

**MASARYKOVA UNIVERZITA**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**  
**ÚSTAV BIOCHEMIE**

# **Diplomová práce**

**Brno 2015**

**Jana Jurečková**



**MASARYKOVA UNIVERZITA**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**  
**ÚSTAV BIOCHEMIE**

---



**EPIGENETICKÝ STAV CHROMATINU**  
**PROTEINOVÉ JEDNOTKY TELOMERÁZY V**  
**MODELOVÉ ROSTLINĚ NICOTIANA TABACUM**

Diplomová práce

**Jana Jurečková**

Vedoucí práce: Mgr. Miloslava Fojtová, CSc.

Brno 2015

## Bibliografický záznam

<b>Autor:</b>	Bc. Jana Jurečková Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Ústav biochemie
<b>Název práce:</b>	Epigenetický stav chromatinu proteinové jednotky telomerázy v modelové rostlině <i>Nicotiana tabacum</i>
<b>Studijní program:</b>	Biochemie
<b>Studijní obor:</b>	Biochemie
<b>Vedoucí práce:</b>	Mgr. Miloslava Fojtová, CSc.
<b>Akademický rok:</b>	2014/2015
<b>Počet stran:</b>	82
<b>Klíčová slova:</b>	<i>TERT</i> , modifikace histonů, methylace DNA, transkripce

## Bibliographic Entry

**Author** Bc. Jana Jurečková  
Faculty of Science, Masaryk University  
Department of Biochemistry

**Title of Thesis:** Epigenetic nature of the telomerase protein subunit chromatin in *Nicotiana tabacum* model plant

**Degree programme:** Biochemistry

**Field of Study:** Biochemistry

**Supervisor:** Mgr. Miloslava Fojtová, CSc.

**Academic Year:** 2014/2015

**Number of Pages:** 82

**Keywords:** *TERT*, histone modifications, DNA methylation, transcription

## Abstrakt

Diplomová práce „Epigenetický stav chromatinu proteinové jednotky telomerázy v modelové rostlině *Nicotiana tabacum*“ se věnuje regulaci této podjednotky na úrovni transkripce a roli epigenetických modifikací v tomto procesu u modelové rostliny *Nicotiana tabacum* (tabák viržinský). Tabák představuje z pohledu regulace telomerázy unikátní systém, v jeho genomu byly popsány tři sekvenční varianty genu kódujícího katalytickou podjednotku telomerázy - *TERT*.

Teoretická část této práce se zabývá problematikou konců eukaryotických chromozomů – telomer, způsobu jejich udržování a prodlužování pomocí telomerázy, dále charakterizaci kovalentních modifikací DNA a histonů, které ovlivňují vlastnosti chromatinu v daném lokusu a tím i genovou transkripci.

V praktické části jsme se věnovali analýze transkripce variant genu *TERT* v pletivech *N. tabacum* a v rodičovské rostlině *N. sylvestris* a charakterizaci modifikací histonů v pletivech *N. tabacum* s aktivní a neaktivní telomerázou. Byl také studován vliv syntetických fytohormonů na transkripci variant *NtTERT* během klíčení semen *N. tabacum*.

Transkripční profil variant *NtTERT* ukazuje, že pro aktivitu telomerázy je determinující varianta *NtTERT-C/t* a pseudogen *NtTERT-D* je pravděpodobně zapojen do negativní regulace aktivity telomerázy. Přítomnost syntetických auxinů během klíčení podpořila transkripci varianty *NtTERT-C/t*, oproti tomu syntetický cytokinin neměl na transkripci variant *NtTERT* žádný vliv. Epigenetická studie ukazuje výrazné rozdíly ve struktuře chromatinu genu *NtTERT* mezi semenáčky (telomeráza-pozitivní pletivo) a maturovanými listy (telomeráza-negativní pletivo). Výsledky byly diskutovány s analogickou studií u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*.

## Abstract

The diploma thesis „Epigenetic nature of the telomerase protein subunit chromatin in *Nicotiana tabacum* model plant“ deals with the regulation of this subunit on the transcriptional level and the role of epigenetic modifications in this process in the *Nicotiana tabacum* (tobacco) model plant. Tobacco represents unique system because in tobacco genome three sequence variants of the gene coding for telomerase catalytic subunit - *TERT* were identified.

In the theoretical part of the thesis the ends of eukaryotic chromosomes – telomeres, their maintenance and elongation by telomerase are described, and characterization of epigenetic modifications of DNA and histones influencing properties of chromatin and gene transcription is presented.

In the practical part of the diploma thesis, transcription of *TERT* gene variants in *N. tabacum* and *N. sylvestris* (donor of the mother genome part) tissues and modifications of histones in tissues with the positive and negative telomerase activity were analysed. Next, the influence of synthetic phytohormones on the *NtTERT* transcription during *N. tabacum* seeds germination was investigated.

The transcription profile of *NtTERT* gene variants indicated that the *NtTERT-C/t* variant is relevant for telomerase activity and the pseudogene *NtTERT-D* is probably involved in negative regulation of telomerase activity. The treatment of tobacco seeds by synthetic auxins during germination increased the level of *NtTERT-C/t* variant transcript, the synthetic cytokinin didn't cause any changes in the *NtTERT* transcription profile. The epigenetic study showed significant differences in chromatin structure between seedling (telomerase-positive tissue) and mature leaves (telomerase-negative tissue). The results were discussed with analogous study in *Arabidopsis thaliana* model plant.



Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta  
Ústav biochemie  
Kotlářská 2, 611 37 Brno, CZ



## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Magisterský studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie

Student(ka): **Bc. Jana Jurečková**

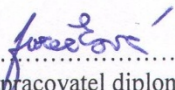
Název tématu: **Epigenetický stav chromatinu proteinové podjednotky telomerázy  
v modelových rostlinách Nicotiana**

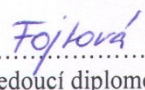
Vedoucí diplomové práce: Mgr. Miloslava Fojtová, CSc.

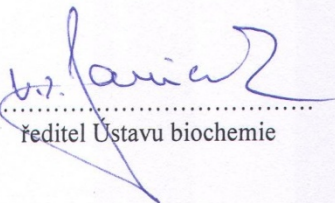
Odborný konzultant: Mgr. Anna Ogrocká

Datum zadání diplomové práce:

Datum odevzdání diplomové práce:

  
.....  
zpracovatel diplomové práce

  
.....  
vedoucí diplomové práce

  
.....  
ředitel Ústavu biochemie

V Brně, dne 11.10.2013

## **Zásady pro vypracování:**

Telomeráza je enzym zodpovědný za udržování konců lineárních eukaryotických chromozómů a její aktivita je striktně regulována během života rostliny. U živočišných modelů bylo prokázáno zapojení epigenetických mechanismů do regulace transkripce proteinové podjednotky telomerázy a tím i regulace aktivity telomerázy během vývoje. Naše recentní práce ukázala, že v modelové rostlině *Arabidopsis thaliana* nejsou epigenetické mechanismy do regulace transkripce telomerázy významněji zapojeny (Ogrocká et al., 2012).

Náplní diplomové práce bude analýza epigenetického stavu chromatinu proteinové podjednotky telomerázy v telomeráza-pozitivních (semenáčky, pupeny) a telomeráza-negativních (listy) tkáních *Nicotiana tabacum* (tabák viržinský). Tabák je ve srovnání s *A. thaliana* z genetického i epigenetického hlediska odlišnou modelovou rostlinou a naše recentní výsledky ukazují, že nepůjde pouze o rozšiřující a doplňující studii (Majerová et al., 2011; Sýkorová et al., 2012).

Práce bude zahrnovat analýzu epigenetických modifikací histonů metodou chromatin imunoprecipitace (ChIP) a analýzu metylace DNA metylačně citlivými restrikcčními endonukleázami, případně genomovým sekvenováním po modifikaci bisulfitem.

## **Seznam odborné literatury:**

Ogrocká A, Sýkorová E, Fajkus J, Fojtová M. (2012) Developmental silencing of the AtTERT gene is associated with increased H3K27me3 loading and maintenance of its euchromatic environment. *J Exp Bot* doi:10.1093/jxb/ers107.

Majerová E, Fojtová M, Mozgová I, Bittová M, Fajkus, J. (2011) Hypomethylating drugs efficiently decrease cytosine methylation in telomeric DNA and activate telomerase without affecting telomere lengths in tobacco cells. *Plant Mol Biol* 77, 371-380.

Sýkorová E., Fulnečková J., Mokroš P, Fajkus J, Fojtová M, Peška V. (2012) Three TERT genes in *Nicotiana tabacum*. *Chromosome Res* 20, 381-394.



Fitzgerald MS, McKnight TD, Shippen DE. (1996) Characterization and developmental pattern of telomerase expression in plants. Proc Natl Acad Sci USA, 93, 14422-14427.

Zhu J, Zhao Y, Wang S. (2011) Chromatin and epigenetic regulation of the telomerase reverse transcriptase gene. Protein Cell 1, 22-32.

## Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala Mgr. Miloslavě Fojtové, CSc. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování diplomové práce věnovala. Také Mgr. Anně Ogrocké, PhD. a Mgr. Pavle Polanské za pomoc při vypracování praktické části.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracovala samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

Brno 2015

  
.....  
Jméno Příjmení

## Obsah

1	Úvod.....	13
1.1	<i>Nicotiana tabacum</i> .....	13
2	Struktura a udržování konců eukaryotických chromosomů .....	15
2.1	Telomery .....	15
2.1.1	Telomerové transkripty.....	16
2.2	Telomeráza.....	17
2.2.1	TERT .....	18
2.2.2	Regulace telomerázy.....	20
2.2.3	Hormonální regulace telomerázy.....	22
3	Epigenetické modifikace.....	23
3.1	Histonový kód .....	23
3.1.1	Acetylace histonů.....	24
3.1.2	Methylace histonů.....	25
3.1.3	Ubiquitinace a biotinylace histonů .....	27
3.2	Methylace DNA .....	28
3.3	Epigenetický stav telomerázy .....	30
4	Cíl diplomové práce.....	32
5	Materiál a metody .....	33
5.1	Rostlinný materiál .....	33
5.2	Výsev semínek .....	33
5.3	Izolace RNA, DNázování a reverzní transkripce.....	34
5.4	Izolace DNA.....	35
5.5	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	36
5.6	Elektroforéza nukleových kyselin na agarózovém gelu.....	42
5.7	Analýza aktivity telomerázy pomocí TRAP (telomere repeat amplification protocol).....	43
5.8	Imunoprecipitace chromatinu.....	45
5.9	Analýza methylace DNA konverzí bisulfitem .....	47

6	Výsledky .....	48
6.1	Optimalizace PCR pro specifickou amplifikaci sekvenčních variant genu <i>NtTERT</i> .....	48
6.2	Zastoupení sekvenčních variant genu <i>NtTERT</i> v genomu studovaných rostlin	51
6.3	Izolace a kontrola kvality RNA.....	52
6.4	Analýza transkripce sekvenčních variant genu <i>NtTERT</i> .....	53
6.5	Analýza transkripce sekvenčních variant genu <i>NtTERT</i> v semenáčcích klíčících v přítomnosti rostlinných hormonů.....	59
6.6	Fenotyp rostlin klíčících v přítomnosti hormonů.....	63
6.7	Analýza aktivity telomerázy .....	64
6.8	Epigenetická analýza <i>NtTERT</i> .....	66
7	Diskuse.....	68
8	Závěr .....	72
9	Literatura.....	73

