

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**1. lékařská fakulta**

Studijní program: Vývojová a buněčná biologie



Mgr. Jitka Bolková

**Jaderná architektura a genová exprese  
u *Caenorhabditis elegans***

Nuclear architecture and gene expression  
in *Caenorhabditis elegans*

*Disertační práce*

Školitel: Christian Lanctôt, Ph.D.

Praha, 2017

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 15. únor 2017

Jitka Bolková

## IDENIFIKAČNÍ ZÁZNAM

BOLKOVÁ, Jitka. *Jaderná architektura a genová exprese u Caenorhabditis elegans*. [*Nuclear architecture and gene expression in Caenorhabditis elegans*]. Praha, 2017. 136 stran, bez přílohy. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Katedra buněčné biologie, BIOCEV, PřF UK 2016. Školitel: Christian Lanctôt, Ph.D.

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala svému školiteli Christianu Lanctôtovi za možnost pracovat pod jeho vedením na velmi zajímavých projektech a za znalosti, které mi v průběhu doktorského studia předal.

Všem svým kolegům jsem vděčna za přátelskou atmosféru, kterou kolem sebe šířili. Viole děkuji za sdílení vzájemných dojmů a to ze sféry pracovní i osobní.

Mé rodině a především mému muži Františkovi patří obrovské poděkování za nekonečnou podporu a pochopení pro všechny mé činy.

Děkuji.

## ABSTRAKT

Po oplození jsou rodičovské genomy nejprve separovány každý ve svém prvojádře. Již v první mitóze se toto prostorové rozlišení ztrácí. Ve své práci jsme využili fotokonverzi prvojader značených Dendra2-H2B k rozpoznání maternálních a paternálních chromatinových domén a pozorovali jejich prostorové rozdělení v živých embryích *Caenorhabditis elegans* krátce po oplození. Oba rodičovské chromatinové domény jsou v zygotě i v celém dvoubuněčném stádiu v rámci jádra stále odděleny. K promíchání dochází teprve po dekondukcii chromatinu na začátku buněčného cyklu čtyřbuněčného embrya. Dle našich znalostí se jedná o první živé pozorování separace a následného promísení parentálních chromatinových domén během embryogeneze. Následování fotokonvertovaného chromatinu nám dále umožnilo detekovat reprodukovatelnou rotaci jader o 180° v průběhu cytokineze zygoty. Sledování fluorescenčně značených P granulí a pólových tělísek odhalilo, že dochází k rotaci celého embrya. Ve druhé části disertace jsme využili modelu *C. elegans* pro výzkum souvislostí mezi jadernou architekturou a genovou expresí. Zaměřili jsme se na lokalizaci transkripční aktivity v zárodečných buňkách gonády. Pomocí metod umožňujících detekci nascentní transkripce, single molecule RNA FISH a fluorescenčně značené inkorporace 5-etynyluridinu do RNA, jsme zdokumentovali, že nejvyšší míra syntézy mRNA se nachází v pozdní pachyténe a diploténe profáze meiózy I. V těchto fázích dochází k dramatické restrukturalizaci chromozomů, které pravděpodobně vedou k částečnému rozvolnění chromatinu. Poslední projekt je zaměřen na vzájemný vztah jaderného a cytoplazmatického objemu buněk. Díky vícebarevnému fluorescenčnímu snímání živých zárodečných buněk v gonádě a embryích *C. elegans* jsme popsali, že nukleo-cytoplazmatický poměr v gametogenezi klesá a v následné embryogenezi naopak stoupá. Děje se tak nejspíše v důsledku metabolických a prostorových změn během vývoje.

**Klíčová slova:** *Caenorhabditis elegans*, embryogeneze, parentální chromatin, gonáda, transkripce

## ABSTRACT

The parental genomes are initially separated in each pronucleus after fertilization. During the first mitosis this spatial distribution is being disintegrated. In my thesis we used green-to-red photoconversion of Dendra2-H2B-labeled pronuclei to distinguish maternal and paternal chromatin domains and to track their distribution in space in living *Caenorhabditis elegans* embryos starting shortly after fertilization. Both of the parental chromatin domains within the nucleus are separated in the zygote and at the 2-cell stage. Intermingling occurs first after chromatin decondensation at the beginning of the cell cycle at the 4-cell stage. To our knowledge, we report to the first live observation of the separation and subsequent mixing of parental chromatin during embryogenesis. Following of the photoconverted chromatin also allowed us to detect a reproducible 180° rotation of the nuclei during cytokinesis of the zygote. Tracking of fluorescently-labelled P granules and polar bodies showed that the entire embryo rotates during the first cell division. In the second part of the thesis we used the *C. elegans* model to investigate relationship between nuclear architecture and gene expression. We focused on localization of transcriptional activity in cells of the germline. Using techniques for detection of nascent transcription, such as single molecule RNA FISH and fluorescent labelling of 5-ethynyl uridine RNA incorporation, we show that the highest level of mRNA synthesis occurs during the late pachytene and diplotene of the prophase in meiosis I. This is a stage of dramatic chromosome restructuralization, which probably leads to partial chromatin decondensation. The last project is focused on the relationship between nuclear and cytoplasmic volume. Multi-color fluorescence imaging of live germline cells in the gonad and early *C. elegans* embryos allowed us to show that nucleo-cytoplasmic ratio in gametogenesis decreases and vice versa increases in embryogenesis. This may be caused by metabolic and spatial changes during each development.

**Key words:** *Caenorhabditis elegans*, embryogenesis, parental chromatin, gonad, transcription

---

## SEZNAM ZKRATEK

|                    |  |
|--------------------|--|
| 3C                 | Chromatin Conformation Capture             |
| BrdU               | 5-bromodeoxyluridin                        |
| BrU                | 5-bromouridinu                             |
| <i>C. elegans</i>  | <i>Caenorhabditis elegans</i>              |
| DAPI               | 4',6-diamidino-2-phenylindol               |
| ddH <sub>2</sub> O | dvojitě destilovaná voda                   |
| DEPC               | dietylpyrokarbonát                         |
| DIC                | differential interference contrast         |
| DTC                | distal tip cells, buňky distální špičky    |
| <i>E. coli</i>     | <i>Escherichia coli</i>                    |
| EU                 | 5-etynyluridin                             |
| FISH               | fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace   |
| GFP                | zelený fluorescenční protein               |
| GV                 | germinal vesicle, zárodečný váček          |
| IPTG               | isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid |
| MAP                | mitogen activated protein                  |
| MeC                | 5-metylcytosinu                            |
| mRNA               | messenger RNA                              |
| MosSCI             | Mos1-mediated Single Copy Insertion        |
| RFP                | červený fluorescenční protein              |
| rRNA               | ribosomální RNA                            |
| SAGE               | Serial Analysis of Gene Expression         |
| SIM                | Structured Illumination Microscopy         |
| smRNA FISH         | single molecule RNA FISH                   |
| gDNA               | genomická DNA                              |

## OBSAH

|   |           |
|---|-----------|
| ABSTRAKT .....  | 1         |
| ABSTRACT.....   | 2         |
| SEZNAM ZKRATEK .....  | 3         |
| SLOVO ÚVODEM.....   | 7         |
| <b>1. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....</b>                                    | <b>9</b>  |
| 1.1.  Architektura buněčného jádra .....                            | 9         |
| 1.1.1.  Historický vývoj studií jaderné architektury .....          | 9         |
| 1.1.2.  Struktura buněčného jádra .....                             | 13        |
| 1.1.3.  Struktura a organizace chromatinu v jádře .....             | 14        |
| 1.1.4.  Mobilita chromatinu .....                                   | 18        |
| 1.1.5.  Jaderná architektura a genová exprese.....                  | 20        |
| 1.1.6.  Jaderná architektura parentálních genomů .....              | 20        |
| 1.1.7.  Genová exprese v meióze .....                               | 23        |
| 1.1.8.  Jaderný a cytoplazmatický objem.....                        | 24        |
| 1.2.  Hlístice <i>Caenorhabditis elegans</i> .....                  | 26        |
| 1.2.1. <i>Caenorhabditis elegans</i> jako modelový organismus ..... | 26        |
| 1.2.2.  Chromatin <i>C. elegans</i> .....                           | 27        |
| 1.2.3.  Gametogeneze u <i>C. elegans</i> .....                      | 28        |
| 1.2.4.  Genová exprese v meióze <i>C. elegans</i> .....             | 32        |
| 1.2.5.  Oplození a časná embryogeneze <i>C. elegans</i> .....       | 32        |
| 1.2.6.  Jaderný a cytoplazmatický objem u <i>C. elegans</i> .....   | 35        |
| <b>2. CÍLE PRÁCE .....</b>  | <b>36</b> |
| <b>3. MATERIÁL A METODY .....</b>                                   | <b>37</b> |
| 3.1.  Kmeny <i>C. elegans</i> .....                                 | 37        |
| 3.1.1.  Kmeny získané od Caenorhabditis Genetics Center (CGC).....  | 37        |
| 3.1.2.  Kmeny vytvořené v této práci.....                           | 37        |
| 3.1.3.  Kmeny <i>Escherichia coli</i> .....                         | 37        |
| 3.2.  Roztoky a pufry .....   | 38        |
| 3.3.  Kultivace <i>C. elegans</i> .....                             | 40        |
| 3.3.1.  Kryokonzervace <i>C. elegans</i> .....                      | 40        |
| 3.3.2.  Rozmrazování populace <i>C. elegans</i> .....               | 40        |
| 3.3.3.  Izolace embryí a dekontaminace <i>C. elegans</i> .....      | 41        |



|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 3.4.      | Příprava transgenních kmenů <i>C. elegans</i> .....                                       | 41        |
| 3.4.1.    | Příprava mikroinjikační směsi .....   | 42        |
| 3.4.2.    | Příprava agarózových sklíček .....  | 43        |
| 3.4.3.    | Příprava <i>C. elegans</i> pro mikroinjikaci do gonád .....                               | 43        |
| 3.4.4.    | Příprava injikační jehly .....  | 44        |
| 3.4.5.    | Mikroinjikace <i>C. elegans</i> .....   | 44        |
| 3.4.6.    | Výběr a ověření pozitivních jedinců .....   | 44        |
| 3.5.      | Produkce kříženců <i>C. elegans</i> .....   | 46        |
| 3.5.1.    | Příprava samců .....  | 46        |
| 3.5.2.    | Křížení hermafroditů s vytvořenými samci a získání homozygotních kříženců .....           | 47        |
| 3.6.      | Příprava živých vzorků <i>C. elegans</i> pro mikroskopování .....                         | 48        |
| 3.6.1.    | Embrya <i>C. elegans</i> .....  | 48        |
| 3.6.2.    | Dospělci <i>C. elegans</i> .....  | 48        |
| 3.7.      | Příprava <i>C. elegans</i> vzorků na SPIM (selective plane illumination microscopy) ..... | 50        |
| 3.8.      | Příprava podložních skel potažených poly-L-lysinem .....                                  | 50        |
| 3.9.      | Imunofluorescenční značení gonád <i>C. elegans</i> .....                                  | 50        |
| 3.10.     | Značení nascentní RNA v gonádách <i>C. elegans</i> .....                                  | 51        |
| 3.11.     | Obrazová analýza EU značení .....   | 54        |
| 3.12.     | Single molecule RNA FISH .....  | 55        |
| 3.12.1.   | smRNA FISH na dospělých <i>C. elegans</i> .....   | 57        |
| 3.12.2.   | smRNA FISH na izolovaných gonádách <i>C. elegans</i> .....                                | 60        |
| <b>4.</b> | <b>VÝSLEDKY .....</b>   | <b>62</b> |
| 4.1.      | Dynamika parentálního chromatinu v časném embryonálním vývoji <i>C. elegans</i> .....     | 62        |
| 4.1.1.    | Příprava Dendra2-H2B transgenní linie .....   | 63        |
| 4.1.2.    | Charakterizace Dendra2-H2B transgenní linie .....   | 66        |
| 4.1.3.    | Charakterizace fotokonverze Dendra2-H2B v embryích .....                                  | 67        |
| 4.1.4.    | Zobrazování maternálního a paternálního chromatinu v časně embryogenezi .....             | 71        |
| 4.1.5.    | Časové zobrazení promísení maternálního a paternálního chromatinu .....                   | 73        |
| 4.1.6.    | Prostorová distribuce chromatinu během mitózy v časném embryu .....                       | 76        |
| 4.1.7.    | Rotace chromatinu v anterior-posteriorní ose během prvního embryonálního dělení .....     | 77        |
| 4.2.      | Dynamika genové exprese v <i>C. elegans</i> .....   | 80        |
| 4.2.1.    | Zobrazení transkripční aktivity v <i>C. elegans</i> pomocí smRNA FISH .....               | 81        |
| 4.2.2.    | Zobrazení transkripční aktivity v gonádě <i>C. elegans</i> pomocí smRNA FISH .....        | 84        |
| 4.2.3.    | Značení transkripční aktivity v gonádě <i>C. elegans</i> pomocí imunofluorescence .....   | 87        |
| 4.2.4.    | Zobrazení transkripční dynamiky v gonádě <i>C. elegans</i> pomocí EU inkorporace .....    | 89        |
| 4.2.5.    | Značení transkripce v samčích gonádách <i>C. elegans</i> .....                            | 95        |

---

|           |  |            |
|-----------|--|------------|
| 4.3.      | Nukleo-cytoplazmatický poměr <i>C. elegans</i> .....                             | 96         |
| 4.3.1.    | Nukleo-cytoplazmatický poměr zárodečných buněk <i>C. elegans</i> .....           | 96         |
| 4.3.2.    | Nukleo-cytoplazmatický poměr v raném embryonálním vývoji <i>C. elegans</i> ..... | 102        |
| <b>5.</b> | <b>DISKUZE</b> .....   | <b>106</b> |
| 5.1.      | Separace parentálních genomů v časném embryu <i>C. elegans</i> .....             | 106        |
| 5.2.      | Transkripční aktivita v gonádě <i>C. elegans</i> .....                           | 110        |
| 5.3.      | Nukleo-cytoplazmatický poměr u <i>C. elegans</i> .....                           | 114        |
| <b>6.</b> | <b>SHRNUTÍ</b> .....   | <b>118</b> |
| <b>7.</b> | <b>SEZNAM PUBLIKACÍ</b> .....  | <b>119</b> |
| <b>8.</b> | <b>CITOVANÁ LITRATURA</b> .....  | <b>120</b> |
| <b>9.</b> | <b>PŘÍLOHY</b> .....   | <b>132</b> |

## SLOVO ÚVODEM

Ve své disertační práci se principiálně věnuji třem projektům. První z nich se zabývá segregací a následným promícháním chromatinu zděděného od matky a od otce v prvních momentech po oplození. Další projekt je o lokalizaci transkripční aktivity v zárodečných buňkách gonády a poslední je zaměřen na vzájemný vztah jaderných a cytoplazmatických objemů v gametogenezi a embryogenezi. Vedle architektury buněčného jádra mají všechny projekty několik dalších společných rysů. Ten primární spočívá v tom, že jsme pro studium těchto jevů zvolili modelový organizmus hlístici *Caenorhabditis elegans*, který je velmi dobře popsán a v poslední době i hojně využívaný pro výzkum v oblasti buněčné biologie. Jedna z jeho významných výhod pro tuto práci spočívá v tom, že celé tělo *C. elegans* je zcela průhledné. Tato vlastnost je u modelových organismů obzvláště ceněna v mikroskopii. Fluorescenční snímání ať živých či fixovaných preparátů je stěžejní metodou celé práce. Pozoruhodným společným jmenovatelem všech částí projektu je dynamičnost studovaných jevů, která je odrazem okamžité reakce buněčných struktur na aktuální dění.

První kapitola je věnována Literárnímu přehledu, kde se blíže zabývám především organizací buněčného jádra a genovou expresí v obecném kontextu. Druhá část přehledu popisuje výše zmíněné poznatky v souvislosti s modelem *C. elegans*. Metodika projektů je podrobně zpracována v kapitole Materiál a metody. Dosažené výsledky jsou součástí následující kapitoly. V závěrečné kapitole Diskuse jsou získaná data projednána v širším kontextu a porovnána s literaturou.

Disertační práce je postavena na výsledcích, které byly vydány v recenzovaných mezinárodně uznávaných časopisech, i na výsledcích, které se k publikování teprve připravují. Již vydané publikace jsou přiloženy na závěr disertace. Data z prvního projektu (Dynamika parentálního chromatinu v časném embryonálním vývoji *C. elegans*) jsou vydána v časopise *The International Journal of Developmental Biology* v publikaci „Live

imaging reveals spatial separation of parental chromatin until the four-cell stage in *Caenorhabditis elegans* embryos“. Výsledky projektu druhého (Dynamika genové exprese v *C. elegans*) jsou částečně publikovány v metodické publikaci „Quantitative gene expression analysis in *Caenorhabditis elegans* using single molecule RNA FISH“ vydané v časopise *Methods*. Ostatní výsledky z druhého a třetího projektu (Nukleocytoplazmatický poměr *C. elegans*) jsou připravovány k publikaci.

Práce je sepsána v českém jazyce. Vzhledem k tomu, že pro spoustu výrazů v tomto oboru neexistují vhodné české ekvivalenty k již běžně používaným v angličtině, uvádím pro úplnost v závorce i tento anglický výraz.

Projekty této disertační práce byly vypracovány na dvou pracovištích. Většina práce byla vytvořena na Ústavu buněčné biologie a patologie na 1. lékařské fakultě Univerzity Karlovy sídlícím v Purkyňově ústavu na Albertově v Praze (roky 2012-2015). Druhá část byla zpracována na detašovaném pracovišti BIOCEV ve Vestci u Prahy jako součást Katedry buněčné biologie na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy (rok 2016).

# 1. LITERÁRNÍ PŘEHLED

## 1.1. Architektura buněčného jádra

Genom eukaryotických buněk je uložen v buněčném jádře - komplexní a dynamické organele. Hlavní buněčné procesy, které se v jádře odehrávají, jsou replikace, oprava a rekombinace DNA, syntéza a procesování RNA a biogeneze ribozomálních podjednotek. Genetický materiál je rozložen na lineárních chromozomech, které jsou v jádře složitě rozmístěny, čímž vytvářejí vysoce organizované a funkční jednotky. To, jakým způsobem je DNA v jádře uspořádána se odráží v genové expresi buňky. Na začátek považuji za vhodné pojednání o tom, co a jak v minulosti vedlo k dosažení současných znalostí o jaderné architektuře.

### 1.1.1. Historický vývoj studií jaderné architektury

První rozsáhlejší studie o uspořádání chromozomů v jádře spadají do konce 19. století, kdy rakouský anatom Carl Rabl ve svém díle *O buněčném dělení (Über Zelltheilung)* pozoroval a zevrubně zdokumentoval mitotické dělení a chování interfázních chromozomů na larvách mloka skvrnitého (Rabl, 1885) (Obrázek 1A). Na jeho práci navázal německý biolog Theodor Boveri, který studoval chromozomální rozdělení škrkavky koňské během mitózy. Boveri si všiml, že si jednotlivé chromozomy v interfázi udržují nápadně podobné uspořádání a vzájemnou polohu, jež zaujímaly v mitóze. A následně v interfázi se toto relativní uspořádání nemění. Na základě těchto prací zavedl Boveri pojem chromozomální teritoria, kde každý chromozom zaujímá v jádře určité postavení, a postuloval domněnku, že uspořádání těchto teritorií se v průběhu interfáze zachovává (Boveri, 1909). Boveri také postřehl, že navzájem příbuzné buňky mají i podobné jaderné uspořádání (Obrázek 1B). Snahu o jednoznačné doložení teritoriálního uspořádání interfázních chromozomů, přímé zobrazování chromozomálních teritorií v jádře nebo dokonce následování jednotlivých

chromozomů v samotných živých buňkách komplikovala nedostatečnost tehdejších zobrazovacích metod.

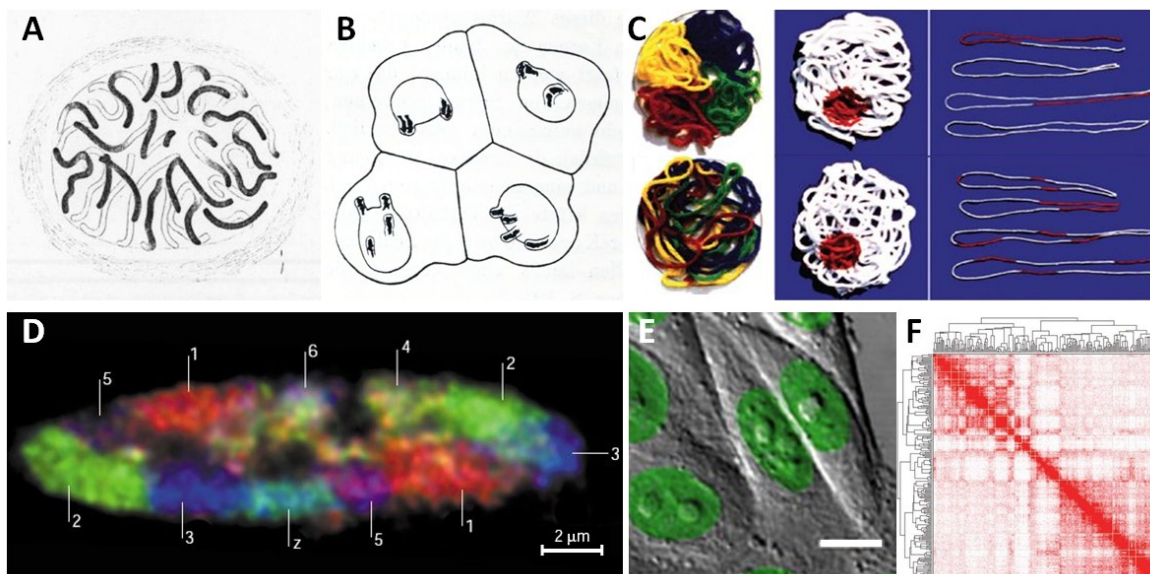
Díky pozorování obarvených chromozomů v buňkách mechu ve 20. letech minulého století rozdělil německý botanik Emil Heitz interfázní chromatin na základě rozdílné barvitelnosti na euchromatin a heterochromatin (Heitz, 1928). Později se přišlo na to, že schopnost absorpce barev odráží míru kompaktnosti chromatinu.

S příchodem elektronové mikroskopie v 60. a 70. letech se zdálo, že je rozluštění otázky interfázního jádra na dosah. Ovšem výsledky nepředčily očekávání. Excelentní rozlišení sice umožnilo detailnější pohled do nitra jádra, ale ke kompletnímu vyřešení záhady jaderné architektury bylo ještě daleko. Naopak, začala převládat myšlenka o náhodném uspořádání rozvolněných DNA molekul v jaderné obálce. Přelomovým se staly pokusy s ozařováním malých segmentů jader živých buněk pomocí UV a následná lokalizace poškozených DNA struktur pomocí autoradiografie (Obrázek 1C). Ty experimentálně prokázaly hypotézu o teritoriálním uspořádání chromozomů v buněčném jádře (Cremer et al., 1982).

Až *in situ* hybridizace a pokročilejší fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) s barevnými chromozomálními próbami umožnila v 80. letech přímou vizualizaci jednotlivých chromozomů (Manuelidis, 1985, Cremer et al., 1988, Pinkel et al., 1988). FISH experimenty jasně ukázaly, že interfázní chromozomy okupují určitá ohraničená teritoria, která se navzájem nepromíchávají ani ve velkém rozsahu nepřekrývají (Cremer et al., 2001) (Obrázek 1D). Pro porozumění prostorového rozložení chromozomových teritorií byla tato technika rozšířena na trojrozměrný (3D) FISH (Walter et al., 2006, Cremer et al., 2008). Vzrůstající dostupnost DNA prób pro specifické barvení vybraných chromozomálních částí a rozvoj konfokální mikroskopie umožnily studium vyšší organizovanosti chromozomových teritorií.

Tak jako celá buněčná biologie, tak i obor jaderné architektury se významně posunul vpřed zásluhou zelených fluorescenčních proteinů (GFP) v 90. letech. Díky tomu bylo možné značení specifických jaderných komponent a jejich následné pozorování v živých buňkách v reálném čase (Chalfie et al., 1994) (Obrázek 1E). Jedním z prvních příkladů bylo prokázání dynamiky jaderných struktur pomocí GFP značených sestřihových faktorů (Misteli et al., 1997).

Hlubší představu o zmapování celogenomových interakcí přinesl postup tzv. zachycení chromatinové konformace (Chromatin Conformation Capture; 3C) (Dekker et al., 2002) (Obrázek 1F). Tato metoda využívá formaldehydu, který kovalentně propojí a tak zachová fyzické interakce mezi chromozomálními lokusy napříč genomem. Principiálně poprvé byla použita při objasnění vzájemného působení estrogenu s prolaktinovým promotorem (Cullen et al., 1993). Dnes má 3C již řadu rozšiřujících modifikací, které umožnily nahlédnout do prostorového uspořádání a vzájemných kontaktů DNA fragmentů (de Wit and de Laat, 2012, Denker and de Laat, 2016).



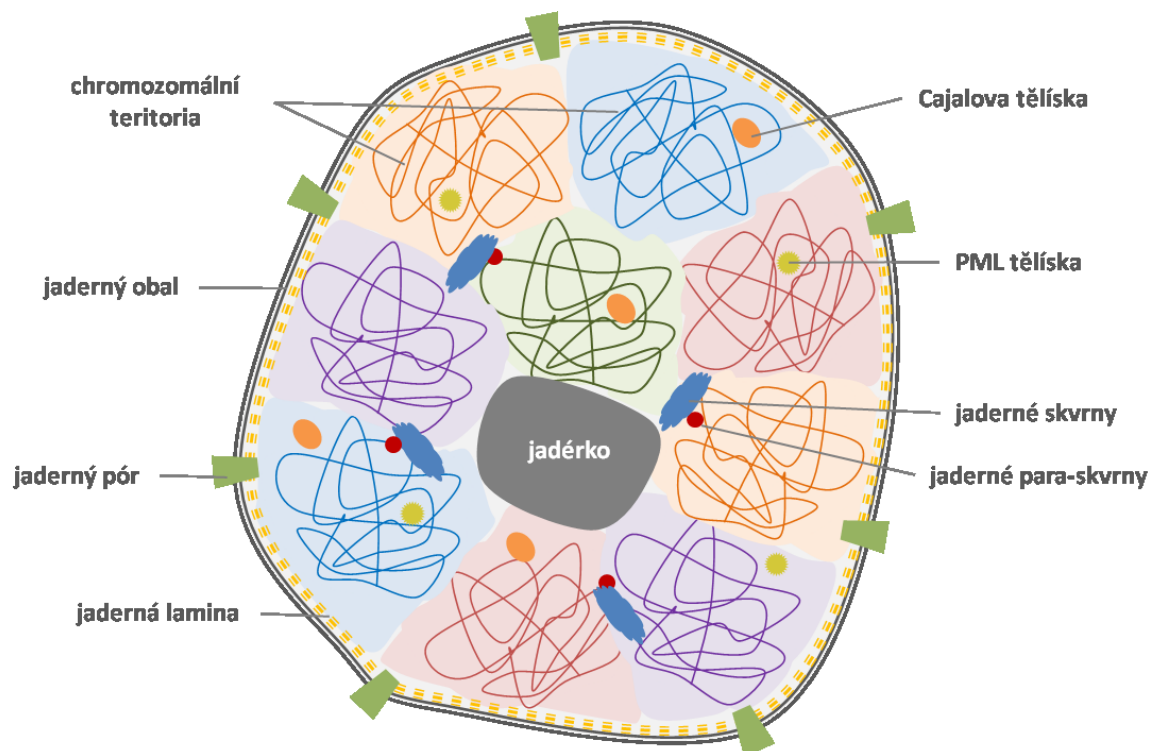
### Obrázek 1 Významné milníky v cestě za poznáním jaderné architektury.

A) Chromozomy epidermální buňky larvy mloka skvrnitého jak je znázornil Carl Rabl na konci předminulého století. Převzato od (Rabl, 1885). B) Kresba čtyřbuněčného embrya škrkavky koňské od Theodora Boveri. Dvě horní a dvě spodní buňky, které nesou podobnější uspořádání jaderných výčnělků, jsou navzájem sesterské blastomery (Boveri, 1909). C) Existence chromozomálních teritorií byla původně předvedena pomocí poškození DNA vyvolaných mikrolasery cílených na přesně definované místo a následné analýzy poškozených chromozomů v metafázi (Cremer et al., 1982). Pokusy ukázaly, že jen malá část chromozomů byla poškozena a že počet značených chromozomů je závislý na velikosti ozařovaného prostoru. Tato zjištění jsou v souladu s modelem, kde chromozomy jsou uspořádány v ohraničeném a přesně definovaném prostoru v jádře (*horní panel*), oproti představě, kde jsou chromozomy náhodně rozprostřeny v celém objemu buněčného jádra (*spodní panel*). Převzato od (Cremer and Cremer, 2010). Tento úsudek byl později přímo potvrzen díky fluorescenční *in situ* hybridizaci FISH pomocí specifických prób na jednotlivé celé chromozomy, což umožnilo vizualizovat chromozomální teritoria *in situ* (D). Mnohobarevné znázornění chromozomálních teritorií kuřecího fibroblastu s čísly označujícími homologní chromozomy je přejato od (Cremer and Cremer, 2001). E) Světelná mikroskopie v kombinaci fluorescenčními proteiny přinesla možnost sledovat chování živých buněk v čase. Na obrázku jsou HeLa buňky s interfázním chromatinem značeným GFP. Měřítka: 10 $\mu$ m. Převzato od (Kanda et al., 1998). F) Metoda 3C přispěla k rozluštění mnoha mezichromozomálních interakcí. Ukázána je mapa frekvence kontaktů na chromozomu 11. Převzato od (Kalhor et al., 2012).



### 1.1.2. Struktura buněčného jádra

Buněčné jádro má naprosto unikátní stavbu. Jeho povrch je z vnější strany tvořen dvojitou fosfolipidovou membránou, zvanou jaderný obal (Obrázek 2). Vnitřní vrstva je ze strany jádra podpírána jadernou laminou, nukleo-skeletální sítí středních filament, která dodává jádru mechanickou odolnost. Vnější membrána je v cytoplasmě přímo napojena na endoplasmatické retikulum. Nitro jádra komunikuje s cytoplasmou skrze jaderné póry, které spojují obě vrstvy jaderného obalu. Obsah buněčného jádra je strukturně a funkčně velmi heterogonní. Kromě chromatinu, který se v interfázi formuje do podoby chromozomálních teritorií, obsahuje další komponenty, které mají svou typickou stavbu, lokalizaci a úlohu. Největší z nich je jadérko, jež hraje důležitou roli v transkripci ribozomální DNA, procesování pre-RNA a biosyntéze ribozomálních podjednotek (Wallace and Birnstiel, 1966). Cajalova tělíčka se podílejí na dozrávání různých ribonukleoproteinů v jádře a správném průběhu sestřihu (Cajal, 1903, Nizami et al., 2010). K dalším strukturám s vlastní jadernou funkcí patří: PML (promyelocytární leukemie) tělíčka, jaderné skvrny (speckles) a paraskvrny (paraspeckles), tělíčka v blízkosti jaderných skvrn (Lallemand-Breitenbach and de Thé, 2010, Lamond and Spector, 2003). Dalším velmi početným jaderným kompartmentem jsou „transkripční továrny“ („transcription factories“). Jedná se o místa, kde se shlukují aktivní geny z různých chromatinových teritorií (Iborra et al., 1996, Osborne et al., 2004). Jejich počet v jádře se pohybuje od 500 do 10 000. Více je transkripčním továrnám věnováno v kapitole 1.1.5. Jaderná architektura a genová exprese.



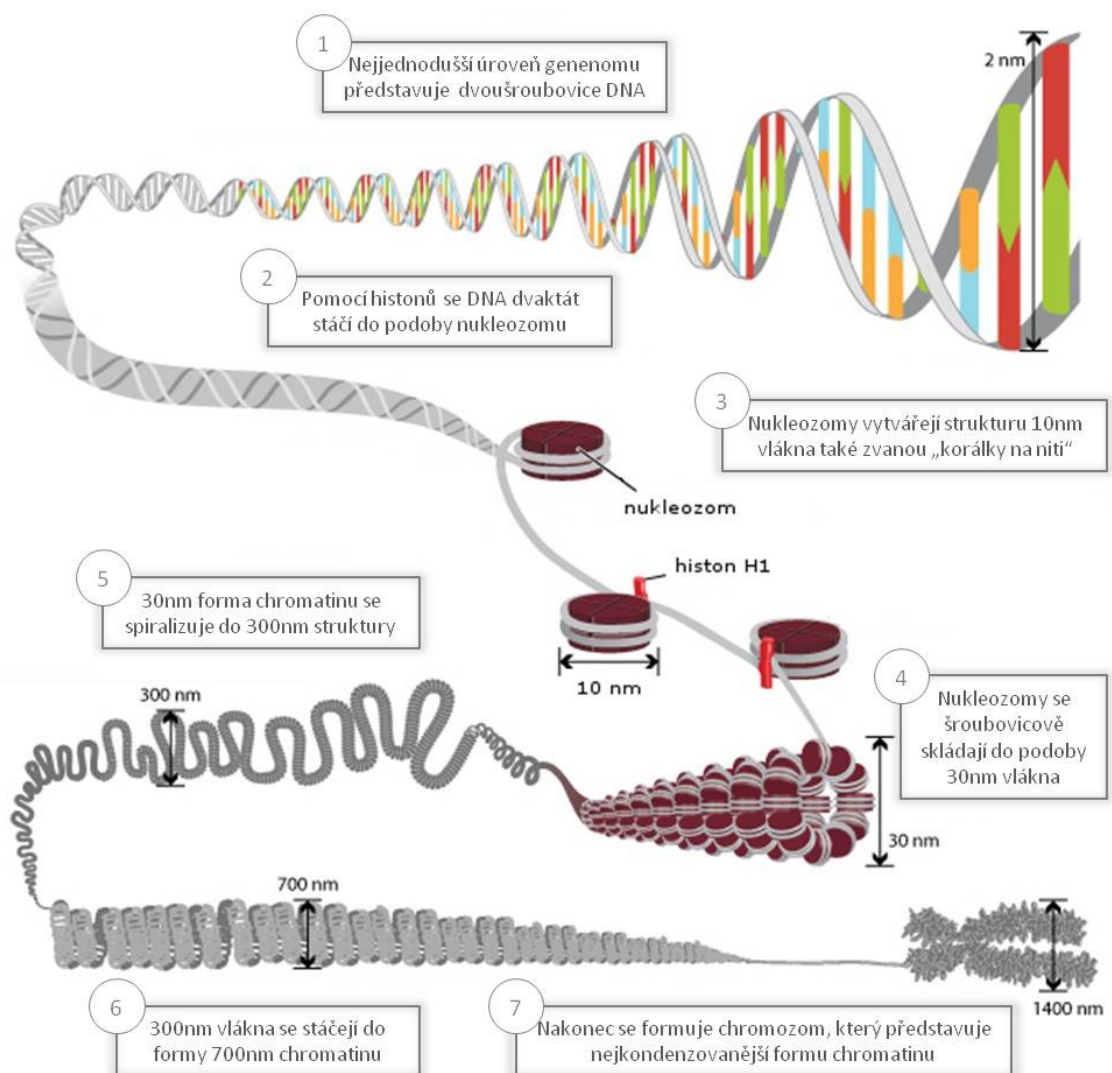
### Obrázek 2 Schéma funkčního a strukturního pořádku interfázního jádra.

Popis jednotlivých struktur uvnitř buněčného jádra je k dispozici v textu kapitoly 1.1.2. Struktura buněčného jádra.

#### 1.1.3. Struktura a organizace chromatinu v jádře

Lineární řetězec DNA je s pomocí histonových proteinů smotán do „klubíčka“ (Obrázek 3), které je tvořeno 147 páry bází dlouhým úsekem dvoušroubovice DNA 1,6krát omotaném okolo oktameru čtyř párů histonů (H2A, H2B, H3 a H4). Pátým typem histonu je histon H1, jenž funguje jako spojník, který drží vlákno na histonovém oktameru (Bednar et al., 1998). Celá tato struktura je nazývána nukleozom a představuje základní jednotku chromatinu. Tato chromatinová konformace bývá nazývána jako „korálky na niti“ díky jejímu zachycení pomocí elektronového mikroskopu (Olins and Olins, 1974) nebo také 10nm vlákno. Sestavování nukleozomů a dynamika histonových výměn byla prověřena

díky úspěšné expresi histonů sfúzovaných s fluorescenčními proteiny. Bylo ukázáno, že histone H2B označený GFP je správně připojován do chromatinu a nijak neovlivňuje chování buňky (Kanda et al., 1998). Konce histonů vyčnívají z centra nukleozomů a jejich aminokyselinové zbytky bývají často předmětem post-translačních modifikací.



**Obrázek 3 Hierarchické uspořádání interfázního chromatinu v jádře.**

Kondenzací chromatinových vláken se vytváří nejvyšší stupeň organizace chromatinu, 1400 nm silné chromozomy. Převzato a přizpůsobeno od (Pierce, 2006).

Jednotlivé nukleozomy se za pomoci dalších podpůrných proteinů dále spiralizují do vyšších chromatinových struktur. Nejprve se formuje 30nm vlákno, které se stáčí jako telefonní kabel do 300nanometrového svazku. Přesné uspořádání chromatinového vlákna na těchto vyšších úrovních zatím není detailně prostudováno. 300nm vlákno se následně pěchuje do 700nanometrové struktury, jež je nakonec smotána do chromatid jednotlivých chromozomů. Chromozomy představují nejvyšší stupeň organizace chromatinu a skládají se ze dvou chromatid, které jsou propojeny centromerou a na koncích zakončeny telomerami.

Jaké jsou tedy nejvýznamnější poznatky o chromatinovém uspořádání uvnitř jaderné obálky? Zhruba 2 nanometry široká a 2 metry dlouhá savčí DNA je sbalena do chromozomů, které jsou sofistikovanými mechanismy poskládány v jádře tak, že každý zaujímá určitou pozici. Systém a způsob organizování chromatinu v trojrozměrném prostoru je zatím předmětem intenzivních diskuzí. Ovšem za již téměř naprostou pravdu je považována myšlenka o nenáhodném uspořádání v jádře. To znamená, že genetický materiál každého chromozomu není ledabytle rozlehlý v jaderném prostoru, ale zaujímá prostorově definované zóny. Řádná organizace jaderného genomu je nezbytná pro správné fungování celé buňky. Veškeré stupně uspořádání DNA mají významnou funkční roli v řízení genové exprese (Cremer and Cremer, 2001).

V průběhu buněčného cyklu mění chromozomy razantně svůj tvar. Při vstupu do mitózy chromatin kondenzuje a proměňuje se na pentlicovité chromozomy. Po rozdělení buňky, v interfázi, dochází k rozvolnění chromozomů a chromatin se rozprostře v jaderném objemu. Snad nejzřetelnější strukturní uspořádání interfázního genomu je na základě míry své kompaktnosti. Vysoce spiralizovaný chromatin nazýváme heterochromatin a je často lokalizován na jaderné periférii a v blízkosti jádérka (Heitz, 1928). Heterochromatin zahrnuje úseky DNA s nízkou četností genů a je považován za transkripčně neaktivní. Patří

sem například repetitivní DNA elementy jako satelitní sekvence, transpozibilní elementy a centromerické úseky. Obecně lze říci, že epigenetickou značkou heterochromatinu lze považovat di- a trimetylaci histonu H3K9 (H3K9me2 a me3) (Saksouk et al., 2015). Naopak rozvolněnou formu chromatinu, nejčastěji o velikosti 10nm vlákna, představuje euchromatin. Tato podoba chromatinu je transkripčně aktivní, velmi bohatá na přítomnost genů a typicky se nachází v centru jádra.

Plochu, kterou chromozomální teritoria v interfázi zaujímají, je proporcionální s délkou chromozomů. Ze začátku se chromozomální teritoria považovala za vzájemně se nepřekrývající (Cremer et al., 1996). Později se ukázalo, že chromozomy v interfázi mohou k sobě velmi těsně přiléhat a dokonce se jejich DNA může prolínat (Visser et al., 2000, Branco and Pombo, 2006). Aktivní geny jsou spíše lokalizovány na okraji chromozomálních teritorií a málo aktivní geny naopak uvnitř (Verschure et al., 1999).

Velkým pokrokem v představě o funkční organizaci genomu bylo objevení radiálního uspořádání v interfázním jádře. Skupina W. A. Bickmorové přišla s domněnkou, že genová hustota na chromozomu silně koreluje s jeho radiální pozicí v rámci jádra (Croft et al., 1999, Bridger et al., 2000, Boyle et al., 2001). Tento jev byl ukázán na příkladu odlišné lokalizace dvou lidských chromozomů pomocí FISH. Chromozomy 18 a 19 jsou co do velikosti téměř totožné, ale zásadně se liší množstvím přítomných genů. Chromozom 19, který vykazuje vysokou hustotu genů, se často vyskytuje v centru jádra, zatímco chromozom 18, který kóduje pětkrát méně genů, se hojně sdružoval s jaderným okrajem. Podobné případy byly ukázány také u vyšších primátů, skotu, hlodavců a ptáků a zdálo se takováto organizace je obecným znakem jaderné organizace u eukaryot (Habermann et al., 2001, Koehler et al., 2009, Mayer et al., 2005, Tanabe et al., 2002).

Další zajímavý příklad toho, jak změny jaderné struktury mohou dramaticky ovlivnit jeho funkci je spojen s viděním. Bylo zjištěno, že architektura jader tyčinkových buněk sítnice je u nočních myši obrácená – kondenzovaný chromatin se nachází v centru

jádra, zatímco méně dekonzenzovaný je na periférii. Ukázalo se, že denní druhy mají uspořádání tradiční, tedy opačné. Inverzní struktura nočních a za soumraku či za úsvitu aktivních tvorů zřejmě minimalizuje rozptyl světla, což zvířatům umožňuje lépe vidět ve tmě (Solovei et al., 2009). Výše zmíněné příklady poukazují na funkční roli chromozomální architektury.

#### **1.1.4. Mobilita chromatinu**

Spíše než tuhou hmotu představují chromozomální teritoria dynamickou a plastickou soustavu. Buňky se od sebe navzájem liší svou jadernou architekturou v závislosti na druhu, stavu diferenciaci, buněčném typu, stáří, akutní potřebě organismu, míře poškození atd. Velmi diskutovanou otázkou dlouho bylo, kdy a za jakých podmínek dochází v buněčném jádře k přeskupování chromozomálních teritorií. Jednotlivé chromozomové úseky se mohou flexibilně přemísťovat podle toho, jestli mají být aktivovány nebo umlčovány. V myších erytroidních progenitorových buňkách se aktivně transkribující geny umějí vyloupnout ze svého teritoria, aby měly přístup k transkripčním továrnám (Osborne et al., 2004). Pomocí UV ozařování živých buněk označených fotoaktivovatelnou formou GFP bylo ukázáno, že dvouvláknové zlomy DNA vyvolávají zvýšenou pohyblivost v řádu mikrometrů právě poškozeného chromatinu. To se děje pravděpodobně proto, aby se shlukly úseky s poškozením a došlo k efektivnějším opravám (Kruhlak et al., 2006, Krawczyk et al., 2012).

