 13: 413-418.

Mathieu, O., Jasencakova, Z., Vaillant, I., Gendrel, A. V., Colot, V., Schubert, I., Tourmente, S. (2003): Changes in 5S rDNA chromatin organization and transcription during heterochromatin establishment in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15: 2929-2939

McDonald, D., Carrero, G., Andrin, C., de Vries, G., Hendzel, M. J. (2006): Nucleoplasmic beta-actin exists in a dynamic equilibrium between low-mobility polymeric species and rapidly diffusing populations. *Journal of Cell Biology* 172: 541-552

Ondřej, V., Navrátilová, B. (2000): Influence of genotype and medium on culture of immature zygotic embryos of *Cucumis sativus* L. and *Cucumis melo* L. *Biologica Cracoviensia* 42: 79-81

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

Ondřej, V., Lukášová, E., Krejčí, J., Matula, P., Kozubek, S. (2008): Lamin A/C and polymeric actin in genome organization. *Molecules and Cells* 26: 356-361

Ondřej, V., Navrátilová, B., Protivánková, I., Piterková, J., Sedlářová, M., Luhová, L., Lebeda A. (2010): Recondensation level of repetitive sequences in the plant protoplast nucleus is limited by oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*: doi:10.1093/jxb/erq067

Ondřej, V., Navrátilová, B., Lebeda A. (2009): Heterochromatin as a marker for protoplast differentiation of *Cucumis sativus*: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 96: 229-234

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

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

Probst, A. V., Fransz, P. F., Paszkowski, J., Scheid, O. M. (2003): Two means of transcriptional reactivation within heterochromatin. *Plant Journal* 33: 743-749

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

Rideout, W. M., Eggan, K., Jaenisch, R. (2001): Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* 293: 1093-1098

Scheid, O. M., Afsar, K., Paszkowski, J. (1998): Release of epigenetic gene silencing by trans-acting mutations in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 632-637

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

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

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

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

Tumbar, T., Sudlow, G., Belmont, A. S. (1999): Large-scale chromatin unfolding and remodeling induced by VP16 acidic activation domain. *Journal of Cell Biology* 145: 1341-1354

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

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

Vongs, A., Kakutani, T., Martienssen, R.A., Richards, E. J. (1993): *Arabidopsis thaliana* demethylation mutants. *Science* 260: 1926-1928

Williams, L., Zhao, J., Morozova, N., Li, Y., Avivi, Y., Grafi, G. (2003): Chromatin reorganization accompanying cellular dedifferentiation is associated with modifications of histone H3, redistribution of HP1 and activation of E2F-target genes. *Developmental Dynamics* 228: 113-120

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

Zorn, C., Cremer, C., Cremer, T., Zimmer, J. (1979): Unscheduled DNA synthesis after partial UV irradiation of the cell nucleus – distribution in interphase and metaphase. *Experimental Cell Research* 124: 111-119