## Zkratky

ALT	<u>a</u> lternative <u>t</u> elomere <u>l</u> engthening, alternativní prodlužování telomer
ABA	<u>a</u> bscise <u>a</u> cid, kyselina abscisová
BAP	6- <u>b</u> enzylaminopurin
CRISPR/Cas	<u>C</u> lustered <u>R</u> egularly <u>I</u> nterspaced <u>S</u> hort <u>P</u> alindromic <u>R</u> epeats asociované s Cas geny
CMT3	<u>C</u> HR <u>O</u> M <u>O</u> M <u>E</u> T <u>H</u> Y <u>L</u> A <u>S</u> E3
CTE	<u>C</u> - <u>t</u> erminal <u>e</u> xtension, C-koncová část
DHPA	9-( <u>S</u> )-(2,3- <u>d</u> i <u>h</u> ydroxypropyl)- <u>a</u> denin
dNTPs	<u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ukleotid <u>t</u> rifosfáty
DTT	<u>d</u> i <u>t</u> hi <u>o</u> threitol
DRM2	<u>D</u> OMAINS <u>R</u> EARRANGED <u>M</u> ETHYLTRANSFERASE2
dsDNA	<u>d</u> ouble-stranded DNA, dvouřetězcová DNA
Fw	for <u>w</u> ard primer, přímý primer
H	<u>h</u> iston
ChIP	<u>c</u> hromatin <u>i</u> muno- <u>p</u> recipitace
ITR	<u>i</u> nterstitial <u>t</u> elomere <u>r</u> egions, intersticiální telomerové oblasti
PCR	polymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction, polymerázová řetězová reakce
qPCR	quantitative PCR, PCR v reálném čase
RT-PCR	<u>r</u> everse <u>t</u> ranscription PCR, reverzně transkripční PCR
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
PVP	polyvinylypyrrolidon
MET1	DNA <u>M</u> ETHYLTRANSFERASE1
MS	<u>m</u> ass <u>s</u> pectrometry, hmotnostní spektrometrie
MS	<u>M</u> urashige and <u>S</u> koog medium
NAA	<u>n</u> aphthyl <u>a</u> cetic <u>a</u> cid, 1-naftyloctová kyselina
RdDM	<u>R</u> NA- <u>d</u> irected <u>D</u> NA <u>m</u> ethylation, RNA řízená methylace DNA
Rev	<u>r</u> everse primer, zpětný primer
RT	<u>r</u> everse <u>t</u> ranscriptase region, reverzně transkriptázová oblast
SAH	<u>S</u> - <u>a</u> denosyl <u>h</u> omocystein
SAM	<u>S</u> - <u>a</u> denosyl <u>m</u> ethionin
ssDNA	<u>s</u> ingle- <u>s</u> tranded DNA, jednořetězcová DNA

TAC1	telomerase <u>a</u> ctivator <u>1</u> , telomerázový aktivátor 1
TALEN	<u>T</u> ranscription <u>a</u> ctivator- <u>l</u> ike <u>e</u> ffector <u>n</u> ucleases
TB2-Y	to <u>b</u> acco <u>b</u> right <u>y</u> ellow- <u>2</u> (tabáková suspenzní kultura)
TEN	telomerase <u>N</u> -terminal, telomerázová N-terminální doména
TERRA	telomeric <u>r</u> epeat-containing <u>R</u> NA
ARRET	TERRA antisense transcripts
TERT	telomerase <u>r</u> everse <u>t</u> ranscriptase
<i>AtTERT</i>	<i>A</i> rabidopsis <i>t</i> haliana <i>TERT</i>
<i>NtTERT-C/s</i>	<i>N</i> icotiana <i>t</i> abacum, <u>c</u> oding putative functional variant odvozená od <i>Nicotiana sylvestris</i>
<i>NtTERT-C/t</i>	<i>N</i> icotiana <i>t</i> abacum, <u>c</u> oding putative functional variant odvozená od <i>Nicotiana tomentosiformis</i>
<i>NtTERT-D</i>	<i>N</i> icotiana <i>t</i> abacum, putative pseudogene variant
<i>hTERT</i>	<u>h</u> uman <i>TERT</i>
TR	telomerázová <u>R</u> NA
TRAP	telomeric <u>r</u> epeat <u>a</u> mplification <u>p</u> rotocol
<i>TRBD</i>	telomere- <u>R</u> NA <u>b</u> inding <u>d</u> omain
2,4D	<u>2,4</u> -dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina

# 1 Úvod

Vědní obor epigenetika se zabývá studiem kovalentních modifikací DNA a histonů, které se významně podílejí na regulaci genové exprese a jsou tak zapojeny do důležitých buněčných procesů, jako je kontrola buněčného cyklu, diferenciaci buněk a adaptace organismu na změny prostředí. Epigenetické regulace jsou zprostředkovány methylací DNA a modifikacemi histonů; tyto modifikace ovlivňují strukturu chromatinu a tím i vlastnosti DNA v dané oblasti.

V této souvislosti se často zmiňuje pojem tzv. histonový kód zahrnující v sobě právě posttranslační kovalentní modifikace histonů. Tento kód není sice univerzální jako genetický kód, ale spolu s methylací DNA může být předáván do dceřiných buněk při buněčném dělení. Důsledkem změn epigenetických modifikací jsou změny fenotypu, přičemž genotyp zůstává neměnný.

Rostliny, jakožto nepohyblivé organismy, vyvinuly sofistikovaný systém epigenetických regulací, aby mohly rychle a účinně reagovat na změny okolního prostředí. Tomu odpovídá i komplexní obraz epigenetických mechanismů, z nichž některé jsou dokonce pro rostliny unikátní. Rostliny lépe snášejí působení toxických látek, aniž by byl pro ně daný účinek letální, stejně tak se lépe vyrovnávají s genetickými mutacemi a i díky totipotentnímu charakteru rostlinných buněk je studium epigenetiky rostlin zajímavým a perspektivním vědním oborem.

U savčích buněk bylo zjištěno, že epigenetické mechanismy jsou zapojeny do regulace proteinové podjednotky telomerázy, která je součástí enzymového komplexu zodpovědného za udržování lineárních konců eukaryotických chromosomů a jejíž exprese je striktně regulována během vývoje organismu. Na druhou stranu, analogické studie u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* ukázaly euchromatinový charakter genu kódujícího proteinovou podjednotku telomerázy v pletivech s aktivní i neaktivní telomerázou. Studium rostlinných telomer a telomerázy tak může přispět k vysvětlení dosud neznámých mechanismů a specifik regulace telomerázy během vývoje organismu.

## 1.1 *Nicotiana tabacum*

*Nicotiana tabacum*, tabák viržinský, patří do čeledi *Solanaceae*, tabákové listy obsahují jedovatý alkaloid nikotin. Jedná se o jednoletou kulturní rostlinu s krátkou

generační dobou pocházející z Jižní a Střední Ameriky, její semena byla do Evropy dovezena Jeanem Nicotem, francouzským vyslancem v Portugalsku v roce 1560.

*N. tabacum* je v rostlinné biologii důležitým modelovým organismem. Jedná se o allotetraploidní rostlinu (48 chromosomů) s velkým genomem ( $4,40 \times 10^9$  bp), jejímiž předky jsou diploidní *Nicotiana sylvestris* (24 chromosomů, donor mateřské části genomu) a diploidní *Nicotiana tomentosiformis* (24 chromosomů, donor otcovské části genomu) [1], [2], [3].

*N. tabacum* byla použita jako modelová rostlina v pilotních studiích zabývajících se charakterizací telomerových a subtelomerových struktur [4], [5], [6] a detekcí telomerázové aktivity u rostlin [7]. Tabák je první rostlinou, u které bylo identifikováno více sekvenčních variant genu *TERT* (telomerase reverse transcriptase) kódujícího proteinovou podjednotku telomerázy (podrobněji v kapitole 2.2.1) [8]. Tomuto tématu je věnována tato diplomová práce.



## 2 Struktura a udržování konců eukaryotických chromosomů

### 2.1 Telomery

Již v roce 1938 pozorovali Barbara McClintock u rostlin a Herman Muller u *Drosophila* odlišnost konců eukaryotických chromosomů od zbylého genomu. Tyto konce nazvané telomery brání spojování chromosomů a hrají tak podstatnou roli ve stabilitě a organizaci genomu.

Telomery jsou nukleoproteinové struktury organizované stejně jako většina genomové DNA do histonových oktamerů a tvořené dvouřetězcovou repetitivní sekvencí DNA s jednořetězcovým přesahem na 3' konci bohatým na guanin (tzv. G-overhang). Délka tohoto přesahu je druhově variabilní (od 16 do 200 nt) [9], [10]. Na udržení stability telomer se podílí celá řada proteinů, které se vážou přímo na telomerovou DNA nebo nepřímo pomocí protein-proteinových interakcí (Obr. 1).

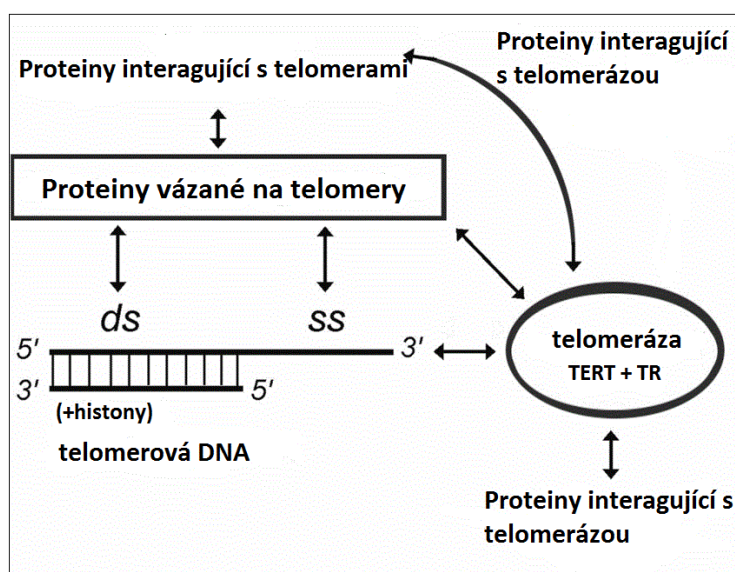
Sekvence telomerové DNA je napříč eukaryotickými organismy poměrně konzervována, nejvíce obvyklá je repetice (5'- T<sub>x</sub>A<sub>y</sub>G<sub>z</sub>-3')<sub>n</sub>. V malém genomu prvoka *Tetrahymena* byly odhaleny první telomerové repetice (5'- TTGGG-3')<sub>n</sub> [11], typickou rostlinnou repeticí je repetice *A. thaliana* (5'- TTTAGGG-3')<sub>n</sub> [12] a savčí (tedy i lidskou) telomeru tvoří motiv (5'- TTAGGG-3')<sub>n</sub> [13]. U některých druhů hmyzu, pavouků a rostlin z čeledi česnekovitých (*Alliaceae*) však nejsou sekvence telomer doposud známy.

Délka telomer je druhově i mezidruhově variabilní, například u *A. thaliana* je v závislosti na konkrétním ekotypu zhruba 2 - 10 kb [14], oproti tomu *N. tabacum* je rostlinou s dlouhými a délkově heterogenními telomery 20 - 150 kb [5]. Telomerové sekvence jsou u většiny organismů včetně *A. thaliana* a lidí lokalizovány také uvnitř chromozómů, jedná se o tzv. intersticiální telomerové repetice (ITR) [15].

Jednou z funkcí telomer je ochrana přirozených konců eukaryotických chromosomů, ty by mohly být buňkou identifikovány jako dvouřetězcové zlomy DNA a byly by tak na ně uplatňovány reparační mechanismy. To by vedlo ke spojování chromosomů a k destabilizaci genomu. Proto telomery tvoří specifické struktury jako G-kvadruplexy nebo T a D-smyčku [16], [17] které brání buněčným reparačním systémům (např. homologní rekombinaci či nehomolognímu spojování volných konců) v jejich uplatnění.

U krytosemenných rostlin jako jsou *A. thaliana*, *Silene vulgaris* a *Zea mays* byly pozorovány tupě zakončené telomery (tzv. blunt-ended), které se v případě *A. thaliana* vyskytují až v polovině případů. Pro stabilitu takových telomer je nepostradatelný heterodimer Ku70/80 [18].

Existence telomer také řeší případnou ztrátu genetické informace v důsledku neúplné replikace konců lineárních eukaryotických chromosomů, která je způsobena neschopností replikačního systému dosyntetizovat sekvenci opožďujícího se řetězce DNA [19], [20] (prokaryota řeší tento problém cirkulárním chromosomem). Při dělení buňky tedy dochází ke zkracování telomer, nikoliv ke ztrátě důležitých kódujících úseků. Zkracování telomer je však limitováno a po dosažení kritické minimální délky buňka zaniká programovanou buněčnou smrtí, tzv. apoptózou, shrnuto v [21]. Maximální počet dělení somatických buněk (mitóz) u živočichů je dán tzv. Hayflickovým limitem [22], [23]. Situace u rostlin je složitější, viz kapitola 2.2.