Díky pokrokovým metodám zobrazování živých buněk a díky fluorescenčním proteinům v kombinaci s konfokální mikroskopií s dostatečným rozlišením je možné přímo sledovat chromozomální pohyby v jednotlivých buňkách. Opakovaně bylo experimentálně předvedeno, že vzájemné pozice chromozomálních teritorií jsou v průběhu interfáze stabilně zachovány tak, že nedochází k širokosáhlému přeskupování chromozomů (Gerlich et al., 2003, Walter et al., 2003, Cvačková et al., 2009, Strickfaden et al., 2010).

Velmi lákavou se stala otázka dědičnosti chromozomálního uspořádání. Tedy, jestli se dané rozložení chromatinu přenesou přes mitózu na dceřiné buňky nebo jestli se v novém buněčném cyklu vždy vytvoří nové uspořádání, které bude v souladu s nově vzniklými potřebami buňky. Walter a spol. pomocí techniky fotobleaching, kdy se silným zářením značně zredukuje fluorescenční emise v dané oblasti, vytvořili značky na chromatinu, které mohli sledovat v čase. Jádra lidských HeLa buněk s takto označenými oblastmi v časně G2 fázi byly následovány přes mitózu do G1 fáze. Dceřiné buňky vykazovaly notně rozdílné rozložení chromatinových vzorů oproti buňce mateřské (Walter et al., 2003). Rozdílných výsledků podobnou metodou dosáhli Gerlich a spol., kteří značili chromatin krysích ledvinných buněk v profázi a snímali do dalšího buněčného cyklu. Ti ukázali, že pozice chromozomů se přes mitózu uchovávají a přenášejí na dceřiné buňky (Gerlich et al., 2003). Cvačková a kolektiv předvedli experimenty na jádrech lidské HepG2 linie označených fotokonvertibilním proteinem Dendra2 (Cvačková et al., 2009). Díky tomu mohli vytvářet různé vzorce na chromatinu a následně pozorovat jejich chování v čase. Ačkoli rozložení značeného chromatinu v dceřiných buňkách s porovnáním s mateřskou buňkou považují autoři za nenáhodné, většina z těchto rozdělených buněk disponovala výrazně odlišnými fluorescenčními vzorci oproti jejich původu. Z jejich studie vyplývá, že pozice chromozomálních teritorií nejsou přenášeny z buněčné generace na generaci, ale spíše dochází k sestavování *de novo* na začátku buněčného cyklu.

Podobných výsledků ohledně mitózy dospěli také Strickfaden s kolegy pozorováním jader plochého tvaru linie RPE-1, buňky pigmentového epitelu sítnice označených RFP (červený fluorescenční protein), a fotoaktivovatelnou formou GFP (Strickfaden et al., 2010). Autoři přišli s myšlenkou, že prometáfáze je stádium, kdy dochází k největším změnám v chromozomálním uspořádání.

### 1.1.5. Jaderná architektura a genová exprese

Obecně platí, že vnitřek jádra představuje spíše „aktivní“ prostředí a jaderná periferie odpovídá prostředí se spíše represivními poměry (Lanctôt et al., 2007, Foster and Bridger, 2005). Transkripčně aktivní geny se srocují v „transkripčních továrnách“. Tato místa disponují vysokou koncentrací RNA polymerázy II, transkripčními a sestřihovými faktory a dalšími regulačními proteiny (Iborra et al., 1996, Osborne et al., 2004). Takováto struktura transkripčních ohnisek umožňuje mnohem účinnější reakce. Všechny nezbytné komponenty pro přepis jsou k dispozici na jednom místě.

Poloha chromozomálních teritorií má v jádře svou pevně danou funkci. Tato teritoria se jen částečně překrývají. Pomocí 3C a FISH experimentů bylo dokumentováno, že chromozomy spolu navzájem účelově interagují, a to jak v rámci jednoho chromozomu, *cis*, tak i chromozomy mezi sebou, *trans*. *Trans* interakce mezi chromozomy je ukázána na příkladu aktivace určitého čichového receptoru po fyzickém spojení jeho genu s H enhancrem na chromozomu 14 (Lomvardas et al., 2006, Fuss et al., 2007) nebo inaktivace jednoho z X chromozomů v ženských buňkách, kde může být aktivní pouze jedna kopie (Anguera et al., 2006).

### 1.1.6. Jaderná architektura parentálních genomů

Diploidní organismy nesou ve své výbavě somatických buněk dvě odpovídající sady chromozomů, jednu od otce, *paternální*, a jednu od matky, *maternální*. U valné většiny organismů jsou pro správný vývoj a fungování jedince nezbytné obě sady (McGrath and Solter, 1984, Surani et al., 1984). V procesu fertilizace se haploidní gamety, oocyt a spermie, nesoucí vždy jednu sadu chromozomů spojí, aby daly vzniknout diploidní zygotě, která následně v průběhu embryogeneze prochází řadou buněčných dělení.

U savců dochází během raného embryonálního vývoje k dramatickým změnám v chromatinové struktuře a jaderného uspořádání vůbec. Prvojádra spermie a vajíčka nesou



dvě epigeneticky rozdílné chromozomální sady. Hlavními epigenetickými značkami u savců jsou kovalentní modifikace DNA, jako metylace, a posttranslační modifikace histonů, jako metylace a acetylace. Ve výsledku tyto modifikace ovlivňují genovou expresi, ale posloupnost nukleotidů v DNA zůstává beze změny. Tím je různým buňkám v těle organismu umožněno vyjadřovat rozdílné transkripční profily, i když mají totožnou sekvenci DNA. V časném embryonálním vývoji jsou epigenetické informace pohlavních buněk vymazány, aby následná zygota jako totipotentní entita mohla dát vzniknout všem buněčným typům.

Genom spermie je před oplozením díky zvýšené úrovni metylace transkripčně umlčen. S pomocí protaminů je její chromatin velmi pevně seskupen tak, že je až šestkrát více kompaktní než metafázní chromozomy (Balhorn, 1982). Po vstupu spermie do cytoplasmy vajíčka dochází k výměně protaminů za oocytem zprostředkované histony. Chromatin se dekonduzuje a přijímá mnoho proteinů, které jsou asociovány s maternálním chromatinem. Otcovský genom si nicméně udržuje své charakteristické znaky, jako je hyperacetylace histonu H4 a rapidní demethylace DNA, které ho odlišují od mateřského genomu (McLay and Clarke, 2003). Zajímavé je, že právě aktivita oocyty je zodpovědná za demethylaci paternálního genomu po oplození, přičemž metylovaná maternální DNA, ač součást stejného prostředí, zůstává zatím neovlivněna (Oswald et al., 2000). Ta se demethyluje postupně až během prvních embryonálních dělení.

S ohledem na organizovanost genomu v jádře a na význam jeho epigenetické informace, je třeba podívat se blíže i na otázku jaderného uspořádání z hlediska původu. Tedy, jak jsou chromozomy zděděné od matky a od otce rozděleny v jaderném prostoru? Odpověď na tuto otázku je komplikována nesnázemi, jak rozpoznat maternální a paternální chromozomy v jádře.

Badatelé pod vedením Thomase Haafa pro rozlišení původu genomu využili techniku imunofluorescenčního *in situ* značení chromatinu pomocí 5-bromodeoxyuridinu

(BrdU). Myší spermie značené BrdU byly použity pro oplození neznačeného oocytu. Následně bylo BrdU značení detekováno pomocí protilátek v časném diploidním embryu (Mayer et al., 2000c). Po rozpadu prvojaderných obalů oba chromozomální sety byly stále oddělené v průběhu první mitózy a v obou jádrech v dvoubuněčném embryu. Separované genomy v jádrech byly pozorovány až do čtyřbuněčného stádia, kde se BrdU signál začínal vytrácet díky inkorporaci nových nukleotidů v replikaci DNA. V pozdějších fázích embryonálního vývoje se rozdělení parentálního genomu jeví spíše náhodné. Pro vyloučení možnosti separace obou genomů kvůli přítomnosti inkorporovaných BrdU značek v DNA spermie využili autoři v další studii myši z rozdílných druhů (*Mus musculus* a *Mus spretus*). Rozdílné sekvence centromerické DNA u těchto druhů umožnily pomocí FISH značení rozpoznání maternálních a paternálních centromer v F1 hybridních embryích (Mayer et al., 2000c). I v tomto případě byla pozorována separace rodičovských konstitutivních heterochromatinů oblasti centromer v mitóze, ve dvou- a částečně i v čtyřbuněčném embryonálním stádiu. Na těchto mezidruhových křížencích bylo ukázáno separované rozložení parentálních genomů v pozdních haploidních spermatidách (Mayer et al., 2000a). Jaké je uspořádání rodičovských chromozomů v diferenciovaných tělních buňkách se rozhodli rozluštit Hepperger s kolegy. Ti na jádrech buněk mul, kříženců osla a koně, a lidských lymfocytů a fibroblastech pomocí FISH ukázali, že v somatických jádrech rodičovské chromozomy nevykazují žádné známky prostorově oddělených pozic (Hepperger et al., 2009).

Pokud nahlédneme do rostlinné říše, najdeme i zde příklady topologicky oddělených mateřského a otcovského genomu. Problém, jak vizuálně rozlišit oba genomy, byl u většiny těchto případů zajištěn pomocí hybridních kříženců, kdy navzdory určité genetické rozdílnosti došlo ke vzniku F1 populace. Separované genomy byly pozorovány u kříženců tabáku a rulíku v somatických buňkách (Gleba et al., 1987), v mitotických i interfázních buňkách na kořenové špičce hybridu ječmene a žita pomocí genomické *in situ*

hybridizaci (Leitch et al., 1991), u kříženců dvou druhů ječmenu (Schwarzacher et al., 1992), u kříženců z čeledi krtačnickovitých pomocí 3D FISH-značených centromer v mitotických i meiotických buňkách (Kikuchi et al., 2007) i hybridů z čeledi brukvovitých v somatických a meiotických buňkách pomocí fluorescenční genomické *in situ* hybridizaci (Ding et al., 2014).

Otázkou stále zůstává, mechanismus a podstata, jak a proč k separaci homologních chromozomů od otce a od matky dochází (Haaf, 2001). Jedno z možných vysvětlení oddělených genomů v časném embryu předkládají autoři rozdílné epigenetické znaky dvou genomů. Imunofluorescenční značení myších embryí protilátkou proti 5-metylcytosinu (MeC) ukázalo, že oba genomy procházejí různými stupni modifikace DNA (Mayer et al., 2000b). Před oplozením je genom oocyty oproti genomu spermie ve stavu nízké metylace. Krátce po oplození dochází u oocyty k rapidní vlně *de novo* metylace (Howlett & Reik1991) tak, že ve stádiu prvojader, asi 3-6 hodin po oplození, jsou oba chromozomální sety přibližně na stejné metylační úrovni. Již 8 hodin po fertilizaci nastává velmi rychlá demethylace paternální DNA ještě před nástupem replikace DNA. Jádra dvoubuněčného embrya vykazovala lokalizované barvení MeC, které odráží rozdílné stupně metylace a prostorové oddělení obou genomů. Tento stav přetrvává až do stádia čtyřbuněčného stádia, kdy s přibývajícím buněčnými cykly dochází k postupné demethylaci i maternálního genomu (Mayer et al., 2000b).

### **1.1.7. Genová exprese v meióze**

Před oplozením oocyt potřebuje vyrobit a naakumulovat obrovské zásoby nezbytné pro růst a pro první kroky embryonálního vývoje, které byly vystihnuty v předchozí kapitole. Velká výzva regulace meiotické genové exprese je na úrovni produkce RNA. Oproti genové expresi v somatických buňkách, která probíhá na interfázních rozvolněných

chromozomech, meiotická transkripce musí být zajištěna ve stavu, kdy jsou chromozomy již kondenzovány, a přístup k chromatinu může být omezen.

Studium meiózy modelových organismů přispělo zajímavými údaji. U obojživelníků, plazů, ptáků, ryb a některých bezobratlých byly pozorovány charakteristické chromozomální struktury zvané štětkovité (lampbrush) chromozomy. V profázi meiózy I jsou v oocyty velmi rozvolněné bivalenty, z nichž vybíhají dlouhé chromatinové smyčky do stran. Tyto smyčky jsou snadno přístupné a vysoce transkripčně aktivní (Gaginskaya et al., 2009). U savců štětkovité chromozomy pozorovány nebyly. Chromatin v savčích oocytech ve stádiu zárodečného váčku (GV, germinal vesicle) se mění z transkripčně aktivní dekondezované konformace v diploténe na velmi kondenzovaný a transkripčně umlčený stav po ukončení růstu oocytů (Zuccotti et al., 1995, De La Fuente et al., 2004). Pomocí značení fosforylované RNA polymerázy II u savců se podařilo ukázat, že transkripční aktivita je v počátečních fázích profáze I nízká, reaktivuje se ve střední pachyténe a trvá až do diploténe (Page et al., 2012). Bylo postulováno, že u savců a jiných organismů jsou chromozomální úseky, jež nejsou v synapsi, předmětem procesu transkripčního utišení (MSUC, meiotic silencing of unsynapsed chromatin), kterého je dosaženo sérií epigenetických modifikací (Baarends et al., 2005). Studie na modelech z řádu ploštic na druhou stranu ukázaly, že transkripce není závislá na tvorbě meiotické synapse, protože k transkripční aktivaci dochází ještě před ukončením formování synapse (Viera et al., 2016).

### **1.1.8. Jaderný a cytoplazmatický objem**

Jedna z dalších charakteristik jádra a vůbec buňky jako takové je její rozměr. Velikost buněčného jádra velmi kolísá, průměrně je to mezi 4-30 $\mu$ m a do jisté míry ovlivňuje velikost samotné buňky. S velikostí jádra souvisí důležitý parametr jeho hodnocení, kterým je tzv. nukleo-cytoplazmatický poměr. Jedná se o poměr objemu jádra (J) k objemu

cytoplazmy (C) vyjma jádra,  $J/(C-J)$ . Ve většině případů objem jádra silně koreluje s objemem buňky. Již v roce 1903 Richard Hertwig navrhl koncept, ve kterém poměr objemů jádra a cytoplazmy bývají zhruba konstantní (Wilson, 1925). Objem jádra je také dán velikostí genomu a jeho ploidií (Cavalier-Smith, 1978, Henery and Kaufman, 1992). Různé buněčné typy mají své charakteristické poměry. Nukleo-skeletální teorie uvádí, že velikost jádra je určena množstvím DNA, mírou kompaktace chromatinu a množstvím komponentů jaderné membrány (Cavalier-Smith, 1982). Může se zdát, že ploidie přímo ovlivňuje velikost jádra. Na druhou stranu, velikost jádra se po duplikaci DNA v S fázi nezdvoujnásobuje (Jorgensen et al., 2007).

Diagnózou histologických preparátů se v lékařské praxi může odhalit rakovinné bujení. Mnoho maligních rakovinných buněk je charakterizováno zvýšeným nukleo-cytoplazmatickým poměrem (White et al., 1997). Nukleo-cytoplazmatický poměr se také zvyšuje s přibývajícím věkem ve svalových buňkách tím, že se snižuje objem cytoplazmy, velikost jádra zůstává (Manta et al., 1987).

Ukázalo se, že poměrné velikosti jádra a cytoplazmy mají zásadní vliv na zrání savčích oocytu. Postupnými odběry části cytoplazmy pomocí mikromanipulace se zvyšoval nukleo-cytoplazmatický poměr oocytů ve stádiu zárodečného váčku. Tyto změny měly za následek prodloužení až zastavení zrání oocytů, narušení meiotické segregace chromozomů a struktury dělicího vřeténka (Fulka et al., 1998, Cui et al., 2005).

Velmi blízký vztah mezi velikostí jaderného a cytoplazmatického obsahu byl popsán během embryogeneze. Ve stádiu střední blastuly v embryonálním vývoji dochází u *Xenopa* a *Drozofily* k dramatickým změnám (MBT; midblastula transition), které jsou iniciovány náhlou změnou nukleo-cytoplazmatického poměru (Lu et al., 2009, Newport and Kirschner, 1982). Jakmile nukleo-cytoplazmatický poměr dosáhne určitého bodu, rychlé časově sladěné dělení se asynchronicky zpomaluje a aktivuje se transkripce embryonálních genů. Zvýšení obsahu DNA v jádře (tetraploidií či přidáním DNA molekul

navíc) nastává tento stav dříve, naopak snížení jaderného objemu odebráním DNA dochází ke zpoždění.

## **1.2. Hlístice *Caenorhabditis elegans***

### **1.2.1. *Caenorhabditis elegans* jako modelový organismus**

*Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), česky háďátka obecné, je bezobratlý mnohobuněčný modelový organismus. Jedná se o asi 1 mm dlouhý nepatogenní (neparazitický) organismus patřící do kmene hlístic. Háďátka může být izolováno prakticky po celém světě z tlejícího ovoce či zeleniny, která obsahuje dostatečný zdroj bakteriální potravy (Barrière and Félix, 2014). Modelovým organismem je *C. elegans* již od roku 1965, kdy byl Sydney Brennerem ustanoven jako vhodný genetický model pro studium vývojové biologie a neurobiologie (Brenner, 1988).

Ráda bych tedy vyzdvihla hlavní výhody, které činí *C. elegans* mimořádným experimentálním systémem. Jeho malá velikost, nenáročná kultivace a bakteriální zdroj potravy (v laboratorních podmínkách se jedná o agarovou petriho misku s vrstvou *E. coli*) představují velmi nenákladnou údržbu. Průhledné tělo umožňuje zobrazování jednotlivých buněk i detailů uvnitř buněk pomocí DIC (differential interference contrast) optiky nebo s pomocí fluorescenčních proteinů. *C. elegans* má velmi rychlý životní cyklus, ve kterém háďátka po vylíhnutí prochází čtyřmi larválními stádii, L1, L2, L3 a L4 než se promění v dospělé. Rychlost růstu se může přizpůsobovat podle teploty, od 15 do 25 °C. Při 20 °C se z embrya vyvine dospělý kladení dalších vajíček již za 4 dny. Embryonální vývoj při stejné teplotě trvá přibližně 16 hodin. Užitečnou vlastností *C. elegans* je schopnost samooplození, jež ulehčuje udržování linie. I jen jeden jedinec může vytvořit celou populaci (~300 potomků). Háďátka se totiž přirozeně vyskytují v podobě hermafroditů (>99%), kteří produkují jak spermie, tak vajíčka, a jsou schopni oplodnit

samy sebe. Samci představují jen asi 0,2 % populace a jsou schopni oplodnit hermafrodity. Přítomnost samců umožňuje jednotlivé kmeny mezi sebou křížit. Pohlaví je u *C. elegans* určeno geneticky. Hermafroditi nesou dva pohlavní X chromozomy (XX) a samci jen jeden X chromozom (X0).

Háďátka je příkladem organismu s determinačním vývojem, při kterém je osud každé buňky určen již při jejím vzniku (Sulston et al., 1983). V průběhu vývoje se tak každá buňka v embryu a larvě dělí a diferencuje na stejný počet a typ buněk podle stejného programu. Děje se tak v každém jedinci stejně, čili reprodukovatelně. Výsledkem je, že každý dospělý jedinec obsahuje stejný počet tělních buněk, 959 u hermafroditů, 1039 u samců.

### **1.2.2. Chromatin *C. elegans***

Genom hlístice byl vůbec první plně osekvenovaný mnohobuněčný genom (Consortium, 1998). Zhruba dvacet tisíc genů na 100 miliónech bází, což zhruba odpovídá velikosti jednoho lidského chromozomu, je rozloženo na pěti autozomech a jednom pohlavním X chromozomu. Chromozomy hlístice jsou holocentrické, to znamená, že mikrotubuly dělicího vřeténka se při mitóze připojují po celé délce chromozomu (Albertson and Thomson, 1982, Oegema et al., 2001).

Háďátka mají neobyčejné uspořádání genů na chromozomech. Střed chromozomů, přibližně jedna třetina délky, je osazen nezbytnými, konzervovanými a vysoce exprimovanými geny, zatímco chromozomální ramena, zbylé dvě třetiny na jejich koncích, vykazují nižší míru exprese i počet genů a více transpozonů a repetitivních elementů (Ikegami et al., 2010). I když, oproti savcům jsou u hlístic dlouhé repetitivní úseky velice vzácné (Consortium, 1998). Neaktivní část genomu je v heterochromatinu lokalizována v blízkosti jaderné periferie. Tyto oblasti spojují utišující epigenetické značky, jako H3K9me2/3 a H3K27me3 (Ikegami et al., 2010, Gu and Fire, 2010, Liu et al., 2011).

Ukázalo se, že metylace histonu H3K9 se jeví jako klíčová pro transkripční utišení genů v embryu *C. elegans* (Towbin et al., 2010, Towbin et al., 2012). Pro přemístění chromatinu na jadernou periferii je metylace H3K9 nezbytná pro jeho uchycení přes CEC-4 chromodoménový protein na lamin na vnitřní jaderné membráně (Harr et al., 2016, Gonzalez-Sandoval et al., 2015).

Současná data naznačují, že jaderná organizace u *C. elegans* je řízena také z hlediska vývojového. Experimenty na embryích, které v sobě ukrývají buňky různých typů a diferenciačních stádií, ukázaly, že s klesající diferenciační plasticitou v průběhu embryogeneze roste kompaktace genomu a jeho organizovanost v prostotu. Aktivní vývojově regulované promotory se v průběhu diferenciace přesídlují do nitra jádra a neaktivní se přesunují na periferii (Meister et al., 2010, Sharma and Meister, 2013). Pomocí světelné a elektronové mikroskopie byla prošetřena struktura buněčného jádra v embryonálním vývoji. Výsledkem bylo, že P4 blastomera zárodečné linie vykazuje oproti sousedním somatickým buňkám vyšší stupeň chromatinové kompaktace (Vágnerová et al., 2014).

Další strukturou, která v průběhu vývoje prochází restrukturalizací je jadérko. Oproti jiným organizmům, kde jsou repetice ribozomální DNA rozděleny na více chromozomech, mají háďátka pouze jediný klastr a to na chromozomu I. V průběhu oogeneze se jadérko zmenšuje a těsně před oplozením zcela zmizí. Znovu se objevuje okolo osmibuněčného stádia embrya ve chvíli, kdy přibližně dochází k transkripční aktivaci zygotického genomu (Korčeková et al., 2012, Lee et al., 2012).

### **1.2.3. Gametogeneze u *C. elegans***

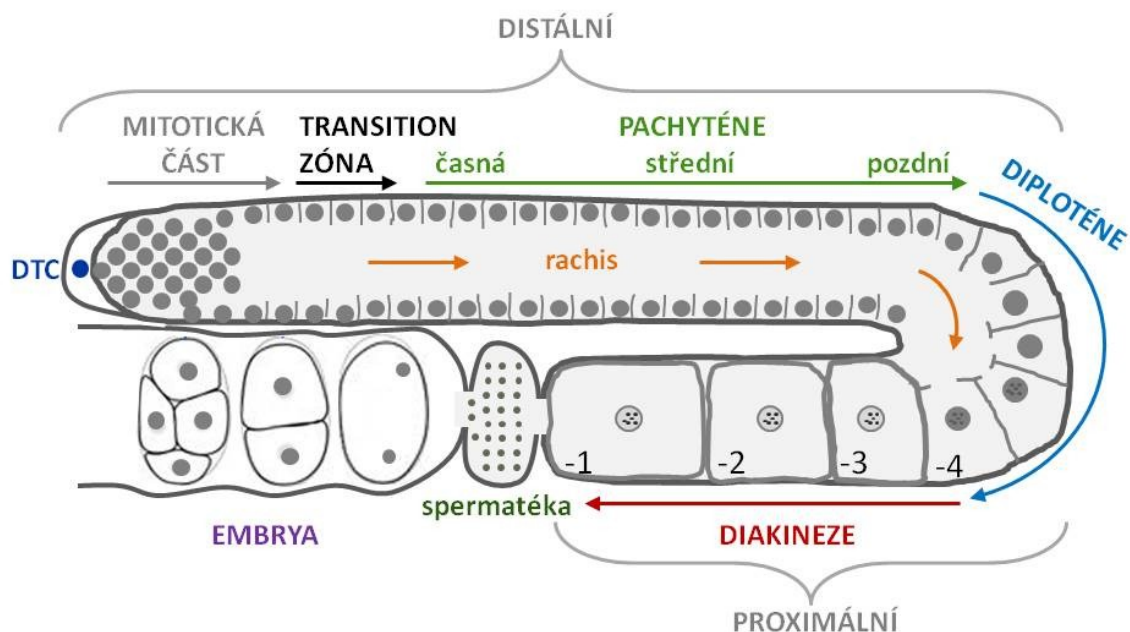
Zárodečná linie je specializovaná soustava buněk, ze kterých vznikají gamety, vajíčka a spermie. U *C. elegans* stejně jako u jiných organismů se zárodečná linie zakládá v časně embryogenezi a od somatické větve se vyvíjí odděleně. Po vytvoření zygoty P0 se



několika cykly asymetrického dělení se utváří primordiální zárodečná linie P4, jejíž všechny dceřiné buňky, Z2 a Z3, tvoří zárodečnou linii (Sulston et al., 1983). V larválních stádiích pak Z2 a Z3 společně s mezodermálními somatickými Z1 a Z4 buňkami tvoří základ budoucí gonády. Z1 a Z4 vytvářejí somatické buňky distální špičky (DTCs, distal tip cells), které mají důležitou signalizační roli ve stimulaci proliferace zárodečných buněk (Hubbard and Greenstein, 2000).

Zralá gonáda hermafrodita je formována do tvaru U a skládá se z distálního a proximálního ramena (Obrázek 4). V celé distální části gonády jsou zárodečná jádra lokalizována na periférii, čímž obklopují velkou bezjadernou zónu uvnitř gonády zvanou rachis. Plasmatická membrána okolo každé buňky je neúplná a vytváří tak propojení mezi cytoplasmou zárodečných buněk a rachis (Hirsh et al., 1976). Rachis je tak místo sdílení cytoplazmatického obsahu. Syncytiální struktura gonády tak umožňuje přímou komunikaci mezi jednotlivými buňkami. Samci *C. elegans* vytvářejí jen jednu gonádu ve tvaru U, která produkuje pouze spermatické buňky.

Ty zárodečné buňky, které jsou nejbližší DTCs, se dělí mitoticky, a proto se této části říká mitotická zóna. Jak jádra zárodečné linie postupují proximálně směrem k děloze a vulvě, procházejí jednotlivými stádii, které jsou snadno rozpoznatelné podle morfologie chomozomů. Oblast, kde buňky podstupují přechod mezi mitózou a meiotickou profází, se nazývá transition zóna (Crittenden et al., 1994).



**Obrázek 4** Schéma gonády dospělého hermafrodita *C. elegans*.

Počátek distální část gonády vytvářejí buňky distální špičky (DTC), následuje část mitotická, transition a pachyténe. Úsek diploténe se nachází v ohybu gonády. Proximální část je tvořena převážně zónou diakineze. Zárodečné buňky v distální části a v ohybu jsou lokalizovány na periferii a jsou jen částečně odděleny plasmatickou membránou. Uvnitř se nachází sdílená část cytoplasmy, rachis. Šipkami je naznačen směr pohybu zárodečných buněk i směr toku cytoplasmy v rachis. Oocyty jsou značeny podle pozice od spermatéky (-1,-2, -3 atd). Zralý oocyt (-1) ovuluje do spermatéky, kde dojde k oplození, a přesune se do dělohy, kde se vyvíjejí embrya.

Meióza je komplexní buněčné dělení, které zahrnuje párování homologních chromozomů, tvorbu synapse, rekombinaci a segregaci chromozomů za účelem vytvoření haploidních buněk. Transition zóna koresponduje se stádií leptoténe a zygoténe profáze meiózy I. Jádra zde zaujímají tvar půlměsíce. Během tohoto procesu dochází k aktivnímu hledání dvou homologních kopií každého chromozomu. Mezi spárovanými chromozomy se zipovitě formuje proteinová struktura synaptonemálního komplexu. Plnohodnotné spojení homologů, tzv. synapse, je charakteristické pro stádium pachyténe. Sesterské chromatidy jsou v každém homologu pevně sbaleny tak, že z každé strany vybíhá řada

chromatinových smyček (Schild-Prüfert et al., 2011). V procesu homologní rekombinace dochází k překřížení, zlomům a znovuspojení chromatid, jehož výsledkem je crossing-over. Chromozomy se přesunují na periferii jádra a obklopují jadérko. Jádra v pachyténe tak mají typickou morfologii připomínající klubko. Tato fáze zaujímá ze všech zón nejdelší část profáze meiózy I, a proto ji rozdělujeme na časnou, střední a pozdní. V pozdní pachyténe se synaptonemální komplex začíná rozpadat, tzv. desynapse. Chromozomy jsou nadále spojeny pomocí rekombinačních uzlíků (chiasmata). Desynapse v diploténe je provázena přechodnou fází, kdy se chromatin částečně dekondenzuje (Chan et al., 2004). Postup z pachyténe a diploténe vyžaduje MAP (mitogen-activated protein) kinázovou signální dráhu, která je zodpovědná za rozpad synaptonemálního komplexu (Church et al., 1995, Nadarajan et al., 2016). MAP kinázová dráha je potencionálním zprostředkovatelem fosforylace serinu<sup>25</sup> proteinu SYP-2, čímž reguluje jeho rozpad. SYP-2 je centrální komponentou synaptonemálního komplexu (Nadarajan et al., 2016). Během posunu meiotických chromozomů z diploténe do diakineze dochází k chromozomální reorganizaci, kdy se chromatin rapidně kondenzuje za vzniku šesti oddělených bivalent (Chan et al., 2004).

V ohybu gonády zárodečné buňky přecházejí do stádia diploténe. V místě, kde vstupují do proximálního ramena se rachis uzavírá. Jádra se začínají celularizovat a přijímají obsah z centrální cytoplasmy, která díky aktomyosinovému cytoskeletu proudí proximálním směrem (Wolke et al., 2007). V ohybu se buňky organizují se do jedné řady. O zárodečných buňkách v diakinezi, kde dochází k oogenezi, hovoříme jako o oocytech. Oocyt nejbližší ke spermatéce je nazýván -1, druhý oocyt od spermatéky je -2 atd. -1 oocyt prochází meiotickou maturací, která zahrnuje rozpad jaderného obalu, sestavení dělicího vřeténka, segregaci chromozomů a další změny nezbytné pro oplození a proměnu oocytu v embryo (Kim et al., 2013).

#### 1.2.4. Genová exprese v meióze *C. elegans*

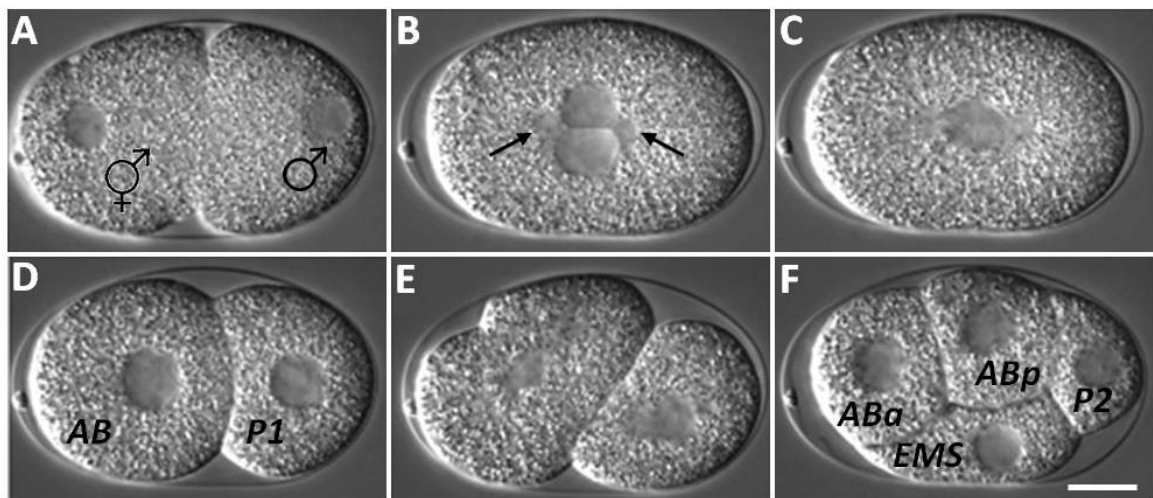
Ohledně celkové genové expresi v profázi meiózy I u *C. elegans* máme k dispozici hodnotné poznatky. Pomocí SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) techniky (Velculescu et al., 1995), která umožňuje kvantitativní a simultánní analýzu velkého množství transkriptů, byl vytvořen seznam genů, které jsou nezbytné pro tvorbu gamet a časnou embryogenezi *C. elegans*. Jedna pětina, zhruba 4700, všech genů hermafrodita *C. elegans* je exprimována v zárodečné linii. Něco přes 1000 genů mají vyšší expresi v zárodečné linii než v somatických buňkách (Wang et al., 2009). Celogenomová analýza expresního profilu pomocí DNA microarray techniky dříve odhalila jen 460 genů, které mají zvýšenou expresi v zárodečné linii *C. elegans* (Reinke et al., 2000). SAGE analýza dále ukázala, že ribozomální geny mají zhruba čtyřikrát vyšší míru exprese v zárodečných než v somatických buňkách (Wang et al., 2009).

Doposud získaná data lokalizující transkripční aktivitu v zárodečných buňkách meiotické profáze u *C. elegans* jsou velmi nejednoznačná. První pokusy o detekci syntézy RNA vycházejí z radioaktivního značení uridinu v gonádách (Starck, 1977, Starck et al., 1983). Z jejich dat bohužel není patrné, zdali se jedná o messenger RNA (mRNA) nebo o ribozomální RNA (rRNA) a hovoří o celkové RNA syntéze. Další studie se spoléhali jen na lokalizaci fosforylované formy RNA polymerázy II, které naznačují uniformní transkripční aktivitu mezi mitotickou zónou v distální části a diploténe (Walker et al., 2007).

#### 1.2.5. Oplození a časná embryogeneze *C. elegans*

Oocyty jsou před oplozením zastaveny ve stádiu diakineze v profázi meiózy I. K fertilizaci dochází ve spermatéce dospělého hermafrodita. Jediná spermie proniká do oocytu, který poté prochází do dělohy, kde oocyt dozrává a začíná embryogeneze (Albertson, 1984). Maternální genom dokončuje meiózu I a vyděluje se první pólóvé tělísko. Následuje

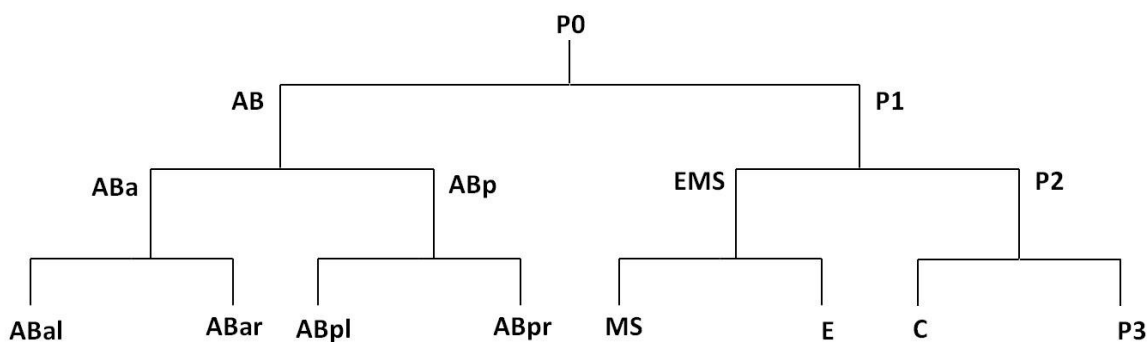
meióza II, která vede k tvorbě druhého pólóvého tělíska (McCarter et al., 1999). Během této doby je DNA spermie ve vysoce kondenzovaném stavu a okamžitě po dokončení meiózy II chromatin dekondenzuje. Formují se maternální a paternální prvojádra a začíná se replikovat DNA (Edgar and McGhee, 1988). Nejprve mateřské prvojádro migruje k prvojádru spermie, poté se společně přesunou do centra zygoty a přitom provedou rotaci o  $90^\circ$  tak, že jsou centrozomy seřazeny v anterior-posteriorní ose připraveny na dělení (Obrázek 5). Pohyby prvojader jsou zprostředkovány paternálně získanými centrozomy, které také formují dělicí vřeténko (Gönczy et al., 1999). Obě prvojádra vstupují do první mitózy, kondenzované chromozomy se seskupují do metafázní roviny a dochází k rozpadu jaderného obalu (Gorjánác and Mattaj, 2009).



**Obrázek 5 Časný embryonální vývoj *C. elegans*.**

A) Formování prvojader; na anteriorní části je mateřské prvojádro, na posteriorní části otcovské prvojádro. B) Obě prvojádra domigrovala doprostřed buňky, šipky ukazují na centromery. C) Metafáze mitózy, zygoty se dělí v předozadní ose. D) Výsledkem prvního dělení jsou blastomery AB a P1. E) AB buňka se dělí kolmo na anterior-posteriorní osu. F) Po druhé mitóze se ve čtyřbuněčném embryu nacházejí blastomery ABa na anteriorní, ABp na dorzální, EMS na ventrální a P2 na posteriorní straně. DIC obrázky byly převzaty od (Alicea et al., 2014). Měřítka je 10  $\mu\text{m}$ .

Zygota *C. elegans* se dělí asymetricky na dvě blastomery. Na anteriorní straně embrya je větší AB buňka, která vytváří vždy somatické části embrya. Na posteriorní části se nachází menší P1 buňka, která je předchůdcem buněk zárodečných a některých somatických. Během druhého dělení se AB buňka dělí symetricky podélně (o 90° k předozadní ose) na buňky ABa a ABp, zatímco P1 blastomera se dále dělí nerovnoměrně příčně za vzniku EMS a P2 linie (Obrázek 5F). Ve třetí sérii dělení vznikají na anteriorní straně buňky ABal, ABar, ABpl a ABpr. Buňka EMS se dělí na linii MS, ze které následně vzniká většina svalových buněk, a E, která je předchůdcem pro střevní buňky. Na posteriorní straně se P2 buňka rozdělí na linii C, která později vytváří hypodermis a svalové buňky, a P3, jež definuje zárodečnou linii (Obrázek 6) (Sulston et al., 1983).



**Obrázek 6 Rodokmen blastomer v časném embryonálním vývoji *C. elegans*.**

Zygota (*P0*) se dělí na anteriorní (*levá strana*) a posteriorní (*pravá strana*) blastomery. Buňky P linie jsou předchůdci zárodečných buněk.

P linie se vždy dělí asymetricky a je charakteristická přítomností P granulí tvořených velkými ribonukloproteiny (Hird et al., 1996). Na konci čtvrté řady dělení vytváří buňku P4, jejíž dceřiné buňky tvoří zárodečnou linii. Všechny ostatní buněčné linie postupně vytvářejí somatické části embrya a následně dospělé.

Před oplozením oocyt *C. elegans* nemá žádné předurčené osy. Spermie proniká do cytoplasmy oocytu na tom místě, které jako první vstoupí do spermatéky. A právě tato část se stává posteriorní. Jádro oocytu osídlí opačnou část cytoplasmy a tím předurčí anteriorní část. První osa, anterior-posteriorní osa, budoucího embrya je tedy určena průnikem spermie do oocytu (Goldstein and Hird, 1996). V průběhu druhého dělení se utváří dorzo-ventrální osa. Blastomera ABp je na dorzální straně a buňka EMS na straně ventrální (Maddox et al., 2007).

#### **1.2.6. Jaderný a cytoplazmatický objem u *C. elegans***

Během embryonálního vývoje *C. elegans* je velmi zřetelná změna ve velikosti buněk. Celkový objem embrya se nemění, protože je omezen vaječným obalem. S každým dělením se tedy zmenšuje velikost blastomer. Japonští badatelé změřili velikosti cytoplasmy a jader v prvních embryonálních stádiích *C. elegans*. Zaměřili se na vztah mezi délkou buněčného cyklu a velikostí blastomer v embryu a ukázali, že tyto dva faktory spolu negativně korelují (Arata et al., 2014). Proměřili také objemy jader a hodnoty použili pro výpočet nukleo-cytoplazmatického poměru. Vyhodnotili, že vztah mezi jaderným a cytoplazmatickým objemem je nelineární a nerovnoměrný. Bylo ukázáno, že velikost embryonální buňky *C. elegans* je zásadní faktor určující účinnost kontrolního bodu během napojování dělicího vřeténka (Galli and Morgan, 2016). Další studie ukázala, že během embryogeneze koreluje délka dělicího vřeténka s velikostí blastomer *C. elegans* (Hara and Kimura, 2009).

Navzdory velmi zřejmému nárůstu velikosti zárodečných buněk během gametogeneze u *C. elegans*, systematické měření objemu buněk a jader v gonádě nebylo dokumentováno. K dispozici tedy nejsou ani rozdíly v nukleo-cytoplazmatickém poměru.

## 2. CÍLE PRÁCE

### **Cíle své práce jsem formulovala těmito body:**

- 1) Připravit vhodný model pro studium chování parentálního chromatinu v raných embryích *C. elegans*. Zdokumentovat vzájemné rozložení mateřského a otcovského chromatinu v prvních cyklech embryonálního dělení a určit časové období, kdy dochází k jeho promíchání.
- 2) Popsat a lokalizovat transkripční aktivitu a její dynamiku v gonádě *C. elegans*. Kvantifikovat míru syntézy mRNA v jednotlivých stádiích profáze meiózy I.
- 3) Porovnat jaderné a cytoplazmatické objemy zárodečných buněk v gonádě dospělého a jednotlivých blastomer v časném embryonálním vývoji *C. elegans* a zjistit nukleo-cytoplazmatický poměr těchto buněk.