**Obr. 1:** Konce eukaryotických chromosomů jsou tvořeny dsDNA (double-stranded DNA; dvouřetězcová DNA) a ssDNA (single-stranded DNA; jednořetězcová DNA). Jsou rozpoznávány specifickými proteiny, ty se váží buď přímo na DNA, nebo je jejich vazba zprostředkována vazbou na jiné proteiny. Tento komplex je u živočišných buněk nazýván shelterin a podílí se na udržování telomer [24]. Telomeráza provádí prodloužení telomer, jako primer pro prodloužení slouží 3'G-přesah [25], TR (telomerázová RNA), viz kapitola 2.2. Upraveno podle [24].

### 2.1.1 Telomerové transkripty

Objevení telomerových transkriptů TERRA (telomeric repeat-containing RNA), dlouhých nekódujících molekul RNA, vyvrátilo domněnku, že repetice telomer jsou

transkripčně neaktivní, jak by vyplývalo z jejich heterochromatinového charakteru. Transkripce TERRA je zprostředkována RNA polymerázou II a je u živočichů iniciována ze subtelomerových oblastí. Délka transkriptů je variabilní, 100 – 9000 nukleotidů u živočichů, ~380 nukleotidů u kvasinek [26], na 5' konci se může vyskytovat 7-methylguanosa (m<sup>7</sup>G) a 3' konec může být polyadenylován [27], [28].

Hladina TERRA transkriptů je regulována během buněčného cyklu, tato nekódující RNA je zapojena do procesu udržování telomer a jejich funkce. Tento mechanismus však nebyl doposud objasněn, jedna ze studií u kvasinek deklaruje, že se pravděpodobně jedná o negativní regulaci (teoreticky je nekódující RNA komplementární s TR a mohla by tak inhibovat její funkci [27]). Avšak jiná kvasinková studie toto tvrzení zpochybňuje, v té bylo ukázáno, že telomerové transkripty vznikají přednostně z krátkých telomer a podílejí se na „navádění“ telomerázy právě k těmto telomerům [29].

U *A. thaliana* probíhá transkripce z obou telomerových vláken DNA, kromě transkriptů TERRA tak byly detekovány i transkripty ARRET (TERRA antisense transcripts) [30]. Přítomnost obou vláken telomerových transkriptů umožňuje vznik dvouvláknové RNA a její štěpení na krátké molekuly RNA, které se účastní methylace telomerových cytosinů procesem RNA řízené methylace DNA, RdDM (RNA-directed DNA methylation). Telomerové transkripty prepisované z obou vláken DNA byly detekovány i u dalších rostlinných modelů - *N. tabacum* a *Ballantinia antipoda* [31].

## 2.2 Telomeráza

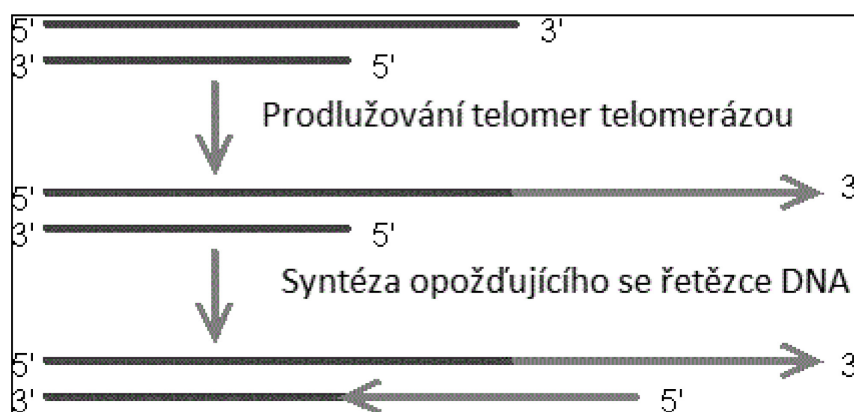
Telomeráza je enzym zodpovědný za prodlužování telomer (Obr. 2). Exprese a aktivita telomerázy je striktně regulována během života rostlin i živočichů. Obecně platí, že vysoká aktivita telomerázy je pozorována v tkáních/pletivech s vysokou proliferační kapacitou [32] (podrobněji v kapitole 2.2.2.).

U rostlin je sice telomeráza aktivní jen v určitých pletivech, přesto je délka telomer stabilní během celého života. V mutantních rostlinách *A. thaliana* s nefunkčním genem *TERT* (*AtTERT*) došlo ke zkrácení telomer u každé generace o 250 – 500 bp [33], cytologické a chromozomální změny se objevily až v osmé generaci a tyto mutantní rostliny byli viabilní do desáté generace [34], [35]. Do prodlužování telomer u rostlin je mimo telomerázy zapojen i proces alternativního prodlužování telomer ALT (alternative

telomere lengthening) [36], [37] který zahrnuje homologní rekombinaci a replikaci DNA.

Telomeráza také přidává *de novo* repetice na netelomerové úseky chromosomů, které byly poškozeny, a tím se podílí na jejich opravách. Byly také popsány „netelomerové“ funkce telomerázy jako jsou regulace buněčného cyklu, inhibice apoptózy, proliferace a diferenciaci buněk a ochrana mitochondriální DNA před oxidačním stresem [38], [39], [40].

Telomeráza je enzymový komplex, který nese vlastní telomerázovou RNA (TR), která slouží jako matrice pro prodlužování telomer. Samotné prodlužování podle TR provádí proteinová podjednotka TERT s aktivitou RNA dependentní DNA polymerázy, reverzní transkriptázy [41].



**Obr. 2:** Telomeráza nasedá na 3' konec telomerového G-přesahu a provádí syntézu telomer podle TR. Opožděující se vlákno DNA je syntetizováno pomocí Okazakiho fragmentů (upraveno podle [42]).

### 2.2.1 TERT

Proteinová podjednotka telomerázy je složena z N-koncové části, reverzně transkriptázového úseku (RT) a z C-koncové části (CTE, C-terminal extension).

Telomerázové motivy T2, CP, QFP a T jsou důležité pro navázání TR, tyto oblasti jsou lokalizovány na N-konci proteinu a kódovány v sekvenci mezi 2. - 9. exonem (Obr 3 a 4). Proteinové oblasti TERT 1, 2 a A-E jsou nezbytné pro reverzně transkriptázovou aktivitu telomerázy, jsou kódovány v oblasti mezi 9. - 10. exonem (Obr 3 a 4).

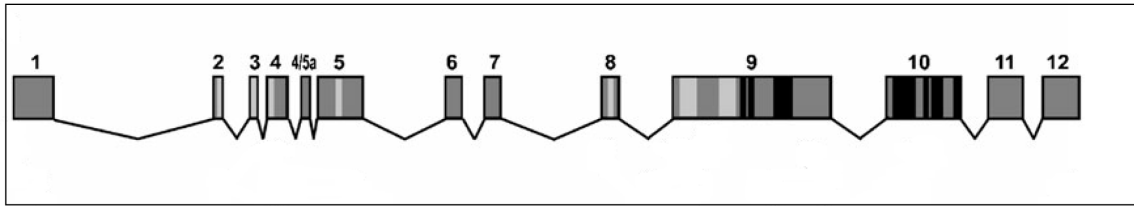
Alternativní sestřih genu *TERT* byl pozorován u všech doposud studovaných organismů, jednotlivé sestřihové varianty mohou vykazovat ztrátu katalytické funkce,

nebo naopak získání funkce nové, mohou tak být zapojeny do regulace transkripce genu *TERT* v jednotlivých tkáních i regulace aktivity telomerázy [24]. Ve srovnání s živočichy je alternativní sestřih genů u rostlin méně obvyklý a v alternativních transkriptech bývají častěji zachovány introny (forma sestřihu „intron retention“, zadržení intronu).

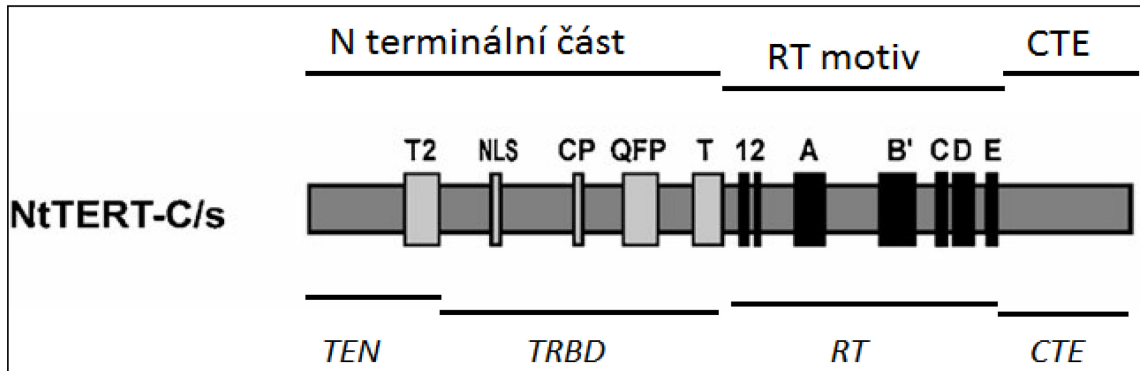
U tetraploidního *N. tabacum* byly identifikovány tři různé sekvence kódující *TERT*. Dvě z těchto variant – varianty *NtTERT-C/s* (předpokládaná funkční kódující varianta; coding putative functional variant) a *NtTERT-D* (předpokládaný pseudogen; putative pseudogene variant) vykazují sekvenční podobnost se dvěma variantami *TERT* charakterizovanými u *N. sylvestris*. Třetí varianta *NtTERT-C/t* je svou sekvencí podobná variantě *TERT* v rostlině *N. tomentosiformis* [8]. Obdobnou situaci jako u *N. tabacum* lze očekávat i u dalších rostlin z čeledi *Solanaceae* (Sýkorová E., nepublikované výsledky).

Varianty genu *TERT-C* jsou plnodélkovými sekvenčními variantami, zatímco varianta *TERT-D* vykazuje delece a inserce v exonech na 5' konci, což vede ke změnám v čtecím rámci a k výskytu předčasného STOP kodonu. Je tedy možné, že tento pseudogen je zapojen do regulace genové exprese pomocí siRNA interference [8]. U polyploidního tabáku by tedy existoval doposud nepopsaný způsob regulace genu *TERT*.

Analýza uspořádání genu *NtTERT* odhalila přítomnost repetitivních motivů uvnitř exonu 5 a nového exonu 4/5a v *TEN* oblasti, pravděpodobně se jedná o znak typický pro rostliny z čeledi *Solanaceae*. Tento exon je dlouhý 64 bp a okolní introny jsou dlouhé 148 a 89 bp, stejné uspořádání lze pozorovat i u *N. sylvestris* a *N. tomentosiformis*. Kvůli nízké podobnosti proteinové sekvence typické pro tento úsek *TERT*, však není možné určit evoluční původ exonu 4/5a. Duplikace uvnitř 5. exonu je dlouhá 63 bp a v proteinové sekvenci vede k repetici 21 aminokyselin. Tato aminokyselinová sekvence však není přítomna u *N. tomentosiformis*. U *N. sylvestris* byla v 5. exonu identifikována jiná duplikace dlouhá 93 bp, ale překvapivě tato duplikace nebyla přítomna v RT-PCR produktu, což naznačuje možný sestřih genu *TERT* [8].



**Obr. 3:** Pro rostliny evolučně ustálené uspořádání 12 exonů v sekvenci genu *NtTERT*. Pro rostlinnou sekvenci genu *TERT* jsou typické dlouhé exony na 3' konci a poměrně krátké exony na 5' konci. Převzato z [8].



**Obr. 4:** Uspořádání proteinové podjednotky NtTERT-C/s. N terminální část je složena ze dvou domén, TEN a TRBD. Doména TEN (telomerase N-terminal) zprostředkovává vazbu telomerázy na telomery. Doména TRBD (telomere-RNA binding domain) váže TR. RT motiv je zodpovědný za reverzně transkripční aktivitu. Význam domény CTE není doposud zcela objasněn, pravděpodobně se stejně jako doména TEN podílí na vazbě telomerázy na DNA. Upraveno podle [8].

## 2.2.2 Regulace telomerázy

*TERT* a *TR* jsou u většiny organismů jednokopiovými geny. Ale například *A. thaliana* má 2 geny pro *TR*. *TR1* je templátem pro prodlužování telomer a *TR2* negativním regulátorem telomerázové aktivity [43]. Prvek *Euplotes crassus* nese sekvenci tří různých genů *TERT* [44] a jak již bylo řečeno v úvodu, *N. tabacum* je rostlinným zástupcem, u kterého bylo také identifikováno více sekvenčních variant tohoto genu [8]. Bylo dále prokázáno, že v rakovinných buňkách se tyto geny vyskytují ve více kopiích a až u 90 % těchto buněk dochází k reaktivaci procesu prodlužování telomer telomerázou [45], [46]. „Genová dávka“ hraje tedy důležitou roli při regulaci telomerázy.

Regulace telomerázy představuje komplexní systém genetických a epigenetických faktorů odehrávající se na mnoha úrovních. Zatímco transkripce *TR* je téměř konstantní, gen kódující proteinovou podjednotku *TERT* je vývojově regulovaným genem a jeho transkripce odráží aktivitu telomerázy v jednotlivých

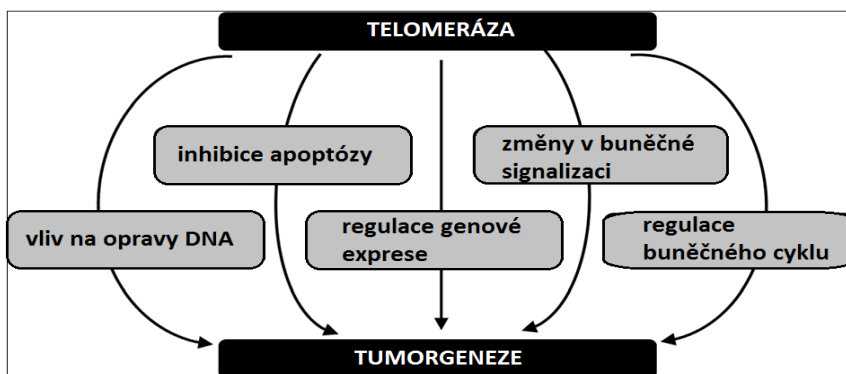
pletivech a tkáních. U rostlin je vysoká aktivita v orgánech obsahujících hojně se dělící buňky (semenáčky, kořenové špičky, pupeny) a v buněčných kulturách, zatímco v terminálně diferencovaných pletivech (listy, stonky) je aktivita telomerázy velice nízká [7], [47], [48].

Transkripce *hTERT* (lidský *TERT*) je regulována například onkogeny a antionkogeny, p53 je pravděpodobně negativním regulátorem exprese *hTERT*, většina rakovinných buněk trpí jeho deficiencí [49], [50]. Dále je transkripce *hTERT* ovlivněna transkripční faktory, např. Sp1 [51]. Bylo potvrzeno, že Sp1 a HIF-1 jsou aktivátory transkripce lidské TR a Sp3 je represorem transkripce [52].

Postranslační regulace telomerázy je podpořena pozorováním, že mRNA vzniklá přepsáním genu *TERT* ne vždy odpovídá aktivitě telomerázy [53] a že všechny buňky s aktivní transkripcí tohoto genu nejsou schopné prodlužovat telomery [54]. Poločas života lidské telomerázy je zhruba 24 hodin, zatímco TR 5 dnů. To potvrzuje, že stabilita *TERT* přispívá k regulaci telomerázy [55], [56]. Klíčovým procesem postranslační regulace je pak fosforylace, předpokládaná fosforylační místa byla identifikována v sekvenci *TERT* u rostlin i živočichů [57], [58]. Významnou roli také hraje ubiquitinace, která vede ke snížení telomerázové aktivity a zkrácení telomer [59].

Nesprávná funkce telomerázy je u lidí korelována s výskytem závažných klinických stavů. Vzácná onemocnění dyskeratosis congenita a idiopatická plicní fibróza souvisí se špatnou funkcí telomerázy [60], [61]. Tento enzymový komplex hraje také roli při vzniku rakoviny (Obr. 5). Reaktivace telomerázy je způsobena selháním kontrolních faktorů, které inhibují její aktivitu v buňkách, to vede k „nesmrtelnosti“ rakovinných buněk na molekulární úrovni a ty se tak mohou nekontrolovaně dělit. Přestože se zdá, že aktivní telomeráza není příčinou, ale spíše důsledkem transformace lidských buněk, je nadějným cílem protinádorových terapií.

Opětovná reaktivace telomerázy u rostlin je zcela běžná a souvisí s přirozenou totipotencí rostlinných buněk.



**Obr. 5:** Schematické znázornění funkcí telomerázy a její možné zapojení při vzniku nádoru. Upraveno podle [62].

### 2.2.3 Hormonální regulace telomerázy

Bezesporu významnou roli v životě organismu hrají hormony, vedle celé řady funkcí jsou zapojeny i do regulace telomerázy.

Bylo zjištěno, že promotor *hTERT* obsahuje ve své sekvenci vazebná místa pro mnohé transkripční faktory zahrnující také tzv. estrogenové receptory, skupinu proteinů aktivovanou estrogenem. Vystavení organismu estrogenu vyústilo ve vyšší transkripci *hTERT*, a to přímým navázáním estrogenových receptorů na příslušné úseky v promotoru *hTERT* [63]. Estrogen zprostředkovává také fosforylaci *hTERT* [64].

V tabákových suspenzních kulturách (TB2-Y, tobacco bright yellow-2 cells) byl v S fázi buněčného cyklu pozorován nárůst telomerázové aktivity indukovaný auxinem (fytohormon podporující prodlužování buněk, podílí se na fototropických a gravitropických reakcích) [65], tento nárůst souvisí s fosforylací *TERT* a může být inhibován protein-kinasovými inhibitory [66]. Telomerázový aktivátor TAC1 (telomerase activator 1) je transkripčním faktorem u *A. thaliana* a je zapojen do auxinem zprostředkovaného nárůstu telomerázové aktivity [67], [68].

Oproti tomu cytokinin (fytohormon, který podporuje aktivní růst a diferenciaci) neměl žádný vliv na aktivitu telomerázy během buněčného cyklu v TB2-Y [65]. Expze telomerázy byla během buněčného cyklu účinně inhibována kyselinou abscisovou (ABA, abscise acid, fytohormon inhibující růst). Avšak ABA neinhibovala telomerázovou aktivitu *in vitro* [66].



### 3 Epigenetické modifikace

Jak již bylo řečeno v úvodu, epigenetické modifikace jsou zapojeny do celé řady důležitých biologických procesů. Jejich role ve vývoji organismu je nepostradatelná, významně se podílí na aktivaci nebo umlčování genové exprese, protože během různých stádií vývoje a v jednotlivých orgánech je nutné exprimovat odlišné geny a blokovat geny, které se exprimovat nemají. Byla také prokázána vzájemná provázanost epigenetických modifikací, například histonové modifikace mají vliv na ustanovení a udržování methylačního obrazu DNA.

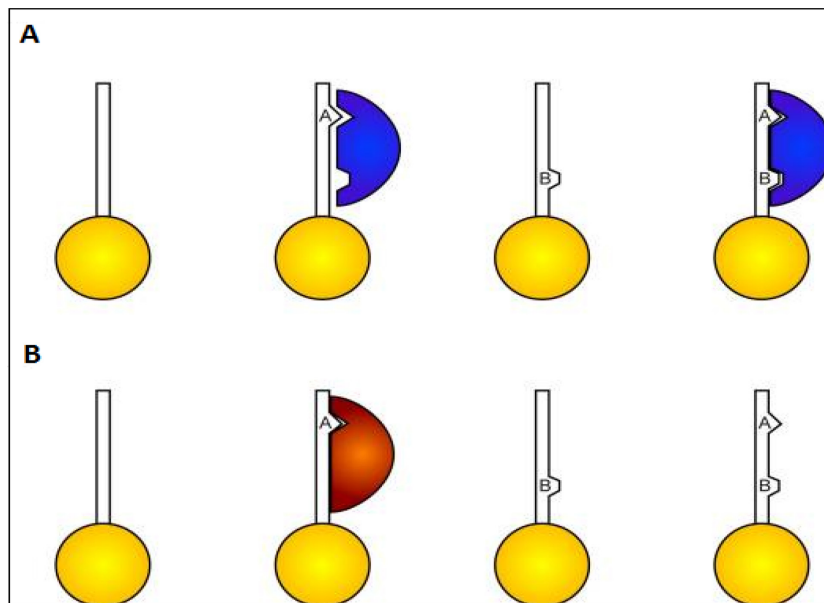
#### 3.1 Histonový kód

Histonový kód je souhrnné označení pro kovalentní posttranslační modifikace aminokyselinových zbytků histonových proteinů. Bylo identifikováno více než 100 typů těchto značek, mezi nejčastější patří acetylace, methylace a ubiquitinace lyzinu, methylace argininu nebo fosforylace serinu.

Metafora „kódu“ je založena na pozorování, že histonové modifikace musí být „čteny“ komplexně, protože jejich různé kombinace plní odlišné funkce [69] (Obr. 6), a že tento vazebný vzor může být předáván při meióze i mitóze [70]. Jak již bylo řečeno v úvodu, epigenetické modifikace ovlivňují vlastnosti chromatinu v daném lokusu a tím zpřístupňují nebo naopak zamezují navázání transkripčních faktorů a jiných regulačních proteinů (Obr. 6).

Velmi obecně lze rozdělit histonové modifikace na euchromatické a heterochromatické, jejich funkce je napříč rostlinami i živočichy poměrně konzervována, nicméně konkrétní modifikace určující strukturu chromatinu se mezi organismy liší.

Ke studiu tohoto typu modifikací se používá Edmanovo mikrosekvenování, hmotnostní spektrometrie (MS) nebo chromatin imuno-precipitace (ChIP). Metody MS a ChIP umožňují kvalitativní i kvantitativní analýzu.



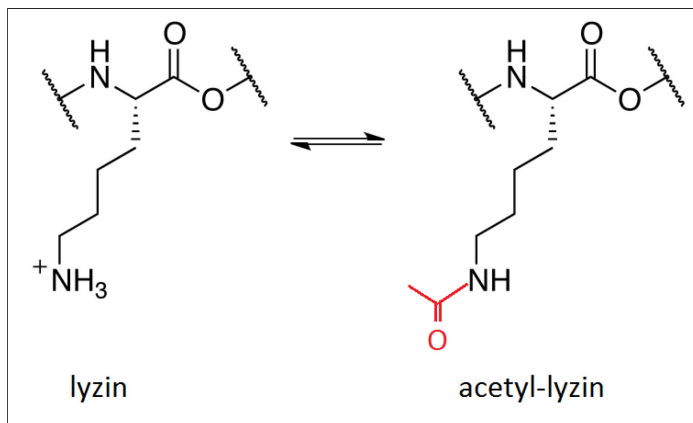
**Obr. 6:** Regulační proteiny obvykle obsahují vazebnou doménu, která se specificky váže na konkrétní kombinaci kovalentních modifikací aminokyselinových zbytků. V případě **A**: Některé proteiny vykazují vyšší vazebnou afinitu k dvojitě značeným úsekům, než k osamoceným značkám.

V případě **B**: Přítomnost druhé modifikace zamezí navázání regulačního proteinu na modifikovaný úsek histonu. Upraveno podle [71].

### 3.1.1 Acetylace histonů

Acetylace je jednou z nejstudovanějších posttranslačních modifikací histonů (Obr. 7), je regulována pomocí histonových acetyltransferáz a deacetyláz. Existují 2 základní typy histonových acetyltransferáz: typ A zodpovědný za acetylaci histonů je přímo zapojen do remodelace chromatinu a regulace genové transkripce [72]; typ B je cytoplazmatickým proteinem, který katalyzuje acetylaci histonů v cytoplazmě, tato acetylace předchází inkorporaci histonů do nově replikované DNA [73].