### 3. MATERIÁL A METODY

#### 3.1. Kmeny *C. elegans*

##### 3.1.1. Kmeny získané od *Caenorhabditis Genetics Center (CGC)*

(<http://www.cgc.cbs.umn.edu>)

|        |   |
|--------|---|
| N2     | divoký kmen Bristol   |
| EG6699 | [eft-3p::GFP + unc-119]   |
| OD139  | [pie-1p::GFP::PH (PLC1delta1) + unc-119(+)]<br>[pie-1p::YFP::LMN-1 + unc-119(+)]      |
| OD95   | [pie-1p::GFP::PH (PLC1delta1) + unc-119(+)]<br>[pie-1p::mCherry::his-58 + unc-119(+)] |
| TH27   | [pie-1p::GFP::tbg-1 + unc-119(+)]   |
| JH2108 | [pie-1p::GFP::pgl-1::pgl-1 3'UTR + unc-119(+)]  |

##### 3.1.2. Kmeny vytvořené v této práci

|      |  |
|------|--|
| JBL1 | [mex-5p::Dendra2::his-66::tbb-2 3'UTR + unc-119(+)] chromozom II   |
| JBL2 | [mex-5p::Dendra2::his-66::tbb-2 3'UTR + unc-119(+)] chromozom II<br>[pie-1p::GFP::tbg-1 + unc-119(+)] chromozom V  |
| JBL3 | [mex-5p::Dendra2::his-66::tbb-2 3'UTR + unc-119(+)] chromozom II<br>[pie-1p::GFP::pgl-1::pgl-1 3'UTR + unc-119(+)] |

##### 3.1.3. Kmeny *Escherichia coli (E. coli)*

|       |  |
|-------|--|
| OP50  | byl používán jako rutinní potrava pro <i>C. elegans</i> v laboratoři                                 |
| HB101 | díky své tekutější povaze byl používán jako potrava pro kmen EG6699                                  |
| HIM14 | exprimuje him-14 RNA, kmen byl využíván pro produkci samců <i>C. elegans</i> pomocí RNA interference |

### 3.2. Roztoky a pufry

#### NGM Kultivace *C. elegans*

V jednolitrové Erlenmeyerově baňce se naváží 1,5 g NaCl, 1,25 g baktepeptonu a 8,5 g agaru. Dolije se 485 ml dvojitě destilované vody (ddH<sub>2</sub>O) a sterilizuje v autoklávu. Po vychladnutí na cca 55 °C se sterilně přidávají následující sloučeniny: 12,5 ml KPO<sub>4</sub> (1M), 0,5 ml CaCl<sub>2</sub> (1M), 0,5 ml MgSO<sub>4</sub> (1M), 0,5 ml cholesterolu (5 mg/ml v etanolu) a 2,5 ml nystatinu (10 000 U/ml). Řádně se promíchá a po 12 ml pipetuje do 60mm Petriho misek. Nechá se ztuhnout a třetí den je možné je použít na nalití bakteriální kultury (200 µl) přes noc narostlé v růstovém mediu.

#### Egg pufr Izolace embryí *C. elegans*

Rozpustí se 3,448 g NaCl, 1,789 g KCl, 0,147 g CaCl<sub>2</sub> (dihydrát), 0,203 g MgCl<sub>2</sub> (hexahydrát) a 2,979 g hepesu (238,3 g/mol) v 450 ml ddH<sub>2</sub>O. Pomocí 1M NaOH se urovná pH na 7,3 a dorovná se objem na 500 ml dolitím ddH<sub>2</sub>O. Sterilizuje se přes 0,22µm filtr.

#### EED roztok Mikroskopické zobrazování embryí *C. elegans*

Do 50ml zkumavky se odměří 1 ml NaCl (5M), 35 ml ddH<sub>2</sub>O a 2 g sacharózy. Po rozpuštění se vodou ddH<sub>2</sub>O doplní objem na 50 ml a sterilizuje přes 0,22µm filtr.

#### M9 médium Manipulace s dospělci *C. elegans*

Rozpustí se 3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (anhydrát), 7,476 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (dihydrát) a 5 g NaCl v 800 ml ddH<sub>2</sub>O s 1 ml MgSO<sub>4</sub> (1M). Nakonec se pomocí ddH<sub>2</sub>O dorovná objem na 1000 ml a sterilizuje přes 0,22µm filtr.

---

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| Roztok na mražení               | <p><u>Kryokonzervace <i>C. elegans</i></u></p> <p>Rozpustí se 0,29 g NaCl ve 45 ml ddH<sub>2</sub>O, přidá se 0,65 ml K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,5M) a 4,35 ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,5M). Promíchá se a sterilizuje přes 0,22µm filtr. Nakonec se přidá 7,5 ml sterilního glycerolu.</p>   |
| DEPC (diethylpyrokarbonát) voda | <p><u>Voda zbavená stop ribonukleáz pro práci s RNA</u></p> <p>V 1 litru ddH<sub>2</sub>O se v digestoři po kapkách rozpouští 1 ml DEPC, dokud nezmizí olejové skvrny (30 min). Roztok se nechá 12 hodin stát při pokojové teplotě a poté se autoklávuje.</p>   |
| Poly-L-lysinový roztok          | <p><u>Imobilizace gonád na podložní sklo</u></p> <p>Ve 40 ml přehřáté (60 °C) ddH<sub>2</sub>O se rozpustí 0,08 g želatiny. Roztok se zchladí na 37 °C, přidá se 0,008 g KCr(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> a rozmíchá. Dále se přidá 40 µl (1M) NaN<sub>3</sub> a 40 mg poly-L-lysinu (hydrobromid, Mw &gt;300 000 g/mol). Poly-L-lysinový roztok se skladuje při 4 °C.</p> |
| 2X Hybridizační pufr            | <p><u>Single molecule RNA FISH</u></p> <p>Ve 2 ml ddH<sub>2</sub>O se rozpustí 1 g dextran sulfátu, přidá se 200 µl 10% (w/v) hovězí sérový albumin a 1 ml 20X SSC (Ambion/Life Technologies, kat. č. AM9763). Nakonec se pomocí DEPC vody dorovná</p>  |

objem na 5 ml. 2X Hybridizační pufr se skladuje při teplotě -20 °C.

PBS pufr

Fyziologický fosfátový pufr s 0,15M NaCl.

PBST pufr

Imunofluorescence *C. elegans*

Jedná se o 0,02% (v/v) roztok Tweenu-20 v PBS. Do 40 ml PBS se přidá 8 µl Tween-20.

### **3.3. Kultivace *C. elegans***

Kmeny hlístice byly chovány v inkubátorech při teplotě od 15 do 24 °C podle standardní procedury (Stiernagle, 2006). Transgenní kmeny vytvořené v naší laboratoři jsme pro zachování genové exprese v zárodečné linii kultivovali při 24 °C.

#### **3.3.1. Kryokonzervace *C. elegans***

Věkově různorodá populace *C. elegans* s již sežranou vrstvou bakterií na Petriho misce se za sterilních podmínek smyje 1 ml roztoku na mražení a přendá do 1,5ml kryovialky, která se zabalí do silné vrstvy buničiny a vloží do polystyrenové krabice. Ta se uloží do -80 °C. Důležité je, aby teplota v krabici klesala pomalu, asi -1 °C za minutu.

#### **3.3.2. Rozmrazování populace *C. elegans***

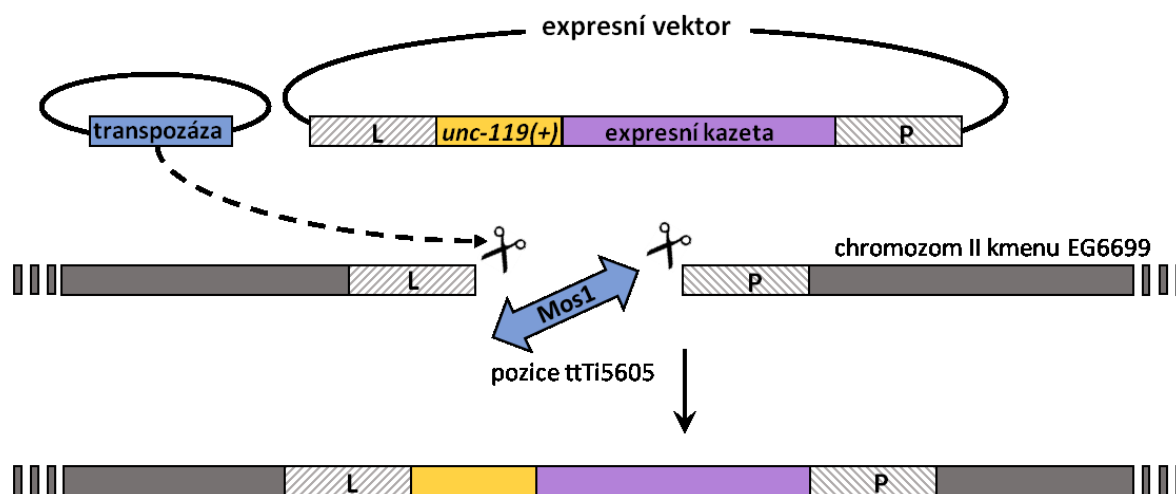
Kryovialka se zamrazenou populací *C. elegans* se vyndá z -80 °C a i z polystyrenové krabice na pokojovou teplotu, kde se nechá bez nadbytečného třepání ve stoje rozmrazit. Po asi 15 minutách se sterilně odpipetuje supernatant a hlístice v peletě se přendají po kapkách na čistou misku s NGM a OP50. Nechá se vsáknout tekutina do agaru a již po několika minutách se začnou první jedinci hýbat.

### 3.3.3. Izolace embryí a dekontaminace *C. elegans*

Populace *C. elegans* se smyje pomocí ddH<sub>2</sub>O do 15ml zkumavky a nechá se klesnout ke dnu. Supernatant se vylije a zkumavka se dolije čistou ddH<sub>2</sub>O. Takto se hlístice ještě dvakrát umyjí, abychom se zbavili většiny bakterií, případně kontaminace. Následně se resuspendují v 3,75 ml ddH<sub>2</sub>O. Přidá se 0,25 ml NaOH (10N) a 1 ml NaClO a řádně protřepe. Po 4-7 minutách občasného promíchání, kdy je většina dospělců rozpuštěna, se líně stočí při 1200 g 30 sekund. Odlíje se supernatant, v peletě zůstala přeživší embrya, a přidá se 5 ml Egg pufri. Zvortexuje se a promytí se opakuje ještě čtyřikrát, dokud se dostatečně nezneutralizuje pH roztoku. Stočená a slitá embrya se ve zbylé tekutině ve zkumavce resuspendují a pomocí pipety, jejíž špička byla propláchnuta v 0,02% Tweenu (v/v), se embrya po kapkách přenesou na čistou NGM misku s OP50 či se uplatní dále v experimentu. Izolovaná embrya jsou velmi přilnavá na polypropylenové materiály, jako jsou špičky, a tak by mohla být lehce ztracena. Proto je nutno tyto nástroje ošetřit slabým roztokem detergentu.

### 3.4. Příprava transgenních kmenů *C. elegans*

Transgenní kmeny byly vytvořeny pomocí metody MosSCI (Mos1-mediated Single Copy Insertion). Jedná se techniku, která je založena na inzerci jediné kopie insertu na přesně definovanou pozici v genomu *C. elegans* zprostředkované Mos1 transposásou (Obrázek 7). Postup je založen na protokolu zveřejněném na stránkách <http://www.wormbuilder.org/test-page/protocol/>. Injikovaný kmen EG6699 má heterozygotně vázanou expresi GFP v celém těle (eft::*GFP*) a genu umožňující normální pohyblivost (*unc-119*). Pro transgenezi byli vybíráni nepohybliví jedinci bez známky zelené fluorescence.



**Obrázek 7 Schéma průběhu transgeneze MosSCI.**

Mos1 transpozón, který je umístěn na nekódujícím lokusu kmenu EG6699 na pozici *ttTI5605* chromozomu II, může být vystřížen transpozázovou aktivitou za vzniku dvouvláknového zlomu chromozomu. Toto přerušení DNA může být opraveno díky homologní rekombinaci při uplatnění expresního vektoru s homologními rameny (*L* a *P*). Gen pro pozitivní selekci a expresní kazeta se tak začlení do chromozomu na pozici *ttTI5605*.

### 3.4.1. Příprava mikroinjikační směsi

Vedle vektorů kódujících transgen (na plasmidu pCFJ150, veškeré plasmidy jsou k dispozici na webu [www.addgene.org](http://www.addgene.org)) a Mos1 transpozázu (pCFJ601) se do mikroinjikační směsi přidávaly plasmidy pro negativní selekci: mCherry vektory s expresí v nervovém systému (pGH8), ve farynxu (pCFJ90) a ve svalech podél těla (pCFJ104), jako vizuální negativní selekční systém, a vektor s toxinem PEEL-1 indukovaný tepelným šokem (pMA122) pro usmrcení transgenních jedinců s insertem, který se neintegroval do chromozomu. Směs plasmidů pro mikroinjikaci byla připravena podle Tabulky 1. Objem 20  $\mu$ l byl doplněn sterilní ddH<sub>2</sub>O. Aby se maximálně zabránilo ucpání mikroinjikační jehly případnými nečistotami přítomných v zásobních roztocích, stočila se směs 15 minut na 11 000 g při 4 °C a 18  $\mu$ l supernatantu se přeneslo do čisté zkumavky pro další použití.

| plasmid            | doporučená<br>konečná<br>koncentrace | použitá konečná<br>koncentrace | koncentrace<br>zásoby<br>plasmidů | objem použitý<br>pro 20 $\mu$ l směsi |
|--------------------|--------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|
| pCFJ601            | 50 ng/ $\mu$ l                       | 50,0 ng/ $\mu$ l               | 250 ng/ $\mu$ l                   | 4,0 $\mu$ l                           |
| pGH8               | 5-10 ng/ $\mu$ l                     | 7,2 ng/ $\mu$ l                | 60 ng/ $\mu$ l                    | 2,4 $\mu$ l                           |
| pCFJ90             | 2-2,5 ng/ $\mu$ l                    | 1,5 ng/ $\mu$ l                | 50 ng/ $\mu$ l                    | 0,6 $\mu$ l                           |
| pCFJ104            | 5-10 ng/ $\mu$ l                     | 7,8 ng/ $\mu$ l                | 65 ng/ $\mu$ l                    | 2,4 $\mu$ l                           |
| pMA122             | 10 ng/ $\mu$ l                       | 10,0 ng/ $\mu$ l               | 250 ng/ $\mu$ l                   | 0,8 $\mu$ l                           |
| pCFJ150 + transgen | 10-50 ng/ $\mu$ l                    | 20,0 ng/ $\mu$ l               | 250 ng/ $\mu$ l                   | 2,0 $\mu$ l                           |

**Tabulka 1 Složení mikroinjikační směsi pro transgenezi *C. elegans* pomocí mikroinjikace.**

### 3.4.2. Příprava agarózových sklíček

Rozehřátá 2% (w/v) agaróza v ddH<sub>2</sub>O se kape na krycí skla (24 x 60 mm, No. 1). Na takto vytvořené kapky se okamžitě přiklopí jiné krycí sklo a nechá 2 min ztuhnout. Poté se skla rozdělí a to, na kterém ulpěla tenká vrstva agarózy, se nechá do druhého dne při pokojové teplotě zaschnout.

### 3.4.3. Příprava *C. elegans* pro mikroinjikaci do gonád

Vybraní nepohybliví (*unc-199*-) jedinci kmenu EG6699 ve stádiu L4 až mladý dospělý se pod stereomikroskopem po jednom až po třech pomocí řasové špičky (oční řasa přilepená vteřinovým lepidlem na hrot 1000 $\mu$ l špičky slouží pro jemnou manipulaci s dospělci a embryi *C. elegans*) pokládají na do kapky minerálního oleje agarózovém sklíčku. Tím dojde ke spolehlivé imobilizaci. Tělo červa je možno ještě pomocí řasové špičky jemně pootočít, dokud není alespoň jedna gonáda jasně viditelná. Poté je třeba okamžitě provést injikaci (viz kapitola 3.4.5. Mikroinjikace *C. elegans*) a co nejrychleji háďátko hydratovat v M9 pufru. Přibližně po 3 minutách v těchto podmínkách pod olejem červ vysychá.

#### 3.4.4. Příprava injikační jehly

Pomocí prodloužené špičky se napipetuje 1-2  $\mu$ l mikroinjikační směsi do připravené jehly vytažené ze skleněné kapiláry s vláknem (0.78 x 1.00 x 100 mm, Science products, GB100TF-10). Naplněná jehla se upevní do držáku mikromanipulátoru, který by měl s vodorovnou rovinou svírat úhel 20°. Pomocí kovové lžičky se v agarózové vrstvě na připraveném skle vytvoří rýhy, toto sklo se namontuje pod mikroskop a využitím vzniklých rýh se jehla otevře tak, že se odlomí její špička. Toto je velmi kritický moment pro celé injikování, na kterém záleží úspěšnost transgeneze. Příliš velký otvor může vážně poškodit tělo hermafrodita, příliš malý otvor se na druhou stranu lehce zanesou a ucpe.

#### 3.4.5. Mikroinjikace *C. elegans*

Agarózové sklo s háďátkem se umístí do mikroskopu, pod 5X objektivem se přitáhne jehla k tělu červa a injikuje se pod 32X objektivem při injikačním tlaku 600 hPa po dobu 3 ms. Poté se na sklo pod stereomikroskopem přidá kapka M9 pufru, aby se nainjиковaní jedinci hydratovali. Ti se pak pomocí řasové špičky přesunou ze skla na Petriho misku s NGM a OP50 a inkubují při 24 °C.

#### 3.4.6. Výběr a ověření pozitivních jedinců

Pozitivní transgenní jedinci byli normálně pohybliví, vykazovali nulovou mCherry fluorescenci a nebyli usmrceni působením toxinu PEEL-1 indukovaném při teplotě 34 °C po dobu 1h. Pro potvrzení, že tito jedinci opravdu obsahují celý a neporušený transgen na správném místě v chromozomu, se nejprve z těchto hlístic vyizolovala genomická DNA (gDNA) pomocí soupravy DNeasy® Blood & Tissue KIT od Qiagenu. gDNA se pak použila na amplifikaci předělu původního chromozomu a vkládaného insertu pomocí reakce PCR s následujícím složením a parametry (Obrázek 8):





**Obrázek 8 Strategie ověření správného vložení insertu do chromozomu transgenního kmenu pomocí PCR.** Kombinace přímého (A) a zpětného primeru (B) je pro ověření místa vloženého transgenu. Očekávaná velikost PCR produktu je 1,8 kb. Kombinace přímého (C) a zpětného primeru (D) potvrdí celistvost transgenu. Očekávaná velikost PCR produktu závisí na variabilní velikosti insertu.

|   |            |
|---|------------|
| gDNA  | 40-100 ng  |
| Primery (25 pmol/μl):                         |            |
| A: 5'-TCTGGCTCTGCTTCTTCGTT-3'                 | 0,5 ul     |
| B: 5'-CAATTCATCCCGGTTTCTGT-3'                 | 0,5 ul     |
| směs dNTP (10mM)                              | 0,5 ul     |
| DreamTaq DNA polymeráza 5 U/ul                | 0,3 ul     |
| 10X DreamTaq pufr (s 20mM MgCl <sub>2</sub> ) | 2,5 ul     |
| ddH <sub>2</sub> O                            | do 25,0 ul |

|                      |       |
|----------------------|-------|
| 94 °C.....3 min      | } 26x |
| 94 °C.....30 s       |       |
| 54 °C.....30 s       |       |
| 72 °C.....1 min 45 s |       |
| 72 °C.....5 min      |       |

Následovala druhá PCR reakce pro ověření délky a neporušenosti vkládaného transgenu:

|                                 |            |
|---------------------------------|------------|
| gDNA                            | 70-100 ng  |
| primery (25 pmol/μl):           |            |
| C: 5'-ACCGGAAACCAAAGGACGAGAG-3' | 0,5 ul     |
| D: 5'-ACGCCAGGAGAACACGTTAG-3'   | 0,5 ul     |
| směs dNTP (10mM)                | 0,5 ul     |
| Phusion DNA polymeráza 2 U/μl   | 0,3 ul     |
| 5X HF Phusion pufr              | 5,0 ul     |
| ddH <sub>2</sub> O              | do 25,0 ul |

|            |           |     |
|------------|-----------|-----|
| 98 °C..... | 2 min     | 26x |
| 98 °C..... | 20 s      |     |
| 67 °C..... | 30 s      |     |
| 72 °C..... | 3 min 30s |     |
| 72 °C..... | 5 min     |     |

### 3.5. Produkce kříženců *C. elegans*

Pro získání kříženců *C. elegans* se využívá samců, kteří jsou v populaci sice velmi vzácní, avšak lze si je uměle vytvořit. Děje se tak na základě indukované ztráty X chromozomu pomocí RNA interference zprostředkované bakteriálním kmenem HIM-14 v potravě *C. elegans* (Killian and Hubbard, 2001). Absence *him* genu zvyšuje frekvenci nespojených X chromozomů v zárodečné linii a následně stoupá i počet narozených samců přes samooplození. Je doporučeno náležitě zvážit, který kmen bude použit pro tvorbu samců. V případě jediného fluorescenčního značení je pro snadnější rozpoznání heterozygotů v F1 generaci lepší zvolit transgenní linii jako samce a N2 jako hermafrodity.

#### 3.5.1. Příprava samců

Kultura HIM-14 se inkubuje 16 hodin při 37 °C v růstovém médiu obohaceném o tetracyklin (12,5 µg/ml) a karbenicilin (50 µg/ml) v konečném objemu 0,2 ml x N, kde N je počet potřebných misek. Druhý den ráno se bakteriální kultura naseje (200 µl) na misky s NGM obsahující ampicilin (50 µg/ml), tetracyklin (12,5 µg/ml) a isopropyl-β-D-thiogalaktopyranisid (IPTG; 1mM). Misky se nechají 24 hodin ve tmě, aby se indukovala exprese dvouvláknové RNA. Další den ráno se přenesou vždy 10 jedinců L3-L4 stádia zvoleného kmenu hermafroditů na připravené misky s HIM-14, kde se při 20 °C nechají, dokud nevyčerpají všechnu potravu. Poté se agar i s háďátkou rozdělí na čtyři díly a ten se

každý dá na čerstvou NGM misku tentokrát již s OP50. Inkubujeme dále při 20 °C. Asi 10. den od přenosu hermafroditů na HIM-14 misky se v F2 generaci objeví samci. Pro úspěšné křížení je vhodné uplatnit samce nejlépe hned po jejich objevení.

### **3.5.2. Křížení hermafroditů s vytvořenými samci a získání homozygotních kříženců**

Získané samce použijeme pro páření s hermafrodity jiného kmenu. Tento postup je založen na protokolu od (Green et al., 2008) publikovaném v *Methods in Cell Biology*. Šest hermafroditů ve stádiu L4 jednoho kmenu se přenesou na NGM misku s OP50 společně se šesti samci kmenu druhého. Inkubuje se 20 hodin při 20 °C v případě exprese transgenu v zárodečné linii a při 24 °C v případě exprese v dospělých. Poté se těchto šest F0 hermafroditů přesune na novou misku, kde je každý jedinec sám. O tři dny později se prověří F1 generace na přítomnost samců, kteří jsou známkou toho, že původní hermafrodit byl oplodněn samcem. To se pozná tak, že zhruba 50 % F1 populace jsou samci. V případě neúspěšného křížení je možné libovolně měnit poměry v počtu samců a hermafroditů. Vyberou se čtyři F1 hermafroditi z každé misky, kde došlo ke křížení, přesunou se každý na svou Petriho misku a nechají se množit až do doby, kdy další generace doroste do dospělosti. Pro získání homozygotních jedinců se opět vyberou čtyři jednotlivci F2 generace z každé misky, přendají do jedné komůrky 12jamkové destičky s NGM a OP50 tak, že v každé jamce je jeden hermafrodit a nechají se opět množit do doby, kdy další generace doroste do dospělosti. Nyní se přezkoumá pod fluorescenčním mikroskopem minimálně 40 hermafroditů F3 generace z každé misky. Pokud jsou všichni zkoumaní jedinci pozitivní na fluorescenční značení, můžeme považovat linii za homozygotní.

### **3.6. Příprava živých vzorků *C. elegans* pro mikroskopování**

#### **3.6.1. Embrya *C. elegans***

Aby se embrya nedeformovala mezi mikroskopickými skly, podkládají se agarózovým polštářkem. Ten se připraví rozehřátím 2% (w/v) agarózy v EED roztoku, který se postupně kape na podložní sklo polepené na krajích dvěma vrstvy lepicí pásky tak, že po přiložení druhého podložního skla na ještě teplou kapku se agaróza mezi skly vytvaruje do asi 1 mm silné a 1 cm široké vrstvy. Tyto polštáře se mohou skladovat v EED roztoku maximálně 3 týdny. Embrya se získají disekcí dospělců v místě vulvy pomocí dvou injekčních jehel 24G v EED roztoku. 1) Jednotlivá embrya se aspirují do úzké skleněné kapiláry propláchnuté v 0,02% (v/v) Tweenu v EED roztoku a přetransportují na agarózový polštář. Poté se pomalu přiklopí krycím sklíčkem. Nebo 2) se disekce provádí přímo na krycím sklu (18 mm x 18 mm, tloušťka  $170 \pm 5 \mu\text{m}$ , # 1,5) v asi 2  $\mu\text{l}$  EED roztoku a poté se sklíčko pomalu položí na polštář. Druhá možnost je sice rychlejší a s menšími ztrátami embryí než možnost první. Na druhou stranu jsou mezi embryi přítomny i pozůstatky dospělců, které mohou snižovat kvalitu preparátu. Rohy krycího sklíčka se zafixují k podložnímu sklíčku pomocí kapek vosku z běžné svíčky. Do prostoru mezi skly se napipetuje pár kapek minerálního oleje, který se rozprostře kolem polštářku a tak zabrání možnému vysychání vzorku. Výsledný preparát je připravený na mikroskopování po dobu i několika hodin (< 3 hodiny) aniž by došlo k vysušení embryí.

Živá embrya byla snímána při pokojové teplotě na Olympus IX81 fluorescenčním mikroskopu vybaveným rotujícím diskem Andor Revolution, FRAPPA modulem, olejovým 100× objektivem (NA 1,4) a kamerou Andor iXon Ultra 897 EMCCD.

#### **3.6.2. Dospělci *C. elegans***

Hlístice *C. elegans* jsou velmi pohyblivé a mrštné, proto je potřena hád'átka za účelem mikroskopování znehybnit. Zároveň je ovšem třeba zachovat jim fyziologické prostředí v

průběhu snímání. Jednou z možností je červy chemicky paralyzovat pomocí 100 $\mu$ M roztoku levamisolu v pufru M9. Ovšem působení levamisolu negativně ovlivňuje jadernou architekturu (P. Askjaer, osobní rozhovor s Christianem Lanctôtem). V naší laboratoři se dospělci *C. elegans* imobilizují mechanicky za pomoci agarózových polštářků a nanokuliček.

Nejprve se nachystají 10% agarózové polštářky. Ty se připraví rozehrátím 10% (w/v) agarózy v M9 pufru, která se postupně kape na podložní sklo polepené na krajích dvěma vrstvy lepicí pásky tak, že po přiložení druhého podložního skla na ještě teplou kapku se agaróza mezi skly vytvaruje do asi 1 mm silné a 1 cm široké vrstvy. Tyto polštáře se mohou skladovat v M9 pufru maximálně 3 týdny. Propláchnuté křemičité kuličky o velikosti 300 nm (Sicastar<sup>®</sup> od Micromod, povrch Ni-NTA) se promyjí v M9 pufru a zkoncentrují přibližně na 100 mg/ml. Na podložní sklíčko se položí agarózový polštářek a nechá se lehce vysušit na vzduchu tak, že na něm nejsou patrné stopy od tekutiny. Na krycí sklíčko (18 mm x 18 mm, tloušťka 170  $\pm$  5  $\mu$ m, # 1,5) se napipetují 2-3  $\mu$ l kuliček, do kterých se postupně pomocí řasové špičky pokládají dospělci *C. elegans* (asi 10 kusů). Poté se pod stereomikroskopem krycí sklíčko pomocí jemné pinzety otočí, velmi pomalu se položí na agarózu a šetrně přimáčkne, dokud nedojde k úplné imobilizaci dospělců. Rohy krycího sklíčka se zafixují k podložnímu sklíčku pomocí kapek vosku z běžné svíčky. Do prostoru mezi skly se napipetuje pár kapek minerálního oleje, který se rozprostře kolem polštářku a tak zabrání možnému vysychání vzorku. Výsledný preparát je připravený na mikroskopování po dobu i několika hodin (< 6 hodin), aniž by došlo k nefyziologické kompresi či dokonce úmrtí dospělého.

Živá hádátka byla snímána při pokojové teplotě na Leica TCS SP8 konfokálním fluorescenčním mikroskopu vybaveným vodním 63 $\times$  objektivem (NA 1,2) a detektory photomultiplier tube (PMT) a hybridním HyD.

### **3.7. Příprava *C. elegans* vzorků na SPIM (selective plane illumination microscopy)**

Vybraní dospělci se přenesou do zkumavky s 10  $\mu$ l levamisolu (0,5mM) v M9 pufru. K nim se přimíchá 200  $\mu$ l přehřáté 1% (w/v) agarózy (se sníženým bodem tání). Výsledná suspenze se natáhne do skleněné kapiláry a nechá ztuhnout. Kapilára se namontuje do komůrky Zeiss Z.1 SPIM mikroskopu zaplněné vodou. Jedinci *C. elegans* byli zobrazováni při pokojové teplotě pomocí 20 $\times$  vodního objektivu (NA 1,0). Krok v ose z byl 2  $\mu$ m.

### **3.8. Příprava podložních skel potažených poly-L-lysinem**

Poly-L-lysin je pozitivně nabitý syntetický řetězec aminokyselin, který zprostředkuje přichycení proteinů a buněk k pevnému povrchu. Poly-L-lysin pokrytá podložní skla umožní imobilizaci embryí a gonád (případně i larev a jiných orgánů *C. elegans*) pro jejich následnou fixaci a další zpracování pro mikroskopování.

Dvě podložní skla se inkubují v poly-L-lysinovém roztoku 5 minut. Poté se skla vyjmou, oddělí od sebe a vnějšími stranami navrch se na vzduchu při pokojové teplotě důkladně vysuší.

### **3.9. Imunofluorescenční značení gonád *C. elegans***

Gonády byly izolovány z mladých dospělců *C. elegans*, kteří se na podložním skle disektují v M9 pufru pomocí 24G jehel. Jednotlivé gonády se pomocí ústní kapiláry propláchnuté v 0,02% (v/v) Tweenu v M9 pufru vyberou a přenesou na sklo ošetřené poly-L-lysinem. Nechají se usadit. Na sklo okolo kapky s gonádami se přilepí silikonový kroužek (vnitřní průměr 13 mm, hloubka 2,5 mm, objem 200  $\mu$ l), který poslouží jako inkubační komůrka. Kapilárou se opatrně odsaje co možná nejvíce tekutiny. Následně se

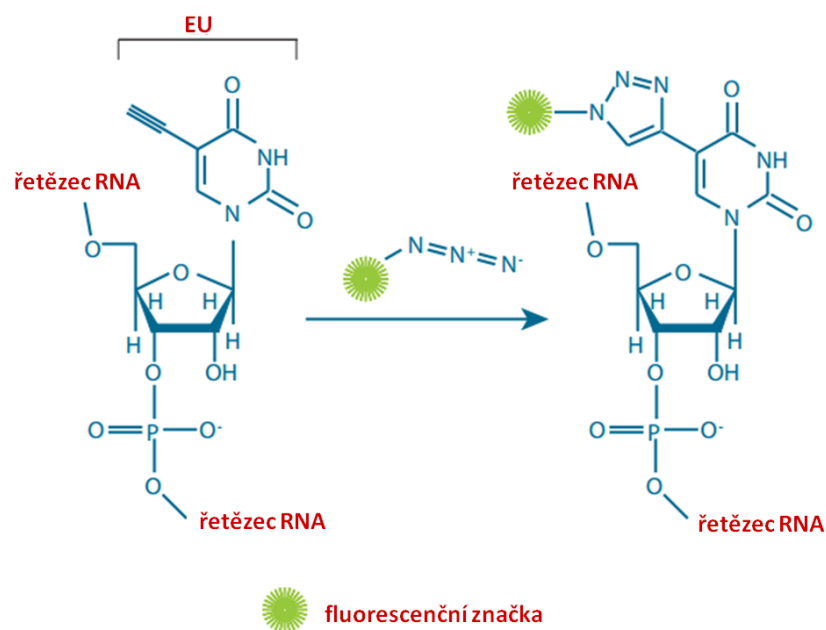
gonády fixují 200  $\mu$ l 2% (v/v) formaldehydem v PBS pufru při pokojové teplotě po dobu 10 min. Poté se fixační roztok odstraní a komůrka se dvakrát promyje PBS pufrem. Následuje 5minutová permeabilizace pomocí 0,2% (v/v) Triton X-100 v PBS pufru. Komůrka se dvakrát promyje PBS pufrem a blokuje se 200  $\mu$ l 5% normálním kozím sérem (NGS) 30 minut při pokojové teplotě. V PBST s 5% NGS se naředí primární protilátka (myší monoklonální proti fosforylované formě serinu5 C-terminální domény RNA polymerázy II, 4H8, kat. č. 05-623, Millipore) (200  $\mu$ l), ve které se 90 minut inkubují gonády při pokojové teplotě. Protilátka se odstraní a gonády se promývají třikrát 3 minuty v PBST na třepačce. Následně se gonády 40 min inkubují při pokojové teplotě v sekundární protilátce (kozí značená Cy5 fluorochromem proti myší IgG), která je naředěná v PBST s 5% NGS (200  $\mu$ l). Protilátka se odstraní a gonády se opět promývají třikrát 3 minuty v PBST na třepačce. Následuje jedno promytí v PBS a pak se gonády barví 2 minuty v 2 $\mu$ g/ml DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) v PBS. Následuje konečné promytí v PBS. Odstraní se silikonová komůrka. Na krycí sklíčko (18 mm x 18 mm, tloušťka 170  $\pm$  5  $\mu$ m, # 1,5) se napipetuje 10  $\mu$ l montovacího média ProlongGold. To se poté přiklopí na podložní sklo s gonády a odsaje přebytečné médium a pufr z okrajů. Nechá se 24 hodin ve tmě sušit a zafixuje lakem na nehty.

Imunofluorescenčně značené gonády byly snímány na Leica TCS SP8 konfokálním fluorescenčním mikroskopu vybaveným olejovým 63 $\times$  objektivem (NA 1,4) a detektory photomultiplier tube (PMT) a hybridním HyD.

### **3.10. Značení nascentní RNA v gonádách *C. elegans***

Transkripční aktivita byla zobrazována pomocí nukleosidového analogu uracilu, 5-etylnyluridinu (EU), který se inkorporuje do sekvence RNA v průběhu její syntézy. Detekce EU je založena chemické reakci alkynu na EU s fluorescenčně značeným azidem (Obrázek 9). Protože je cílem tohoto experimentu detekce RNA, všechny použité roztoky jsou

míchány z DEPC-ošetřené ddH<sub>2</sub>O a veškeré pracovní postupy byly organizovány tak, aby se minimalizoval kontakt preparátu s všudypřítomnou RNázovou aktivitou na neošetřených površích.



**Obrázek 9** Reakce mezi EU inkorporovanou do RNA a flourescenčně značeným azidem. Převzato z protokolu od Invitrogenu zveřejněném na webu [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com))

Gonády byly izolovány z mladých dospělců *C. elegans*, kteří se na podložním skle disektují v Egg pufru pomocí 24G jehel. Jednotlivé gonády se pomocí ústní kapiláry propláchnuté v 0,02% (v/v) Tweenu v Egg pufru vyberou a přenesou na sklo ošetřené poly-L-lysinem. Ke gonádám se přidá tolik 4mM EU v Egg pufru, aby výsledná koncentrace EU v suspenzi gonád činila 2 mM, a inkubuje se 15 min při pokojové teplotě. Mezitím se na sklo okolo kapky s gonádami přilepí silikonový kroužek (vnitřní průměr 13 mm, hloubka 2,5 mm, objem 200  $\mu$ l), který poslouží jako inkubační komůrka. Gonády se



fixují 200  $\mu$ l 2% (v/v) formaldehydu v Egg pufru při pokojové teplotě po dobu 15 min. Poté se fixační roztok odstraní a komůrka se promyje Egg puftrem. Následuje 5minutová permeabilizace pomocí 0,2% (v/v) Triton X-100 v Egg pufru. Komůrka se opět promyje Egg puftrem. Následně se připraví Click-iT<sup>®</sup> reakce (reagencie jsou součástí komerčního kitu od Life Technologies, kat. č. E10345):

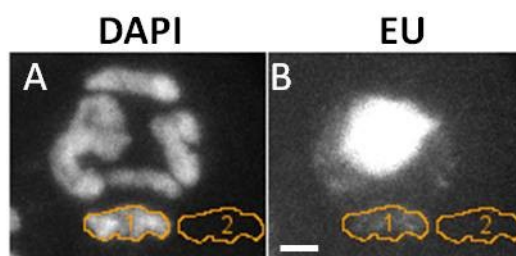
|  |              |
|--|--------------|
| 1X Click-iT <sup>®</sup> reakční pufr      | 171 $\mu$ l  |
| CuSO <sub>4</sub> 100 mM                   | 8 $\mu$ l    |
| 1X Click-iT <sup>®</sup> aditiva           | 20 $\mu$ l   |
| Alexa Flour <sup>®</sup> 488 azid          | 0,72 $\mu$ l |
| <hr/>                                      |              |
| celkový objem Click-iT <sup>®</sup> reakce | 200 $\mu$ l  |

Gonády se v Click-iT<sup>®</sup> reakční směsi inkubují 30 minut ve tmě. Odstraní se reakční směs a přidá 200  $\mu$ l Click-iT<sup>®</sup> promývací pufr. Gonády se poté promyjí Egg puftrem a barví 2 minuty v 2 $\mu$ g/ml DAPI v Egg pufru. Následuje konečné promytí Egg puftrem. Odstraní se silikonová komůrka. Na krycí sklíčko (18 mm x 18 mm, tloušťka 170  $\pm$  5 mm, # 1,5) se napipetuje 10  $\mu$ l montovacího média ProlongGold. To se poté přiklopí na podložní sklo s gonády a odsaje přebytečné médium a pufr z okrajů. Nechá se 24 hodin ve tmě sušit a zafixuje lakem na nehty.

EU značené gonády byly snímány na Leica TCS SP8 konfokálním fluorescenčním mikroskopu vybaveným olejovým 63 $\times$  objektivem (NA 1,4) a detektory photomultiplier tube (PMT) a hybridním HyD. Nebo na super-rezolučním mikroskopu Nikon Eclipse Ti-E se strukturovaným osvětlením (Structured Illumination Microscopy, SIM) vybaveným olejovým 100 $\times$  objektivem (NA 1,49) a kamerou Hamamatsu.

### 3.11. Obrazová analýza EU značení

Pro kvantifikaci míry inkorporace EU do mRNA byly nejprve získány detailní snímky jader značených pomocí DAPI a EU a synchronizovány v programu Fiji/ImageJ (Obrázek 10). Měřeny byly průměrné intenzity signálu v místě chromatinu. Analyzována byla jádra ve fázi mitotické, pachyténe časné, střední a pozdní, diploténe a diakinezi. V každé zóně bylo měřeno obvykle 5 jader na jednu gonádu. Celkem bylo analyzováno 7 gonád. Nejprve byla od signálu na pozici chromatinu odečtena intenzita pozadí. Výsledné hodnoty pro každou fázi se zprůměrovaly. Výsledky v dané fázi odpovídají průměrně 29 měření. Pro názornost byly získané hodnoty vztaženy k nejnižším hodnotám (v diakinezi) a vyneseny do grafu v kapitole 4.2.4. Zobrazení transkripční dynamiky v gonádě *C. elegans* pomocí EU inkorporace.

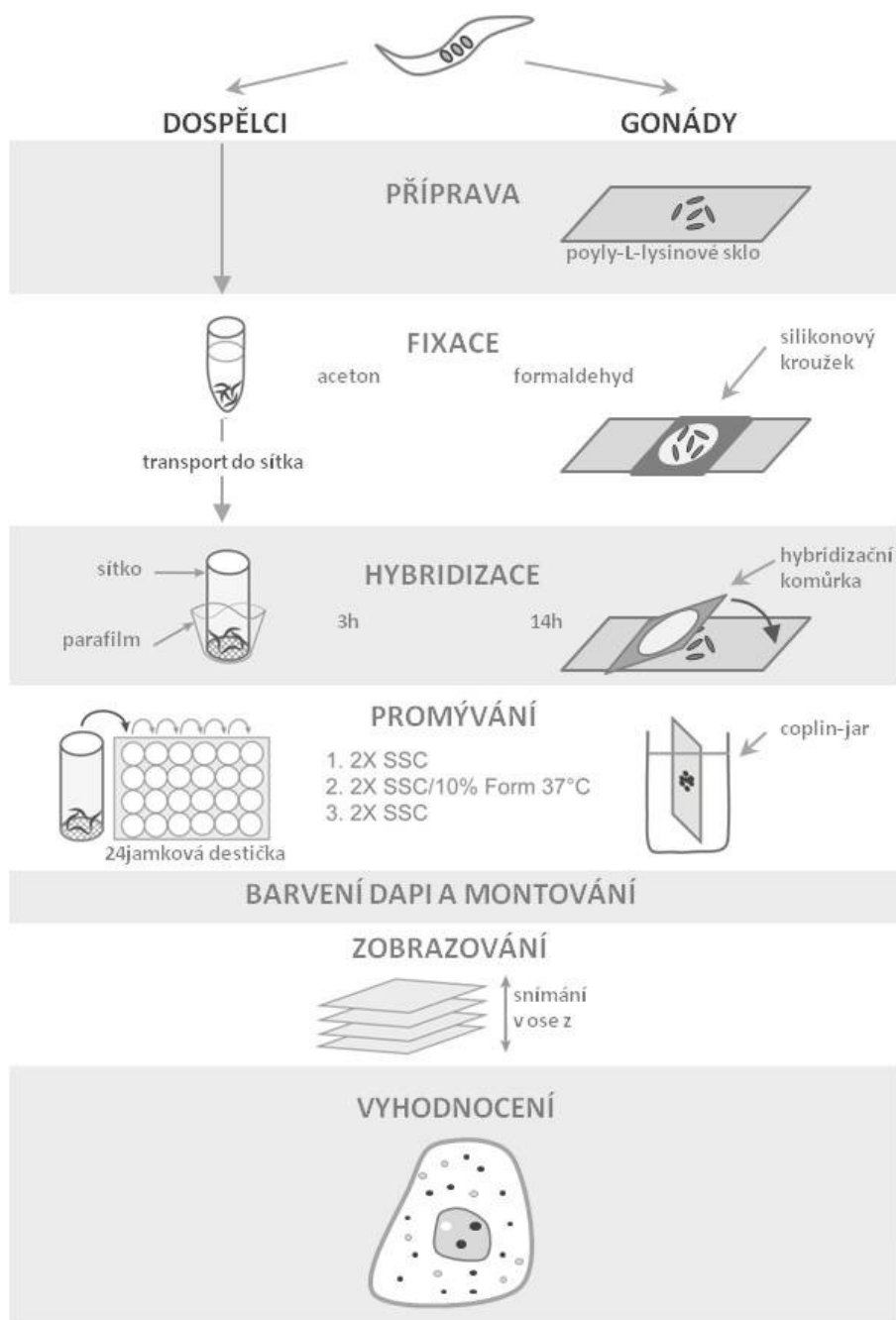


**Obrázek 10** Znárodnění analýzy obrazu EU značení.

Chromozomy značené DAPI (A, *obrys 1*) v jednotlivých fázích profáze meiózy I nám pomohly označit kontury EU inkorporovaného do mRNA na chromatinu (B, *obrys 1*). U obou značení byla změřena průměrná intenzita signálu uvnitř vyznačených obrysů. Pro získání intenzity pozadí byla měřena fluorescenční signál vně jádra, tedy v cytoplasmě (*obrys 2*). Měření bylo provedeno na jedné optické sekci. Měřítka je 1  $\mu\text{m}$ .