Důsledkem acetylace lyzinu je neutralizace jeho kladného náboje a oslabení interakce s DNA v daném úseku. To vede k rozvolnění struktury chromatinu a jeho vyšší přístupnosti např. pro navázání transkripčních faktorů. Acetylace tedy působí jako transkripční aktivátor a deacetylace je zapojena do genového umlčování.



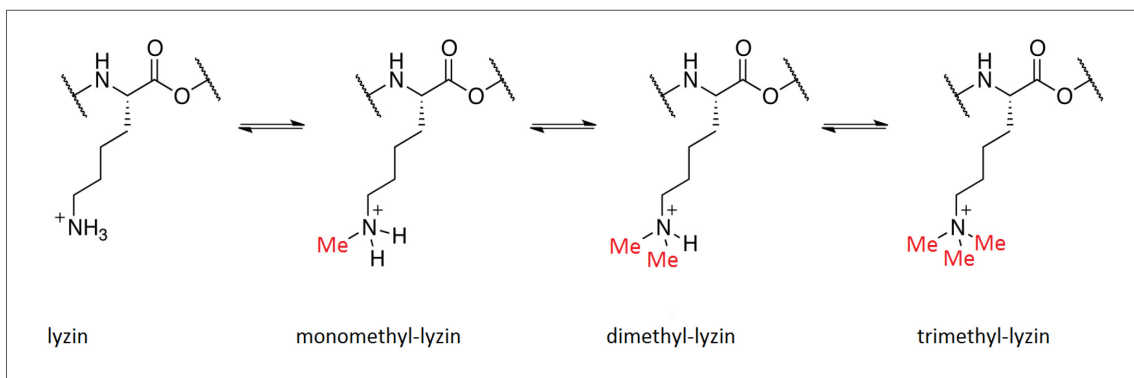
**Obr. 7:** Posttranslační acetylace lyzinu, upraveno podle [74].

### 3.1.2 Methylace histonů

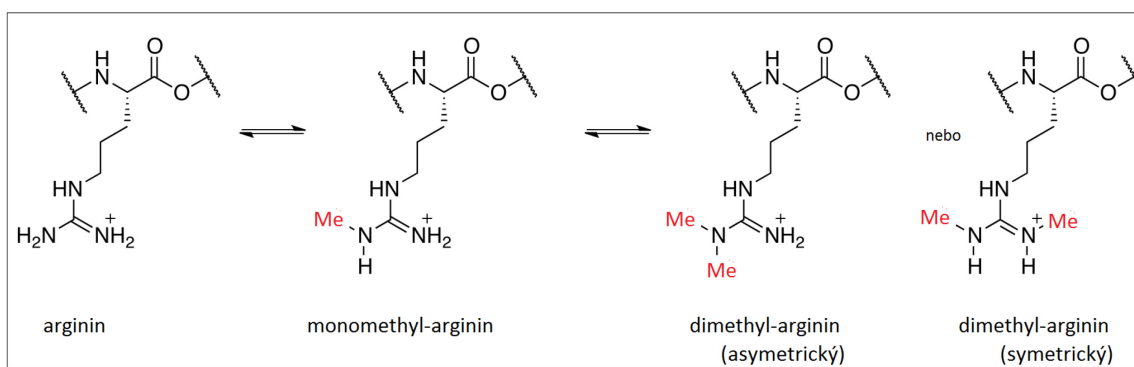
Ve srovnání s acylací histonů je methylace stabilnější postranslační modifikace (shrnutí v [75]). Na udržování této epigenetické modifikace se podílí histonové methyltransferázy a demethylázy. Nejčastěji methylované jsou histony H3 a H4.

Vedle lyzinu (Obr. 8) může být methylován i arginin (Obr. 9). Vliv této značky na genovou transkripci není ve srovnání s acylací tak jednoznačný. U *A. thaliana* jsou monometylované lyziny asociovány především s heterochromatinem a trimetylované s euchromatinem (shrnutí v [76]). Oproti tomu trimetylované lyziny v genomu myši se vyskytují především v heterochromatinu, výjimkou je H3K27 (histon 3, lyzin 27), shrnutí v tabulce 1, 2 a 3. Methylované H3K4 (histon 3, lyzin 4) a H3K36 (histon 3, lyzin 36) jsou obvykle považovány za aktivátory transkripce, oproti tomu H3K27 je modifikací typickou pro vývojově umlčené geny a stejně jako H4R3 (histon 4, arginin 3) způsobují spíše heterochromatický charakter daného úseku.

Funkčně specifický význam methylovaných lyzinů je pozorován i pro konkrétní oblasti DNA. Například H3K9me3 (histon 3, trimetylovaný lyzin 9) a H3K36me3 (histon 3, trimetylovaný lyzin 36) způsobují u živočichů potlačení transkripce, pokud se vyskytují v promotorech, ale aktivaci transkripce když se nacházejí v samotném genu (shrnutí v [77], [78], [79]), H3K9me3 má navíc vliv na ustanovení methylace DNA, stejně jako H3K4me1 (histon 3, monometylovaný lyzin 9) [80]. Byl také prokázána souvislost mezi posttranskripčním sestřihem RNA a histonovými modifikacemi. Modifikace H3K36me3 se u *Cernohabditis elegans*, myši a člověka vyskytuje častěji v exonech než v intronech [81] a komplexní proces sestřihu RNA tak může být kontrolován i stavem chromatinu v daném lokusu [82].



**Obr. 8:** Posttranslační modifikace lyzinu, na lyzin mohou být navázány až 3 CH<sub>3</sub>- skupiny, upraveno podle [74].



**Obr. 9:** Posttranslační modifikace argininu, na arginin mohou být navázány maximálně 2 CH<sub>3</sub>-skupiny. V případě dimethyl-argininu rozlišujeme modifikaci symetrickou a asymetrickou, upraveno podle [74].

		<u>H3K9</u>		
		mono	di	tri
<i>Arabidopsis</i>	heterochromatin	vysoká	vysoká	nízká
	euchromatin	nízká	nízká	vysoká
myš	heterochromatin	nízká	nízká	vysoká
	euchromatin	vysoká	vysoká	nízká

**Tabulka 1:** Porovnání hladiny výskytu monometylovaného, dimetylovaného a trimetylovaného lyzinu 9 v histonu 3 (H3K9) v genomu *A. thaliana* a myši (upraveno podle [76]).

---

		<u>H3K27</u>		
		mono	di	tri
<i>Arabidopsis</i>	heterochromatin	vysoká	vysoká	nízká
	euchromatin	nízká	nízká	vysoká
myš	heterochromatin	vysoká	střední	nízká
	euchromatin	střední	vysoká	vysoká

---

**Tabulka 2:** Porovnání hladiny výskytu monometylovaného, dimetylovaného a trimetylovaného lyzinu 27 v histonu 3 (H3K27) v genomu *A. thaliana* a myši (upraveno podle [76]).

---

		<u>H4K20</u>		
		mono	di	tri
<i>Arabidopsis</i>	heterochromatin	vysoká	nízká	nízká
	euchromatin	nízká	vysoká	vysoká
myš	heterochromatin	nízká	nízká	vysoká
	euchromatin	vysoká	vysoká	nízká

---

**Tabulka 3:** Porovnání hladiny výskytu monometylovaného, dimetylovaného a trimetylovaného lyzinu 20 v histonu 4 (H4K20) v genomu *A. thaliana* a myši (upraveno podle [76]).

### 3.1.3 Ubiquitinace a biotinylace histonů

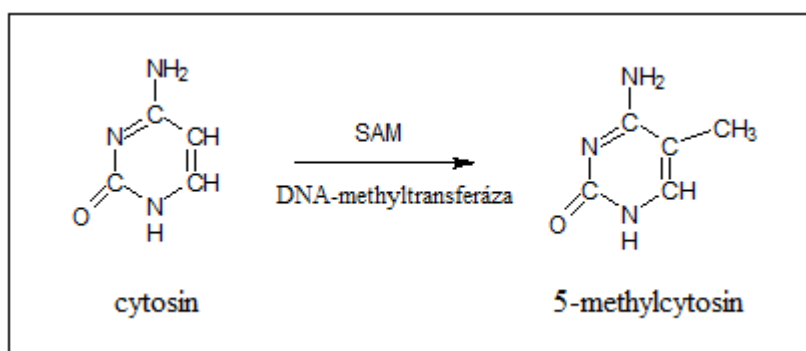
Ubiquitinace histonů je kritická pro správný průběh mitózy a meiózy, nebyl ale prokázán její přímý vliv na transkripci [83].

Biotinylace histonů je realizována dvěma typy enzymů, jedním je biotináza, která využívá biocytin jako substrát, tím druhým je holokarboxysyntetáza využívající pro biotinylace histonů biotin a ATP. Lyziny 4, 9, 18 v histonu H3 a lyziny 8 a 12 v histonu H4 byly identifikovány jako místa biotinylace [84].

## 3.2 Methylace DNA

Methylace cytosinu v pozici 5 pyrimidinového kruhu (Obr. 10) je častou modifikací eukaryotických genomů. Methylované cytosiny se mohou vyskytovat v několika sekvenčních motivech a především v symetrických sekvencích se jedná o velice stabilní modifikaci (viz dále). Stejně jako jiné epigenetické modifikace je i methylace DNA zahrnuta do regulace genové exprese, u rostlin je tato modifikace zapojena např. do iniciace kvetení, tzv. vernalizace, má také vliv na rozdílnou expresi mateřské a otcovské alely, jedná se o tzv. genový imprinting. Mimo jiné se methylace DNA podílí i na ochraně před transpozabilními elementy, úseky DNA které mají schopnost cestovat po genomu a tím způsobovat mutace nebo nestabilitu chromozomů. Tyto elementy proto musí být silně methylovány, čímž se inhibuje jejich aktivita.

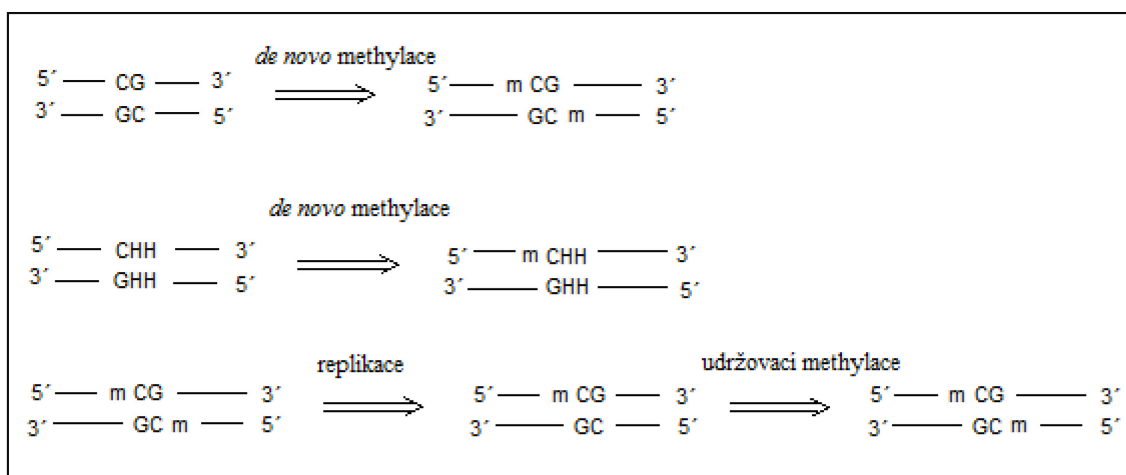
U prokaryot můžeme vedle methylovaného cytosinu najít i methylovaný adenin, takto modifikované dusíkaté báze jsou součástí obranného modifikačně restrikčního systému, který chrání prokaryotický genom před atakem cizorodé DNA.