### **3.12. Single molecule RNA FISH**

Použité próby pro single molecule RNA FISH (smRNA FISH) byly připraveny přes aplikaci Stellaris RNA FISH probe designer na webu firmy Biosearch Technologies (<https://www.biosearchtech.com/stellarisdesigner/>). Próby o délce 20 nukleotidů byly značené na 3' konci fluorescenční Quasar barvičkou, *sbp-1* pomocí Quasar 570, *pho-1* a *vha-11* pomocí Quasar 670. Celou délku mRNA pokrývalo 48 prób. Značené oligonukleotidy byly resuspendovány v 10mM Tris-HCl (pH 8) na koncentraci 25  $\mu$ M a skladovány při -20 °C. Dospělci byli značeni v hybridizačním sítku, zatímco izolované gonády byly připevněny na poly-L-lysinovém skle (Obrázek 11).

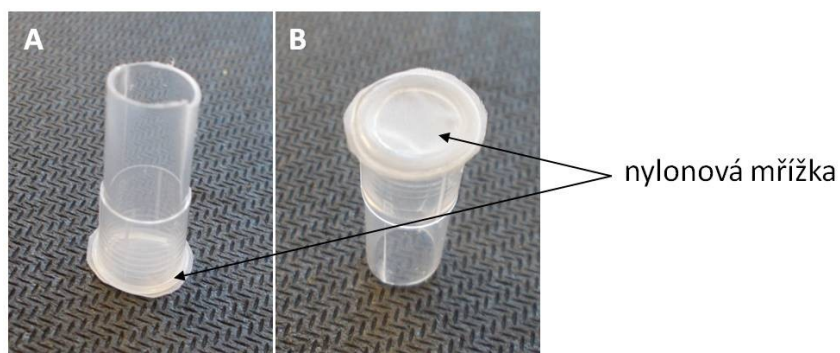


**Obrázek 11 Schéma protokolu smRNA FISH na *C. elegans* vzorcích.**

Postup značení se provádí v suspenzi pro dospělé a L4 larvy *C. elegans* (vlevo) nebo na skle pro izolované gonády (vpravo). Hlavní kroky protokolu jsou: příprava vzorku, fixace, hybridizace, promývání, barvení DAPI a montování, zobrazování a vyhodnocení. Vedle způsobu manipulace se vzorky (v sítku nebo na skle) hlavními rozdíly mezi těmito postupy jsou: (1) izolace gonád z mladých dospělců; (2) použité fixativum, tedy aceton nebo formaldehyd; (3) kratší hybridizační doba u vzorku v suspenzi.

### 3.12.1. smRNA FISH na dospělých *C. elegans*

Celý proces značení probíhal v suspenzi a dospělá háďátka byla z jednoho roztoku do dalšího přemísťována pomocí vytvořeného hybridizačního sítka (Obrázek 12).



**Obrázek 12** Filtrační sítko pro manipulaci s dospělci a L4 larvami pro značení metodou smRNA FISH. Sítko bylo vyrobeno z odstřižené tupé části špičky P1000 a nylonové mřížky Nitex. Hotové sítko je zobrazeno v orientaci manipulační A) a převrácené B) pro detail upevnění mřížky na špičku.

Filtrační sítko se připraví následovně. Ustříhne se zhruba 2 cm<sup>2</sup> velký kousek nylonové membrány Nitex (velikost ok 50 µm, výrobce Sefar, kat. č. 03-50/37, pořízeno od Dominique Dutcher Inc., kat. č. 074010). Odstříhne se asi 2 cm od širšího okraje špičky P1000. Okruží vzniklé rourky se krátce roztaví nad ohněm a ihned se přitiskne na čtverec nylonové látky. Zkontroluje se, že je membrána řádně přichycena ke špičce, a okraje se odstříhnou.

Dospělci *C. elegans* z alespoň jedné plně narostlé 60mm misky se přenesou do 15ml skleněné zkumavky s kónickým dnem. Háďátka se nechají usadit a ještě dvakrát se promyjí pomocí DEPC vody. Opět se nechají usadit a odstraní se co nejvíce tekutiny. K peletě se přidají 4 ml ledového (-20 °C) acetonu a jemně promíchá. Během 10minutové fixace při pokojové teplotě mají háďátka tendenci agregovat. Nechají se usadit. Fixovaná háďátka se následně hydratují, kdy se shluky postupně uvolňují. Odstraní se 2 ml acetonu a

nahradí se stejným množstvím PBS. Inkubuje se další 2 minuty. Poté se odstraní 2 ml již naředěného acetonu, nahradí se stejným množstvím PBS a promíchá. Inkubuje se další 2 minuty. Pomocí pipety, která byla propláchnuta v 0,02% (v/v) Tweenu, se směs hád'átek přecedí přes připravené hybridizační sítko. Dospělci a L4 larvy zůstanou v sítku zadrženy.

Od této chvíle se s hád'átky manipuluje jen pomocí sítko. To se nejprve propláchne v 1,5 ml PBS v jedné komůrce 24jamkové destičky. Poté přenesse do další komůrky s 1,5 ml PBS, kde se 5 minut inkubuje. Sítko se přenesse do další komůrky s 10% formamidem v 2X SSC, kde se propláchne, a poté se přenesse do další komůrky novým s 10% formamidem v 2X SSC, kde se inkubuje alespoň 15minut, aby se vyrovnaly koncentrace. Připraví se hybridizační směs:

|   |                              |
|---|------------------------------|
| Próby (25 $\mu$ M)                        | 1 $\mu$ l                    |
| DEPC-voda                                 | 32 $\mu$ l                   |
| Kvasinková tRNA (10 mg/ml)                | 2 $\mu$ l                    |
| Ribonukleosid-vanadylový komplex (200 mM) | 5 $\mu$ l                    |
| Formamid                                  | 10 $\mu$ l                   |
| 2X hybridizační pufr                      | 50 $\mu$ l                   |
| <u>celkový objem hybridizační směsi</u>   | <u>100 <math>\mu</math>l</u> |

Směs s konečnou koncentrací próby 250 nM a 10% formamidem se důkladně promíchá. Sítko se odebere z předešlého roztoku a odstraní se co nejvíce tekutiny, nejlépe odsátím skrz membránu sítko. Připraví se čtverec parafilmu ( $\sim 2 \text{ cm}^2$ ), do kterého se zabalí dno sítko. K hád'átkům se napipetuje hybridizační směs. Obsah sítko se jemně províří a ujistíme se, že jsou všechna hád'átka v hybridizační směsi. Nyní se celé sítko obalí parafilmem, aby směs nevysychala, a vloží se do zkumavky. Hybridizuje se ve vodní lázni 3 hodiny při 37 °C ve tmě.

Ze sítka se odstraní parafilm a skrz membránu sítka se odsaje co nejvíce hybridizační směsi. Pro každý vzorek se připraví následující komůrky v 24jamkové destičce: 5 komůrek s 2X SSC a 2 s 10% formamidem v 2X SSC. 1,5 ml pro každou jamku. Učiní se promývání přenášením sítka z jedné komůrky do druhé v následujícím pořadí:

|                       |                  |                  |
|-----------------------|------------------|------------------|
| 2X SSC                | promytí          | jednou           |
| 2X SSC                | promytí 5 minut  | dvakrát          |
| 10% formamid v 2X SSC | promytí          | jednou           |
| 10% formamid v 2X SSC | promytí 30 minut | jednou při 37 °C |
| 2X SSC                | promytí          | jednou           |
| 2X SSC                | promytí 5 minut  | jednou           |

Po posledním promytí se hádátka barví v 2 $\mu$ g/ml DAPI v 2X SSC v 24jamkové destičce po dobu 2 minut. Sítko se naposled propláchně v 2X SSC a jeho dno se zabalí do parafilmu. Přidá se 500  $\mu$ l 2X SSC a pomocí špičky propláchnuté v 0,02% (v/v) Tweenu se hádátka přesunou do mikrozkuhavky. Počká se, až si hádátka sednou na dno. Pomocí jemně vytažené skleněné kapiláry se pod stereomikroskopem odstraní co nejvíce tekutiny. K peletě hádátek se přidá 10  $\mu$ l montovacího média ProlongGold. Pomocí propláchnuté špičky se hádátka přenesou na mikroskopické sklo a zakryjí sklíčkem krycím (18 mm x 18 mm, tloušťka 170  $\pm$  5  $\mu$ m, # 1,5). Odsaje se přebytečné médium z okrajů, nechá se 24 hodin ve tmě sušit a zafixuje lakem na nehty.

smRNA FISH značená hádátka byla snímána na Olympus IX71 wide field fluorescenčním mikroskopu vybaveným olejovým 60 $\times$  (NA 1,35) a 100 $\times$  (NA 1,2) objektivem s vysokou numerickou aperturou a CCD kamerou Andor Clara.

### 3.12.2. smRNA FISH na izolovaných gonádách *C. elegans*

Oproti předchozímu postupu značení dospělců pomocí vyrobeného sítko byly gonády přichyceny na sklo ošetřené poly-L-lysinem.

Začátek postupu značení gonád pomocí smRNA FISH je stejný s postupem při značení gonád pomocí imunofluorescence (kapitola 3.9. Imunofluorescenční značení gonád *C. elegans*). Vyizolované gonády se tedy na skle ošetřeném poly-L-lysinem fixují po dobu 10 minut. Poté se fixační roztok odstraní a komůrka se dvakrát promyje PBS pufrem. Následuje permeabilizace v 70% roztoku ethanolu (v DEPC vodě) přes noc při 4 °C. Poté se sklíčko opět dvakrát promyje v PBS a 30 minut se inkubuje v 10% formamidu v 2X SSC. Připraví se hybridizační směs:

|   |                 |
|---|-----------------|
| Próby (2,5 μM)                            | 2,50 μl         |
| DEPC-voda                                 | 5,25 μl         |
| Kvasinková tRNA (10 mg/ml)                | 1,00 μl         |
| Ribonukleosid-vanadylový komplex (200 mM) | 1,25 μl         |
| Formamid                                  | 2,50 μl         |
| 2X hybridizační pufr                      | 12,50 μl        |
| <u>celkový objem hybridizační směsi</u>   | <u>25,00 μl</u> |

Směs s konečnou koncentrací próby 250 nM a 10% formamidem se důkladně promíchá a 20 μl se napipetuje na sklíčko hybridizační komůrky (vnitřní průměr 13 mm, hloubka 0,2 mm, objem 20 μl). Odstraní se 10% formamid v 2X SSC. Z poly-L-lysinového skla s gonády se odstraní silikonový kroužek a opatrně se osuší většina tekutiny. Komůrka s hybridizační směsí se obrátí na gonády a jemně přitiskne, aby gonády byly zality směsí. Hybridizace probíhá 14 hodin při 37 °C ve tmě. Následně se odstraní hybridizační směs a sklíčko se nejprve opláchně v 2X SSC a pak řádně dvakrát promyje v čistém 2X SSC po dobu 5 minut v coplin-jaru. Sklo se propláchně v 10% formamidu v 2X SSC a pak se



inkubuje v předeřátém 10% formamidu v 2X SSC po dobu 30 minut při 37 °C. Následuje opět proplach v 2X SSC a dvakrát promytí v čistém 2X SSC 5 minut. Gonády se barví 2 minuty v 2µg/ml DAPI v 2X SSC. Následuje konečné promytí v 2X SSC. Na krycí sklíčko (18 mm x 18 mm, tloušťka 170 ± 5 µm, # 1,5) se napipetuje 10 µl montovacího média ProlongGold. To se poté přiklopí na podložní sklo s gonády a odsaje přebytečné médium a pufr z okrajů. Nechá se 24 hodin ve tmě sušit a zafixuje lakem na nehty.

smRNA FISH značené gonády byly snímány na Nikon Eclipse Ti-E wide field fluorescenčním mikroskopu vybaveným olejovým 60× objektivem (NA 1,49) a kamerou Andor DU-888.

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Dynamika parentálního chromatinu v časném embryonálním vývoji *C. elegans*

Po průniku spermie do vajíčka se u *C. elegans* začínají formovat prvojádra. Od této chvíle až do doby, kdy se obě haploidní prvojádra v profázi prvního embryonálního dělení spojí, je lokalizace otcovského a mateřského genomického příspěvku evidentní. Potíž nastává již od chvíle uspořádání chromozomů do metafázní roviny, kdy se jaderný obal rozpadá a jednotlivé chromozomy již nejsou ohraničeny. Na fixovaných preparátech lze rozlišit parentální genomy pomocí imunologického značení rozdílné distribuce epigenetických značek nebo na základě rozdílné sekvence centrozomálního úseku u hybridů pomocí RNA FISH. Schopnost rozlišení paternálního a maternálního genomu v reálném čase by v návaznosti na předchozí experimenty přispěla především svou informací ohledně dynamiky a časové rozlišení tohoto jevu.

Christian Lanctôt s Darinou Majovskou z naší laboratoře zkoušeli možnost rozpoznání maternální DNA pomocí fluorescenčně značeného derivátu nukleotidu (Cy3-dUTP), který byl za tímto účelem injikován do gonád dospělé *C. elegans*. Cy3-dUTP se měl inkorporovat do DNA v procesu replikace DNA probíhající v distální části gonády a následně se po meióze usadit v mateřském prvojádře. Ačkoliv se značení integrovalo do genomu oocytů, časná embrya však nevykazovala význačné známky obarvené DNA (data nejsou součástí této práce).

Zdánlivě zřejmým experimentem s cílem zobrazit osud rodičovského chromatinu v embryích se může zdát pozorování embryí, jehož rodiče produkují gamety s rozdílně značeným chromatinem. Tedy jednoduše zkřížit dvě transgenní linie, kde každá exprimuje různé fluorescenční formy histonu, a to nejenom u *C. elegans*, ale třeba taky u jiných modelových organismů jako je myš. Je třeba uvést na pravou míru skutečnost, že krátce po fertilizaci dochází v prvojádře spermie k výměně protaminů za histony, které jsou tvořeny

v cytoplazmě oocyty (Chu et al., 2006). Tím se tedy potírají možnosti odlišného značení gamet.

Rozhodli jsme se tyto překážky obejít a vydat se cestou značení parentálního chromatinu po oplození chvíli před první zygotickou mitózou u *C. elegans*. Pro značení chromatinu jsme zvolili fotokonvertibilní protein Dendra2, který nám umožní selektivně označit maternální či paternální chromatin a následovat jeho chování v živých embryích v čase.

Dendra2 je příhodné pojmenování toho proteinu. Podobně jako stromy na podzim i Dendra2 mění svou barvu. Jedná se o fotokonvertibilní molekulu, to znamená, že ve své nativní konformaci emituje fluorescenci v zeleném spektru (emisní maximum  $\lambda_{\max}=507$  nm). Po ozáření 405nm škálou se její fluorescence konvertuje na červenou ( $\lambda_{\max}=573$  nm). Důležitým znakem tohoto jevu je jeho nevratnost, tedy již červené molekuly nemohou být přeměněny na molekuly zelené v nativní konformaci (Gurskaya et al., 2006). Dendra2 jako protein zraje při teplotě kolem 20 °C, což jí činí vhodným proteinem pro expresi v *C. elegans*.

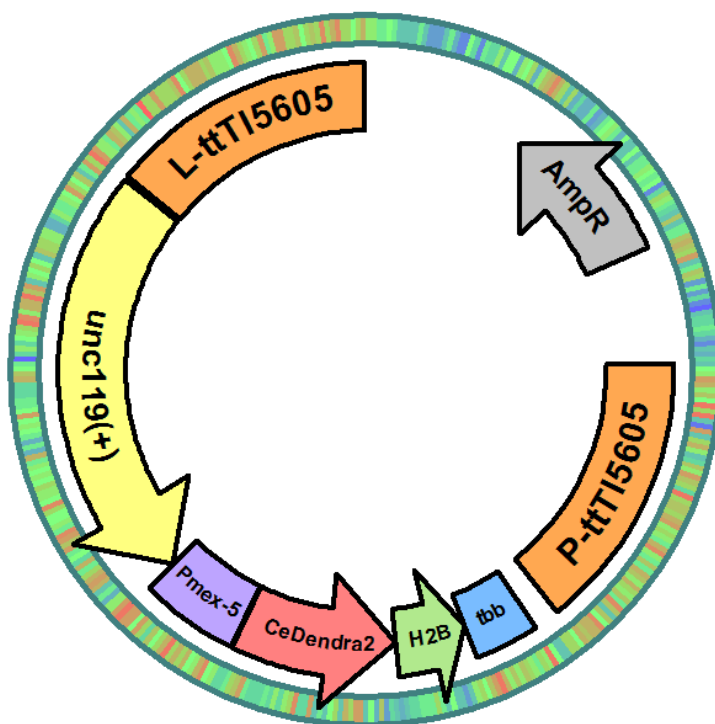
#### **4.1.1. Příprava Dendra2-H2B transgenní linie**

Pro vytvoření transgenní linie exprimující chromatin označený fotokonvertibilním proteinem Dendra2 byl nejprve Christianem Lanctôttem připraven vektor pro transgenezi. Kódující sekvence Dendra2 byla pro expresi v *C. elegans* optimalizována (Obrázek 13). Zhruba polovina kodonů byla pozměněna tak, aby se zvýšila četnost A+T. Dále byly do kódující sekvence vloženy tři krátké (50 párů bází) introny.

|           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Dendra2   | M   | N   | T   | P   | G   | I   | N   | L   | I   | K   | E   | D   | M   | R   | V   | K   | V   | H   | M   | E   |
| CeDendra2 | ATG | AAC | ACC | CCG | GGA | ATT | AAC | CTG | ATC | AAG | GAG | GAC | ATG | CGC | GTG | AAG | GTG | CAC | ATG | GAG |
| Dendra2   | G   | N   | V   | N   | G   | H   | A   | F   | V   | I   | E   | G   | E   | G   | K   | G   | K   | P   | Y   | E   |
| CeDendra2 | GGC | AAC | GTG | AAC | GGC | CAC | GCC | TTC | GTG | ATC | GAG | GGC | GAG | GGC | AAG | GGC | AAG | CCC | TAC | GAG |
| Dendra2   | G   | T   | Q   | T   | A   | N   | L   | T   | V   | K   | E   | G   | A   | P   | L   | P   | F   | S   | Y   | D   |
| CeDendra2 | GGC | ACC | CAG | ACC | GCC | AAC | CTG | ACC | GTG | AAG | GAG | GGC | GCC | CCC | CTG | CCC | TTC | AGC | TAC | GAC |
| Dendra2   | I   | L   | T   | T   | A   | V   | H   | Y   | G   | N   | R   | V   | F   | T   | K   | Y   | P   | E   | D   | I   |
| CeDendra2 | ATC | CTG | ACC | ACC | GCC | GTG | CAC | TAC | GGC | AAC | CGG | GTG | TTC | ACC | AAG | TAC | CCC | GAG | GAC | ATC |
| Dendra2   | P   | D   | Y   | F   | K   | Q   | S   | F   | P   | E   | G   | Y   | S   | W   | E   | R   | T   | M   | T   | F   |
| CeDendra2 | CCC | GAC | TAC | TTC | AAG | CAG | AGC | TTC | CCC | GAG | GGC | TAC | AGC | TGG | GAG | CGC | ACC | ATG | ACC | TTC |
| Dendra2   | E   | D   | K   | G   | I   | C   | T   | I   | R   | S   | D   | I   | S   | L   | E   | G   | D   | C   | F   | F   |
| CeDendra2 | GAG | GAC | AAG | GGC | ATC | TGC | ACC | ATC | CGC | AGC | GAC | ATC | AGC | CTG | GAG | GGC | GAC | TGC | TTC | TTC |
| Dendra2   | Q   | N   | V   | R   | F   | K   | G   | T   | N   | F   | P   | P   | N   | G   | P   | V   | M   | Q   | K   | K   |
| CeDendra2 | CAG | AAC | GTG | CGC | TTC | AAG | GGC | ACC | AAC | TTC | CCC | CCC | AAC | GGC | CCC | GTG | ATG | CAG | AAG | AAG |
| Dendra2   | T   | L   | K   | W   | E   | P   | S   | T   | E   | K   | L   | H   | V   | R   | D   | G   | L   | L   | V   | G   |
| CeDendra2 | ACC | CTG | AAG | TGG | GAG | CCC | AGC | ACC | GAG | AAG | CTG | CAC | GTG | CGC | GAC | GGC | CTG | CTG | GTG | GGC |
| Dendra2   | N   | I   | N   | M   | A   | L   | L   | L   | E   | G   | G   | G   | H   | Y   | L   | C   | D   | F   | K   | T   |
| CeDendra2 | AAC | ATC | AAC | ATG | GCC | CTG | CTG | CTG | GAG | GGC | GGC | GGC | CAC | TAC | CTG | TGC | GAC | TTC | AAG | ACC |
| Dendra2   | T   | Y   | K   | A   | K   | K   | V   | V   | Q   | L   | P   | D   | A   | H   | F   | V   | D   | H   | R   | I   |
| CeDendra2 | ACC | TAC | AAG | GCC | AAG | AAG | GTG | GTG | CAG | CTG | CCC | GAC | GCC | CAC | TTC | GTG | GAC | CAC | CGC | ATC |
| Dendra2   | E   | I   | L   | G   | N   | D   | S   | D   | Y   | N   | K   | V   | K   | L   | Y   | E   | H   | A   | V   | A   |
| CeDendra2 | GAG | ATC | CTG | GGC | AAC | GAC | AGC | GAC | TAC | AAC | AAG | GTG | AAG | CTG | TAC | GAG | CAC | GCC | GTG | GCC |
| Dendra2   | R   | Y   | S   | P   | L   | P   | S   | Q   | V   | W   | -   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| CeDendra2 | CGC | TAC | AGC | CCC | CTG | CCC | AGC | CAG | GTG | TGG | TAA |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

**Obrázek 13** Sekvenční alignment kódujících úseků Dendra2 a CeDendra2, který byl optimalizován pro expresi v *C. elegans*. Nukleotidová identita sekvencí je 79 %, 125 z 230 kodonů bylo optimalizováno. Pozměněné nukleotidy jsou zvýrazněny šedě. Četnost A+T vzrostla optimalizací z 37 % na 53 %. Šipky označují pozice tří krátkých intronů, které byly vloženy do expresní kazety. Nad kodony je zobrazena predikovaná proteinová sekvence.

Na začátek expresní kazety byl zvolen pomotor genu *Mex-5* (-472 až +1 párů bází), který vykazuje značnou expresi v zárodečné linii (Zeiser et al., 2011). Histon *his-66* je *C. elegans* homolog savčího H2B a byl připojen na 3' konec *Dendra2* sekvence. Pro účinnější expresi v zárodečné linii byl na závěr expresní kazety vložen 3' nepřekládaný úsek tubulinu  $\beta$ , *tbb-2* (Merritt et al., 2008). Celá expresní kazeta je uložena v plasmidu pCFJ150 (Obrázek 14).



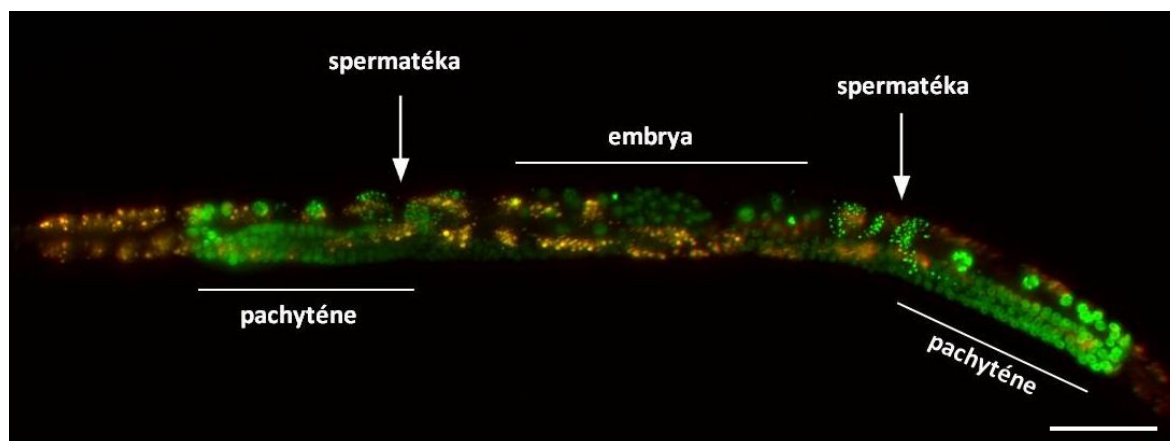
**Obrázek 14** Transgenní vektor použitý pro tvorbu *C. elegans* linie JBL1.

Expresní kazeta obsahuje: promotor *Mex-5*, *Pmex-5*, optimalizovaná sekvence *CeDendra2*, histon *H2B* a *tbb-2* na 3' konci. *Unc119(+)* umožňuje selekci pozitivních transgenních jedinců. Úseky L- a P-*ttTI5605* jsou totožné s úseky chromozomu, mezi něž má být vložen insert, zde pozice *ttTI5605* na chromozomu II. Vektor je vybaven ampicilinovou rezistencí *AmpR*.

Jako metoda transgeneze byla zvolena mikroinjikací gonád zprostředkovaná MosSCI (Mos1-mediated Single Copy Insertion), která umožňuje vložení jedné kopie expresní kazety na předem určené místo v genomu kmenu EG6699 (Frøkjær-Jensen et al., 2008, Frøkjær-Jensen et al., 2012). Správné umístění a celistvost transgenu byly ověřeny pomocí PCR (viz kapitola 3.4.6. Výběr a ověření pozitivních jedinců). Z transgenních jedinců byli vybráni homozygoti, aby se zamezilo případné ztrátě cílového insertu.

#### 4.1.2. Charakterizace Dendra2-H2B transgenní linie

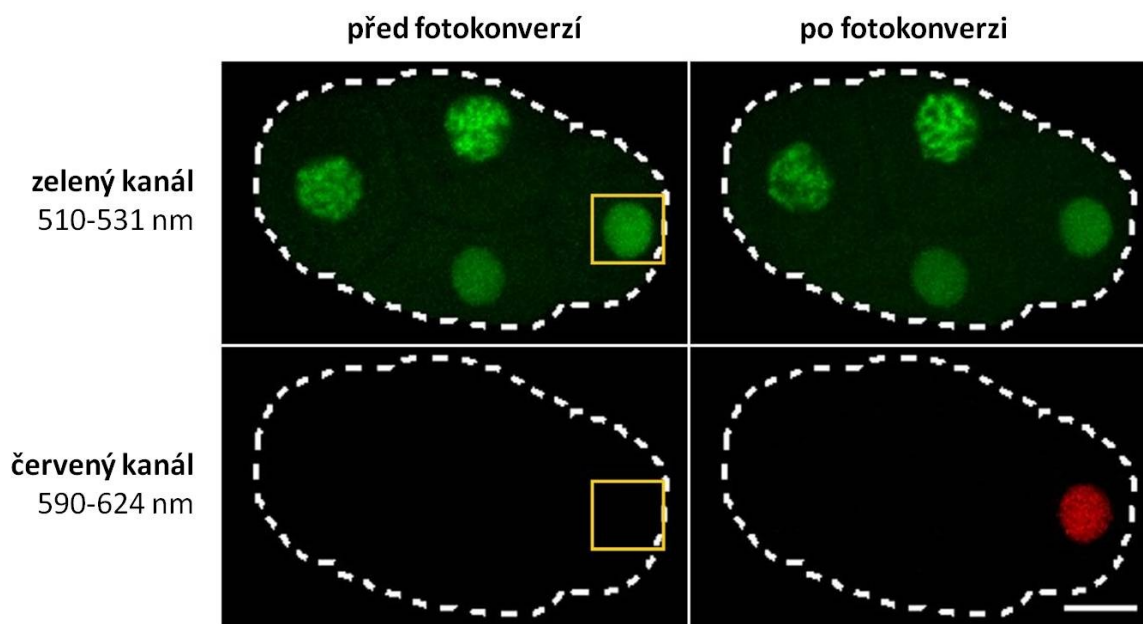
Vytvořený kmen byl nazván JBL1. Vzhled, pohyb a vývoj nového kmenu byl k nerozeznání od divokého kmenu N2. Z toho můžeme soudit, že vložený transgen nikterak neovlivnil chování těchto háďátek. JBL1 vykazuje silnou expresi Dendra2-H2B v zárodečné linii, tedy v celé délce gonády, ve spermiích a v embryích umístěných v děloze (Obrázek 15). Zvláště výrazná exprese je očividná v gonádě od stádia pachyténe. Exprese Dendra2-H2B proteinu byla pozorována až do stádia L1.



**Obrázek 15** Exprese Dendra-H2B v dospělci transgenního kmenu JBL1 zobrazená pomocí SPIM mikroskopu. Signál Dendra-H2B je zobrazen zeleně. Autofluorescenční signál ze střevních granulí způsobený excitací modrého světla je prezentován červeně. Exprese fúzního proteinu v jádře je viditelná v gonádách, spermatéce a v embryích uvnitř dělohy. Od pachyténního stádia je patrná zvýšená intenzita exprese transgenu. Zobrazena je maximální projekce trojrozměrného obrazu celého dospělého. Měřítko je 100  $\mu$ m.

#### 4.1.3. Charakterizace fotokonverze Dendra2-H2B v embryích

Jádra kmenu JBL1 byla pro ověření funkčnosti fotokonverze Dendra2 proteinu vystavena 405nm záření. Značený chromatin se po ozáření okamžitě změnil svou fluorescencí ze zelené na červenou (Obrázek 16). Nárůst červené fluorescence po fotokonverzi je přibližně stonásobný.



**Obrázek 16** Fotokonverze chromatinu značeného Dendra2 v embryu *C. elegans*.

Jádro P2 blastomery živého čtyřbuněčného embrya kmenu JBL1 exprimujícího Dendra2-H2B bylo ozářeno 405nm světlem. Levý panel znázorňuje embryo před fotokonverzí a pravý panel po fotokonverzi. Fluorescenční signál při  $\lambda = 510-531$  nm (*zelený kanál*) je zobrazen v horní části a fluorescenční signál při  $\lambda = 590-624$  nm (*červený kanál*) je v části spodní. Jádro P2, čtvercem ohraničená oblast, byla cílem fotokonverze. Po fotokonverzi je v P2 jádře patrný intenzivní signál v červeném kanálu. Zobrazeny jsou maximální projekce snímků pokrývající 10  $\mu\text{m}$  centra embrya. Měřítko je 5  $\mu\text{m}$ .

Navzdory očekávání jsme pozorovali, že se intenzita zelené fluorescence po ozáření téměř nezměnila. To znamená, že zdaleka ne všechny molekuly Dendra2 přešly z nativního do konvertovaného stavu. Usilování o přeměnu větší části zelené formy histonů na

---

červenou zvyšováním síly či doby působení laseru jen vedlo k celkovému vysvěcování obou signálů. Důvod takového chování není zcela jasný. Jedno vysvětlení by mohlo být to, že část Dendra2-H2B molekul se před fotokonverzí nachází ve stavu „vypnuto“ a aktivují se, tedy zezelenají, až po dodání určité dávky energie v podobě 405nm záření (rozhovor se Zdeňkem Švindrychem). Asi největší potíž nám působila velmi vysoká citlivost Dendry2 na ozařování. Její fluorescenční intenzita v průběhu snímání klesala mnohem rychleji v porovnání s GFP-H2B exprimovaným kmenem TH32 za obdobných podmínek (data nejsou součástí této práce). Nakonec se ukázalo, že nám zbytková zelená fluorescence po fotokonverzi ani snižující se intenzita signálu nebrání v analýze dynamiky chromatinu.

Pro rozpoznání mateřského a otcovského chromatinu v časných embryích bylo vždy jedno z prvojader, buď mateřské, nebo otcovské ozářeno 405nm laserem. Tím došlo k okamžitému vizuálnímu rozeznání chromatinů. Fotokonverze byla provedena ještě ve fázi, kdy byla prvojádra od sebe vzdálena. Maternální prvojádro bylo identifikováno jako to, které se nachází na stejné straně embrya jako pólové tělísko. Pro posouzení fototoxicity 405nm laseru byly nejprve mladá embrya ve stádiu do 50 buněk ozářena a následně prověřena, jestli jsou schopna vyvinout se v larvy. Z 23 embryí, která byla fotokonvertována, se 22 z nich normálně vyvinulo. Dále bylo potřeba zjistit, zdali fotokonverze negativně neovlivňuje vývoj zygoty a nezpůsobuje větší odchylku od průměrných časů dělení v raném embryu. Za tímto účelem byl chromatin vždy jednoho prvojádra fotokonvertován a pozorován během embryogeneze. Uskupení metafázní roviny bylo vzato jako časový referenční bod. Pro každou blastomeru byl změřen čas, kdy dospěje k další metafázi. Rozdíl mezi kontrolními a fotokonvertovanými embryi byl kvantitativně vyhodnocen (Tabulka 2).



| Embryo                        | Fotokonverze | Čas dělení (minuty) |              |              |              |              |
|-------------------------------|--------------|---------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|                               |              | AB                  | P1           | ABa/p        | EMS          | P2           |
| 1                             | ne           | 13,0                | 15,0         | 27,0         | 30,0         | 34,0         |
| 2*                            | ne           | 12,2                | 15,8         | 28,0         | 31,0         | 34,0         |
| 3                             | ne           | 13,0                | 15,0         | 26,0         | 28,0         | 32,0         |
| 4                             | ne           | 13,5                | 15,0         | 28,0         | 30,0         | 34,0         |
| 5                             | ne           | 13,5                | 15,0         | 27,0         | 29,5         | 32,5         |
| 6                             | ne           | 14,0                | 18,0         | 32,5         | 34,0         | 36,5         |
| 7                             | ne           | 13,0                | 15,0         | 27,0         | 29,0         | 32,0         |
| 8                             | ne           | 13,0                | 15,0         | 25,0         | 29,0         | 32,0         |
| <b>průměr</b>                 |              | <b>13,1</b>         | <b>15,5</b>  | <b>27,6</b>  | <b>30,1</b>  | <b>33,4</b>  |
| <b>SD</b>                     |              | <b>0,4</b>          | <b>0,7</b>   | <b>1,5</b>   | <b>1,2</b>   | <b>1,3</b>   |
| 9                             | ano          | 12,0                | 14,0         | 24,0         | 28,0         | 30,0         |
| 10                            | ano          | 12,5                | 14,5         | 30,0         | 32,0         |              |
| 11                            | ano          | 14,0                | 16,0         | 28,0         | 31,0         | 34,0         |
| 12                            | ano          | 14,0                | 16,0         | 27,0         | 30,0         | 35,0         |
| 13                            | ano          | 14,0                | 16,0         | 28,0         | 31,0         | 34,5         |
| 14                            | ano          | 12,0                | 14,0         | 26,0         | 28,0         | 32,0         |
| 15                            | ano          | 16,0                | 18,0         | 32,0         | 34,0         | 40,0         |
| 16                            | ano          | 16,0                | 18,0         | 31,0         | 35,0         | 38,0         |
| 17                            | ano          | 15,0                | 18,0         | 31,0         | 34,0         | 37,0         |
| 18                            | ano          | 14,0                | 16,0         | 29,0         | 32,0         | 36,0         |
| 19                            | ano          | 14,0                | 16,0         | 30,0         | 32,0         | 36,0         |
| <b>průměr</b>                 |              | <b>14,0</b>         | <b>16,0</b>  | <b>28,7</b>  | <b>31,5</b>  | <b>35,3</b>  |
| <b>SD</b>                     |              | <b>1,0</b>          | <b>1,1</b>   | <b>1,9</b>   | <b>1,8</b>   | <b>2,2</b>   |
| <b>p, Mann-Whitneyův test</b> |              | <b>0,068</b>        | <b>0,093</b> | <b>0,115</b> | <b>0,063</b> | <b>0,050</b> |

**Tabulka 2 Délka buněčného cyklu v embryích Dendra2-H2B bez fotokonverze a po fotokonverzi.** Chromatin jednoho prvojádra byl fotokonvertován pomocí 405nm laseru podle postupu v oddílu Materiál a metody. Následný vývoj embrya byl zobrazován v intervalu 1-2 minuty. Video embrya číslo 2 (\*) bylo získáno snímáním na základě Nomarského diferenciálního interferenčního kontrastu (DIC), zatímco všechna ostatní videa pomocí fluorescenčního snímání. Čas, kdy byla pozorována metafázní rovina v zygotě, byl stanoven jako 0,0. Pro každou z blastomer byl měřen čas, než dospěje k další metafázi. Embrya snímaná bez předchozí fotokonverze jsou zobrazena jako kontrolní. SD, standardní deviace.

---

Srovnáním obou souborů dat vidíme, že jejich odlišnost je statisticky nevýznamná. Mezi dělením AB a P1 blastomerami jsme pozorovali asi dvouminutový rozdíl bez ohledu na to, jestli byl chromatin jednoho prvojádra fotokonvertován či nikoliv. Tato odlišnost je ovšem charakteristická pro normální vývoj. Tyto testy nám potvrdily, že ozařováním embryí 405nm laserem jsme nezpůsobili fototoxicitu, která by významně ovlivnila embryonální vývoj.

S ohledem na případné rozdíly v účinnosti fotokonverze mezi maternálním a paternálním prvojádrem byl provedeno následující měření. Byly zaznamenány průměrné fluorescenční intenzity prvojader před a po fotokonverzi pro oba kanály, tedy zelený a červený (Tabulka 3). Tato data byla korigována údaji získanými z pozadí cytoplasmy. Poměry těchto hodnot můžeme považovat jako indikátory účinnosti fotokonverze. Násobný nárůst fotokonverze byl v červeném kanále u mateřského prvojádra naměřen  $150 \pm 86$  a u otcovského  $103 \pm 81$ . Z naměřených dat vyplývá, že rozdíl mezi mírou fotokonverze rodičovských chromatinů je nevýznamný ( $p = 0,159$ , Mann-Whitneyův test). Vysoká variabilita těchto hodnot je způsobena velmi nízkým a kolísavým signálem v červeném kanále před fotokonverzí na chromatinu a v cytoplasmě. To je nejspíše dáno díky fluorescenčnímu šumu. Z tohoto důvodu byly některé intenzity nižší než v pozadí. Proto byly záporné hodnoty nahrazeny hodnotou 1. Dále je z těchto údajů vidět, jak fotokonverzi Dendra2-H2B doprovází dříve zmíněný jen nepatrný pokles intenzity zeleného signálu.

| Prvojádro                     |          | Zelený signál (488 nm) |      |              | Červený signál (561 nm) |              |        |
|-------------------------------|----------|------------------------|------|--------------|-------------------------|--------------|--------|
|                               |          | Před                   | Po   | Poměr        | Před                    | Po           | Poměr  |
| 1                             | Mateřské | 846                    | 695  | 0,82         | 9                       | 181          | 20,21  |
| 2                             | Mateřské | 534                    | 592  | 1,11         | 1                       | 143          | 142,99 |
| 3                             | Mateřské | 764                    | 616  | 0,81         | 1                       | 299          | 299,14 |
| 4                             | Mateřské | 696                    | 420  | 0,60         | 1                       | 249          | 248,77 |
| 5                             | Mateřské | 310                    | 791  | 2,55         | 1                       | 330          | 329,91 |
| 6                             | Mateřské | 1473                   | 1276 | 0,87         | 5                       | 332          | 66,30  |
| 7                             | Mateřské | 342                    | 380  | 1,11         | 1                       | 49           | 48,68  |
| 8                             | Mateřské | 926                    | 889  | 0,96         | 1                       | 131          | 130,74 |
| <b>Průměr</b>                 |          | <b>1,10</b>            |      |              | <b>150,72</b>           |              |        |
| <b>SD</b>                     |          | <b>0,36</b>            |      |              | <b>86,18</b>            |              |        |
| 1                             | Otcovské | 280                    | 242  | 0,87         | 1                       | 193          | 192,91 |
| 2                             | Otcovské | 592                    | 441  | 0,75         | 1                       | 172          | 172,46 |
| 3                             | Otcovské | 482                    | 577  | 1,20         | 38                      | 135          | 3,53   |
| 4                             | Otcovské | 396                    | 448  | 1,13         | 12                      | 124          | 10,67  |
| 5                             | Otcovské | 596                    | 561  | 0,94         | 1                       | 154          | 154,16 |
| 6                             | Otcovské | 487                    | 350  | 0,72         | 1                       | 218          | 217,84 |
| 7                             | Otcovské | 658                    | 462  | 0,70         | 1                       | 59           | 58,74  |
| 8                             | Otcovské | 920                    | 1157 | 1,26         | 11                      | 174          | 15,61  |
| <b>Průměr</b>                 |          | <b>0,94</b>            |      |              | <b>103,24</b>           |              |        |
| <b>SD</b>                     |          | <b>0,19</b>            |      |              | <b>81,10</b>            |              |        |
| <b>p, Mann-Whitneyův test</b> |          |                        |      | <b>0,480</b> |                         | <b>0,159</b> |        |

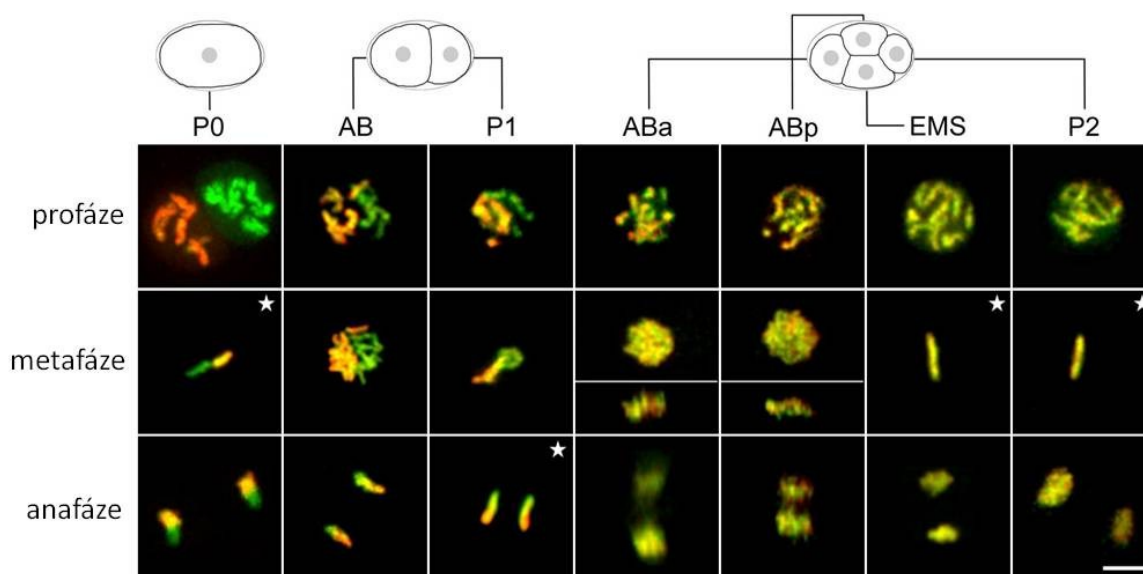
**Tabulka 3 Intenzita Dendra2-H2B signálu mateřského a otcovského prvojádra.**

V zygote byla měřena fluorescenční intenzita jedno prvojádro před a po fotokonverzi vždy v zeleném a červeném kanále. Od těchto měření byla odečtena intenzita pozadí a výsledné hodnoty byly zaznamenány do tabulky. Poměr těchto hodnot odráží míru fotokonverze. SD, standardní deviace.

#### 4.1.4. Zobrazování maternálního a paternálního chromatinu v časně embryogenezi

Po fotokonverzi Dendra2-H2B chromatinu vždy jednoho prvojádra byla velmi rychle snímána zelená i červená fluorescence ve třech dimenzích na konfokálním mikroskopu s rotujícím diskem. Zpravidla bylo nasnímáno 30 optických sekcí s 500nm krokem v ose z. Podobných výsledků bylo dosaženo pozorováním interfázních a mitotických

embryonálních jader. Ovšem protože průvodní kondenzace chromatinu vede k silnějšímu fluorescenčnímu signálu, prostorové uspořádání parentálního chromatinu bylo nejzřetelněji patrné v mitotických jádrech. Zachytili jsme dobře ohraničenou separaci maternálního a paternálního chromatinu v zygotě a v dvoubuněčném embryu (Obrázek 17).



**Obrázek 17 Chromatin od otce a od matky je v zygotě a dvoubuněčném embryu prostorově separován.** Ve stádiu časně zygoty kmenu JBL1 exprimující Dendra2-H2B bylo vždy jedno prvojádro fotokonvertováno. Následně byl snímán chromatin z fotokonvertovaného (červeného) a nefotokonvertovaného (zeleného) prvojádra až do čtyřbuněčného stádia embrya. Jádra jsou prezentována v mitotické profázi (*horní panely*), v metafázi (*prostřední panely*) a v anafázi (*spodní panely*). Totožnost blastomer je popsána a načrtnuta na vrchu odpovídajících panelů. V anafázních AB a P1 blastomerách je zřetelně patrná separace rodičovského chromatinu. Ve všech mitotických jádrech čtyřbuněčného embrya je chromatin již promíchaný (žlutý). Reprezentativní snímky jsou získány z různých embryí. Kromě panelů označených hvězdičkou, kde zobrazení představují pouze jednu optickou sekci, jsou všechny obrazy výsledkem maximální projekce 3D snímání. ABa a ABp jádra v metafázi a anafázi jsou znázorněna jako ortogonální pohledy. Měřítka je 5  $\mu\text{m}$ .

V AB i P1 blastomerách byl rodičovský chromatin oddělen podle původu. Až v jádrech vzniklých následujícím dělením nastalo vzájemné promíchání mateřského a otcovského chromatinu. Ty byly opět nejjasněji zřetelné na mitotických snímcích čtyřbuněčného embrya. Je třeba zdůraznit, že tento jev byl zaznamenán bez ohledu na to, které prvojádro bylo fotokonvertováno.

Prostorové rozdělení parentálního chromatinu v raných blastomerách bylo pozorováno celkem na 38 videích, jak je shrnuto v Tabulce 4. Až na případy, kdy byl Dendra2-H2B signál příliš slabý pro nepochybné zhodnocení, byl mateřský a otcovský chromatin separován v zygotě ve 34 ze 34 případů a v dvoubuněčném embryu ve 12 ze 14 případů, ale nikdy (0 ze 14 případů) ve čtyřbuněčném mitotickém embryu.

|          | P0    | AB    | P1    | ABa | ABp | EMS  | P2  |
|----------|-------|-------|-------|-----|-----|------|-----|
| Profáze  | 22/22 | 11/11 | 9/10  | 0/7 | 0/6 | 0/11 | 0/8 |
| Metafáze | 26/26 | 7/10  | 10/12 | 0/6 | 0/3 | 0/7  | 0/6 |
| Anafáze  | 24/24 | 8/11  | 8/10  | 0/7 | 0/7 | 0/6  | 0/6 |

**Tabulka 4 Podíl případů, kde byla pozorováno prostorové oddělení maternálního a paternálního chromatinu.** Je zobrazen počet snímků se separovaným chromatinem / celkový počet snímků. Zobrazená data jsou složena z videí a fotografií zachycených v různých časech po fotokonverzi jednoho z prvojader. Výsledky jsou prezentovány podle mitotické fáze (*řádky*) a totožnosti blastomery (*sloupce*).

#### 4.1.5. Časové zobrazení promísení maternálního a paternálního chromatinu

Snaha určit s vyšší přesností dobu, kdy dochází k promíchání rodičovských chromatinů, se ukázala neúspěšná. Patrně kombinace rychlého vysvěcování a postupného zředování fluorescenčního signálu bránila dalšímu rozeznání rodičovských chromatinů v interfázi čtyřbuněčného embrya.

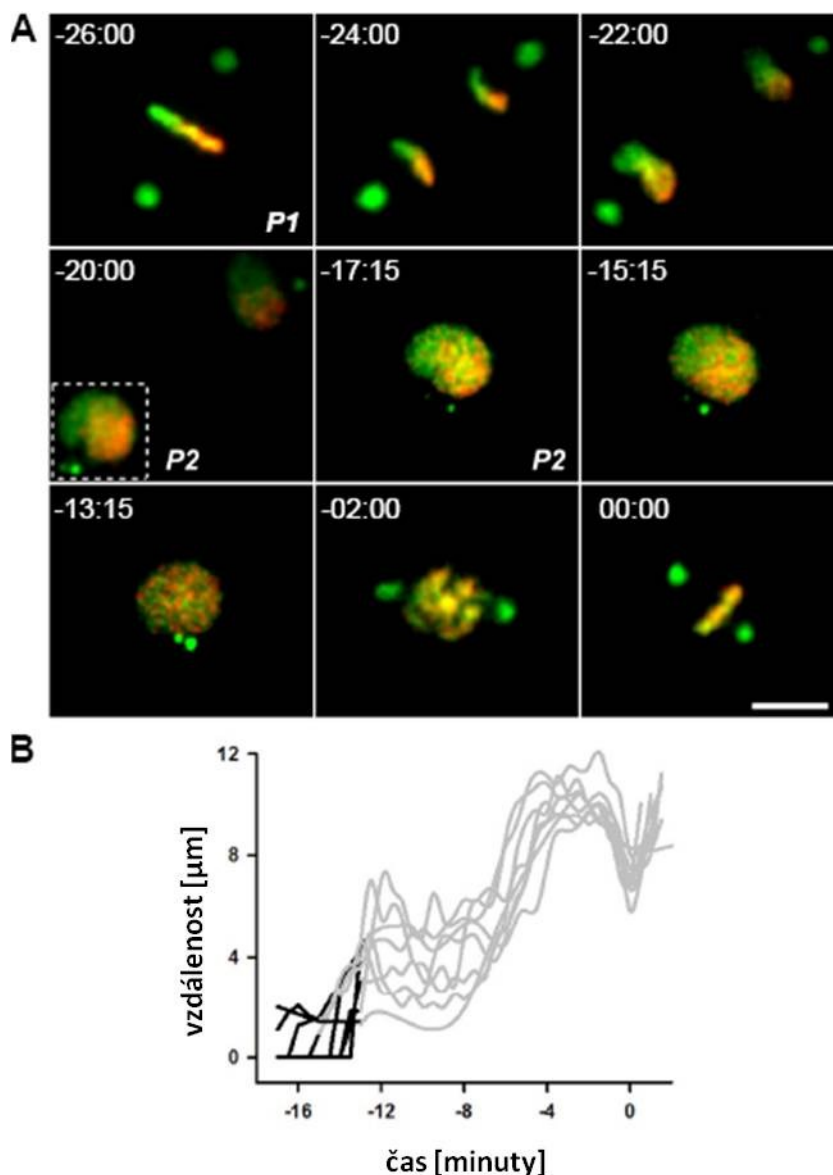
Abychom obešli toto technické omezení, rozhodli jsme se fotokonvertovat polovinu metafázní roviny dělicí se blastomery dvoubuněčného embrya. Takto se obnoví schéma

---

segregovaného chromatinu, jak je zřejmé z předchozích experimentů. Následně jsme pozorovali pohyby fotokonvertovaného a nefotokonvertovaného chromatinu při vysokém časovém rozlišení. Pro tyto pokusy byla vybrána blastomera P1, která se dělí v rovině časově rozlišení. Pro tyto pokusy byla vybrána blastomera P1, která se dělí v rovině přibližně kolmé na směr snímání a tak umožňuje vyšší rozlišení než buňky dělící se v ose z, jak je tomu u AB blastomery.

V průběhu dekondezace chromatinu po rozdělení P1 buňky není zřejmá změna rozložení značeného chromatinu (Obrázek 18A). Část chromatinu, která byla označena fotokonverzí poloviny metafázní roviny, skutečně zůstala v prvních minutách buněčného cyklu vymezena v polovině jader obou dceřiných buněk. Poté došlo k téměř okamžitému promíchání fotokonvertovaného chromatinu s nefotokonvertovaným. Promíšení rozdílně označeného chromatinu bylo jasně patrné v následujících mitotických stádiích.

Za účelem kvantifikace a určení bližšího časového úseku smísení rodičovských chromatinů jsme již užitý kmen JBL1 zkřížili s kmenem TH27 exprimujícím GFP- $\gamma$ -tubulin. Tím jsme získali kmen JBL2 pro označení chromatinu v jádře a vizualizaci centrozomů v cytoplasmě. Počet a pozice centrozomů nám umožnily posoudit aktuální fázi buněčného cyklu dceřiné P2 buňce. Jako referenční časový bod byla stanovena chvíle uspořádání následující metafázní roviny, protože začátek snímání nebyl vždy přesně synchronizován. Celkem bylo nasnímáno 10 videí s časovými intervaly 0,5 – 2 minuty, z toho 2 nemohla být využita z důvodu vysokého vysvícení nebo zastavení buněčného cyklu. Ostatních 8 videí bylo analyzováno. Úroveň promíchání byla vztažena k aktuálnímu času a ke vzdálenosti mezi centrozomy (Obrázek 18B).



**Obrázek 18 Časové rozlišení prostorového promíchání chromatinu v časném embryu *C. elegans*.** V průběhu metafáze byla polovina chromatinu v jádře P1 buňky fotokonvertována a následně snímána až do stádia další metafáze, jež byla stanovena jako referenční časový údaj (0:00). V tomto experimentu byl použit kmen JBL2, jež exprimuje Dendra2-H2B a GFP- $\gamma$ -tubulin pro označení jak chromatinu (zelená a červená), tak centrozomů (zelená). A) Chromatinové domény zůstávají po fotokonverzi oddělené po zbytek mitózy (čas -22:00), během dekondenzace chromatinu (čas -20:00) a během prvních minut buněčného cyklu (čas -15:15). K promísení chromatinových domén dochází relativně rychle (čas -13:15 v znázorněném sledu snímků). Zobrazeny jsou maximální projekce odpovídající 1,5 - 5  $\mu\text{m}$  ze středu embryonálních jader. Čas je vyjádřen

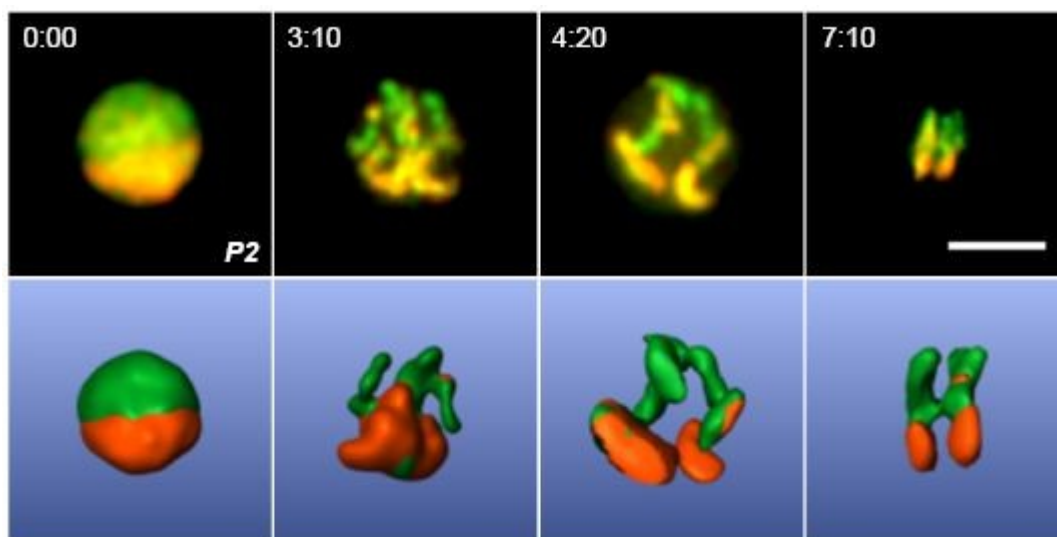
jako minuty:sekundy. Měřítka je 5  $\mu\text{m}$ . B) V metafázi P1 rozdílně označené chromatinové domény byly v P2 jádrech zhodnoceny buďto jako prostorově oddělené nebo jako promíchané. Stav chromatinových domén byl vynesena proti času vztaženému k metafázi P2 buňky (na ose x, 0 představuje vznik této metafázní roviny) a proti aktuálnímu stádiu buněčného cyklu, který byl stanoven vzdáleností centrozomů (na ose y). Prostorově oddělený projev chromatinových domén (*černá část grafu*, 8 videí) byl pozorován na začátku buněčného cyklu, ale ne později než 5 minut po vstupu do buněčného cyklu. Chromatinové domény se jednoznačně promíchávají (*šedivá část grafu*) ve chvíli, kdy se centrozomy začnou rapidně pohybovat od sebe (čas -6:00).

První okamžiky promísení byly zachyceny  $4 \pm 1$  minuty po začátku buněčného cyklu,  $2 \pm 1$  minuty po zjevení dvou oddělených centrozomů a  $6 \pm 1$  minuty předtím než jeden z centrozomů začal migrovat na opačnou stranu jádra. Tato pozorování naznačují, že k promísení chromatinu v časném embryu *C. elegans* nedochází během dekondenzace chromatinu na konci mitózy, ale poměrně náhle 3-5 minut po vstupu do buněčného cyklu, tedy ještě předtím než jeden z duplikovaných centrozomů začne migrovat k opačnému pólu.

#### 4.1.6. Prostorová distribuce chromatinu během mitózy v časném embryu

Předchozí výsledky nevylučují možnost, že k promíchání chromatinových domén dochází ještě před sestavením metafázní roviny tak, jak bylo dříve popsáno v savčích buňkách (Strickfaden et al., 2010). K prošetření této otázky v embryu *C. elegans* byl chromatin poloviny jádra ve P1 a P2 buňkách fotokonvertován v S fázi a chromatinové rozčlenění bylo pozorováno v průběhu následující mitózy. Jak je vidět z Obrázku 19, fotokonvertovaná a nefotokonvertovaná část chromatinu zaujímají stále stejnou pozici a orientaci v jednotlivých fázích mitózy. Stejných výsledků bylo dosaženo pozorování dělicích se jader ve dvou- a čtyřbuněčném stádiu embrya. Z uvedených dat vyplývá, že během mitózy nedochází k radikálním změnám v chromatinové distribuci. Tento jev byl pozorován v osmi z jedenácti případů.



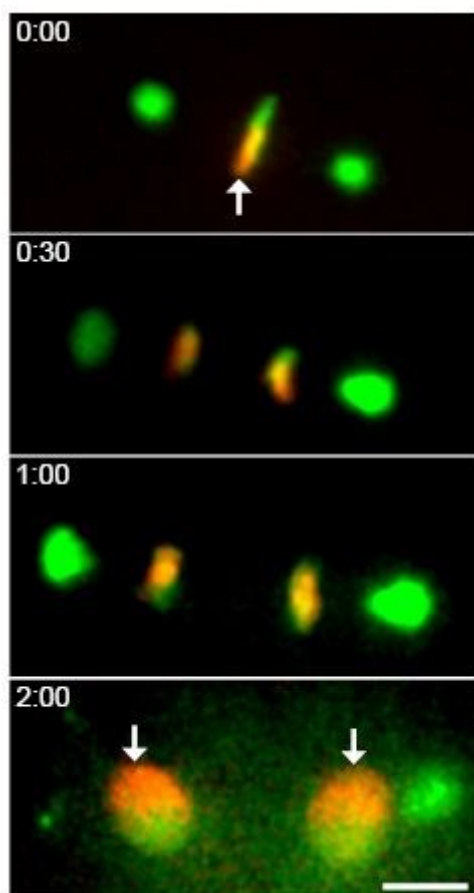


**Obrázek 19** Prostorové rozložení chromatinu během mitotického dělení embrya *C. elegans*. Chromatin poloviny P2 jádra kmenu JBL1 byl fotokonvertován v S fázi (čas 0:00). Prostorové snímky byly zachyceny během následující mitózy. Zobrazeny jsou reprezentativní maximální projekce nasnímané od profáze k anafázi (horní panely) a odpovídající 3D rekonstrukce (spodní panely). Z obrázku je patrné, jak je prostorové rozdělení fotokonvertovaného chromatinu z velké části zachováno během mitózy (srovnání prvního a posledního časového bodu). Čas je vyjádřen jako minuty:sekundy. Měřítko je 5  $\mu\text{m}$ .

#### 4.1.7. Rotace chromatinu v anterior-posteriorní ose během prvního embryonálního dělení

Během získávání obrazového materiálu embryonálního chromatinu *C. elegans* pro posuzování dynamiky rodičovského chromatinu jsme zaznamenali pozoruhodné otáčivé pohyby jader v anterior-posteriorní ose. Tuto rotaci (Obrázek 20) bylo možné vizualizovat díky schopnosti fúzního proteinu Dendra2-H2B kmenu JBL1 a JBL2 označit chromatin a následovat ho v čase. Jedno z prvojader bylo před jejich fúzí fotokonvertováno. Chromatin byl snímán od metafáze až do úplného rozdělení buňky. Rotace chromatinu, která začala v časně anafázi a byla dokončena v pozdní telofázi zygotického dělení, nebyla nikdy pozorována v pozdějších stádiích embryogeneze. Chromatin se vždy otočil o půl otáčky,

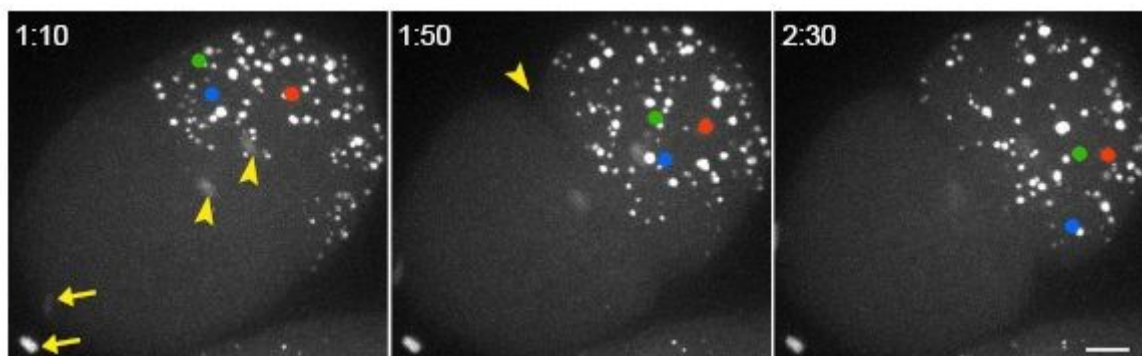
tedy o  $180^\circ$ , a celý proces trval přibližně 1 minutu. Směr této reproducidbilní rotace v anterior-posteriorní ose je pravotočivý (to znamená, že když palec pravé ruky míří k posterioru, prsty stejné ruky naznačují směr rotace). Tento jev byl pozorován v 16 z 18 embryí, která byla analyzována. Orientace rotace není závislá na tom, jaké prvojádro bylo cílem fotokonverze.



**Obrázek 20** Jaderná rotace během prvního embryonálního dělení v *C. elegans*.

Krátce po oplození bylo fotokonvertováno samčí prvojádro kmenu JBL2, který exprimuje Dendra2-H2B a GFP- $\gamma$ -tubulin pro označení jak chromatinu (zelená a červená) a centrozomů (zelená). Snímání bylo započato ve chvíli sestavení metafázní roviny (čas 0:00). Počínaje časnou anafází (čas 0:30) a v průběhu celé telofáze (čas 1:00 až 2:00) vznikající jádra rotují o  $180^\circ$  tak, že fotokonvertovaná část chromatinu se v dvoubuněčném embryu nachází na opačné straně, než byla v metafázi. Zobrazeny jsou maximální projekce odpovídající 6,5 - 10  $\mu\text{m}$  ze středu embrya. Čas je vyjádřen jako minuty:sekundy. Měřítka je 5  $\mu\text{m}$ .

Tyto rotační pohyby nás zaujaly a chtěli jsme dále zjistit, jestli je toto otáčení omezeno pouze na vznikající jádra nebo jestli dochází k rotaci i jiných embryonálních struktur. Rozhodli jsme se nasnímat chování cytoplazmatických P granulí v čase karyokineze zygoty. Za tímto účelem jsme zkřížili JBL1 linii s kmenem JH2108, který exprimuje fluorescenční fúzní protein GFP-PGL-1 pro označení P granulí (Gallo et al., 2010). Vzniklý kmen JBL3 má tedy obojí, Dendra2 značený chromatin a GFP značená P granule v cytoplasmě. Embrya byla snímána ve 3D v 10sekundových intervalech od metafáze až do ukončené cytokineze. Ve všech snímaných embryích jsme pozorovali zřetelnou rotaci P granulí (Obrázek 21). Velmi intenzivní GFP signál pocházející z P granulí (oproti slabšímu Dendra2-H2B) nám bohužel znemožnil plánované pozorování jaderné i cytoplazmatické rotace zároveň.



**Obrázek 21** Rotace P granulí během zygotické cytokineze *C. elegans*.

Embrya kmenu JBL3 exprimující Dendra2-H2B a GFP-PGL-1 pro označení chromatinu a P granulí byla snímána v 10sekundových intervalech. Zobrazeny jsou maximální projekce trojrozměrných snímků embrya (20  $\mu\text{m}$ ) ve třech časových bodech, které představují dobu od sestavení metafázní roviny. Tři samostatná P granula jsou označena barevnými body, které jasně rotují kolem anterior-posteriorní osy během zygotického dělení. V levém panelu je označen Dendra2 pozitivní chromatin v anafázních jádrech (*horní dvě šipky*) a dvě pólová tělíska (*spodní dvě šipky*). Šipka v prostředním panelu ukazuje na asymetricky vznikající dělicí rýhu. Čas je vyjádřen jako minuty:sekundy. Měřítko je 5  $\mu\text{m}$ .

---

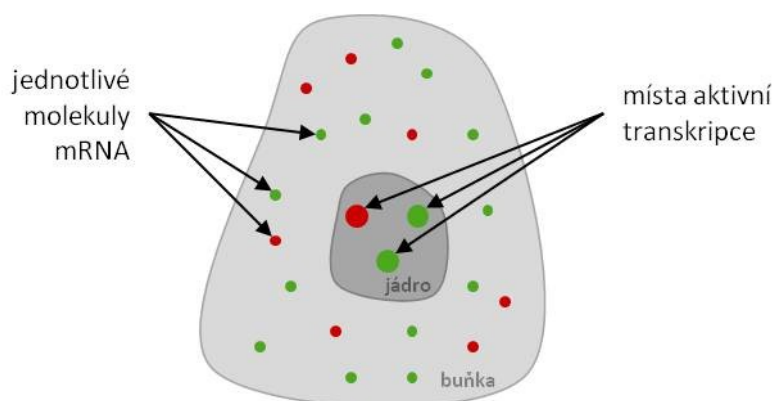
Podobně jako chromatin i P granula rotují v anterior-posteriorní ose v pravotočivém směru o asi 180°. Ovšem doba trvání otočného pohybu je delší, přibližně 3 minuty oproti 1 minutě u chromatinu. Pozorování pólových tělísek, která jsou také pozitivní na fluorescenční značení Dendra2-H2B, nám poskytlo dodatečné informace ohledně rotace v embryu. První, dříve odloučené, pólové tělísko se nepohybuje, zatímco to druhé, které je na rozdíl od předešlého přichyceno k plasmatické membráně (Benenati et al., 2009), jasně rotuje ve stejném směru jako chromatin a P granula. Z těchto pozorování jasně plyne, že v průběhu cytokineze dochází k rotaci celého jednobuněčného embrya uvnitř vaječného obalu. Za zmínku také stojí zajímavé zjištění, že začátek těchto rotačních pohybů se shoduje se zrodem asymetrické invaginace v podobě cytokinetické rýhy, která se prohlubuje na budoucí levé straně embrya.

#### **4.2. Dynamika genové exprese v *C. elegans***

Z předchozích výsledků je patrné, jak se jaderná organizace chromatinu dokáže velice rapidně proměnit a vytvořit tak odlišné prostředí uvnitř jádra. Je zajímavé, že zprvu pohybově velmi pasivní chromatin se dovede během několika málo minut proměnit ve velice dynamické a mobilní celky. Dynamika jako taková je projevem na stávající skutečnosti a ve světě buněk se jedná o velmi významnou vlastnost. V této části disertace se zabývám jadernou architekturou v souvislosti s genovou expresí a její dynamikou během vývoje. *C. elegans* je jeden z mála modelových organismů, u kterého je možné sledovat aktivitu genové exprese v rámci celého orgánu či dokonce celého organismu. Za tímto účelem jsme se rozhodli využít techniky smRNA FISH.

#### 4.2.1. Zobrazení transkripční aktivity v *C. elegans* pomocí smRNA FISH

Metoda smRNA FISH umožňuje vizualizaci transkripce pomocí fluorescenčně značených prób, které hybridizují na cílové molekuly mRNA (Obrázek 22). Oproti jiným metodám zjišťujících transkripční aktivitu, jako jsou microarray analýzy nebo sekvenování transkriptomů (RNA-seq), které poskytují jen průměrnou míru exprese v buněčné populaci, smRNA FISH přesně lokalizuje transkripci v soustavě buněk nebo v celém organismu. Fluorescenční próby umožňují uniformní *in situ* značení individuálních RNA molekul, které jsou zobrazeny jako jednotlivé tečky v cytoplasmě (Raj and van Oudenaarden, 2009, Larson et al., 2009, Raj et al., 2006, Levsky et al., 2002). smRNA FISH také detekuje místa aktivní neboli nascentní transkripce, která jsou lokalizována na chromatinu. Míra a dynamika transkripce může být odvozena od počtu jak jednotlivých molekul mRNA, tak transkripčních míst v jádře. Transkripční místa mohou mít různou intenzitu podle množství mRNA, které je právě syntetizováno a procesováno (Paul and Montpetit, 2016).



#### Obrázek 22 Schéma vizualizace transkripce pomocí metody smRNA FISH.

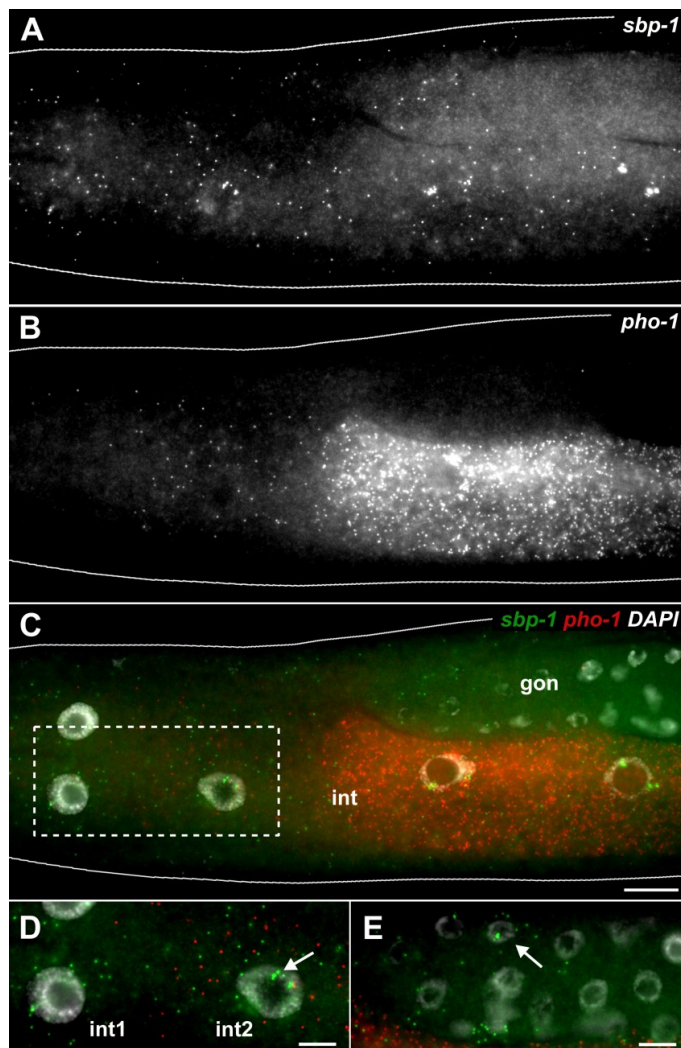
Jednotlivé mRNA molekuly jsou značeny fluorescenčními próbami (*zelené a červené tečky v cytoplasmě buňky*). Místa aktivní „nascentní“ transkripce jsou značeny mnohem intenzivnějším signálem a nacházejí se na chromatinu (*silné tečky uvnitř jádra*).

---

Rozhodli jsme se prověřit tuto metodu v zobrazení transkripce v orgánovém kontextu. Zaměřili jsme se na střevo, jako jeden z nejrozměrnějších orgánů *C. elegans*. Střevní buňky u *C. elegans* mají tu výhodu, že jsou polyploidní a jejich velikost je oproti jiným tělním buňkám zvýšená (Hedgecock and White, 1985). Jsou tedy mnohem příhodnější pro zobrazení.

Pro získání kvalitnějších výsledků jsme postup oproti zavedenému protokolu (Ji and van Oudenaarden, 2012) upravili. Zlepšení, které jsme zavedli ve značení dospělců v smRNA FISH, spočívá především v tom, že hádátka jsou zachycena a přemístována v připravených sítkách. To umožňuje snadnější a šetrnější manipulaci se vzorky z jednoho roztoku do druhého. Tímto se pro získání pelety před každou změnou roztoku vyvarujeme centrifugačních kroků, které jsou jednak časově náročnější, jednak ne příliš ohleduplné pro uchování buněčné morfologie. Použití poly-L-lysinového skla, které je vhodné pro imobilizaci embryí, L1 a L2 larev či jiných orgánů *C. elegans*, je pro starší larvy (L3 a L4) a dospělé neúčinné. Nezbytnou součástí našeho sítky je nylonová membrána, jejíž oka mají velikost 50  $\mu\text{m}$  právě tak, aby zachytila dospělé a L4 larvy a roztoky účinně propouštěla. Další předností našeho postupu je kratší hybridizační doba a fixace pomocí acetonu, jenž snižuje autofluorescenci způsobenou aldehydovou fixací. Podrobný popis našeho postupu je sepsán v kapitole 3.12 Single molecule RNA FISH.

Genová exprese byla zobrazena v anteriorní části těla L4 larvy *C. elegans* s použitím prób značící *sbp-1* a *pho-1* mRNA (Obrázek 23).



**Obrázek 23** Dynamika genové exprese *C. elegans* vyjádřena pomocí vícebarevné smRNA FISH. Použité próby jsou cíleny na genové produkty *sbp-1* (zelená) a *pho-1* (červená). Jaderná DNA je obarvena DAPI (šedá). A-C) Samotný *sbp-1* a *pho-1* signál a sloučení obou signálů společně s DAPI jsou zobrazeny jako maximální projekce ze dvou vedlejších optických sekcí o celkové tloušťce 500 nm anteriorní části těla larvy L4. V panelech A a B byl upraven jas pro znázornění jednotlivých RNA bodů v cytoplasmě. Ohraničená oblast v panelu C je zvětšená zachycena v panelu D. *gon*, gonáda; *int*, střevo. Měřítko je 10  $\mu\text{m}$ . D) *sbp-1* je v obou anteriorních buňkách střeva *C. elegans* exprimován na stejné úrovni (zelené tečky v *int1* a *int2*). smRNA FISH umožňuje zobrazit i tak nízkou míru transkripce jako je *pho-1* v *int2*, zatímco v *int1* se *pho-1* mRNA nezdá být přítomna. Intenzivní signál v jádře značeném DAPI označuje místo aktivní transkripce (šipka). Měřítko je 5  $\mu\text{m}$ . E) Snímek zachycuje část gonády ze stejného L4 jedince a přítomný *sbp-1* signál, který se jeví značně variabilní mezi buňkami. Šipka ukazuje na akumulaci *sbp-1*

mRNA a na jádro s aktivní transkripcí. Zobrazena je maximální projekce dvou snímků. Měřítka je 5  $\mu\text{m}$ .

*sbp-1* je transkripční faktor nezbytný pro normální metabolismus lipidů a je hojně expromován ve střevních buňkách (Taghibiglou et al., 2009). *pho-1* kóduje střevní kyselou fosfatázu, která je exprimována v celém střevu mimo první dvě anteriorní buňky int1 a int2 (Beh et al., 1991). Cytoplasmatický signál *sbp-1* (Obrázek 23A) je v rámci pozorované oblasti velmi homogenní. Naproti tomu *pho-1* (Obrázek 23B) signál vykazuje značnou variabilitu. Vysoká citlivost metody smRNA FISH umožňuje rozlišovat i velmi nízkou míru exprese, jako je například *pho-1* v int2, druhém anteriorním segmentu střeva (Obrázek 23D). Takovéto výsledky nejsou poskytovány pomocí histochemických nebo reportérových značení (Fukushige et al., 2005). Velmi zřetelná jsou místa právě aktivní transkripce, na snímku viditelná jako intenzivní tečky v jádře barveném pomocí DAPI.

Během dokumentace transkripční dynamiky ve střevních buňkách jsme si nemohli nevšimnout aktivní syntézy mRNA v gonádě (Obrázek 23E). Zaujala nás její variabilita. Relativně vysokou míru transkripční aktivity genu pro *sbp-1* jsme pozorovali v oblasti pachyténe lokalizované před ohybem gonády. Proto jsme se rozhodli využít potenciál metody smRNA FISH pro odhalení rozdílů v aktivní transkripci mezi jednotlivými stádii meiózy v gonádě.

#### **4.2.2. Zobrazení transkripční aktivity v gonádě *C. elegans* pomocí smRNA FISH**

Výše popsaná metoda smRNA FISH na celých dospělých *C. elegans* nám neumožnila detailně vyhodnotit rozdílnost v úrovni genové exprese v kontextu celé gonády. Velmi intenzivní signál pocházející ze střevních buněk částečně omezil bližší rozlišení transkripce v oocytech. Vnější kutikula dospělého je sice průhledná, přesto je zdrojem určité míry

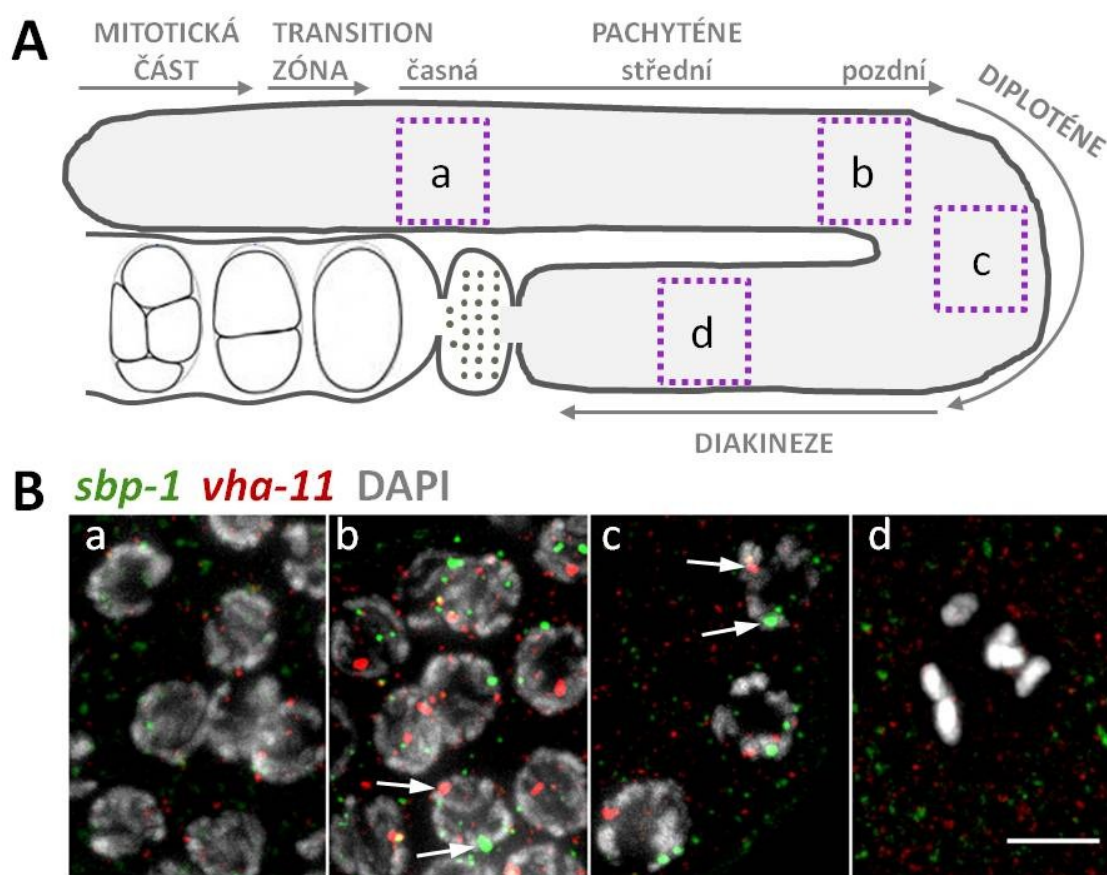


difrakce fluorescenčního světla. Abychom obešli tyto limitace, zvolili jsme použití postupu smRNA FISH na gonádách izolovaných z těla dospělého háďátka. Podrobný protokol je popsán v kapitole 3.12.2. smRNA FISH na izolovaných gonádách *C. elegans*. Od postupu hybridizace v dospělých se liší především v tom, že zafixované gonády jsou po celou dobu procesu imobilizovány na poly-L-lysinovém skle namísto volných dospělců v suspenzi a jako fixační médium je oproti acetonu použit formaldehyd, který poskytl kvalitnější data. Zvolili jsme fluorescenční próby pro zobrazení transkripce *sbp-1* a *vha-11*. Gen *vha-11* kóduje jednu z komponent vakuolární ATPázy a bylo ukázáno, že je nezbytný pro správný průběh ovulace u *C. elegans* (Oka and Futai, 2000).

Jeden z benefitů metody smRNA FISH je možnost kvantifikace míry transkripce v jednotlivých buňkách, které často vykazují vysokou variabilitu v úrovni genové exprese mezi sousedními buňkami. Počítání jednotlivých mRNA v cytoplasmě dovoluje velmi přesně určit míru transkripce. V tkáňové soustavě je potřeba, oproti buňkám v kultuře, rozeznat hranice mezi jednotlivými buňkami. Toho je možné dosáhnout například barvením aktinových struktur pomocí fluorescenčně značeného faloidinu. V gonádě *C. elegans*, která je tvořena soubuním a jednotlivé cytoplasmy většiny oocytů jsou částečně propojené, představuje kvantifikace transkripce pomocí vizualizace a kalkulace transkriptů na jednobuněčné úrovni další překážku. Současné značení transkriptů pomocí smRNA FISH a hranic buněk pomocí fluorescenčně značeného faloidinu se v našem případě nesešlo s úspěchem. Ačkoliv byl náš smRNA FISH signál v cytoplasmě jasně detekován, rozhodli jsme se pro porovnání míry genové exprese na základě počtu transkripčních spotů v jádře.

smRNA FISH signály byly dokumentovány ve čtyřech stádiích meiózy v gonádě (Obrázek 24). V časném stádiu pachyténe nebyly detekovány téměř žádné jaderné transkripční spoty (Obrázek 24Ba). Velmi podobná situace byla pozorována pro dvě předchozí fáze, tedy mitotická a transition zóna (data nejsou předvedena). Zato v pozdní

pachyténe (Obrázek 24Bb) a v celé diploténe (Obrázek 24Bc) vykazují buňky vysokou míru exprese. Většina buněk v těchto fázích měla jedno až dvě místa aktivní transkripce *sbp-1* i *vha-11*. V žádném z diakinetických oocytů transkripční místa nebyly dokumentovány (Obrázek 24Bd).