**Obr. 10:** Methylace cytosinu. SAM = S-adenosylmethionin, převzato z [85].

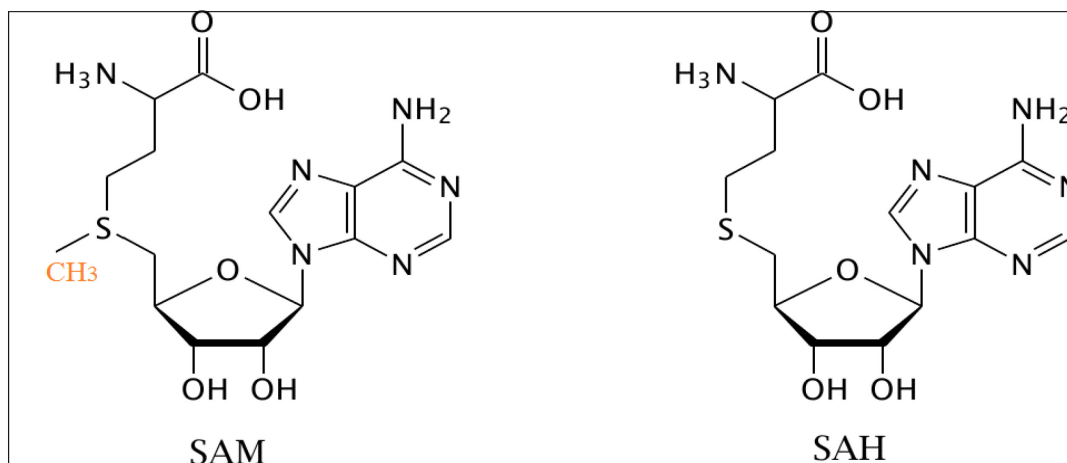
U rostlin mohou být methylované cytosiny lokalizované v symetrických i asymetrických sekvencích, a to ve všech třech sekvenčních motivech. Jsou rozlišovány symetrické sekvence: CG a CHG a asymetrické sekvence CHH (kde H je jakákoliv báze mimo guaninu) [86]. U živočišných buněk jsou methylované cytosiny lokalizované především v symetrických dubletových motivech CG, ve specifických fázích vývoje organismu byla identifikována i relevantní hladina asymetricky methylovaných cytosinů [87]. Úroveň methylace DNA je unikátní pro každý organismus a jak je zmíněno výše, vysoká hladina methylace DNA je častá u transpozonů a repetitivních sekvencí [88], oproti tomu obvykle nízkou methylaci DNA vykazují promotory aktivních genů.

Sekvenční motiv, ve kterém se methylovaný cytosin vyskytuje, hraje zásadní roli při udržování methylačního obrazu (Obr. 11). Methylace cytosinu je postreplikativní modifikací, po replikaci DNA je methylace udržována v symetrických sekvencích, kdy mateřské vlákno si methylované cytosiny uchovává a v nově syntetizovaném dceřiném vlákne dochází k lokalizaci symetrických cytosinů a jejich následné methylaci. V případě nesymetrických sekvencí nebo symetrických sekvencí, které původně methylované nebyly, jsou cytosiny methylovány *de novo* mechanismy.



**Obr. 11:** Ustanovení methylace v symetrických (CG a CHG) a asymetrických sekvencích (CHH) udržovacími mechanismy a *de novo* mechanismy, převzato z [85].

Mechanismus methylace cytosinu objasňuje transmethylační reakce, při které je donor methylové skupiny SAM konvertován na S-adenosylhomocystein (SAH) (Obr. 12). SAH je díky vyšší afinitě vhodnějším substrátem pro methyltransferázy, enzymy katalyzující transmethylační reakce, než SAM. Většina těchto enzymů je inhibována právě vzrůstající koncentrací SAH uvnitř buňky [89]. Jako indikátor methylačního potenciálu je označován poměr SAH a SAM v buňkách.



**Obr. 12:** Vzorce SAM a SAH, upraveno podle [90].

U rostlin byly charakterizovány tři DNA methyltransferázy: DNA METHYLTRANSFERASE1 (MET1), CHROMOMETHYLASE3 (CMT3), DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE2 (DRM2). Enzym MET1 je zodpovědný především za udržování methylace v sekvenčním kontextu CG. CMT3 je pro rostliny specifická methyltransferáza, která udržuje methylaci v sekvencích CHG. DRM2 je zodpovědná za *de novo* methylaci DNA ve všech sekvenčních motivech. Aktivita tohoto enzymu může být regulována dráhou RdDM (RNA-directed DNA methylation) a hraje významnou roli při methylaci sekvence CHH, která v důsledku absence symetrie nemůže být udržována klasickými udržovacími mechanismy.

Při studiu methylace DNA se užívají látky, inhibující aktivitu transmethylačních drah [91]. Jedná se například o analogy cytosinu, jako je zebularin nebo 5-aza-deoxycytosin, v tomto případě je methyltransferáza inhibována kovalentní vazbou, která znemožní její další aktivitu [92]. Dalším inhibítorem je 9-(S)-(2,3-dihydroxypropyl)-adenin (DHPA), který inhibuje S-adenosylhomocystein hydrolázu, tím narůstá buněčná koncentrace SAH a daná methyltransferáza je inhibována kompetitivně [93].

### 3.3 Epigenetický stav telomerázy

Byl studován epigenetický stav promotoru *hTERT*, ten je u telomeráza negativních somatických buněk lokalizován v oblasti vysoce kondenzovaného chromatinu a je asociován s hypoacetylovanými histony [94], [95]. Použití trichostatinu A (inhibitor deacetyláz) vyvolalo u telomeráza negativních buněk zvýšení transkripce *hTERT*. Bylo prokázáno, že jak modifikace histonů, tak methylace DNA se podílí na regulaci *hTERT*



[96]. Není ale zcela jasné, zda methylace DNA a histonů přispívá k negativní nebo pozitivní expresi *hTERT* v rakovinných buňkách.

Analýza epigenetického stavu regulační oblasti předpokládaného promotoru genu *AtTERT* u *A. thaliana* ukázala nízkou hladinu methylovaných cytosinů bez výrazných rozdílů mezi telomeráza pozitivním pletivem (semenáčky) a telomeráza negativním pletivem (maturované listy). Překvapivě byla ale pozorována relativně vysoká hladina methylace DNA v sekvenčním motivu CG v kódující oblasti genu (v 5. exonu), která je charakteristická pro konstitutivně exprimované geny, kterým vývojově striktně regulovaná telomeráza zcela jistě není. Analýza struktury chromatinu regulační oblasti genu *AtTERT* a 5. exonu ukázala jistý nárůst represivní modifikace H3K27me3 v pletivu s umlčenou telomerázou. Oproti tomu hladina H3K4me3, H3K9ac a H3K9me2 byla v semenáčcích i listech srovnatelná. Byla detekována vysoká hladina histonových modifikací H3K4me3 a H3K9ac a velice nízká hladina heterochromatinové značky H3K9me2, což ukazuje na euchromatinový charakter chromatinu proteinové podjednotky telomerázy v pletivech s aktivní i neaktivní telomerázou. Ve srovnání s živočišnými buňkami je tedy vliv epigenetických modifikací na vývojovou regulaci telomerázy v modelové rostlině *A. thaliana* výrazně nižší [97].

## 4 Cíl diplomové práce

Teoretická část diplomové práce se věnuje problematice telomer, konců lineárních chromosomů eukaryotických organismů, funkci telomer v ochraně genetické informace a jejich udržování pomocí telomerázy. Podstatná část je věnována regulaci genové exprese pomocí epigenetických mechanismů a jejich vlivu na regulaci enzymového komplexu telomerázy.

V praktické části bylo studováno zastoupení transkriptů sekvenčních variant genu *TERT* v rostlinách *N. tabacum*, *N. sylvestris* a *N. tomentosiformis*, byla analyzována hladina transkripce sekvenčních variant v rostlinných pletivech s odlišnou telomerázovou aktivitou. Pro funkční studii transkripce těchto variant klíčily rostliny *N. tabacum* v přítomnosti rostlinných hormonů. Metodou chromatin imunoprecipitace byly studovány histonové modifikace v regulační oblasti genu *TERT* a pomocí bisulfitové konverze methylace DNA.

Pro splnění cílů experimentální části práce bylo třeba napěstovat rostlinný materiál, navrhnout primery pro kvantitativní PCR a zoptimalizovat reakce pro specifickou amplifikaci variant genu *TERT*. Analýza zastoupení sekvenčních variant v genomech studovaných rostlin a analýzy transkripce byly provedeny kvantitativní PCR a RT-PCR. Studium histonových modifikací vyžadovalo izolaci chromatinu, jeho následnou sonikaci a precipitaci s danou protilátkou, vzorky byly dále analyzovány klasickou PCR. Pro analýzu methylace DNA byly navrženy degenerované primery, které byly testovány na DNA konvertované bisulfitem.

Výsledky získané v rámci této diplomové práce jsou součástí výzkumu epigenetických regulací rostlinných telomer a telomeráz v Laboratoři Molekulárních komplexů chromatinu, CEITEC MU.

## 5 Materiál a metody

### 5.1 Rostlinný materiál

Byly použity rostliny *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana sylvestris* a *Nicotiana tomentosiformis*.

Laboratoři Dr. Davida Honyse, CSc. (Ústav experimentální botaniky AV ČR, Praha) byly laskavě poskytnuty vzorky pylu (pylová stádia a stádia pylových láček) *N. tabacum*. Kultivaci a charakterizaci pylových stádií a pylových láček shrnují publikace [98], [99].

Kalusy *N. tabacum* kultivovala Mgr. Pavla Polanská (Laboratoř molekulárních komplexů chromatinu).

### 5.2 Výsev semínek

Pro dodržení zásad sterilní práce je výsev semínek prováděn ve sterilním boxu Biohazard (Biohazard flowbox, TRIGON PLUS), který je stejně jako všechny potřebné nástroje (Petriho misky, nůžky, pipety,...) sterilizován UV zářením.

Tzv. živnou půdou je Muraschige&Skoog medium (MS médium, MO255.0050, pH 5,8, Duchefa Biochemie), které obsahuje veškeré látky potřebné pro správný růst rostlin. Toto médium je připraveno dle pokynů daných výrobcem, pro vyklíčení semínek rostlin rodu *Nicotiana* musí být přidána sacharóza (ve výsledné koncentraci 1%, Penta) a pro ztuhnutí agar (ve výsledné koncentraci 0,8%, Plant agar, Duchefa Biochemie). Takto připravené médium je nutné sterilizovat 30 minut v Papinově hrnci. Pokud mají semínka klíčit v prostředí hormonu, odměříme požadované množství MS média a přidáme k němu hormon do výsledné koncentrace: BAP 5 $\mu$ M (6-benzylaminopurin, Duchefa Biochemie), NAA 5 $\mu$ M (1-naftyloctová kyselina, Duchefa Biochemie) a 2,4D 5 $\mu$ M (2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina, Duchefa Biochemie). MS médium naléváme na Petriho misky (průměr 8,5 cm, objem zhruba 25 ml) a po jeho ztuhnutí můžeme semínka vyset.

Samotná semínka je nutné před vlastním výsevem sterilizovat, nejprve je opláchneme ve vodě s přidaným detergentem (TWEEN 80, o výsledné koncentraci 1%), následně jsou sterilizována 2x 2 min 90% savem (savo ředěné vodou s 1% TWEEN 80). Po sterilizaci semínka proplachujeme sterilní vodou, a to 3x 10 min. Takto připravená

semínka nanese na ztuhlé MS médium. Petriho misky oblepíme izolační páskou, abychom zajistili sterilitu a stálou vlhkost. Misky jsou uloženy do fytostronu, kde v podmínkách krátkého dne vyklíčí (8 hodin světlo, 21 °C, intenzita osvětlení 100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ ; 16 hodin tma, 19 °C).

Po 12 dnech semenáčky sklízíme a uchováváme při -80 °C, případně je přesadíme do hlíny a pěstujeme ve fytostronu v podmínkách dlouhého dne (16 hodin světlo, 8 hodin tma).

Rostlinný materiál sklízíme nůžkami a pinzetou do označených eppendorfků, případně alobalu. Materiál lze ihned použít k izolaci RNA a DNA, nebo jej můžeme dlouhodobě skladovat při -80 °C.

### 5.3 Izolace RNA, DNázování a reverzní transkripce

Izolace RNA z rostlinných pletiv provádíme pomocí komerčně dodávaných sad TriReagent (Molecular Research Center), RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) a NucleoSpin RNA Plant (Macherey-Nagel). Postupujeme podle protokolů dodaných výrobcem, rostlinný materiál může být čerstvý i zmražený.