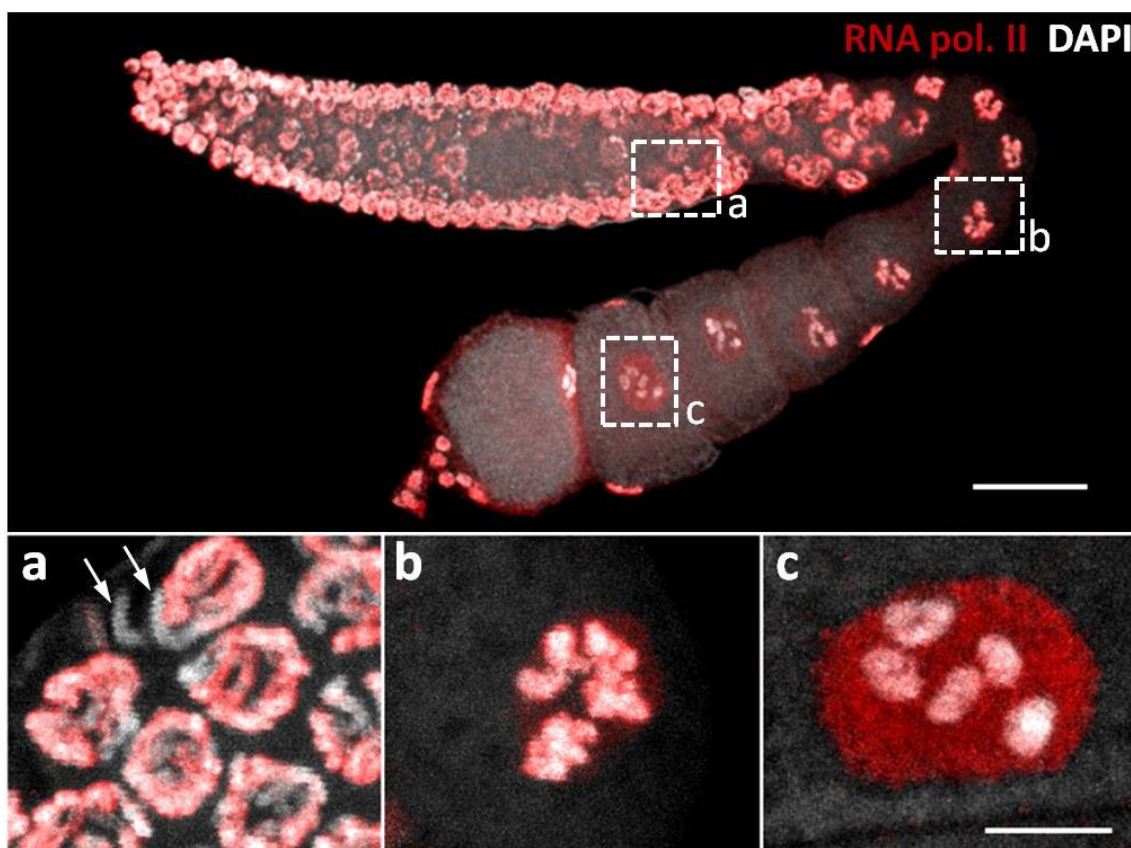
**Obrázek 24 Analýza genové exprese v gonádě *C. elegans* pomocí smRNA FISH.**

A) Schéma gonády *C. elegans* ohraničenými oblastmi znázorňuje pozici jednotlivých snímků v panelu B. Jednotlivé zóny gonády jsou ilustrovány šipkami. B) Značení transkriptů *sbp-1* (zeleně) a *vha-11* (červeně) metodou smRNA FISH je zobrazeno v časné (a) a pozdní (b) pachyténe, v diploténe (c) a diakinezi (d) disektovaných gonád. Transkripční spoty obou genů (intenzivní tečky v jádrech barvených DAPI) jsou přítomny v oocytech pozdní pachyténe a diploténe. Zobrazena je maximální projekce osmi snímků o celkové tloušťce 3,50  $\mu\text{m}$ . Měřítka je 5  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.3. Značení transkripční aktivity v gonádě *C. elegans* pomocí imunofluorescence

Pomocí metody smRNA FISH jsme zdokumentovali transkripci na základě genové exprese dvou genů. Naším cílem bylo zobrazení genové exprese meiotických zárodečných buněk v globálním měřítku. Jako první jsme se rozhodli prošetřit tento úkol pomocí imunofluorescenčního značení RNA polymerázy II, která je zodpovědná za syntézu mRNA. Zvolili jsme myši monoklonální protilátku detekující fosforylovaný serin5 C-terminální domény RNA polymerázy II, která nepřímo naznačuje míru transkripční iniciace (Phatnani and Greenleaf, 2006). Gonády byly opět izolovány z těla dospělců *C. elegans*, až poté fixovány, značeny protilátkami a snímány na konfokálním mikroskopu (Obrázek 25).

RNA polymeráza II byla na chromozomech od mitotické části až do diploténe velmi rovnoměrně akumulovaná (Obrázek 25 horní panel). Na diakinetických oocytech byla polymeráza detekována jen v nukleoplazmě, na chromozomech nikoliv (Obrázek 25 spodní panel c). V oblasti pachyténe je velmi patrná transkripční inaktivace X chromozomu (Obrázek 25 spodní panel a), který je oproti autozomům navýšen o represivní epigenetické modifikace H3K27 a H3K9 (Bender et al., 2004, Strome et al., 2014, Kelly et al., 2002). S předchozí metodou smRNA FISH imunologické značení transkripce koresponduje jen v oblasti neaktivní diakineze. V ostatních zónách značení nevykazuje žádnou variabilitu a jeví se jako transkripčně homogenní. Abychom prověřili naše výsledky o aktuálním stavu genové exprese, která se podle smRNA FISH zdá být významná v oblasti pachyténe a diploténe, rozhodli jsme se pro použití metody EU inkorporace, která umožňuje globální značení nascentní RNA.

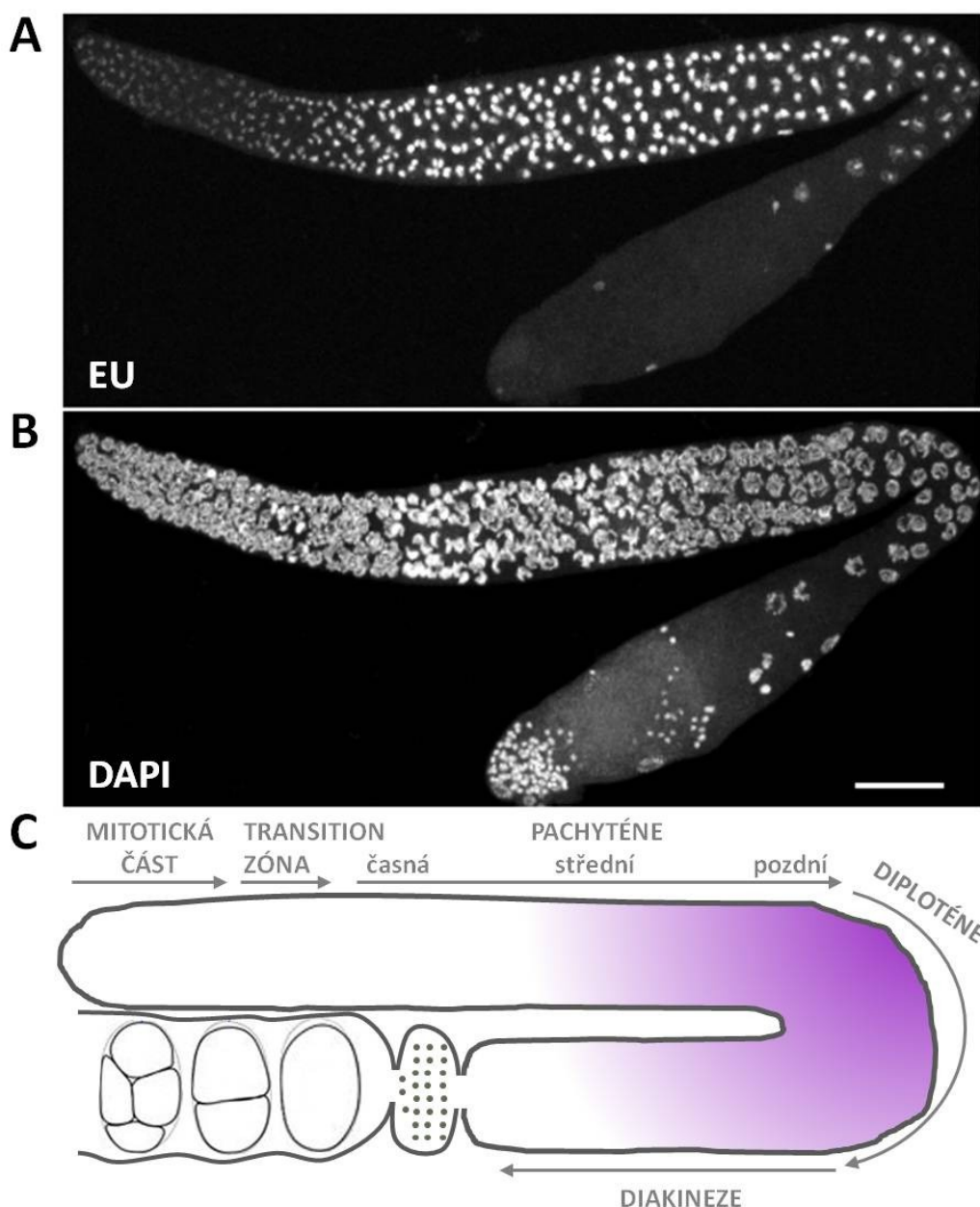


**Obrázek 25 Akumulace RNA polymerázy II v zárodečných buňkách gonády *C. elegans*.** Izolované gonády dospělých hermafroditů byly značeny protilátkou proti C-terminální doméně RNA polymerázy II (červeně) a DAPI (šedá). Celkové akumulace polymerázy je zachycena v horním panelu. Zobrazena je maximální projekce o celkové tloušťce 800 nm. Pozn: jádro -1 oocyty je z neznámého důvodu staženo ke straně. Měřítka je 20  $\mu\text{m}$ . Ohraničené oblasti stejné gonády jsou zvětšené zachyceny ve spodních panelech: (a) střední pachyténe, autozomy jsou rovnoměrně značeny RNA polymerázou II, šipka ukazuje na transkripčně inaktivovaný X chromozomy dvou sousedních jader (b) diploténe, polymeráza je akumulována na chromozomech a částečně v nukleoplasmě, (c) diakinesis, polymeráza již vyplňuje celý prostor jádra mimo chromozomů. Zobrazena je maximální projekce o celkové tloušťce 3  $\mu\text{m}$ . Měřítka je 5  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.4. Zobrazení transkripční dynamiky v gonádě *C. elegans* pomocí EU inkorporace

Pro dokumentaci aktuálního stavu celkové transkripce a její dynamiky v gonádě jsme využili metody inkorporace 5-etynyluridinu (EU). EU je nukleosidový analog uridinu, který se po přeměně na UTP (uridintrifosfát) inkorporuje během aktivní RNA syntézy. Jedná se o alternativní metodu ke značení pomocí 5-bromouridinu (BrU), jež je běžně detekován pomocí protilátek. Je přínosné krátce se ohlédnout po metodě měření míry celkové transkripce v buňkách z časů minulých. První metoda se spoléhala na značení RNA radioaktivními nukleosidy [<sup>3</sup>H]-uridinu a následnou autoradiografii tkáně (Uddin et al., 1984). Jedná se o velmi pomalou proceduru, která vyžaduje velmi dlouhou expozici a práci s radioaktivitou. Výsledné rozlišení mikroskopických obrázků je navíc velice slabé (Jao and Salic, 2008). Nevýhoda BrU inkorporace tkví právě ve značení tkání, protože je omezena difuzí protilátky vzorkem. Vizualizace EU je založena na chemické „click“ reakci alkynu na 5-etynyluridinu s fluorescenčně značeným azidem (více v Kapitole 3.10. Značení nascentní RNA v gonádách *C. elegans*). Výhody této metody jsou: oproti molekule protilátky je velikost reaktivního azidu velmi nízká, azid tak snadno penetruje do tkání, EU se inkorporuje do RNA, nikoliv do DNA (Jao and Salic, 2008), rychlá detekce a vysoká citlivost fluorescenčních azidů.

Opět jsme barvili izolované gonády, které byly okamžitě po extrakci vystaveny 2 mM roztoku EU po dobu 15 minut a následně zafixovány. EU bylo fluorescenčně značeno azidem Alexa Flour<sup>®</sup> 488 nm. Míra inkorporace EU do RNA utvářela v celé gonádě gradient (Obrázek 26). Úroveň transkripce mRNA se vyčte z intenzity značeného EU v místě chromozomální DNA (Obrázek 26A), která je barvena DAPI (Obrázek 26B). V daných podmínkách jsme pozorovali velmi nízkou mírou transkripce v části mitotické a prakticky žádnou v oblasti diploténe. Aktivní transkripce postupně sílila s nejvyšší úrovní v pachyténe a diploténe (Obrázek 26C).



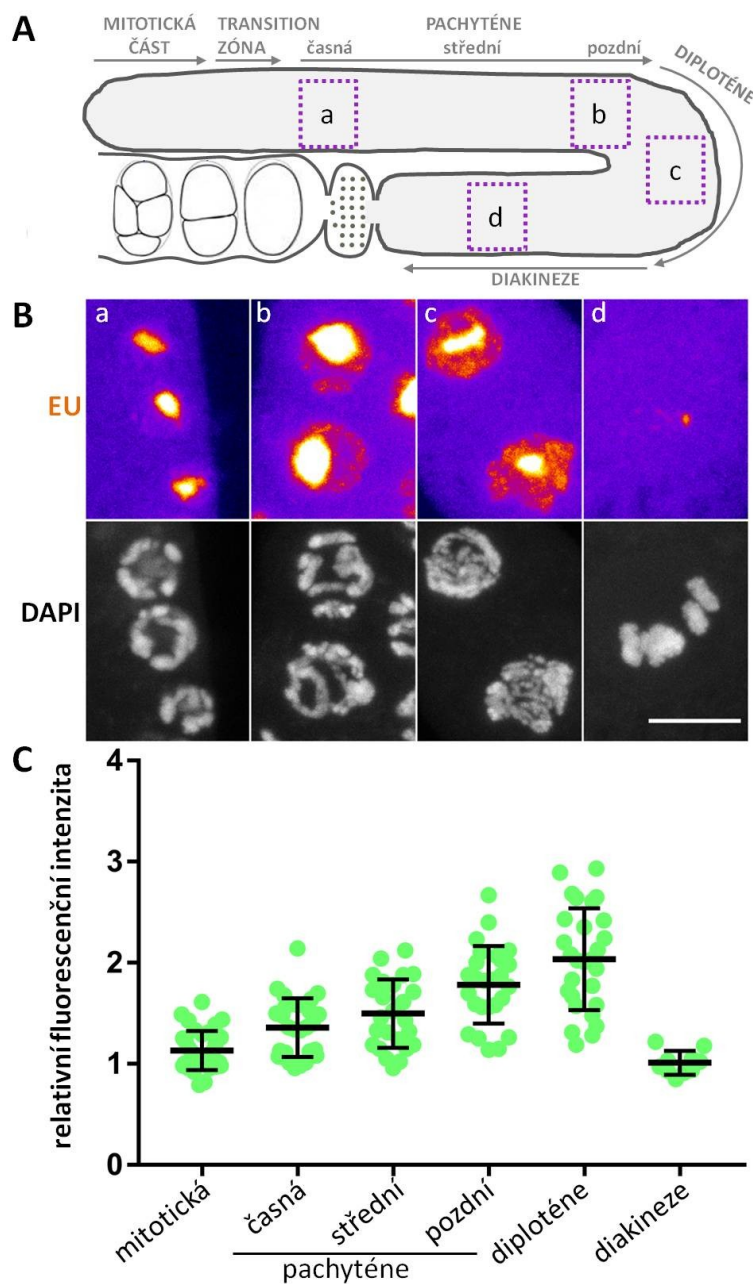
**Obrázek 26** Transkripční aktivita v gonádě *C. elegans* zobrazena pomocí EU inkorporace do RNA. Disektované gonády byly vystaveny médiu s 2mM uridinovým analogem EU po dobu 15 minut a poté ihned fixovány. A) RNA byla detekována reakcí EU s fluorescenčně značeným azidem Alexa Flour<sup>®</sup> 488 nm. B) DNA je barvena DAPI. V rámci celé gonády je patrná vysoká variabilita inkorporace EU do mRNA (na chromatinu) i do rRNA (v jadérku). Zobrazena je maximální projekce o celkové tloušťce 12  $\mu\text{m}$ . Měřítka je 20  $\mu\text{m}$ . C) Schéma gonády *C. elegans* ilustruje gradient míry inkorporace EU do mRNA (fialově). Jednotlivá stádia meiózy jsou vystižena šipkami.

Protože se EU inkorporuje do RNA transkriptů generovaných RNA polymerázou I, II i III, můžeme v gonádě pozorovat i míru produkce ribozomální RNA v jadérku uprostřed jádra (Obrázek 26A a detailně Obrázek 27B). Intenzita jadéřkové EU je oproti té chromozomální viditelně silnější. Nejvyšší stupeň syntézy rRNA jsme pozorovali v celé oblasti pachyténe. Od diploténe se intenzita i velikost EU signálu v jadérku snižovala a v diakinezi jsme detekovali jen slabé tečky, které pravděpodobně odpovídají fibrillárním centrům jadérka.

Pro získání co možná nejvíce fyziologické výsledky jsme zkoušeli EU značení gonád *in vivo*. Živá háďátka jsme vystavili 2 mM roztoku EU, poté byly gonády izolovány a fixovány. Bohužel, ani po 30minutové inkubaci jsme nedekovali EU inkorporaci v oocytech. Důvodem může být zhoršená propustnost kutikuly těla pro EU.

Pro kvantifikaci míry genové exprese v jednotlivých stádiích meiózy v gonádě jsme se zaměřili na analýzu podrobných snímků inkorporace EU zejména do mRNA (Obrázek 27). Značené gonády byly nasnímány s vysokým rozlišením. Míra transkripce mRNA byla určena jako průměrná intenzita EU fluorescenčního signálu na chromozomu značeném pomocí DAPI. Zaměřili jsme se na kvantifikaci transkripce v části mitotické, časné, střední a pozdní pachyténe, diploténe a diakineze (Obrázek 27B). Postup analýzy a kvantifikace je popsán v kapitole 3.11. Obrazová analýza EU značení. Získané hodnoty byly vztaženy k hodnotám v diakinezi, kde jsou hodnoty nejnižší. Výsledná měření byla porovnána v rámci celé gonády (Obrázek 27C).

V mitotické části jsme detekovali velmi slabý transkripční signál. V rámci pachyténe se transkripční aktivita postupně zvyšuje s proximálním směrem. Nejvyšší míra aktuální syntézy mRNA je detekována v diploténe. V diakinezi transkripční aktivita rapidně klesá. V této fáze není detekována žádná transkripční aktivita.



**Obrázek 27** Kvantifikace míry aktuální transkripce v gonádě *C. elegans*.

A) Schéma gonády *C. elegans*, které ohraničenými oblastmi označuje pozici snímků gonády v panelu B. Jednotlivé zóny gonády jsou ilustrovány šipkami. B) Reprezentativní detaily inkorporace EU (horní řada) a DAPI barvení chromozomů (spodní řada) v podstatných částech gonády. Intenzita EU signálu v místě chromozomu značí úroveň transkripce, v místě jádérka míru syntézu rRNA. a) časná pachyténe, transkripce jen na bazální úrovni, b) pozdní pachyténe, zvýšená míra transkripce, největší c) diploténe,

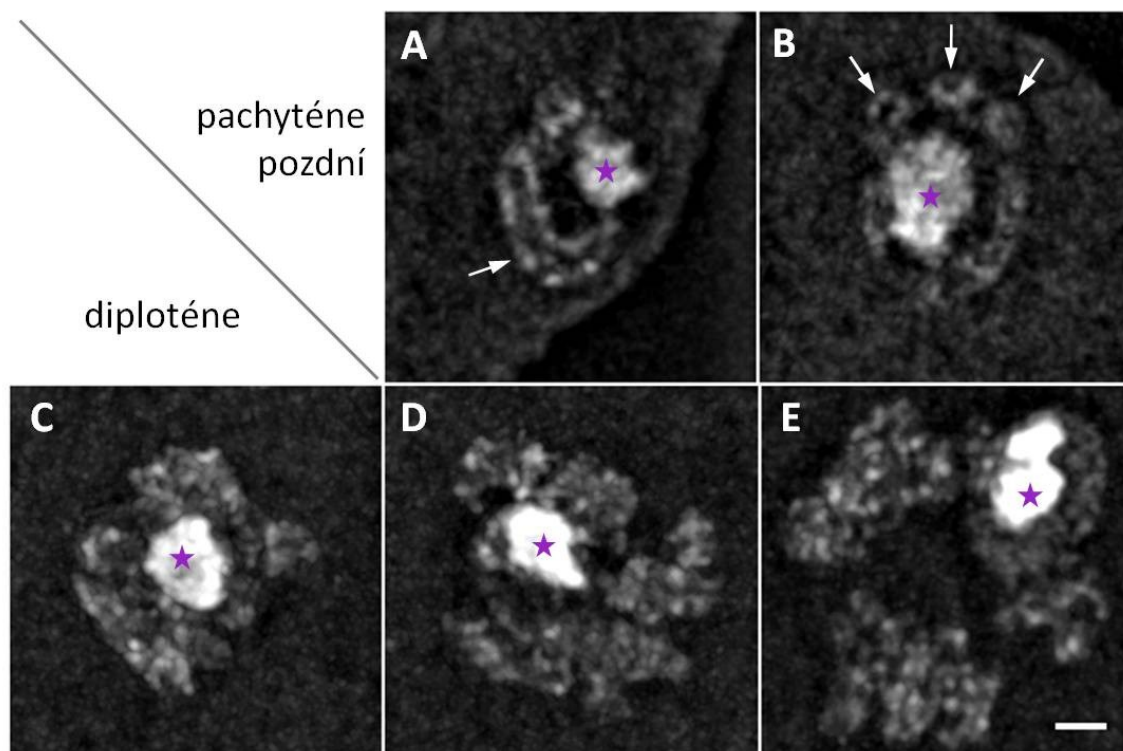


---

nejvyšší míra transkripce, d) diakineze, transkripce umlčena. Zobrazena je maximální projekce o celkové tloušťce 4-8  $\mu\text{m}$ . Měřítka je 5  $\mu\text{m}$ . C) Grafické znázornění míry inkorporace EU především do mRNA (osa  $y$ ; relativní fluorescenční intenzita EU vztažena k hodnotám v diakinezi) v jednotlivých zónách gonády (osa  $x$ ). Každý bod představuje měření jednoho jádra.

Na detailních snímcích značené gonády získaných za pomoci konfokální mikroskopie jsme si všimli velmi zajímavé struktury EU inkorporace na chromozomech. Chtěli jsme tento jev blíže prošetřit a rozhodli jsme se pro snímání pomocí super-rezolučního mikroskopu. Zvolili jsme mikroskopii se strukturovaným osvětlením SIM (Structured Illumination Microscopy), jenž umožňuje získat obrázky s jemnějšími detaily o rozlišení okolo 100 nm (Gustafsson, 2000, Gustafsson, 2005). EU značené gonády byly snímány s 250nm krokem v ose  $z$  v oblasti pachyténe a diploténe (Obrázek 28).

Ze super-rezolučních snímků je zřejmé, jak chromatin mění od pachyténe přes diploténe svou morfologii. Pachyténní chromozomy ve formě synapse vytvářejí na periferii jádra tvar klubka. Zajímavé pro nás bylo zjištění, že aktivní transkripce značená pomocí EU je v těchto jádrech lokalizována na periferii chromozomů (Obrázek 28A, B). V diploténe, kdy dochází k rozpadu synaptonemálního komplexu, se chromozomy rozvolňují (Obrázek 28C-E). EU vyplňuje celý objem chromozomu, ale i zde je patrná strukturně nepravidelná inkorporace EU do RNA syntetizované zejména RNA polymerázou II. Distribuce nascentní mRNA v pachyténe a diploténe je velmi vzorovaná, takže se zdá, že transkripce neprobíhá na chromozomech rovnoměrně.

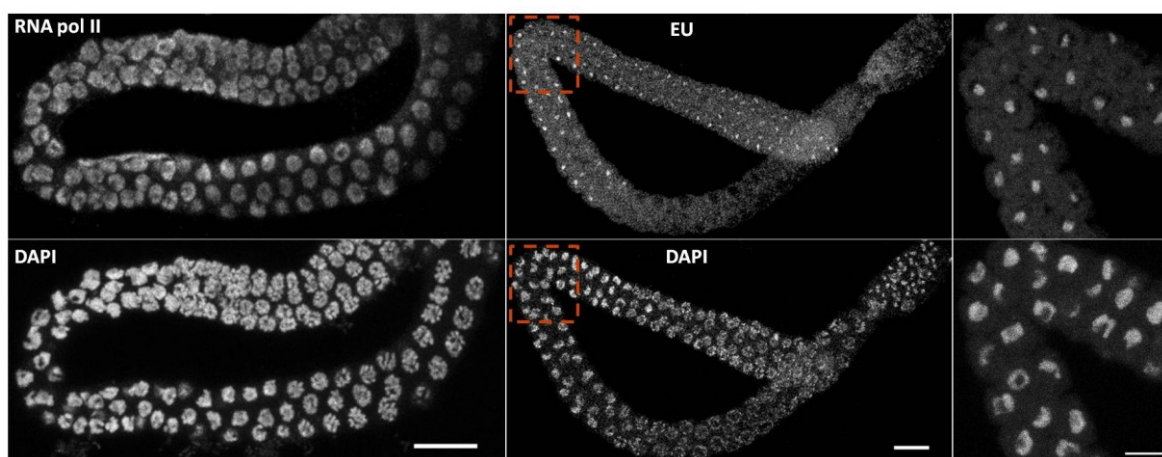


**Obrázek 28** EU značená jádra zárodečných buněk zobrazena pomocí super-rezoluční mikroskopie. Gonády s inkorporovaným EU byly snímány na SIM mikroskopu v oblasti pozdní pachyténe (A, B) a diploténe (C, D, E). Ve všech zobrazených detailech jádra je patrná vzorovaná struktura inkorporace EU do mRNA na chromozomech. Jadérko leží v centru jádra (*hvězdička*). A) Průřez jádrem zobrazuje podélný řez chromozomem, který leží rovnoběžně s rovinou snímku (*šipka*), B) Příčný řez třemi chromozomy, které leží kolmo na rovinu snímku (*šipky*). Zobrazeny jsou maximální projekce o celkové tloušťce 750 nm. Ve spodním panelu jsou postupně zobrazena diplotenní jádra tak, jak jdou po sobě v proximálním směru gonády. C) Chromozomy jsou již částečně rozvolněné a těsně obklopují jadérko. D) Chromozomy se začínají rozpínat od jadérka, které se zmenšuje a koncentruje. E) Poslední diplotenní jádro před postupem do diakineze. Chromozomy i jadérko jsou rozptýlené od centra jádra. Zobrazeny jsou maximální projekce celých jader o celkové tloušťce 4,5 – 7,5  $\mu\text{m}$ . Měřítka je 1  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.5. Značení transkripce v samčích gonádách *C.elegans*

Využili jsme potenciálu EU značení k prošetření transkripce v gonádách samců. Izolovali jsme gonády samců, které v celé délce vytvářejí jen samčí zárodečné buňky. Gonády byly značeny EU i RNA polymerázou II (Obrázek 29) stejně jako gonády hermafroditů.

Zárodečné buňky v samčích gonádách vykazují homogenní akumulace RNA polymerázy II. V porovnání s gonádou hermafroditů (Obrázek 25) se jedná přibližně o podobnou hladinu. Naproti tomu inkorporaci EU na úrovni mRNA jsme v samčích gonádách nedetekovali. RNA v jadérku se zdá být jediná struktura značená EU. I zde je inkorporace EU oproti gonádě hermafrodita nižší.



**Obrázek 29 Značení RNA polymerázy II a EU inkorporace v samčích gonádách *C. elegans*.** V celé gonádě je zobrazena akumulace RNA polymerázy II s DAPI barvením (*levý panel*) a EU inkorporace s DAPI barvením (*prostřední panel*). Měřítko je 10  $\mu\text{m}$ . Ohraničená místa v prostředním panelu v pozici ohybu gonády jsou zvětšena (*pravý panel*). Měřítko je 5  $\mu\text{m}$ .

### **4.3. Nukleo-cytoplazmatický poměr *C. elegans***

#### **4.3.1. Nukleo-cytoplazmatický poměr zárodečných buněk *C. elegans***

Gonáda *C. elegans* je velmi dynamický orgán. Jednotlivé zárodečné buňky v průchodu jednotlivými stádii meiózy značně mění morfologii jádra, reorganizují cytoplazmu, vytvářejí si makromolekuly nezbytné pro oplození a časnou embryogenezi. Dalším znakem, který provází buňky v gametogenezi *C. elegans* je postupné zvyšování velikosti buněk. Začátek tohoto chování je viditelný právě v pozici ohybu gonády. Z našich předchozích výsledků je vidět, že tato oblast je v gonádě transkripčně nejvíce aktivní. Naším dalším cílem se proto stalo bližší prozkoumání změn jaderné morfologie a jejich propojení je s metabolismem celého orgánu. Zaměřili jsme se na změnu velikosti buněk a jader a na jejich vzájemný vztah.

Nukleo-cytoplazmatický poměr je významný parametr v metabolismu buňky. Chtěli jsme získat data, která co nejvíce odpovídají skutečnosti. Proto jsme rozhodli provést měření na intaktních tkáních v živých jedincích *C. elegans*. Jedná se o velmi unikátní přístup vyžadující špičkovou techniku vícebarevné fluorescenční mikroskopie. Abychom mohli měřit velikosti buněk a jader, potřebovali jsme vhodné značky těchto struktur. Měli jsme k dispozici kmen OD95, který exprimuje GFP konjugovaný s PH doménou delta podjednotky fosfolipázy C přítomné v cytoplazmatické membráně [GFP-PH(PLCdelta1)] a mCherry fúzovaný s histonem H2B (mCherry-H2B) pro označení chromatinu. Pro značení jaderného povrchu je vhodný kmen OD139, který exprimuje LMN-1 (*C. elegans* homolog laminu B) konjugovaný se žlutým fluorescenčním proteinem YFP (YFP-LMN-1) i mCherry-H2B. Prvním krokem tedy bylo zkřížit tyto dva kmene, abychom mohli zobrazit všechny 3 znaky najednou. Jedna z komplikací, které nám částečně znesnadnily postup, je fakt, že transgeny pro značení cytoplazmatické membrány a laminu jsou v těchto kmenech přítomny na stejném chromozomu. Nebylo tedy možné zkřížením získat stabilní homozygotní linie.

Další výzvou, které jsme čelili, byla příprava vzorků pro mikroskopické snímání gonád v živých *C. elegans*. Jediné bylo potřeba imobilizovat a přitom zachovat fyziologickou morfologii orgánů. Znehybnění pomocí paralyzačního činidla levamisolu má vedlejší nežádoucí účinky v podobě změny struktury buněčného jádra (P. Askjaer, osobní rozhovor s Christianem Lanctôtem)). Rozhodli jsme se pro mechanickou metodu imobilizaci pomocí mikroskopických kuliček, které ve vysoké koncentraci znemožní pohybu, jež je pro *C. elegans* tolik přirozený.

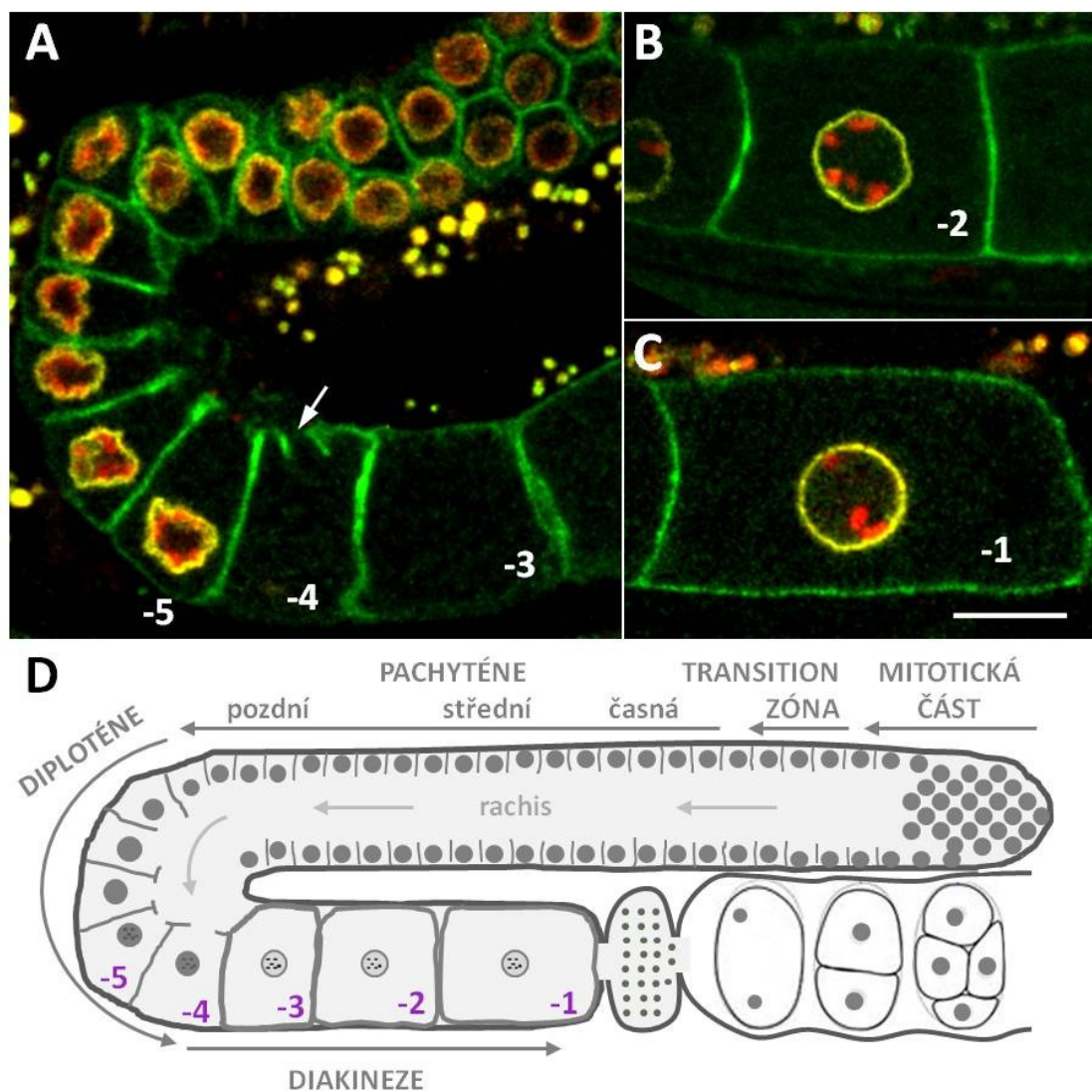
Podářilo se nám znemožnit celkovému pohybu, ale v zabránění vnitřního neklidu orgánů jsme neuspěli. Fluorescenční iluminace způsobuje stahy střev a gonád ve snaze hádátka uniknout škodícímu ozařování. Ani tato překážka nám nezabránila získat hodnotná data buněčných rozměrů.

Gonády byly snímány ve 3D na konfokálním mikroskopu pomocí vodního objektivu se zaměřením na ohyb gonády a oocyty v proximální části (Obrázek 30). YFP značený lamin jasně určil kontury jádra. Signál z GFP značené cytoplazmatické membrány nám posloužil pro definování obrysu buněk a následně pro měření jejich objemu.

Velmi nás překvapilo, jak silný signál všech tří znaků jsme u heterozygotních kříženců detekovali. Z obrázků je jasně patrné, že zárodečné buňky postupně od fáze pozdní pachyténe až k poslednímu oocytu (-1) rapidně zvětšují svou velikost. Buňky se od diploténe rovnají do jedné řady a postupně uzavírají propojení s rachis. Oocyty v diakinezi přístup do rachis již nesdílejí.

Jádra zárodečných buněk v oblasti ohybu také procházejí dramatickými změnami. Jádro v pachyténe má kulovitý tvar. V diploténe se jaderný obal postupně svažuje a na povrchu se formují hluboké vrásky, které těsně obepínají chromozomy (Obrázek 30A). Tento jev je nejspíše způsoben změnou osmotického tlaku v cytoplazmě vyvolanou náhlým nárůstem nasyntetizovaných proteinů. Kim s kolegy se domnívají, že důsledkem toho proudí voda z jádra do cytoplazmy a jaderný obal se svažuje. V diakinezi se tlaky

postupně vyrovnávají a jádro se zakulacuje (Kim et al., 2015). Jádro -1 oocyty má vždy tvar pravidelné koule (Obrázek 30C).

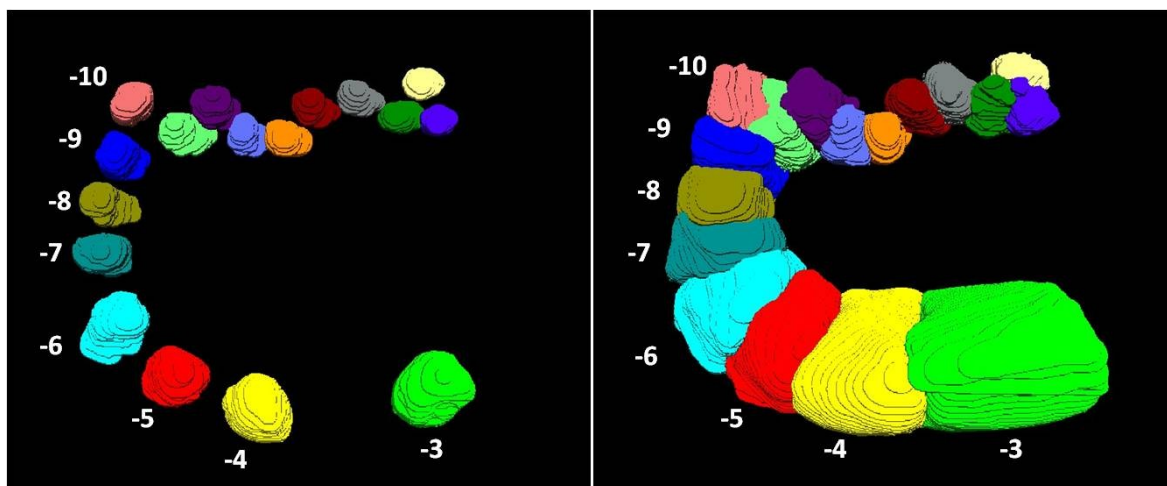


**Obrázek 30 Zachycení gonády *C. elegans* pro měření objemu cytoplazmy a jader.**

Heterozygotní kmen exprimuje fluorescenčně značenou cytoplazmaticou membránu [GFP-PH(PLCdelta1)] zeleně, lamin B (YFP-LMN-1) žlutě a chromatin (mCherry-H2B) červeně. Snímány byly gonády v místě ohybu (A), -2 oocyty (B) a -1 oocyty (C). Šipka značí poslední propojení rachis s oocytem. Rachis a jádra buněk -3 a -4 leží mimo zachycenou úroveň. Zobrazeny jsou maximální projekce o celkové tloušťce 1-0,5  $\mu\text{m}$ . D) Schéma gonády *C. elegans* naznačuje pozici oocytů.

K identifikaci jaderné morfologie nám posloužil mCherry značený chromatin. Ten se v přechodu z pachyténe do diploténe mění z tvaru dutého klubka do částečně rozvolněnějších chromozomů. Chromatin v těchto fázích vyplňuje většinu objemu jádra. V diploténe se z chromozomů utvářejí vysoce kondenzované bivalenty, které zaujímají jen malou část nukleoplazmy (Obrázek 30C).

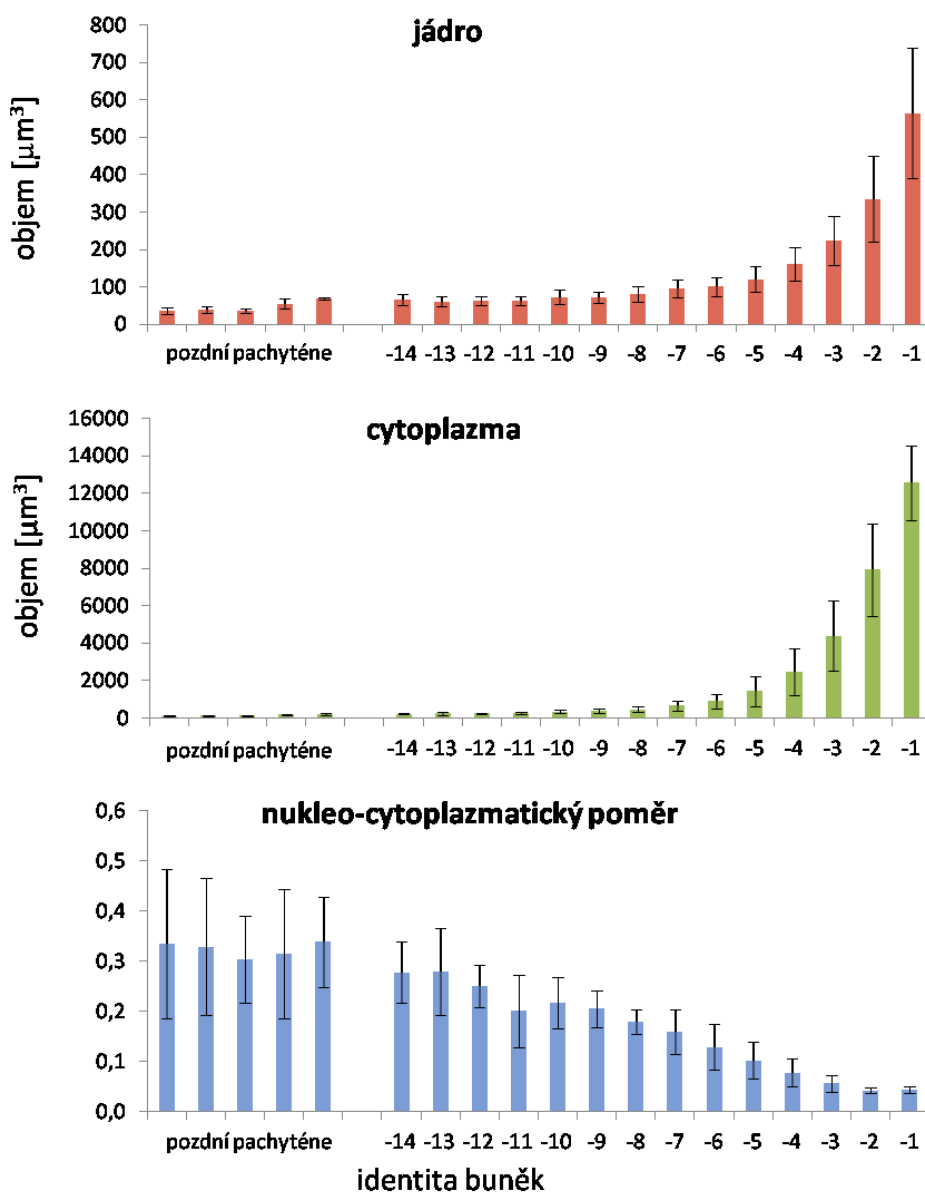
Pro poměření velikostí jader a celých buněk jsme nasnímali 3D obrázky gonád vytvořeného heterozygotního kmenu. Gonády byly segmentovány a rekonstruovány ve 3D pomocí programu Amira 6.2 od FEI (Obrázek 31).