Izolace pomocí TriReagentu je „robustnější“ metodou, proto byla použita pro izolaci RNA z pylu, pylových láček a starých listů; staré listy jsou plně maturovanou tkání a transkripční aktivita v nich obecně není vysoká, proto byla izolace provedena z dvojitě dávkou materiálu, než bylo množství doporučené výrobcem. Pyl a pylové láčky jsou materiálem, který je obtížně homogenizovatelný a obsahuje vysoké množství balastních proteinů. V těchto případech RNA získaná kolonkovou izolací pomocí RNeasy Plant Mini Kitu neměla dostatečnou kvalitu a koncentraci.

Koncentrace RNA byla zjištěna spektrofotometricky (Nano UV Spektrofotometr, Implemen) měřením absorbance při 260 nm, čistota byla odhadnuta z poměrů absorbancí 260 nm /280 nm a 260 nm /230 nm, které by pro RNA měly být okolo 2, integrita vzorku byla zkontrolována agarózovou gelovou elektroforézou.

Po izolaci RNA obsahuje vzorek kontaminující molekuly DNA, které je potřeba odstranit, jejich přítomnost by mohla zkreslit výsledky při následných analýzách poskytnutím falešně pozitivního signálu. DNA je degradována enzymaticky pomocí komerčního kitu TURBO DNA-free (Ambion) podle protokolu výrobce. Výrobce doporučuje 2 DNázovací cykly (2x přidat enzym DNázu do reakční směsi a inkubovat 30 min při 37 °C), to však v případě RNA izolované z pletiv rostlin *Nicotiana* nebylo

dostatečné a musely být přidány další 3 DNázovací cykly. Pro dodatečné DNázování bylo výrobcem kitu doporučeno připravit roztok „Second DNA digest buffer“ (10x koncentrovaný: 200mM Tris-HCl o pH 7,5, 100mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM CaCl<sub>2</sub>, objem je doplněn vodou zbavenou RNáz (RNáza free voda), finální pH roztoku 7,5 [100]).

Reverzní transkripce je proces, při kterém je RNA přepsána do cDNA pomocí enzymu reverzní transkriptázy MuLV (NEB). Reakce vyžaduje přítomnost random nonamerů (Sigma, 50μM), náhodných primerů, které pomohou přepsat celý transkriptom a směs deoxyribonukleotid trifosfátů, dNTP (ROCHE) (dATP, dCTP, dTTP, dGTP, každý o koncentraci 25μM).

**Reakční směs:**

- 2 μg RNA, doplníme sterilní vodou do objemu 15,5 μl
- 1 μl random nonamerů
- 0,5 μl dNTP
- 1 μl reverzní transkriptázy MuLV (NEB)

**Program:**

- 70 °C 5 minut, porušení sekundárních struktur RNA
- 40 °C 90 minut, reverzní transkripce, až v tomto kroku je přidána reverzní transkriptáza a dNTPs
- 80 °C 5 minut, inaktivace reverzní transkriptázy
- 4 °C, závěrečné chlazení vzorku

## 5.4 Izolace DNA

DNA byla izolována metodou dle Dellaporta [101]. Protokol viz níže, je možné navýšit množství vstupního materiálu. Rostlinný materiál může být čerstvý i zmražený.

Kontrola kvality a koncentrace vyizolované DNA byla stanovena obdobně jako u RNA spektrofotometricky měřením absorpance při 260 nm, čistota vzorku byla odhadnuta z poměrů absorpací 260 nm /280 nm a 260 nm /230 nm, které by pro DNA měly být v rozmezí 1,6 - 1,8. Integrita vzorku byla ověřena agarózovou gelovou elektroforézou.

1. 100 mg rostlinného materiálu homogenizujeme v tekutém dusíku.
2. Nadrcený rostlinný materiál smícháme s 0,5 ml pufru EB (100mM Tris-HCl pH 8, 50mM EDTA pH 8, 500mM NaCl), do kterého byl před začátkem práce přidán  $\beta$ -merkaptoetanol (Sigma, zásobní koncentrace 14,3M; 7,2  $\mu$ l na 10 ml EB pufru,), vše uchováváme na ledu.
3. Přidáme 35  $\mu$ l 20% SDS, vortexujeme a inkubujeme 10 min při 65-70 °C.
4. Přidáme 130  $\mu$ l 5M octanu draselného (pH 7-8) a inkubujeme 5 min na ledu.
5. Centrifugujeme 10 min na stolní centrifuze na maximum otáček.
6. Opatrně přeneseme supernatant do čisté eppendorfky obsahující 60  $\mu$ l 3M octanu sodného a 640  $\mu$ l izopropanolu, vortexujeme.
7. Centrifugujeme 5 min na maximum otáček.
8. Supernatant odstraníme, pelet promýváme 70% etanolem a následně ho sušíme cca 20 min při 37 °C. Pelet rozpustíme v 200  $\mu$ l pufru BTE (50mM Tris-HCl, pH 8, 1mM EDTA, pH 8) při pokojové teplotě přes noc, nebo inkubujeme 2 hod při 50 °C.
9. Centrifugujeme 5 min na maximum otáček, supernatant odebereme do čisté eppendorfky.
10. Přidáme 2  $\mu$ l RNázyA (10 mg/ml, Sigma), inkubujeme 1 hod při 37 °C.
11. Přidáme 20  $\mu$ l 3M octanu sodného a 440  $\mu$ l 96% etanolu, inkubujeme 1 hod při -20 °C, případně přes noc.
12. Centrifugujeme při 4 °C 15 min na maximum otáček.
13. Supernatant odstraníme, pelet promýváme 70% etanolem, sušíme cca 20 min při 37 °C a rozpustíme ve 20  $\mu$ l pufru TE (10mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA, pH 8) nebo vody.

## 5.5 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

V roce 1983 zavedl Kary B. Mullis metodu replikace DNA *in vitro*, polymerázovou řetězovou reakci PCR (polymerase chain reaction), o 10 let později byl za tento objev oceněn Nobelovou cenou za chemii.

Metoda využívá stejné DNA polymerázy jako buňky při *in vivo* syntéze DNA, ale na rozdíl od *in vivo* reakcí jde o jediný enzym účastnící se tohoto procesu. Principem této metody je cyklická amplifikace specifické sekvence dsDNA ve směru 5'→3' za

přesně daných reakčních podmínek. Nemusí být známa kompletní sekvence studovaného úseku DNA, musí být znám pouze začátek a konec, na který nasedají tzv. primery.

PCR se skládá ze tří základních kroků: 1) při teplotě 95 °C probíhá denaturace templátové dsDNA, vznikají dva ssDNA řetězce, které jsou v následujících krocích využity jako předlohy pro syntézu nových řetězců. 2) při konkrétní teplotě dané sekvencí a délkou primerů nasedají tyto primery na komplementární úsek DNA. 3) při teplotě 72 °C provádí DNA polymeráza syntézu nového řetězce, vzniká tak opět dsDNA, produkt PCR reakce. Množství získaného produktu v jednotlivých cyklech lze vyjádřit vztahem  $2^n$ , kdy n je počet cyklů. Tyto tři kroky dohromady tvoří jeden cyklus, reakce probíhají v zařízeních zvaných termocyklery (Rotor-Gene 6000, Qiagen; C1000TM Thermal Cycler, Biorad). Počet cyklů volíme podle typu analyzovaného genu (30 – 40).

Pro srovnání množství produktů PCR vzniklých po amplifikaci s různými sadami primerů musí tyto reakce probíhat s vysokou efektivitou, která je pro všechny sady srovnatelná, jinak by do experimentu byla zavedena technická chyba, která by zkreslovala výsledky, PCR reakce proto musí být pečlivě optimalizovány. Tento proces zahrnuje návrh primerů v programu IDT (Integrated DNA Technology) [102], ověření zda netvoří sekundární struktury, neinteragují samy se sebou a nasedají pouze na daný úsek DNA (specifita reakce). Pro nasednutí primerů je kritická tzv. „annealingová“ teplota, která je experimentálně stanovena pomocí gradientové PCR, ta je prováděna v termocyklerech umožňujících nastavení různých teplot pro nasedání primerů. PCR produkty jsou potom analyzovány agarózovou gelovou elektroforézou, díky které můžeme vyhodnotit, při jaké teplotě reakce proběhla nejspecifičtěji s vysokým výtěžkem. Dalším krokem optimalizace je stanovení koncentrace primerů v PCR reakci. Efektivita reakce je odečtena z kalibrační křivky sestavené pomocí qPCR (kvantitativní; quantitative PCR, viz dále).

Protože jednotlivé vzorky se liší svou kvalitou a koncentrací cDNA používáme k normalizaci tzv. referenční gen, jehož transkripce je konstantní v jakémkoliv pletivu (tkáni) a stejně tak během vývoje organismu. Transkripce referenčního genu nesmí být ovlivněna podmínkami experimentu (např. použitím toxické látky), často se jedná o transkripční faktor.

Významnou modifikací této metody je qPCR: PCR v reálném čase. Od klasické PCR se liší přítomností fluorescenční barvy v reakční směsi, v našem případě SYBR Green I, která je schopna vazby na dsDNA. Po interakci fluorescenční barvy s dsDNA dochází k nárůstu fluorescence. Odečítáním fluorescenčního signálu v jednotlivých

cyklech můžeme kvantifikovat množství vznikajícího produktu. Pro vlastní kvantifikaci je rozhodující hodnota Ct, což je číslo cyklu, kdy hodnota fluorescence vzrostla nad detekční mez přístroje. Reakce qPCR jsou prováděny v komerčně dodávaných mixech, které obsahují optimální poměr všech reakčních složek. Aby byly limitovány technické a pipetovací chyby, jsou reakce připravovány v triplikátech, třech technických replikách. Analýzu vzniklých produktů qPCR produktů lze provést sestrojením křivky tání – analyzuje se úbytek fluorescence v závislosti na stoupající teplotě. Analýza transkripce je provedena pomocí qRT-PCR (quantitative reverse transcription PCR).

Vyhodnocení qPCR experimentů včetně statistické analýzy (byl použit Mann Whitney statistický test) bylo provedeno programem qbase+ (Biogazelle) metodou  $\Delta\Delta Ct$  [103], [104].

Princip vyhodnocení:  $R=2^{-\Delta\Delta Ct}$  udává relativní transkripci analyzovaného genu.  $\Delta Ct$  je rozdílem v Ct konkrétní sekvenční varianty *TERT* a genu referenčního (v našem případě EF1, actin),  $\Delta Ct = Ct (TERT) - Ct (ref. gen)$ .  $\Delta\Delta Ct$  je pak rozdíl mezi  $\Delta Ct$  pletiv (listy, kořínky, pupeny,...) a semenáčků, ke kterým byla transkripce v ostatních pletivech vztahována, případně semenáčků klíčících v přítomnosti hormonu a kontrolních semenáčků klíčících v čistém médiu.  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (pletivo) - \Delta Ct (semenáčky)$ . Pro zralý pyl a kalusy byly směrodatné odchylky počítány v programu Excel (vzorec viz níže), statistické vyhodnocení programem qbase+ nebylo kvůli nízkému počtu biologických replik možné.

$$\sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n - 1)}} \quad n - \text{počet měření, } x - \text{hodnota, } \bar{x} - \text{průměrná hodnota}$$

#### **Reakční směs klasická PCR (20 $\mu$ l):**

13,9  $\mu$ l vody

4  $\mu$ l MyTaq Reaction Buffer Colorless, 5x koncentrovaný (Bioline)

0,5  $\mu$ l primeru Fw 10  $\mu$ M

0,5  $\mu$ l primeru Rev 10  $\mu$ M

0,1  $\mu$ l MyTaq DNA polymerázy (Bioline, 5U/ $\mu$ l)

1  $\mu$ l templátu DNA



**Reakční směs qPCR (20 µl):**

- 8 µl vody
- 10 µl KAPA SYBR FAST qPCR MM, 2x koncentrovaný (Kapa Biosystems)
- 0,5 µl primeru Fw, 10µM
- 0,5 µl primeru Rev, 10µM
- 1 µl templátu DNA nebo cDNA

**Program:**

95 °C	15 nebo 5 min aktivace enzymu, záleží na použitém mixu		
95 °C	30 s denaturace dsDNA	←	35 – 40 cyklů
56 - 62 °C	20 – 30 s nasedání primerů		
72 °C	20 – 30 s syntéza nového vlákna, měření fluorescenčního signálu		
72 °C	3 min závěrečná polymerace		
50 - 99 °C	analýza křivky tání		

V tabulkách 5 – 9 jsou uvedeny sekvence použitých primerů a v tabulkách 10 -15 jsou uvedeny konkrétní programy pro všechny použité primery.