**Obrázek 31 3D modely zárodečných buněk v ohybu gonády *C. elegans*.**

Jádra (vlevo) a cytoplazmy (vpravo) jednotlivých zárodečných buněk byly rekonstruovány do trojrozměrných modelů. Obě struktury jedné buňky jsou obarveny stejnou barvou. Čísla identifikují jednotlivé buňky v pořadí od posledního oocyty v gonádě. Od buňky -10 a dále jsou zobrazeny modely jen vybraných buněk.

Objemy byly měřeny manuálně po jednotlivých vrstvách o výšce posunu 500 nm v ose z jako počet voxelů v programu Amira 6.2. Pro získání objemu cytoplazmy ( $C$ ) byl objem buňky ( $B$ ) zmenšen o objem jádra ( $J$ ):  $C = B - J$ . Celkem bylo změřeno 11 gonád v oblasti od pozdní pachyténe až po -1 oocyt. Jednotlivé hodnoty všech gonád odpovídající stejným buňkám byly zprůměrovány a graficky porovnány (Obrázek 32).



**Obrázek 32** Objemy jader a cytoplazmy zárodečných buněk v gonádě *C. elegans*.

Vyneseny jsou průměrné hodnoty objemu jader (*nahoře*), cytoplazmy (*uprostřed*) a nukleo-cytoplazmatický poměr (*dole*) zárodečných buněk od pozdní pachyténe k poslednímu oocytu. Totožnost buněk je označena čísly, která určují pořadí buňky od posledního oocytu v gonádě. Celkem bylo analyzováno 11 gonád. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku.



Zhodnotili jsme také nukleo-cytoplazmatický poměr zárodečných buněk, tedy poměr objemu jádra ku objemu cytoplazmy, J/C. Zárodečné buňky v pachyténe a diploténe mají cytoplazmy ještě propojené s rachis. Objem buněk byl tedy měřen tak, že tento otvor byl považován za uzavřený.

Buňky v oblasti pachyténe si udržují relativně stejnou velikosti jádra i cytoplazmy. Jejich průměrný nukleo-cytoplazmatický poměr o hodnotě 0,33 vypovídá o tom, že jádro zde zaujímá přibližně jednu třetinu objemu cytoplazmy. V diploténe, začátek ohybu gonády, přibližně kolem -14 buněk, se cytoplazma i jádra buněk začínají razantně zvětšovat. Největší nárůst objemu nastává v přechodu do diakineze, přibližně okolo -5 a -4 oocyty. Nejobjemnější jádro i cytoplazmu nalezneme u -1 oocyty. Jádro zde však představuje jen 1/25 z celkového objemu buňky.

Z grafů je patrné, že cytoplazma roste rychleji než jádra, která se v průměru od pachyténe až k poslednímu oocyty zvětší přibližně desetkrát (z  $\sim 50$  na  $\sim 600 \mu\text{m}^3$ ), cytoplazma se zvětší stokrát (z  $\sim 140$  na  $\sim 13\,000 \mu\text{m}^3$ ). To se projevuje na snižujícím se nukleo-cytoplazmatickém poměru, který u -1 oocyty spadne skoro na desetinu své hodnoty v pachyténe (z  $\sim 0,33$  na  $\sim 0,04$ ). Nukleo-cytoplazmatický poměr se u -2 a -1 oocyty nijak zvlášť neliší. Předposlední oocyt sice naroste v průměru o polovinu svého objemu na velikost posledního, poměrný nárůst je však stejný i v případě buněčného jádra.

Určitá variabilita v naměřených hodnotách je dána především tím, že jednotlivé oocyty rostou nepřetržitě. Každý oocyt ve své pozici v rámci gonády setrvává přibližně 23 minut, než se posune na pozici blíže ke spermatéce. To je doba, za kterou dochází u *C. elegans* k ovulaci. Dalším faktorem zvyšující směrodatné odchylky hodnot je fakt, že pro tento pokus byli vybíráni dospělci, kteří ovšem nebyli zcela synchronizováni. Příčinou toho je heterozygotní populace kříženců, která produkovala jen zlomek dospělců pozitivních ve všech třech znacích.

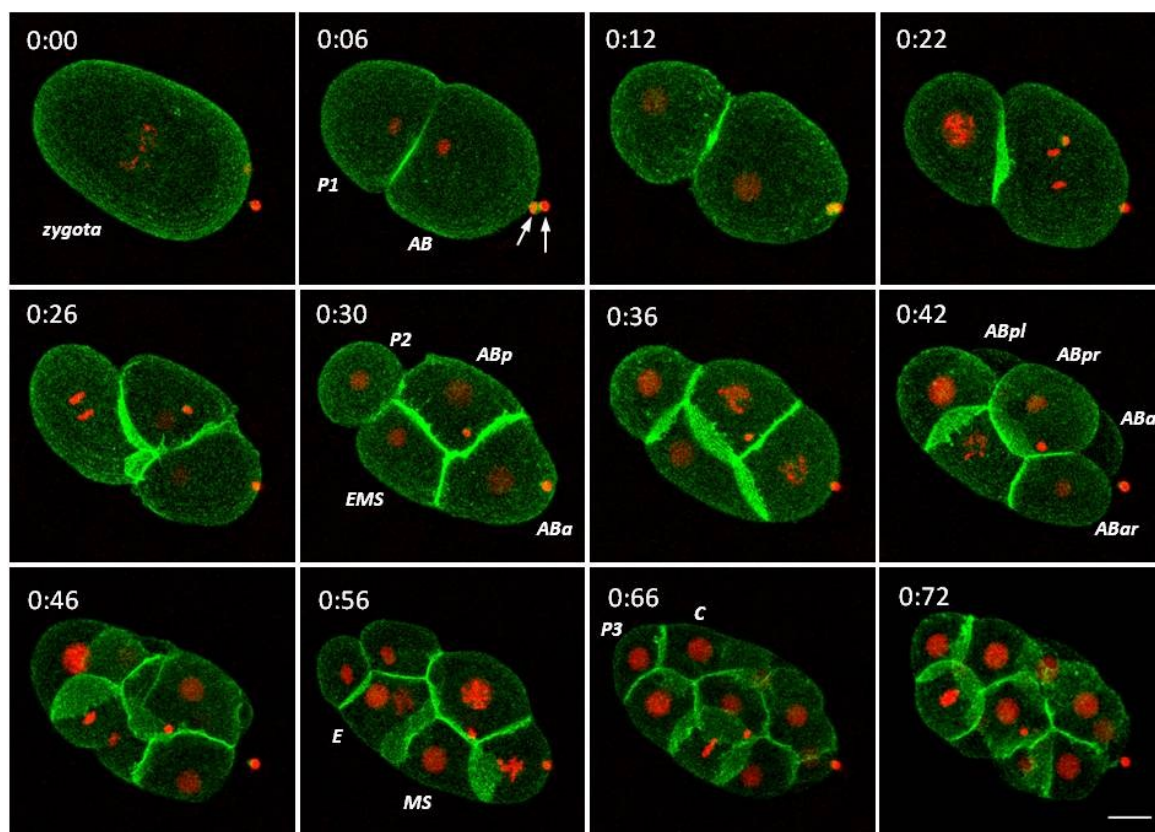
---

V návaznosti na rostoucí velikosti zárodečných buněk v gonádě jsme se dále rozhodli zdokumentovat rozměry buněk v procesu hned následujícím, tedy embryogenezi, kde naopak dochází k postupnému zmenšování jednotlivých blastomer v rámci vývoje.

#### **4.3.2. Nukleo-cytoplazmatický poměr v raném embryonálním vývoji *C. elegans***

Další nepochybně zajímavou strukturou ve vztahu k poměrným velikostem buněk je embryo *C. elegans*. Jeho vnější obal se s vývojem embrya nezvětšuje a s každým rozdělením blastomer se velikost buněk zmenšuje. Proto jsme se rozhodli změřit objemy jádra a cytoplazmy jednotlivých blastomer v časném embryonálním vývoji. Za tímto účelem jsme jako model zvolili kmen OD95, který exprimuje značený chromatin (H2B-mCherry) a cytoplasmatickou membránu [GFP-PH(PLCdelta1)]. Na rozdíl od předchozího heterozygotního kmene pro měření objemů gonády není třeba selektovat pozitivní jedince. Oba dva znaky leží v tomto kmeni na různých chromozomech, což umožňuje vytvořit homozygotní kmen. U embryí nám jako jaderný mákrk postačí fluorescenčně značený histon H2B, poněvadž blastomery ve svém cyklu procházejí S fází, kdy chromatin zcela zaplňuje celý objem jádra.

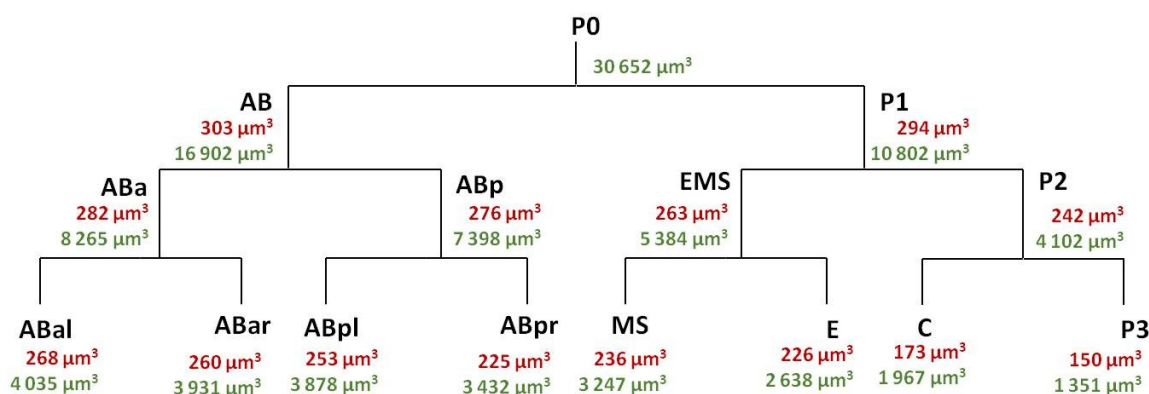
Embrya byla disektována z mladých dospělců a upevněna na agarózový polštář mezi krycím a podložním sklem. Snímání s dvouminutovým intervalem od zygoty až do osmibuněčného stádia ve 3D bylo realizováno na konfokálním mikroskopu Leica SP5 pomocí vodního objektivu 60X (Obrázek 33). Velikost posunu v ose z je 500 nm.



**Obrázek 33 Časná embryogeneze *C. elegans* pro měření objemu jader a cytoplazmy.** Jednotlivé snímky představují embryonální vývoj kmenu OD95, který exprimuje značený chromatin (H2B-mCherry) červeně a cytoplasmatickou membránu [GFP-PH(PLCdelta1)] zeleně. Zobrazeny jsou maximální projekce od zygoty až po 13buněčné stádium. Totožnost jednotlivých blastomer je popsána kurzívou vedle buněk. Šipky ukazují na mCherry značená pólóvá tělíška. Jaderný a cytoplazmatický objem byly měřeny v S fázi buňky. Čas od metafáze je znázorněn v minutách. Měřítko je 10  $\mu\text{m}$ .

Pro měření objemu jader a celých buněk byly vybrány ty snímky, které zachycovaly jádro v S fázi buněčného cyklu. V tomto stádiu vývoje jsou buňky buďto v mitóze, což je jasně zřejmé z kondenzace chromatinu značeného pomocí H2B-mCherry, anebo v S fázi. Embrya byla rekonstruována do 3D modelu a segmentována pomocí programu Amira 6.0. Objemy byly opět měřeny manuálně po jednotlivých vrstvách o výšce posunu 500 nm v ose z jako počet voxelů. Pro získání objemu cytoplazmy (C) byl

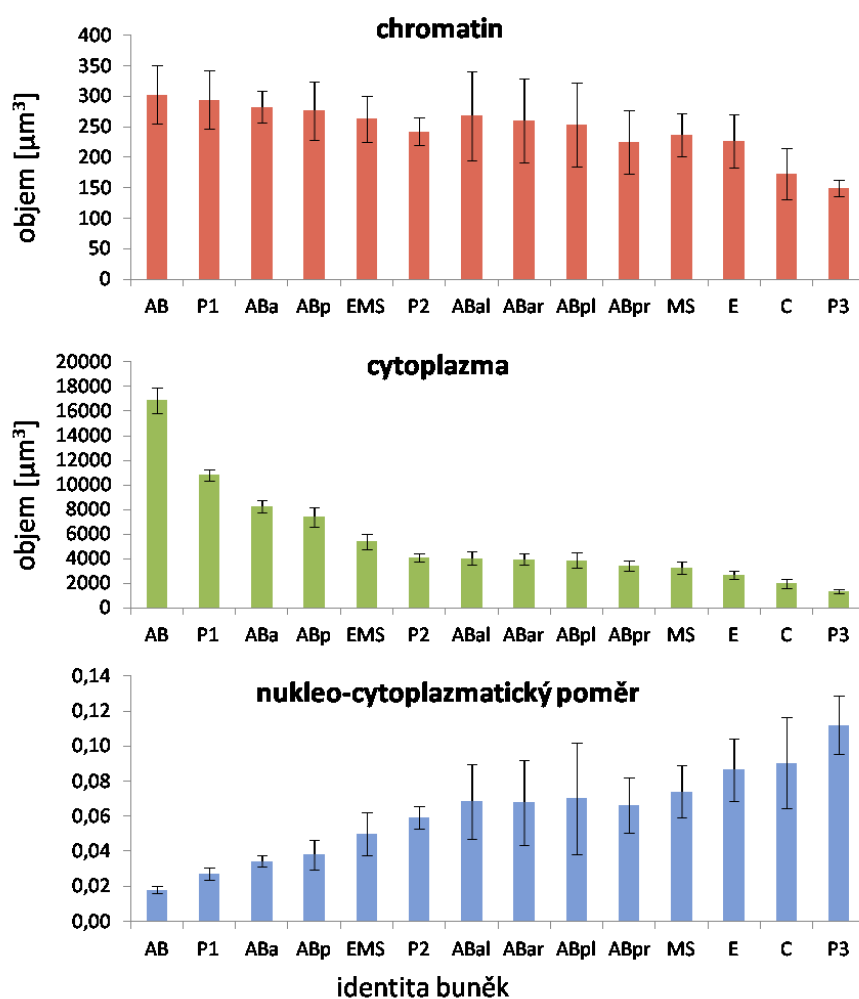
objem buňky ( $B$ ) zmenšen o objem jádra ( $J$ ):  $C = B - J$ . Celkem bylo analyzováno 5 embryí. Jejich průměrné hodnoty byly vyneseny do rodokmene blastomer pro porovnání absolutních hodnot (Obrázek 34) a do grafu pro porovnání jednotlivých velikostí mezi sebou (Obrázek 35).



**Obrázek 34** Znárodnění velikosti jádra a cytoplazmy podle buněčné linie v embryu *C. elegans*. Zobrazeny jsou průměrné hodnoty jaderného (červeně) a cytoplazmatického (zeleně) objemu naměřené v jednotlivých buňkách od zygoty ( $P0$ ) až po 8buněčné embryo. Směrodatná odchylka objemů jader je v rozmezí 9-27% a objemů cytoplazmy v rozmezí 4-17%,  $n=5$ .

Velikost jednotlivých blastomer v prvních třech buněčných dělení během embryonálního vývoje podle očekávání razantně klesá. Součet objemů dceřiných buněk přibližně odpovídá objemu buňky mateřské. Zmenšuje se i velikost jader, i když oproti cytoplazmě velmi pozvolně. Nesouladné snižování jaderného a buněčného objemu se projevilo v nukleo-cytoplazmatickém poměru, který má vzrůstající tendenci. Nápadné je uchování menší cytoplazmatické velikosti pohlavní linie (P) oproti sousední somatické linii (AB) v průběhu embryogeneze. Velikost jádra je v P linii také snižena než v sesterské somatické, ale jen nepatrně oproti cytoplazmě. Následkem toho je vyšší nukleo-

cytoplazmatický poměr ve všech buňkách P linie (P1, P2, P3). Rozdíly mezi somatickými a zárodečnými liniemi jsou statisticky významné ( $p < 0,05$ , Mann-Whitney test).



**Obrázek 35** Objemy jader a cytoplazmy blastomer v časně embryogenezi *C. elegans*. Vyneseny jsou průměrné hodnoty objemu jader (*nahoře*), cytoplazmy (*uprostřed*) a nukleo-cytoplazmatický poměr (*dole*) embryonálních buněk od dvou- do osmibuněčného stádia. Totožnost buněk je indikována na ose *x*. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku.

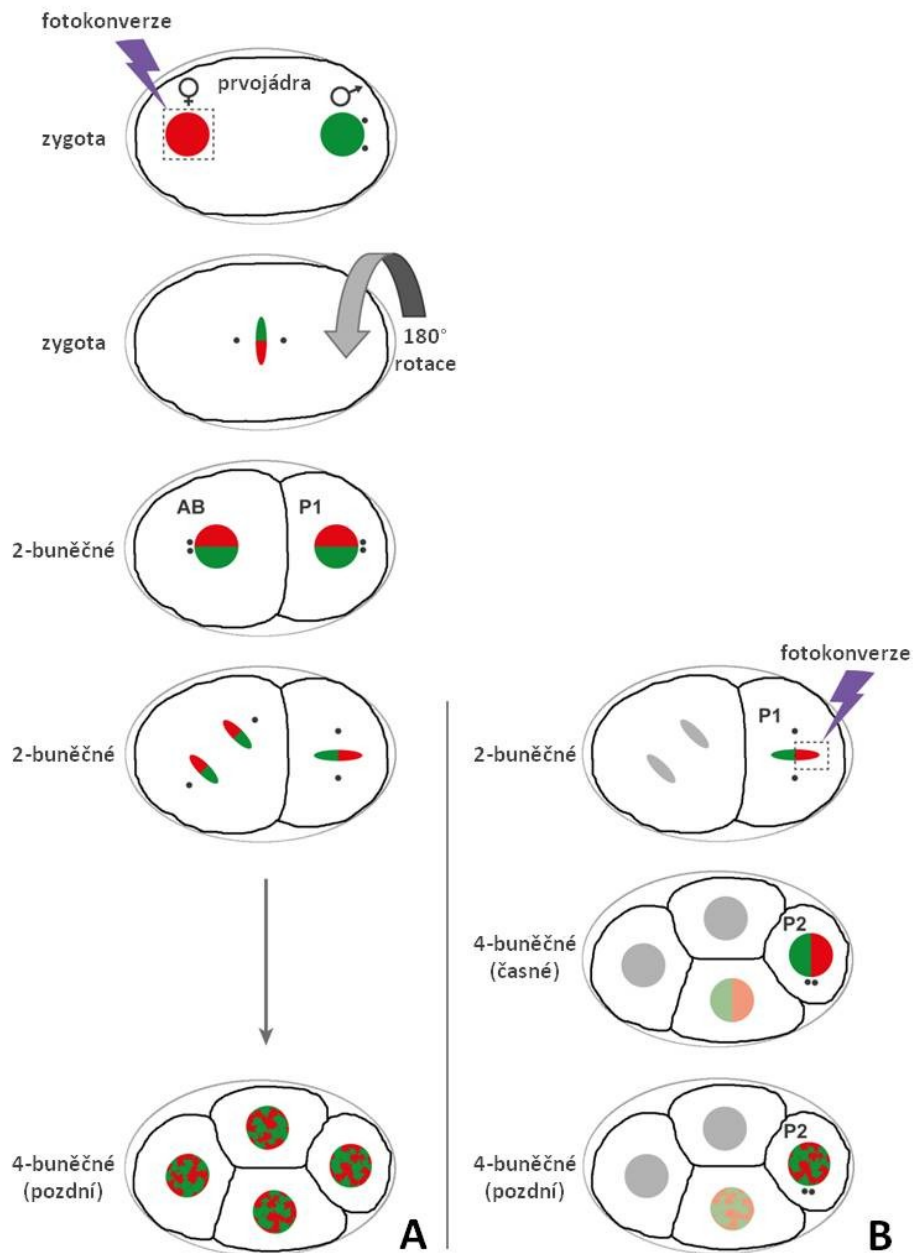
## 5. DISKUZE

### 5.1. Separace parentálních genomů v časném embryu *C. elegans*

S použitím fotokonverze histonu H2B značeného Dendra2 v jednom z prvojader zygoty *C. elegans* jsme pozorovali promísení parentálních genomů. Podle našeho nejlepšího vědomí se jedná o první dokumentaci tohoto jevu v živých embryích. Dřívější práce, která použila BrdU značení otcovské DNA s následnou imunodetekcí na fixovaných vzorcích pro sledování otcovského genomu během embryogeneze, přišla s tím, že se parentální vlákna DNA odlučují náhodně (Ito and McGhee, 1987). Více se ale nevěnovala problému mísení rodičovských genomů v časném embryu. Ve své práci ukazujeme, že parentální chromatin setrvává prostorově oddělen až do ukončení druhého mitotického dělení embryonálních blastomer.

V samostatném experimentu jsme předvedli, že k promísení chromatinových domén překvapivě nedochází během mitózy, jak bylo dříve ukázáno u savčích buněk v kultuře (Strickfaden et al., 2010) ani během dekondezace chromatinu na konci telofáze. Zobrazování chromatinových domén během celého buněčného cyklu v P1 a P2 blastomerách v reálném čase nám prozradilo, že promíchání nastává ~3-5minut po zahájení buněčného cyklu. Z naší podrobné studie je patrné, že 1) chromatinové domény zůstávají prostorově odděleny až do objevení dvou rozlišitelných centrozomů, zřejmě na začátku S fáze, a 2) chromatinové domény se zcela promísí ještě před začátkem rychlého rozchodu jednoho z centrozomů po vstupu do mitózy.

Výsledky jsou shrnuty v následujícím schématu (Obrázek 36).



**Obrázek 36 Schéma promísení rodičovského chromatinu v časném embryu *C. elegans***

A) Vytvoření kmene háďátka exprimující Dendra2-H2B v zárodečné linii nám umožnilo specificky označit otcovský nebo mateřský chromatin pomocí fotokonverze. Zobrazování následného vývoje na živo odhalilo, že rodičovské chromatinové domény zůstávají prostorově odděleny v zygotě a v dvoubuněčném embryu. Až ve stádiu čtyřbuněčného embrya jsou parentální chromatinové domény již promíseny. Fotokonverze prvojaderného chromatinu nám dále dovolila pozorovat reprodukovatelnou rotaci celého embrya o 180° během zygotického dělení. B) Abychom přesněji určili časový úsek chromatinového

---

promíchání, fotokonvertovali jsme polovinu metafázní roviny P1 blastomery ve dvoubuněčném stádiu. Následné snímání ukázalo, že chromatinové domény zůstávají prostorově separované ještě krátce po buněčném dělení. K promísení dochází ~3-5 minut po vstupu do buněčného cyklu a je ukončeno před začátkem migrace jednoho z centrozomů. Z technických důvodů bylo toto zobrazování provedeno na P1 a P2 blastomerách. Chromatinové domény jsou označeny zeleně a červeně. Centrozomy jsou vyznačeny jako černé tečky.

Mohlo by se polemizovat o tom, že pozorované promísení chromatinů není výsledkem chromatinové migrace, ale výměny molekul histonu H2B mezi fotokonvertovanými a nefotokonvertovanými doménami. Domníváme se, že toto je velmi nepravděpodobné, jelikož počas výměny histonů H2B je v řádech stovek minut (Kimura and Cook, 2001), tedy mnohem déle než je celá posloupnost dějů, které jsou v této práci zachyceny.

Naše pozorování vyvolává řadu otázek, jako je třeba, proč nedochází k promísení rodičovských genomů mnohem dříve. Co se zygoty týče, odpověď je nasnadě. Vnitřek prvojader je chráněn před promícháním jaderným obalem, který u *C. elegans* zůstává celistvý až do tvorby a vyrovnání metafázních rovin obou prvojader (Gorjánác and Mattaj, 2009). Rychlé a řízené pohyby chromozomů během následné anafáze se nezdají být slučitelné s chromatinovým promícháním. Nicméně není jasné, proč rodičovské chromatinové setrvávají odděleny v AB a P1 blastomerách, jakmile je zygotické dělení ukončeno. Je možné, že existuje mechanismus, který aktivně zabraňuje chromatinovému promísení ve dvoubuněčném embryu, pravděpodobně na základě epigenetických modifikací. Ačkoliv se vyskytují studie popisující rozdíly v post-translačních modifikacích histonů mezi otcovskými a mateřskými prvojádry, zejména v nedostatku trimetylace H3K79m a acetylace H4K16 na paternálním chromatinu, tyto rozdíly se rychle vyrovnávají, takže modifikace specifické pro otcovské histony ve dvoubuněčném stádiu dosud nebyly popsány (Samson et al., 2014).



Bez ohledu na molekulární mechanismus tohoto procesu se zdá zřejmé, že pro to, aby mohlo k promísení dojít, je potřeba vytvořit časový prostor. Mobilita chromatinu v S fázi v savčích buňkách se jeví spíše omezená (Walter et al., 2003). Z naší práce vyplývá, že prostorové uspořádání chromatinu je během mitózy v časném embryu *C. elegans* do značné míry uchováno. Na tomto základě navrhuje hypotézu, že doba mezi dekondukcí chromatinu po mitóze a zahájením S fáze, tedy případná G1 fáze, je právě tím faktorem v procesu promísení rodičovského chromatinu u tohoto organismu. V tomto ohledu je třeba poznamenat, že během embryogeneze bylo popsáno postupné prodlužování buněčného cyklu (Bao et al., 2008). Ačkoliv je toto prodlužování vnímáno výhradně jako následek delších S fází v časném embryu s tím, že se gap fáze objevují až v pozdějším období (Kipreos, 2005), zahájení replikace DNA dosud nebylo zobrazeno v živých čtyřbuněčných embryích a výskyt G1 fáze v této etapě nemůže být vyloučen. Tudíž navrhuje, že během nebo krátce po této předpokládané rychlé G1 fázi dochází ke smísení rodičovských chromatinů uvnitř buněčného jádra. Tato myšlenka je v souladu s předchozími výsledky, které ukazují, že mobilita chromatinu v savčích buňkách je vyšší v G1 fázi než ve zbytku buněčného cyklu (Thomson et al., 2004, Walter et al., 2003). Je třeba zmínit, že přítomnost domnělé G1 fáze nemusí být jedinou podmínkou pro výskyt chromatinového promísení. Rodičovské genomy u myši byly ukázány prostorově oddělené v dvoubuněčném stádiu, ačkoliv blastomery v G1 fázi setrvávají v této etapě po dobu několika hodin (Mayer et al., 2000c). Je tedy patrné, že pro objasnění mechanismu jednak separace, tak vzájemného promíchání rodičovských chromatinů, je nezbytná další práce. Použití velmi dobře popsaného modelu *C. elegans* se v tomto ohledu se ukazuje velice přínosné.

Fotokonvertibilní forma histonu H2B exprimovaná v zárodečné linii nám umožnila další pokusy prošetřující chování chromatinu v časném embryu *C. elegans*. Jak již bylo zmíněno dříve, na savčích buňkách v kultuře bylo popsáno, že k rozsáhlému přeuspořádání

chromatinových pozic dochází během prometafáze (Strickfaden et al., 2010). V naší studii jsme v této fázi buněčného cyklu nepozorovali významné přeskupení značených chromozomů. Důvod tohoto rozdílu zůstává nejasný. Avšak se můžeme domnívat, že svoji roli v tomto jevu hraje pozdější rozpad jaderného obalu během mitózy v časném (< 30 buněk) embryu *C. elegans* (Lee et al., 2000) a že uchování těchto jaderných struktur až do počátku anafáze může omezovat a řídit chromatinové pohyby.

Další pozorování, které jsme v této části práce učinily, je reprodukovatelná rotace chromatinové masy v pozdní anafázi a telofázi zygotického dělení. Zobrazováním P granulí a druhého pólového tělíska nám pomohlo odhalit, že se jedná o celé embryo, které se otáčí uvnitř vaječného obalu. Otáčení okolo anterior-posteriorní osy je stále stejným směrem. Podobné pozorování bylo popsáno ve studii využívající kortikálních granulí a GFP-NMY-2 jako navigační značky (Schonegg et al., 2014). Autoři tohoto článku uplatnili neměnnou orientaci této rotace v určení vnitřní chiralita komponent uvnitř jednobuněčného embrya. Dále navrhli, že tato chiralita by mohla poskytnout vodítko pro utvoření pravolevé asymetrie v pozdějším stádiu.

## **5.2. Transkripční aktivita v gonádě *C. elegans***

Záměrem druhé části práce bylo získání detailního pohledu na transkripční aktivitu v gonádě *C. elegans*. Ačkoliv je zřejmé, že maternálně vyprodukované mRNA a proteiny se musí uskladnit v oocytech pro správný vývoj embrya, plnohodnotná charakterizace jejich syntézy není u *C. elegans* dosud objasněna.

Pomocí metody smRNA FISH jsme detekovali transkripční místa vybraných genů, *sbp-1* a *vha-11*, ve střední části gonády, tedy v pozdní pachyténe a diploténe. Zobrazení transkripce pomocí imunofluorescenčního značení RNA polymerázy II nám přineslo očekávaný výsledek podle již publikovaných dat (Walker et al., 2007). RNA polymeráza II se rovnoměrně akumuluje na chromatinu ve všech fázích meiotické profáze kromě

---

diakineze, kde je RNA polymeráza II přítomna pouze v nukleoplazmě. Tento výsledek z velké části neodpovídá zobrazení transkripce pomocí smRNA FISH, kde jsme v distální části gonády nedetekovali žádnou transkripční aktivitu. Jedná se totiž o techniky s odlišnými atributy. Obohacení chromatinu o RNA polymerázu II nám nepodá přesnou informaci o aktivitě transkripce tak, jako metoda smRNA FISH. Fosforylace serinu5 na C-terminální doméně RNA polymerázy II značí iniciaci transkripce. Zdá se, že RNA polymeráza II je mezi mitotickou částí a diploténe rovnoměrně navázána, třebaže nedochází k elongaci. smRNA FISH na druhou stranu vykazuje expresní údaje jen vybraných transkriptů.

Značení RNA pomocí inkorporace EU nám umožnilo získat hodnotné informace o globálním stavu genové exprese v celé gonádě *C. elegans*. Z našich výsledků plyne, že míra syntézy mRNA od mitotické zóny postupně stoupá. Nejvyšší transkripční aktivitou disponují zárodečné buňky ve stádiu pozdní pachyténe a diploténe. Diakinetické oocyty skokově zastavují expresi a udržují si transkripční utišení. Tímto jsme potvrdili výsledky získané pomocí metody smRNA FISH dvou vybraných transkriptů. Genová exprese během meiózy se zdá být pevně regulovaná v závislosti na stádiu profáze I.

Naše výsledky lokalizace meiotické transkripční aktivity v gonádě *C. elegans* korespondují s daty z jiných studií odlišných organismů. Transkripce u savců také postupně stoupá počátkem profáze I a vrcholí v pozdní pachyténe a diploténe (Page et al., 2012). Štětkovité (lampbrush) chromozomy u obratlovců (mimo savce) a některých bezobratlých, které jsou přítomny v diploténních jádrech, disponují zvýšenou transkripční aktivitou (Gaginskaya et al., 2009). Zajímavé projekty pocházejí i z rostlinné říše. U mikrosporocytů modřínů byla zjištěna korelace mezi transkripční aktivitou a stavy chromatinové dekondezace v diploténe, která u tohoto druhu trvá 5 měsíců (Kołowerzo-Lubnau et al., 2015).

---

U *C. elegans* se hlavní výživová složka, žloutková lipoproteinové partikule, syntetizuje ve střevních buňkách, odkud se v procesu receptorem zprostředkovaná endocytóza přesouvají do rostoucích oocytů na proximální straně gonády (Kimble and Sharrock, 1983, Grant and Hirsh, 1999). Vedle toho je potřeba vytvořit zásobu molekul mRNA a proteinů. Transkripce v somatických buňkách většinou probíhá na rozvolněných interfázních chromozomech. Meiotická genová exprese může v tomto ohledu mít ztíženější podmínky z hlediska přístupnosti chromatinu. Nabízí se zajímavá otázka. Jakým způsobem je umožněna transkripce na meiotických chromozomech? O tom, jaká je skutečnost, se zatím můžeme jen dohadovat. Jedna z možných hypotéz je z pohledu jaderné architektury.

Jak již bylo popsáno v kapitole 1.2.3. Gametogeneze u *C. elegans*, homologní chromozomy v pachyténe jsou spojeny v synapsi za pomoci synaptonemálního komplexu. Struktura synapse je charakteristická tím, že z proteinové kostry vybíhají do strany chromatinové smyčky. Pomocí super-rezoluční mikroskopie se nám podařilo získat detailní snímky zachycující transkripci jako nehomogenní proces v rámci chromozomu (Obrázek 28). Pachyténní chromozomy vykazovaly expresní aktivitu na svém obvodu, zatímco centrální část chromozomu byla aktivní výrazně méně. Podoba této struktury podněcuje k myšlence, že transkripční aktivita je lokalizována především ve smyčkách synapse. Možnosti zhoršené penetrace značených EU molekul je nepravděpodobná, jelikož chromozomy v diploténe byly značeny celé. Vzorovaná struktura inkorporace EU naznačuje, že chromozom disponuje místy s různými mírami transkripční aktivity.

Ze super-rezolučních snímků je dále patrné, jak se mění chromatinová morfologie v pachyténe a diploténe. Chromatin v diploténe je jasně rozvolněnější než chromatin v pachyténe. Právě stupeň dekondenzace chromatinu může hrát důležitou roli v navýšení transkripční aktivity díky přístupnosti chromatinu transkripční mašinérii. Diploténe je charakteristická pro počátek separace homologních chromozomů (desynapse) díky rozpadu synaptonemálního komplexu. Mechanismus dekondenzace chromatinu v této fázi je

---

neznámý. Pravděpodobně v něm hrají svou úlohu reorganizační procesy kondenzinů, kohezinů a dalších DNA vazebných proteinů na chromatinu a synaptonemálním komplexu (Chan et al., 2004, Crawley et al., 2016). Hlavní protein synaptonemálním komplexu SYP-2 se po fosforylaci MAP kinázovou dráhou odvažuje (Nadarajan et al., 2016) a zřejmě se účastní chromatinového rozvolnění v přechodu mezi pachyténe a diploténe. Určitě hodnotné by byly studie mapující stav kondenzace chromatinu a transkripční aktivitu v mutantních kmenech pro vybrané geny u *C. elegans*. Super-rezoluční obrázky se z hlediska chromatinové morfologie jeví velmi cennými.

Podíváme-li se na meiózu z hlediska jaderné architektury, zjistíme, že diploténe je vlastně vhodná fáze pro transkripci. Dle předchozích studií se ukázalo, že chromozomy, které ještě nejsou spojeny v synapsi, tedy leptoténe až začátek pachyténe, jsou transkripčně utišeny pomocí epigenetických mechanismů (Baarends et al., 2005). Diakinetické chromozomy se již masivně kondenzují v přípravě na nastávající segregaci a první meiotické dělení. Chromatin je v této fázi maximálně zneprístupněn transkripčním procesům.

Z hlediska buněčné biologie hraje fáze pachyténe a diploténe roli v programované smrti buněk. V normálním průběhu oogeneze *C. elegans* podstupuje až polovina zárodečných buněk apoptózu (Gumienny et al., 1999). Jednou z možných vysvětlení je, že jsou zárodečné buňky produkovány v nadbytku, aby syntetizovaly cytoplazmatické komponenty pro zrající oocyty. Oproti savcům a *Drosophile* nedisponuje *C. elegans* žádnými morfologicky odlišnými nutritivními buňkami. K programované smrti dochází přibližně v místě ohybu gonády, tedy tam, kde jsou buňky ve stádiu pozdní pachyténe a diploténe transkripčně velmi aktivní. Transkripty produkované těmito buňkami jsou exportovány do rachis, odkud jsou následně přijaty zrajícími oocyty (Gibert et al., 1984). Tedy vysoká míra genové exprese je lokalizována v místě, kde se rapidně snižuje množství

---

buněk a syntetizované produkty jsou přes společnou cytoplazmu distribuovány přímo do budoucích oocytů pomocí aktomyosinového proudění (Wolke et al., 2007).

Pro první chvíle existence embrya je nezbytná notná dávka jak nutritivních, tak informačních makromolekul, které zajistí úspěšný vývoj, než bude samo schopno si zajistit tyto látky. Oproti spermatickým buňkám je oocyt ten, kdo do budoucího embrya přispívá větší částí cytoplazmy. Vedle toho, že spermie přispívá otcovským genomem (Sadler and Shakes, 2000), poskytuje centrozom (Albertson, 1984), vytváří anterior-posteriorní osu (Goldstein and Hird, 1996) spouští schopnost oocytu ukončit meiotické dělení a aktivuje embryogenezi. Metodou EU inkorporace do RNA jsme ukázali, že transkripční aktivita zárodečných buněk v gonádě samců je oproti gonádě hermafroditů utištěna. Tyto výsledky jsou ve shodě s daty získaných metodami microarray a SAGE (Wang et al., 2009, Reinke et al., 2000).

### **5.3. Nukleo-cytoplazmatický poměr u *C. elegans***

Úsek kolem ohybu gonády *C. elegans* se zdá být značně metabolicky aktivní. Pro prošetření souvislosti zvýšené transkripční aktivity v ohybu gonády s nukleo-cytoplazmatickým poměrem jsme se zaměřili na měření buněčných a jaderných velikostí. U obojživelníků a Drozofily má náhlá změna nukleo-cytoplazmatického poměru ve stádiu střední blastuly zásadní vliv na aktivaci transkripce embryonálních genů (Lu et al., 2009, Newport and Kirschner, 1982).

Snímáním gonád živých jedinců *C. elegans* ve 3D jsme získali data pro kvantifikaci jaderných a cytoplazmatických objemů. Zaměřili jsme se na fáze, kde dochází ke zřetelným změnám v buněčných velikostech, tedy od pozdní pachyténe až po poslední diakinetický oocyt. Buňky v pachyténe a v počátku diploténe rostou jen mírně (Obrázek 32). Zásadní nárůst objemů začíná od druhé poloviny diploténe a stále narůstá až k -1

---

oocytu. Velikost jader se v průběhu zvětšuje pomaleji než velikosti cytoplazmy. Tento jev se promítá do nukleo-cytoplazmatického poměru, který se tak snižuje s postupem buněk proximálním směrem.

Na základě našich výsledků se nukleo-cytoplazmatický poměr neukazuje jako faktor, který přímo ovlivňuje transkripční metabolismus v gonádě *C. elegans*. Spíše by se mohlo jednat o vliv opačný. Produkované transkripty a proteiny jsou z cytoplazmy buněk v pachyténe a diploténe transportovány do rachis, odkud jsou pomocí aktomysinového proudění distribuovány do buněk. To může mít za následek zvyšující objem cytoplazmy. Toto rozdělování makromolekul funguje jen do doby, kdy jsou cytoplazmy oocytu spojeny s rachis. Proximální oocyty přijímají žlutkové lipoproteinové partikule vyprodukované střevními buňkami (Kimble and Sharrock 1983) v procesu receptorem zprostředkovaná endocytóza (Grant and Hirsh 1999). Tento zdroj má pravděpodobně největší vliv na zvyšující se velikost buněk, které v diakinezi rostou nejrychleji.

Vedle vzrůstající velikosti oocytů se velmi zajímavý jev děje na úrovni chromatinu. Buněčné jádro se postupně zvětšuje, ovšem chromozomy podstupují změnu opačnou. Bivalenty kondenzují a smrskávají se na šest malých oválů, které nakonec v nukleoplazmě -1 oocytu zaujímají jen zlomek objemu. Část z nich je v těsné blízkosti s jadernou laminou, část z nich se nachází v centru jádra. Jaké jaderné struktury jsou v tuto fázi v nukleoplazmě přítomny, aby „vyplnily“ prostor po dříve relaxovanějších chromozomech a jaká je jejich funkce? Zvyšuje se jaderný objem následkem růstu cytoplazmy nebo se jedná o opačný vztah? To jsou otázky, které se nabízejí při bližším pohledu na buněčnou a jadernou architekturu oocytů v gonádě *C. elegans*.

Oogeneze a embryogeneze u *C. elegans* jsou z hlediska změn velikostí jader a cytoplazmy procesy obrácené. V průběhu embryonálního vývoje se zmenšuje objem jader se snižující se velikostí blastomer. Jestliže je objem buněk předurčen velikostí

---

vaječné obálky a počtem dělení, jaderný objem by tím měl být omezen také. Je pravděpodobné, že existuje mechanismus, který kontroluje velikost jader, když růst cytoplasmy je omezen, ačkoliv podoba takového mechanismu je zatím nejasná. Se zajímavým výzkumem přišli Maddox s kolegy, kteří navrhuji, že se snižující se velikostí buněk a jader embrya se proporcionálně snižuje i délka mitotických chromozomů, která má pravděpodobně co dočinění s transportním systémem přes jaderné póry (Ladouceur et al., 2015)

Z našich výsledků embryonálního vývoje do osmibuněčného stádia je patrné, že nukleo-cytoplazmatický poměr blastomer s každým buněčným dělením stoupá. To je dáno strmějším poklesem velikosti buněk oproti jádrům. Z hlediska jaderné architektury se nabízí velmi zajímavá otázka, jak se důsledkem stále zvyšujícího nukleo-cytoplazmatického poměru mění vyšší uspořádání embryonálního chromatinu. Větší objem jádra znamená i větší jaderný povrch. Obal jádra může být osazen větším počtem jaderných pórů určených pro komunikaci mezi nukleoplazmou a cytoplazmou a tím zvýšit efektivitu genové exprese.

Buňky P linie jsou v embryu *C. elegans* předurčeny pro tvorbu zárodečných buněk v budoucím dospělci. Z hlediska buněčných objemů se pohlavní buňky od somatických nápadně liší. Nukleo-cytoplazmatický poměr P linie je ve dvou-, čtyř- i osmibuněčném stádiu vyšší než u linií ostatních.

Nepochybně zajímavé je měření buněčných velikostí i v pokročilejším stádiu embryogeneze *C. elegans*. Pro konfokální mikroskopii je toto snímání již velmi tuhý oříšek kvůli rostoucí vzdálenosti snímaných jader od roviny objektivu. Tento problém se dá obejít použitím SPIM mikroskopie, která umožňuje postupné otáčení vzorku okolo své osy, čímž vzniká série snímků, které jsou následně rekonstruovány do 3D modelu. Tímto způsobem již byla získána velmi působivá data embryí *C. elegans* (Fu et al., 2016), ovšem jednotlivé hodnoty nebyly poskytnuty k dispozici.



Arata a kolektiv za účelem ověření vztahu velikosti blastomer a délky buněčného cyklu v časném embryu *C. elegans* provedli měření objemů (Arata et al., 2014). Tyto hodnoty byly získány snímáním pomocí DIC optiky a vypočítány z poloměrů ve třech osách. Dle našeho názoru může tato metoda měření být velmi nepřesná, protože DIC snímání objemu může zkreslovat vzdálenost v ose z. V našem projektu jsme získali hodnoty objemů součtem voxelů z rekonstrukcí trojrozměrných snímků buněčných struktur.

## 6. SHRNU TÍ

Ve své disertační práci jsem se na modelovém organismu *C. elegans* zabývala studiem separace a promísení rodičovských chromatinů v časném embryu, zygotickou rotací, transkripční dynamikou v meióze a buněčnými a jadernými objemy a jejich vzájemnému vztahu v gametogenezi a časně embryogenezi.

Dosažené výsledky jsou shrnuty v následujících bodech:

- mateřský a otcovský chromatin po oplození setrvávají v jádře oddělené i ve dvoubuněčném embryu; k promísení dochází krátce po zahájení buněčného cyklu ve čtyřbuněčném stádiu.
- během zygotické cytokineze podstupuje celé embryo reprodukovatelnou rotaci o 180° v anterior-posteriorní ose.
- transkripční aktivita zárodečných buněk v gonádě dosahuje svého vrcholu ve stádiu pozdní pachyténe a diploténe, kdy dochází k dramatické restrukturalizaci chromozomů, poté v diakinezi skokově klesá na minimum.
- nukleocytoplazmatický poměr zárodečných buněk v gonádě postupně klesá, zatímco v embryogenezi stoupá.

## 7. SEZNAM PUBLIKACÍ

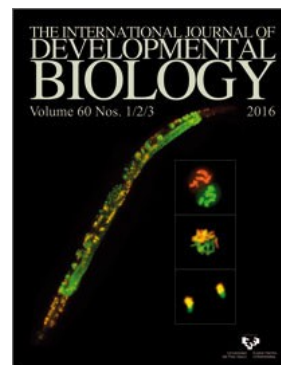
**Live imaging reveals spatial separation of parental chromatin until the four-cell stage in *Caenorhabditis elegans* embryos**

Bolková Jitka a Lanctôt Christian

*The International Journal of Developmental Biology*, březen 2016;

vol. 60 (1-3): s.5-12

IF<sub>2015</sub>: 1,753



**Quantitative gene expression analysis in *Caenorhabditis elegans* using single molecule RNA FISH**

Bolková Jitka a Lanctôt Christian

*Methods*, duben 2016; vol. 98: s. 42-9

IF<sub>2015</sub>: 3,503

**Localization of transcriptional activity in *Caenorhabditis elegans* germ cells**

Bolková Jitka a Lanctôt Christian

Připravovaný manuskript.

---

## 8. CITOVANÁ LITRATURA

- Albertson, D. G. (1984) 'Formation of the first cleavage spindle in nematode embryos', *Dev Biol*, 101(1), pp. 61-72.
- Albertson, D. G. and Thomson, J. N. (1982) 'The kinetochores of *Caenorhabditis elegans*', *Chromosoma*, 86(3), pp. 409-28.
- Alicea, B., McGrew, S., Larson, S., Watts, M., Warrington, T. and Gordon, R. 2014. DevoWorm: raising the (Open)Worm. OpenWorm group.
- Anguera, M. C., Sun, B. K., Xu, N. and Lee, J. T. (2006) 'X-chromosome kiss and tell: how the Xs go their separate ways', *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 71, pp. 429-37.
- Arata, Y., Takagi, H., Sako, Y. and Sawa, H. (2014) 'Power law relationship between cell cycle duration and cell volume in the early embryonic development of *Caenorhabditis elegans*', *Front Physiol*, 5, pp. 529.
- Baarends, W. M., Wassenaar, E., van der Laan, R., Hoogerbrugge, J., Sleddens-Linkels, E., Hoeijmakers, J. H., de Boer, P. and Grootegoed, J. A. (2005) 'Silencing of unpaired chromatin and histone H2A ubiquitination in mammalian meiosis', *Mol Cell Biol*, 25(3), pp. 1041-53.
- Balhorn, R. (1982) 'A model for the structure of chromatin in mammalian sperm', *J Cell Biol*, 93(2), pp. 298-305.
- Bao, Z., Zhao, Z., Boyle, T. J., Murray, J. I. and Waterston, R. H. (2008) 'Control of cell cycle timing during *C. elegans* embryogenesis', *Dev Biol*, 318(1), pp. 65-72.
- Barrière, A. and Félix, M. A. (2014) 'Isolation of *C. elegans* and related nematodes', *WormBook*, pp. 1-19.
- Bednar, J., Horowitz, R. A., Grigoryev, S. A., Carruthers, L. M., Hansen, J. C., Koster, A. J. and Woodcock, C. L. (1998) 'Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(24), pp. 14173-8.
- Beh, C. T., Ferrari, D. C., Chung, M. A. and McGhee, J. D. (1991) 'An acid phosphatase as a biochemical marker for intestinal development in the nematode *Caenorhabditis elegans*', *Dev Biol*, 147(1), pp. 133-43.
- Bender, L. B., Cao, R., Zhang, Y. and Strome, S. (2004) 'The MES-2/MES-3/MES-6 complex and regulation of histone H3 methylation in *C. elegans*', *Curr Biol*, 14(18), pp. 1639-43.
- Benenati, G., Penkov, S., Müller-Reichert, T., Entchev, E. V. and Kurzchalia, T. V. (2009) 'Two cytochrome P450s in *Caenorhabditis elegans* are essential for the organization of eggshell, correct execution of meiosis and the polarization of embryo', *Mech Dev*, 126(5-6), pp. 382-93.
- Boveri, T. 1909. Die Blastomerenkerne von *Ascaris megalocephala* und die Theorie der Chromosomenindividualität. Archiv für Zellforschung.

- Boyle, S., Gilchrist, S., Bridger, J. M., Mahy, N. L., Ellis, J. A. and Bickmore, W. A. (2001) 'The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells', *Hum Mol Genet*, 10(3), pp. 211-9.
- Branco, M. R. and Pombo, A. (2006) 'Intermingling of chromosome territories in interphase suggests role in translocations and transcription-dependent associations', *PLoS Biol*, 4(5), pp. e138.
- Brenner, S. 1988. *Foreword*. The Nematode *Caenorhabditis elegans*, edited by W. B. Wood. Foreword. The Nematode *Caenorhabditis elegans*, edited by W. B. Wood. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Bridger, J. M., Boyle, S., Kill, I. R. and Bickmore, W. A. (2000) 'Re-modelling of nuclear architecture in quiescent and senescent human fibroblasts', *Curr Biol*, 10(3), pp. 149-52.
- Cajal, S. R. 1903. Un sencillo método de coloración selectiva del retículo protoplásmico y sus efectos en los diversos órganos nerviosos de vertebrados e invertebrados. Tra. Lab. Invest. Biol.
- Cavalier-Smith, T. (1978) 'Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection for cell volume and cell growth rate, and the solution of the DNA C-value paradox', *J Cell Sci*, 34, pp. 247-78.
- Cavalier-Smith, T. (1982) 'Skeletal DNA and the evolution of genome size', *Annu Rev Biophys Bioeng*, 11, pp. 273-302.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. and Prasher, D. C. (1994) 'Green fluorescent protein as a marker for gene expression', *Science*, 263(5148), pp. 802-5.
- Chan, R. C., Severson, A. F. and Meyer, B. J. (2004) 'Condensin restructures chromosomes in preparation for meiotic divisions', *J Cell Biol*, 167(4), pp. 613-25.
- Chu, D. S., Liu, H., Nix, P., Wu, T. F., Ralston, E. J., Yates, J. R. and Meyer, B. J. (2006) 'Sperm chromatin proteomics identifies evolutionarily conserved fertility factors', *Nature*, 443(7107), pp. 101-5.
- Church, D. L., Guan, K. L. and Lambie, E. J. (1995) 'Three genes of the MAP kinase cascade, mek-2, mpk-1/sur-1 and let-60 ras, are required for meiotic cell cycle progression in *Caenorhabditis elegans*', *Development*, 121(8), pp. 2525-35.
- Consortium, C. e. S. (1998) 'Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology', *Science*, 282(5396), pp. 2012-8.
- Crawley, O., Barroso, C., Testori, S., Ferrandiz, N., Silva, N., Castellano-Pozo, M., Jaso-Tamame, A. L. and Martinez-Perez, E. (2016) 'Cohesin-interacting protein WAPL-1 regulates meiotic chromosome structure and cohesion by antagonizing specific cohesin complexes', *Elife*, 5, pp. e10851.
- Cremer, C., Münkler, C., Granzow, M., Jauch, A., Dietzel, S., Eils, R., Guan, X. Y., Meltzer, P. S., Trent, J. M., Langowski, J. and Cremer, T. (1996) 'Nuclear architecture and the induction of chromosomal aberrations', *Mutat Res*, 366(2), pp. 97-116.
- Cremer, M., Grasser, F., Lanctôt, C., Müller, S., Neusser, M., Zinner, R., Solovei, I. and Cremer, T. (2008) 'Multicolor 3D fluorescence in situ hybridization for imaging interphase chromosomes', *Methods Mol Biol*, 463, pp. 205-39.

- Cremer, M., von Hase, J., Volm, T., Brero, A., Kreth, G., Walter, J., Fischer, C., Solovei, I., Cremer, C. and Cremer, T. (2001) 'Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells', *Chromosome Research*, 9(7), pp. 541-567.
- Cremer, T. and Cremer, C. (2001) 'Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells', *Nat Rev Genet*, 2(4), pp. 292-301.
- Cremer, T., Cremer, C., Baumann, H., Luedtke, E. K., Sperling, K., Teuber, V. and Zorn, C. (1982) 'Rabl's model of the interphase chromosome arrangement tested in Chinese hamster cells by premature chromosome condensation and laser-UV-microbeam experiments', *Hum Genet*, 60(1), pp. 46-56.
- Cremer, T. and Cremer, M. (2010) 'Chromosome territories', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(3), pp. a003889.
- Cremer, T., Lichter, P., Borden, J., Ward, D. C. and Manuelidis, L. (1988) 'Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes.', *Human Genetics*, 80(3), pp. 235-246.
- Crittenden, S. L., Troemel, E. R., Evans, T. C. and Kimble, J. (1994) 'GLP-1 is localized to the mitotic region of the *C. elegans* germ line', *Development*, 120(10), pp. 2901-11.
- Croft, J. A., Bridger, J. M., Boyle, S., Perry, P., Teague, P. and Bickmore, W. A. (1999) 'Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus', *J Cell Biol*, 145(6), pp. 1119-31.
- Cui, L. B., Huang, X. Y. and Sun, F. Z. (2005) 'Nucleocytoplasmic ratio of fully grown germinal vesicle oocytes is essential for mouse meiotic chromosome segregation and alignment, spindle shape and early embryonic development', *Hum Reprod*, 20(10), pp. 2946-53.
- Cullen, K. E., Kladde, M. P. and Seyfred, M. A. (1993) 'Interaction between transcription regulatory regions of prolactin chromatin', *Science*, 261(5118), pp. 203-6.
- Cvačková, Z., Masata, M., Staněk, D., Fidlerová, H. and Raska, I. (2009) 'Chromatin position in human HepG2 cells: although being non-random, significantly changed in daughter cells', *J Struct Biol*, 165(2), pp. 107-17.
- De La Fuente, R., Viveiros, M. M., Burns, K. H., Adashi, E. Y., Matzuk, M. M. and Eppig, J. J. (2004) 'Major chromatin remodeling in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes is dispensable for global transcriptional silencing but required for centromeric heterochromatin function', *Dev Biol*, 275(2), pp. 447-58.
- de Wit, E. and de Laat, W. (2012) 'A decade of 3C technologies: insights into nuclear organization', *Genes Dev*, 26(1), pp. 11-24.
- Dekker, J., Rippe, K., Dekker, M. and Kleckner, N. (2002) 'Capturing chromosome conformation', *Science*, 295(5558), pp. 1306-11.
- Denker, A. and de Laat, W. (2016) 'The second decade of 3C technologies: detailed insights into nuclear organization', *Genes Dev*, 30(12), pp. 1357-82.
- Ding, L., Zhao, Z. G., Ge, X. H. and Li, Z. Y. (2014) 'Different timing and spatial separation of parental chromosomes in intergeneric somatic hybrids between *Brassica napus* and *Orychophragmus violaceus*', *Genet Mol Res*, 13(2), pp. 2611-8.

- Edgar, L. G. and McGhee, J. D. (1988) 'DNA synthesis and the control of embryonic gene expression in *C. elegans*', *Cell*, 53(4), pp. 589-99.
- Foster, H. A. and Bridger, J. M. (2005) 'The genome and the nucleus: a marriage made by evolution. Genome organisation and nuclear architecture', *Chromosoma*, 114(4), pp. 212-29.
- Frøkjær-Jensen, C., Davis, M. W., Hopkins, C. E., Newman, B. J., Thummel, J. M., Olesen, S. P., Grunnet, M. and Jorgensen, E. M. (2008) 'Single-copy insertion of transgenes in *Caenorhabditis elegans*', *Nat Genet*, 40(11), pp. 1375-83.
- Frøkjær-Jensen, C., Davis, M. W., Ailion, M. and Jorgensen, E. M. (2012) 'Improved Mos1-mediated transgenesis in *C. elegans*', *Nat Methods*, 9(2), pp. 117-8.
- Fu, Q., Martin, B. L., Matus, D. Q. and Gao, L. (2016) 'Imaging multicellular specimens with real-time optimized tiling light-sheet selective plane illumination microscopy', *Nat Commun*, 7, pp. 11088.
- Fukushige, T., Goszczynski, B., Yan, J. and McGhee, J. D. (2005) 'Transcriptional control and patterning of the *pho-1* gene, an essential acid phosphatase expressed in the *C. elegans* intestine', *Dev Biol*, 279(2), pp. 446-61.
- Fulka, J., First, N. L. and Moor, R. M. (1998) 'Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation', *Mol Hum Reprod*, 4(1), pp. 41-9.
- Fuss, S. H., Omura, M. and Mombaerts, P. (2007) 'Local and cis effects of the H element on expression of odorant receptor genes in mouse', *Cell*, 130(2), pp. 373-84.
- Gaginskaya, E., Kulikova, T. and Krasikova, A. (2009) 'Avian lampbrush chromosomes: a powerful tool for exploration of genome expression', *Cytogenet Genome Res*, 124(3-4), pp. 251-67.
- Galli, M. and Morgan, D. O. (2016) 'Cell Size Determines the Strength of the Spindle Assembly Checkpoint during Embryonic Development', *Dev Cell*, 36(3), pp. 344-52.
- Gallo, C. M., Wang, J. T., Motegi, F. and Seydoux, G. (2010) 'Cytoplasmic partitioning of P granule components is not required to specify the germline in *C. elegans*', *Science*, 330(6011), pp. 1685-9.
- Gerlich, D., Beaudouin, J., Kalbfuss, B., Daigle, N., Eils, R. and Ellenberg, J. (2003) 'Global chromosome positions are transmitted through mitosis in mammalian cells', *Cell*, 112(6), pp. 751-64.
- Gibert, M. A., Starck, J. and Beguet, B. (1984) 'Role of the gonad cytoplasmic core during oogenesis of the nematode *Caenorhabditis elegans*', *Biol Cell*, 50(1), pp. 77-85.
- Gleba, Y. Y., Parokonny, A., Kotov, V., Negrutiu, I. and Momot, V. (1987) 'Spatial separation of parental genomes in hybrids of somatic plant cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(11), pp. 3709-13.
- Goldstein, B. and Hird, S. N. (1996) 'Specification of the anteroposterior axis in *Caenorhabditis elegans*', *Development*, 122(5), pp. 1467-74.
- Gonzalez-Sandoval, A., Towbin, B. D., Kalck, V., Cebianca, D. S., Gaidatzis, D., Hauer, M. H., Geng, L., Wang, L., Yang, T., Wang, X., Zhao, K. and Gasser, S. M. (2015) 'Perinuclear Anchoring of H3K9-Methylated Chromatin Stabilizes Induced Cell Fate in *C. elegans* Embryos', *Cell*, 163(6), pp. 1333-47.

- Gorjánác, M. and Mattaj, I. W. (2009) 'Lipin is required for efficient breakdown of the nuclear envelope in *Caenorhabditis elegans*', *J Cell Sci*, 122(Pt 12), pp. 1963-9.
- Grant, B. and Hirsh, D. (1999) 'Receptor-mediated endocytosis in the *Caenorhabditis elegans* oocyte', *Mol Biol Cell*, 10(12), pp. 4311-26.
- Green, R. A., Audhya, A., Pozniakovsky, A., Dammermann, A., Pemble, H., Monen, J., Portier, N., Hyman, A., Desai, A. and Oegema, K. (2008) 'Expression and imaging of fluorescent proteins in the *C. elegans* gonad and early embryo', *Methods Cell Biol*, 85, pp. 179-218.
- Gu, S. G. and Fire, A. (2010) 'Partitioning the *C. elegans* genome by nucleosome modification, occupancy, and positioning', *Chromosoma*, 119(1), pp. 73-87.
- Gumienny, T. L., Lambie, E., Hartwig, E., Horvitz, H. R. and Hengartner, M. O. (1999) 'Genetic control of programmed cell death in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline', *Development*, 126(5), pp. 1011-22.
- Gurskaya, N. G., Verkhusha, V. V., Shcheglov, A. S., Staroverov, D. B., Chepurnykh, T. V., Fradkov, A. F., Lukyanov, S. and Lukyanov, K. A. (2006) 'Engineering of a monomeric green-to-red photoactivatable fluorescent protein induced by blue light', *Nat Biotechnol*, 24(4), pp. 461-5.
- Gustafsson, M. G. (2000) 'Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy', *J Microsc*, 198(Pt 2), pp. 82-7.
- Gustafsson, M. G. (2005) 'Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(37), pp. 13081-6.
- Gönczy, P., Pichler, S., Kirkham, M. and Hyman, A. A. (1999) 'Cytoplasmic dynein is required for distinct aspects of MTOC positioning, including centrosome separation, in the one cell stage *Caenorhabditis elegans* embryo', *J Cell Biol*, 147(1), pp. 135-50.
- Haaf, T. (2001) 'The battle of the sexes after fertilization: behaviour of paternal and maternal chromosomes in the early mammalian embryo', *Chromosome Res*, 9(4), pp. 263-71.
- Habermann, F. A., Cremer, M., Walter, J., Kreth, G., von Hase, J., Bauer, K., Wienberg, J., Cremer, C., Cremer, T. and Solovei, I. (2001) 'Arrangements of macro- and microchromosomes in chicken cells', *Chromosome Res*, 9(7), pp. 569-84.
- Hara, Y. and Kimura, A. (2009) 'Cell-size-dependent spindle elongation in the *Caenorhabditis elegans* early embryo', *Curr Biol*, 19(18), pp. 1549-54.
- Harr, J. C., Gonzalez-Sandoval, A. and Gasser, S. M. (2016) 'Histones and histone modifications in perinuclear chromatin anchoring: from yeast to man', *EMBO Rep*, 17(2), pp. 139-55.
- Hedgecock, E. M. and White, J. G. (1985) 'Polyploid tissues in the nematode *Caenorhabditis elegans*', *Dev Biol*, 107(1), pp. 128-33.
- Heitz, E. 1928. Das Heterochromatin der Moose Jahrb Wiss Bot.
- Henery, C. C. and Kaufman, M. H. (1992) 'Relationship between cell size and nuclear volume in nucleated red blood cells of developmentally matched diploid and tetraploid mouse embryos', *J Exp Zool*, 261(4), pp. 472-8.



- Hepperger, C., Mayer, A., Merz, J., Vanderwall, D. K. and Dietzel, S. (2009) 'Parental genomes mix in mule and human cell nuclei', *Chromosoma*, 118(3), pp. 335-47.
- Hird, S. N., Paulsen, J. E. and Strome, S. (1996) 'Segregation of germ granules in living *Caenorhabditis elegans* embryos: cell-type-specific mechanisms for cytoplasmic localisation', *Development*, 122(4), pp. 1303-12.
- Hirsh, D., Oppenheim, D. and Klass, M. (1976) 'Development of the reproductive system of *Caenorhabditis elegans*', *Dev Biol*, 49(1), pp. 200-19.
- Hubbard, E. J. and Greenstein, D. (2000) 'The *Caenorhabditis elegans* gonad: a test tube for cell and developmental biology', *Dev Dyn*, 218(1), pp. 2-22.
- Iborra, F. J., Pombo, A., Jackson, D. A. and Cook, P. R. (1996) 'Active RNA polymerases are localized within discrete transcription "factories" in human nuclei', *J Cell Sci*, 109 ( Pt 6), pp. 1427-36.
- Ikegami, K., Egelhofer, T. A., Strome, S. and Lieb, J. D. (2010) '*Caenorhabditis elegans* chromosome arms are anchored to the nuclear membrane via discontinuous association with LEM-2', *Genome Biol*, 11(12), pp. R120.
- Ito, K. and McGhee, J. D. (1987) 'Parental DNA strands segregate randomly during embryonic development of *Caenorhabditis elegans*', *Cell*, 49(3), pp. 329-36.
- Jao, C. Y. and Salic, A. (2008) 'Exploring RNA transcription and turnover in vivo by using click chemistry', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(41), pp. 15779-84.
- Ji, N. and van Oudenaarden, A. (2012) 'Single molecule fluorescent in situ hybridization (smFISH) of *C. elegans* worms and embryos', *WormBook*, pp. 1-16.
- Jorgensen, P., Edgington, N. P., Schneider, B. L., Rupes, I., Tyers, M. and Futcher, B. (2007) 'The size of the nucleus increases as yeast cells grow', *Mol Biol Cell*, 18(9), pp. 3523-32.
- Kalhor, R., Tjong, H., Jayathilaka, N., Alber, F. and Chen, L. (2012) 'Genome architectures revealed by tethered chromosome conformation capture and population-based modeling', *Nat Biotechnol*, 30(1), pp. 90-8.
- Kanda, T., Sullivan, K. F. and Wahl, G. M. (1998) 'Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells', *Curr Biol*, 8(7), pp. 377-85.
- Kelly, W. G., Schaner, C. E., Dernburg, A. F., Lee, M. H., Kim, S. K., Villeneuve, A. M. and Reinke, V. (2002) 'X-chromosome silencing in the germline of *C. elegans*', *Development*, 129(2), pp. 479-92.
- Kikuchi, S., Tanaka, H., Wako, T. and Tsujimoto, H. (2007) 'Centromere separation and association in the nuclei of an interspecific hybrid between *Torenia fourmieri* and *T. baillonii* (Scrophulariaceae) during mitosis and meiosis', *Genes Genet Syst*, 82(5), pp. 369-75.
- Killian, D. J. and Hubbard, E. J. A. (2001) 'RNAi feeding to produce males', (no. 1), pp. 32.
- Kim, D. H., Li, B., Si, F., Phillip, J. M., Wirtz, D. and Sun, S. X. (2015) 'Volume regulation and shape bifurcation in the cell nucleus', *J Cell Sci*, 129(2), pp. 457.
- Kim, S., Spike, C. and Greenstein, D. (2013) 'Control of oocyte growth and meiotic maturation in *Caenorhabditis elegans*', *Adv Exp Med Biol*, 757, pp. 277-320.

- Kimble, J. and Sharrock, W. J. (1983) 'Tissue-specific synthesis of yolk proteins in *Caenorhabditis elegans*', *Dev Biol*, 96(1), pp. 189-96.
- Kimura, H. and Cook, P. R. (2001) 'Kinetics of core histones in living human cells: little exchange of H3 and H4 and some rapid exchange of H2B', *J Cell Biol*, 153(7), pp. 1341-53.
- Kipreos, E. T. (2005) 'C. elegans cell cycles: invariance and stem cell divisions', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(10), pp. 766-76.
- Koehler, D., Zakhartchenko, V., Froenicke, L., Stone, G., Stanyon, R., Wolf, E., Cremer, T. and Brero, A. (2009) 'Changes of higher order chromatin arrangements during major genome activation in bovine preimplantation embryos', *Exp Cell Res*, 315(12), pp. 2053-63.
- Korčėková, D., Gombitov, A., Rařka, I., Cmarko, D. and Lanctôt, C. (2012) 'Nucleologenesis in the *Caenorhabditis elegans* embryo', *PLoS One*, 7(7), pp. e40290.
- Kołowerzo-Lubnau, A., Niedojadło, J., řwidziński, M., Bednarska-Kozakiewicz, E. and Smoliński, D. J. (2015) 'Transcriptional activity in diplotene larch microsporocytes, with emphasis on the diffuse stage', *PLoS One*, 10(2), pp. e0117337.
- Krawczyk, P. M., Borovski, T., Stap, J., Cijssouw, T., ten Cate, R., Medema, J. P., Kanaar, R., Franken, N. A. and Aten, J. A. (2012) 'Chromatin mobility is increased at sites of DNA double-strand breaks', *J Cell Sci*, 125(Pt 9), pp. 2127-33.
- Kruhlak, M. J., Celeste, A., Dellaire, G., Fernandez-Capetillo, O., Mller, W. G., McNally, J. G., Bazett-Jones, D. P. and Nussenzweig, A. (2006) 'Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks', *J Cell Biol*, 172(6), pp. 823-34.
- Ladouceur, A. M., Dorn, J. F. and Maddox, P. S. (2015) 'Mitotic chromosome length scales in response to both cell and nuclear size', *J Cell Biol*, 209(5), pp. 645-51.
- Lallemand-Breitenbach, V. and de Th, H. (2010) 'PML nuclear bodies', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(5), pp. a000661.
- Lamond, A. I. and Spector, D. L. (2003) 'Nuclear speckles: a model for nuclear organelles', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(8), pp. 605-12.
- Lanctôt, C., Cheutin, T., Cremer, M., Cavalli, G. and Cremer, T. (2007) 'Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions', *Nat Rev Genet*, 8(2), pp. 104-15.
- Larson, D. R., Singer, R. H. and Zenklusen, D. (2009) 'A single molecule view of gene expression', *Trends Cell Biol*, 19(11), pp. 630-7.
- Lee, K. K., Gruenbaum, Y., Spann, P., Liu, J. and Wilson, K. L. (2000) 'C. elegans nuclear envelope proteins emerin, MAN1, lamin, and nucleoporins reveal unique timing of nuclear envelope breakdown during mitosis', *Mol Biol Cell*, 11(9), pp. 3089-99.
- Lee, L. W., Lee, C. C., Huang, C. R. and Lo, S. J. (2012) 'The nucleolus of *Caenorhabditis elegans*', *J Biomed Biotechnol*, 2012, pp. 601274.
- Leitch, A. R., Schwarzacher, T., Mosgfiller, W., Bennett, M. D. and Heslop-Harrison, J. S. 1991. Parental genomes are separated throughout the cell cycle in a plant hybrid. *Chromosoma*.

- Levsky, J. M., Shenoy, S. M., Pezo, R. C. and Singer, R. H. (2002) 'Single-cell gene expression profiling', *Science*, 297(5582), pp. 836-40.
- Liu, T., Rechtsteiner, A., Egelhofer, T. A., Vielle, A., Latorre, I., Cheung, M. S., Ercan, S., Ikegami, K., Jensen, M., Kolasinska-Zwierz, P., Rosenbaum, H., Shin, H., Taing, S., Takasaki, T., Iniguez, A. L., Desai, A., Dernburg, A. F., Kimura, H., Lieb, J. D., Ahringer, J., Strome, S. and Liu, X. S. (2011) 'Broad chromosomal domains of histone modification patterns in *C. elegans*', *Genome Res*, 21(2), pp. 227-36.
- Lomvardas, S., Barnea, G., Pisapia, D. J., Mendelsohn, M., Kirkland, J. and Axel, R. (2006) 'Interchromosomal interactions and olfactory receptor choice', *Cell*, 126(2), pp. 403-13.
- Lu, X., Li, J. M., Elemento, O., Tavazoie, S. and Wieschaus, E. F. (2009) 'Coupling of zygotic transcription to mitotic control at the *Drosophila* mid-blastula transition', *Development*, 136(12), pp. 2101-10.
- Maddox, A. S., Lewellyn, L., Desai, A. and Oegema, K. (2007) 'Anillin and the septins promote asymmetric ingression of the cytokinetic furrow', *Dev Cell*, 12(5), pp. 827-35.
- Manta, P., Vassilopoulos, D. and Spengos, M. (1987) 'Nucleo-cytoplasmic ratio in ageing skeletal muscle', *Eur Arch Psychiatry Neurol Sci*, 236(4), pp. 235-6.
- Manuelidis, L. (1985) 'Individual interphase chromosome domains revealed by in situ hybridization', *Hum Genet*, 71(4), pp. 288-93.
- Mayer, R., Brero, A., von Hase, J., Schroeder, T., Cremer, T. and Dietzel, S. (2005) 'Common themes and cell type specific variations of higher order chromatin arrangements in the mouse', *BMC Cell Biol*, 6, pp. 44.
- Mayer, W., Fundele, R. and Haaf, T. (2000a) 'Spatial separation of parental genomes during mouse interspecific (*Mus musculus* x *M. spretus*) spermiogenesis', *Chromosome Res*, 8(6), pp. 555-8.
- Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R. and Haaf, T. (2000b) 'Demethylation of the zygotic paternal genome', *Nature*, 403(6769), pp. 501-2.
- Mayer, W., Smith, A., Fundele, R. and Haaf, T. (2000c) 'Spatial separation of parental genomes in preimplantation mouse embryos', *J Cell Biol*, 148(4), pp. 629-34.
- McCarter, J., Bartlett, B., Dang, T. and Schedl, T. (1999) 'On the control of oocyte meiotic maturation and ovulation in *Caenorhabditis elegans*', *Dev Biol*, 205(1), pp. 111-28.
- McGrath, J. and Solter, D. (1984) 'Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes', *Cell*, 37(1), pp. 179-83.
- McLay, D. W. and Clarke, H. J. (2003) 'Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals', *Reproduction*, 125(5), pp. 625-33.
- Meister, P., Towbin, B. D., Pike, B. L., Ponti, A. and Gasser, S. M. (2010) 'The spatial dynamics of tissue-specific promoters during *C. elegans* development', *Genes Dev*, 24(8), pp. 766-82.
- Merritt, C., Rasoloson, D., Ko, D. and Seydoux, G. (2008) '3' UTRs are the primary regulators of gene expression in the *C. elegans* germline', *Curr Biol*, 18(19), pp. 1476-82.

- Misteli, T., Cáceres, J. F. and Spector, D. L. (1997) 'The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells', *Nature*, 387(6632), pp. 523-7.
- Nadarajan, S., Mohideen, F., Tzur, Y. B., Ferrandiz, N., Crawley, O., Montoya, A., Faull, P., Snijders, A. P., Cutillas, P. R., Jambhekar, A., Blower, M. D., Martinez-Perez, E., Harper, J. W. and Colaiacovo, M. P. (2016) 'The MAP kinase pathway coordinates crossover designation with disassembly of synaptonemal complex proteins during meiosis', *Elife*, 5, pp. e12039.
- Newport, J. and Kirschner, M. (1982) 'A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: I. characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage', *Cell*, 30(3), pp. 675-86.
- Nizami, Z., Deryusheva, S. and Gall, J. G. (2010) 'The Cajal body and histone locus body', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(7), pp. a000653.
- Oegema, K., Desai, A., Rybina, S., Kirkham, M. and Hyman, A. A. (2001) 'Functional analysis of kinetochore assembly in *Caenorhabditis elegans*', *J Cell Biol*, 153(6), pp. 1209-26.
- Oka, T. and Futai, M. (2000) 'Requirement of V-ATPase for ovulation and embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*', *J Biol Chem*, 275(38), pp. 29556-61.
- Olins, A. L. and Olins, D. E. (1974) 'Spheroid chromatin units (v bodies)', *Science*, 183(4122), pp. 330-2.
- Osborne, C. S., Chakalova, L., Brown, K. E., Carter, D., Horton, A., Debrand, E., Goyenechea, B., Mitchell, J. A., Lopes, S., Reik, W. and Fraser, P. (2004) 'Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription', *Nat Genet*, 36(10), pp. 1065-71.
- Oswald, J., Engemann, S., Lane, N., Mayer, W., Olek, A., Fundele, R., Dean, W., Reik, W. and Walter, J. (2000) 'Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote', *Curr Biol*, 10(8), pp. 475-8.
- Page, J., de la Fuente, R., Manterola, M., Parra, M. T., Viera, A., Berríos, S., Fernández-Donoso, R. and Rufas, J. S. (2012) 'Inactivation or non-reactivation: what accounts better for the silence of sex chromosomes during mammalian male meiosis?', *Chromosoma*, 121(3), pp. 307-26.
- Paul, B. and Montpetit, B. (2016) 'Altered RNA processing and export lead to retention of mRNAs near transcription sites and nuclear pore complexes or within the nucleolus', *Mol Biol Cell*, 27(17), pp. 2742-56.
- Phatnani, H. P. and Greenleaf, A. L. (2006) 'Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD', *Genes Dev*, 20(21), pp. 2922-36.
- Pierce, B. 2006. Genetics: A Conceptual Approach. 2nd Edition ed.
- Pinkel, D., Landegent, J., Collins, C., Fuscoe, J., Segraves, R., Lucas, J. and Gray, J. (1988) 'Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(23), pp. 9138-42.
- Rabl, C. 1885. Über Zelltheilung. Morphologisches Jahrbuch.
- Raj, A., Peskin, C. S., Tranchina, D., Vargas, D. Y. and Tyagi, S. (2006) 'Stochastic mRNA synthesis in mammalian cells', *PLoS Biol*, 4(10), pp. e309.

- Raj, A. and van Oudenaarden, A. (2009) 'Single-molecule approaches to stochastic gene expression', *Annu Rev Biophys*, 38, pp. 255-70.
- Reinke, V., Smith, H. E., Nance, J., Wang, J., Van Doren, C., Begley, R., Jones, S. J., Davis, E. B., Scherer, S., Ward, S. and Kim, S. K. (2000) 'A global profile of germline gene expression in *C. elegans*', *Mol Cell*, 6(3), pp. 605-16.
- Sadler, P. L. and Shakes, D. C. (2000) 'Anucleate *Caenorhabditis elegans* sperm can crawl, fertilize oocytes and direct anterior-posterior polarization of the 1-cell embryo', *Development*, 127(2), pp. 355-66.
- Saksouk, N., Simboeck, E. and Déjardin, J. (2015) 'Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals', *Epigenetics Chromatin*, 8, pp. 3.
- Samson, M., Jow, M. M., Wong, C. C., Fitzpatrick, C., Aslanian, A., Saucedo, I., Estrada, R., Ito, T., Park, S. K., Yates, J. R. and Chu, D. S. (2014) 'The specification and global reprogramming of histone epigenetic marks during gamete formation and early embryo development in *C. elegans*', *PLoS Genet*, 10(10), pp. e1004588.
- Schild-Prüfert, K., Saito, T. T., Smolikov, S., Gu, Y., Hincapie, M., Hill, D. E., Vidal, M., McDonald, K. and Colaiácovo, M. P. (2011) 'Organization of the synaptonemal complex during meiosis in *Caenorhabditis elegans*', *Genetics*, 189(2), pp. 411-21.
- Schonegg, S., Hyman, A. A. and Wood, W. B. (2014) 'Timing and mechanism of the initial cue establishing handed left-right asymmetry in *Caenorhabditis elegans* embryos', *Genesis*, 52(6), pp. 572-80.
- Schwarzacher, T., Heslop-Harrison, J. S., Anamthawat-Jonsson, K., Finch, R. A. and Bennett, M. D. 1992. Parental genome separation in reconstructions of somatic and premeiotic metaphases of *Hordeum vulgare* x *H. bulbosum*. *Journal of Cell Science*.
- Sharma, R. and Meister, P. (2013) 'Nuclear organization in the nematode *C. elegans*', *Curr Opin Cell Biol*, 25(3), pp. 395-402.
- Solovei, I., Kreysing, M., Lanctôt, C., Kösem, S., Peichl, L., Cremer, T., Guck, J. and Joffe, B. (2009) 'Nuclear architecture of rod photoreceptor cells adapts to vision in mammalian evolution', *Cell*, 137(2), pp. 356-68.
- Starck, J. (1977) 'Radioautographic Study of RNA Synthesis in *Caenorhabditis elegans* (Bergerac Variety) Oogenesis', 30 (2), pp. 181-182.
- Starck, J., Gibert, M.-A., Brun, J. and Bosch, C. (1983) 'Ribosomal RNA synthesis and processing during oogenesis of the free living nematode *Caenorhabditis elegans*', *Comparative Biochemistry and Physiology*, 75B(4), pp. 575-580.
- Stiernagle, T. (2006) Maintenance of *C. elegans*. *WormBook*. 2006 Feb 11; ():1-11.
- Strickfaden, H., Zunhammer, A., van Koningsbruggen, S., Köhler, D. and Cremer, T. (2010) '4D chromatin dynamics in cycling cells: Theodor Boveri's hypotheses revisited', *Nucleus*, 1(3), pp. 284-97.
- Strome, S., Kelly, W. G., Ercan, S. and Lieb, J. D. (2014) 'Regulation of the X chromosomes in *Caenorhabditis elegans*', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6(3).
- Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G. and Thomson, J. N. (1983) 'The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*', *Dev Biol*, 100(1), pp. 64-119.

- Surani, M. A., Barton, S. C. and Norris, M. L. (1984) 'Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis', *Nature*, 308(5959), pp. 548-50.
- Taghibiglou, C., Martin, H. G., Rose, J. K., Ivanova, N., Lin, C. H., Lau, H. L., Rai, S., Wang, Y. T. and Rankin, C. H. (2009) 'Essential role of SBP-1 activation in oxygen deprivation induced lipid accumulation and increase in body width/length ratio in *Caenorhabditis elegans*', *FEBS Lett*, 583(4), pp. 831-4.
- Tanabe, H., Müller, S., Neusser, M., von Hase, J., Calcagno, E., Cremer, M., Solovei, I., Cremer, C. and Cremer, T. (2002) 'Evolutionary conservation of chromosome territory arrangements in cell nuclei from higher primates', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(7), pp. 4424-9.
- Thomson, I., Gilchrist, S., Bickmore, W. A. and Chubb, J. R. (2004) 'The radial positioning of chromatin is not inherited through mitosis but is established de novo in early G1', *Curr Biol*, 14(2), pp. 166-72.
- Towbin, B. D., González-Aguilera, C., Sack, R., Gaidatzis, D., Kalck, V., Meister, P., Askjaer, P. and Gasser, S. M. (2012) 'Step-wise methylation of histone H3K9 positions heterochromatin at the nuclear periphery', *Cell*, 150(5), pp. 934-47.
- Towbin, B. D., Meister, P., Pike, B. L. and Gasser, S. M. (2010) 'Repetitive transgenes in *C. elegans* accumulate heterochromatic marks and are sequestered at the nuclear envelope in a copy-number- and lamin-dependent manner', *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 75, pp. 555-65.
- Uddin, M., Altmann, G. G. and Leblond, C. P. (1984) 'Radioautographic visualization of differences in the pattern of [3H]uridine and [3H]orotic acid incorporation into the RNA of migrating columnar cells in the rat small intestine', *J Cell Biol*, 98(5), pp. 1619-29.
- Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (1995) 'Serial analysis of gene expression', *Science*, 270(5235), pp. 484-7.
- Verschure, P. J., van Der Kraan, I., Manders, E. M. and van Driel, R. (1999) 'Spatial relationship between transcription sites and chromosome territories', *J Cell Biol*, 147(1), pp. 13-24.
- Viera, A., Parra, M. T., Rufas, J. S. and Page, J. (2016) 'Transcription reactivation during the first meiotic prophase in bugs is not dependent on synapsis', *Chromosoma*.
- Visser, A. E., Jaunin, F., Fakan, S. and Aten, J. A. (2000) 'High resolution analysis of interphase chromosome domains', *J Cell Sci*, 113 ( Pt 14), pp. 2585-93.
- Vágnerová, L., Gombitová, A., Cmarko, D. and Lanctôt, C. (2014) 'Distinct chromatin organization in the germ line founder cell of the *Caenorhabditis elegans* embryo', *Dev Growth Differ*, 56(9), pp. 605-14.
- Walker, A. K., Boag, P. R. and Blackwell, T. K. (2007) 'Transcription reactivation steps stimulated by oocyte maturation in *C. elegans*', *Dev Biol*, 304(1), pp. 382-93.
- Wallace, H. and Birnstiel, M. L. (1966) 'Ribosomal cistrons and the nucleolar organizer', *Biochim Biophys Acta*, 114(2), pp. 296-310.
- Walter, J., Joffe, B., Bolzer, A., Albiez, H., Benedetti, P. A., Müller, S., Speicher, M. R., Cremer, T., Cremer, M. and Solovei, I. (2006) 'Towards many colors in FISH on 3D-preserved interphase nuclei', *Cytogenet Genome Res*, 114(3-4), pp. 367-78.

- 
- Walter, J., Schermelleh, L., Cremer, M., Tashiro, S. and Cremer, T. (2003) 'Chromosome order in HeLa cells changes during mitosis and early G1, but is stably maintained during subsequent interphase stages', *J Cell Biol*, 160(5), pp. 685-97.
- Wang, X., Zhao, Y., Wong, K., Ehlers, P., Kohara, Y., Jones, S. J., Marra, M. A., Holt, R. A., Moerman, D. G. and Hansen, D. (2009) 'Identification of genes expressed in the hermaphrodite germ line of *C. elegans* using SAGE', *BMC Genomics*, 10, pp. 213.
- White, F. H., Jin, Y. and Yang, L. (1997) 'An evaluation of the role of nuclear cytoplasmic ratios and nuclear volume densities as diagnostic indicators in metaplastic, dysplastic and neoplastic lesions of the human cheek', *Histol Histopathol*, 12(1), pp. 69-77.
- Wilson, E. B. 1925. The karyoplasmic ratio. In *The Cell in Development and Heredity*. The karyoplasmic ratio. In *The Cell in Development and Heredity*. Third edition ed. New York: The Macmillan Company.
- Wolke, U., Jezuit, E. A. and Priess, J. R. (2007) 'Actin-dependent cytoplasmic streaming in *C. elegans* oogenesis', *Development*, 134(12), pp. 2227-36.
- Zeiser, E., Frøkjær-Jensen, C., Jorgensen, E. and Ahringer, J. (2011) 'MosSCI and gateway compatible plasmid toolkit for constitutive and inducible expression of transgenes in the *C. elegans* germline', *PLoS One*, 6(5), pp. e20082.
- Zuccotti, M., Piccinelli, A., Giorgi Rossi, P., Garagna, S. and Redi, C. A. (1995) 'Chromatin organization during mouse oocyte growth', *Mol Reprod Dev*, 41(4), pp. 479-85.

## 9. PŘÍLOHY