Actin_Fw	CTG GAT TTG CTG GTG ATG AT
Actin_Rev	CYC TCT TGG ATT GAG CTT
EF1_Fw	TGA GAT GCA CCA CGA AGC TC
EF1_Rev	CCA ACA TTG TCA CCA GGA AGT G

**Tabulka 4:** Sekvence primerů referenčních genů uvedené ve směru 5' → 3', qPCR. (Fw foward primer, Rev reverse primer)

Nt_9exFw3	GTG CTG GAT GAT CTC AAT TTG GAG	-
Nt_9exRev1C	CAA GAA TGC CAT GCA ATG AGC C	* Nt <i>TERT</i> -C/t Nt <i>TERT</i> -C/s
Nt_9exCA_1C-31R	GAA GAC AAG ACC TGG CAT TAG CAG	*Nt <i>TERT</i> -C/t
Nt_9exCB_1C-31R	GGA AGA TAA GAC CTA GCA TTG GCG	*Nt <i>TERT</i> -C/s
Nt_9exD_1C-31R	GAA GAC AAG ACC TGG CAT TGA CG	*Nt <i>TERT</i> -D

**Tabulka 5:** Sekvence primerů pro analýzu 9. exonu genu *TERT* uvedené ve směru 5' → 3'. Primer Nt\_9exFw3 je společný pro uvedené reverzní primery, qPCR. \*specificky amplifikují konkrétní sekvenční variantu genu *TERT*.

3ex_Fw	TCA CCA GCA TGG AGC CTT CTC C
4ex_Rev	CTC CAG CCA CCT GAC GGT GT

**Tabulka 6:** Sekvence primerů navržených přes intron uvedené ve směru 5' → 3', qPCR.

Nt_TERT_1ex_Rev	AGA GAT AAA ATT GTA TGT CCT AGA GTA CG
Nt_TERT_ATG_Fw	ATG TCG ACG AAG AGA CCG AGA CTT

**Tabulka 7:** Sekvence primerů pro ověření počátku transkripce genu *TERT* uvedené ve směru 5' → 3', qPCR.

Nt_TERT_1ex_Rev	AGA GAT AAA ATT GTA TGT CCT AGA GTA CG
NtTERT_up_CA_Fw	GAT TTT CAT TAC TGT TGT CTT TTA CGG
NtTERT_up_CB2_Fw	GCT TAA CAG TTA ACA CCA TGC AAA TGT GAA TTC

**Tabulka 8:** Sekvence primerů pro studium regulační oblasti genu *NtTERT* uvedené ve směru 5' → 3', klasická PCR.

BGS_1521_Rev_deg	CTA RAR ATA AAA TTR TAT RTC CTA RAR TA
BGS_1284_Fw_deg	AAT AAY YGT TGG GTA AAA GAA AAT
BGS_772_Fw_deg	GGG TAA AYA ATT ATA TTA AAT AGA TTA A

**Tabulka 9:** Sekvence primerů navržených pro studium methylace DNA v regulační oblasti genu *NtTERT* uvedené ve směru 5' → 3', klasická PCR. R = G nebo A, Y = C nebo T.

95 °C	5 min
95 °C	5 s
56 °C	20 s
72 °C	15 s
72 °C	3 min
50 - 99 °C	melt analýza

**Tabulka 10:** Program pro actin, qPCR.

95 °C	5 min
95 °C	5 s
60 °C	20 s
72 °C	15 s
72 °C	3 min
50 - 99 °C	melt analýza

**Tabulka 11:** Program pro EF1, qPCR.

95 °C	5 min
95 °C	5 s
62 °C	20 s
72 °C	15 s
72 °C	3 min
50 - 99 °C	melt analýza

**Tabulka 12:** Program pro 9. exon genu *NtTERT*, qPCR.

(Sady primerů: Nt\_9exFw3 a Nt\_9exRev1C, Nt\_9exFw3 a Nt\_9exCA\_1C-31R, Nt\_9exFw3 a Nt\_9exCB\_1C-31R, Nt\_9exFw3 a Nt\_9exD\_1C-31R).

95 °C	5 min
95 °C	5 s
56 °C	20 s
72 °C	15 s
72 °C	3 min
50 - 99 °C	melt analýza

**Tabulka 13:** Program pro 3. a 4. exon genu *NtTERT*, qPCR.

95 °C	5 min
95 °C	5 s
56 °C	20
72 °C	20 s
72 °C	3 min
50 - 99 °C	melt analýza

**Tabulka 14:** Program pro 1. exon (od ATG) genu *NtTERT*, qPCR.

95 °C	1 min
95 °C	15 s
56 °C	15 s
72 °C	15 s
72 °C	8 min
10 °C	-

**Tabulka 15:** Program pro regulační oblast genu *NtTERT*.

(Sady primerů: Nt\_TERT\_1ex\_Rev a NtTERT\_up\_CA\_Fw, Nt\_TERT\_1ex\_Rev a NtTERT\_up\_CB2\_Fw).

## 5.6 Elektroforéza nukleových kyselin na agarózovém gelu

Principem elektroforézy je pohyb nukleové kyseliny ve stejnosměrném elektrickém poli ke kladně nabitě elektrodě, DNA i RNA na svém povrchu nesou díky zbytku kyseliny fosforečné záporný náboj. Protože záporný náboj je na povrchu nukleové kyseliny rozložen rovnoměrně, je její pohyblivost v agarózovém gelu dána především její velikostí. Větší molekuly jsou v důsledku vyššího tření zbrzděovány a pohybují se tedy pomaleji.

Tuto separační metodu lze použít k vizualizaci a kvantifikaci nukleových kyselin po jejich izolaci, nebo k ověření délky produktu klasické PCR podle komerčně dodávaného hmotnostního markeru (Gene Ruler 1kb DNA, Fermentas) - „žebříčku“ (0,1 µg/µl), dle kterého můžeme odhadnout velikost produktu.

Pro snadné nanesení vzorku do jamek v gelu přidáváme tzv. nanášecí pufr, obsahuje glycerol a barevné složky (bromfenolovou modř, xylen cyanolovou zeleň [105]) umožňující sledovat pohyb nukleové kyseliny gelem (loading buffer, Top – Bio). K 10 µl PCR produktu přidáváme 2 µl 6x koncentrovaného nanášecího pufru. RNA nanášíme na gel v 10 µl připravené směsi, která se skládá z 1 µl RNA, 2 µl 5x koncentrovaného nanášecího pufru určeného pro RNA (složení a návod na přípravu pufru je součástí manuálu pro izolaci RNA, RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen) a ze 7 µl vody zbavené RNáz. Směs pro genomovou DNA je obdobná, pouze použijeme standardní 6x koncentrovaný nanášecí pufr.

Hustotu gelu volíme podle typu analyzované nukleové kyseliny, pro relativně krátké produkty PCR připravíme 2% agarózový gel (Serva) v pufru 1x TAE(140mM Tris-kyselina octová, 1mM EDTA), elektroforéza probíhá 30 až 60 minut při elektrickém napětí 80 V (2, 67 V/cm). Pro ověření kvality vyizolované RNA nebo genomové DNA připravíme 1% agarózový gel v pufru 1x TAE, elektroforéza probíhá asi 60 minut při

elektrickém napětí 60 V (6 V/cm). Před nalitím gelu do nosiče se do mírně zchladlého gelu přidává ethidiumbromid (Serva) do výsledné koncentrace 0,2 µg/ml.

V případě elektroforézy RNA musíme dbát zvýšené opatrnosti, aby nedošlo k degradaci vzorku RNázami, proto gel sterilizujeme rozvařením v Papinově hrnci a aparaturu promyjeme vodou ošetřenou dimethylpyrokarbonátem (inhibitor RNáz).

Signály DNA a RNA po elektroforéze detekujeme dokumentačním systémem LASS3000 (FujiFilm).

## **5.7 Analýza aktivity telomerázy pomocí TRAP (telomere repeat amplification protocol)**

TRAP je *in vitro* metoda, pomocí které je možno stanovit, případně kvantifikovat, aktivitu telomerázy v daném vzorku. Pro stanovení aktivity telomerázy je nutné připravit telomerázový extrakt, který obsahuje aktivní telomerázu. Všechny vzorky, v nichž je aktivita telomerázy porovnávána, musí být připravovány paralelně, neboť telomeráza je teplotně senzitivní a mírné odchylky podmínek při přípravě telomerázového extraktu mohou aktivitu telomerázy ovlivnit. Rostlinný materiál může být čerstvý i zmražený.

1. 50-70 mg rostlinného materiálu homogenizujeme v homogenizátoru s abrazivou (10x 6s), chladíme v tekutém dusíku. K nadrcenému rostlinnému materiálu okamžitě přidáme 200-280 µl kompletního pufru W. Vzorky je nutné uchovávat neustále na ledu.

Složení nekompletního pufru W: 50mM Tris-Ac, pH 7,5, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM glutamát draselný, 20mM EGTA, pH 8, 1,5% PVP (polyvinylpyrrolidon), 10% glycerol. Těsně před použitím přidáme k nekompletnímu pufru W následující komponenty na výslednou koncentraci: 1mM DTT (dithiothreitol), 0,1 – 0,2mM PMSF (fenylmethylsulfonyl fluorid), 0,6mM vanadylribonukleozidový komplex (inhibitor RNáz), 1 µg/ml pepstatin A (inhibitor proteináz), 2 µg/ml leupeptin (inhibitor proteináz). Pufř W je nutné před použitím sterilizovat filtrací za studena.

2. Centrifugujeme 15 min při 4 °C, 16 000 - 25 000 g.
3. Odebereme supernatant a přidáme k němu jeden objem 20% PEG 8 000, směs mícháme 30 min při 4 °C na kolotoči.
4. Centrifugujeme 5 min při 4 °C, 16 000 - 25 000 g.

5. Odstraníme supernatant, k peletu přidáme 20  $\mu$ l kompletního W pufru a opatrně propipetujeme.
6. Směs mícháme 30 min při 4 °C na kolotoči.
7. Centrifugujeme 2 min při 4 °C, 25 000 g.
8. Odebereme supernatant (telomerázový extrakt) do čisté eppendorfky a uchováváme při -70 °C.

Před zmražením telomerázového extraktu je doporučeno změřit koncentraci proteinů metodou Bradfordové (Bradfordovo činidlo, Bio-rad) a vyředit tento roztok kompletním W pufrem na standardní koncentraci, v případě telomerázových extraktů připravených z pletiv rostlin rodu *Nicotiana* je vhodná koncentrace proteinů 400 ng/ $\mu$ l (T400).

Analýza telomerázové aktivity se provádí pomocí TRAP (telomeric repeat amplification protocol), který využívá schopnosti telomerázy prodlužovat telomery o repetitivní sekvence podle templátové RNA. V prvním kroku reakce slouží telomerový primer TS21 jako templát, který je prodlužován telomerázou, v dalším kroku dochází k amplifikaci produktu extenze pomocí primerů TS21 a TelPr (Obr. 13, sekvence primerů v tabulce 16). Prováděli jsme analýzu pomocí qPCR.

#### **Reakční směs:**

10  $\mu$ l Fast Start Syber Green Master, 2x koncentrovaný (ROCHE)

8  $\mu$ l vody

0,5  $\mu$ l primeru TS21, 10 $\mu$ M

0,5  $\mu$ l primeru Telpr, 10 $\mu$ M

1  $\mu$ l telomerázového extraktu T400

#### **Program:**

26 °C            45 min, přidávání repetit telomerázou na primer TS21

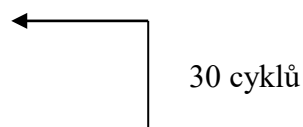
95 °C            15 min, aktivace DNA polymerázy

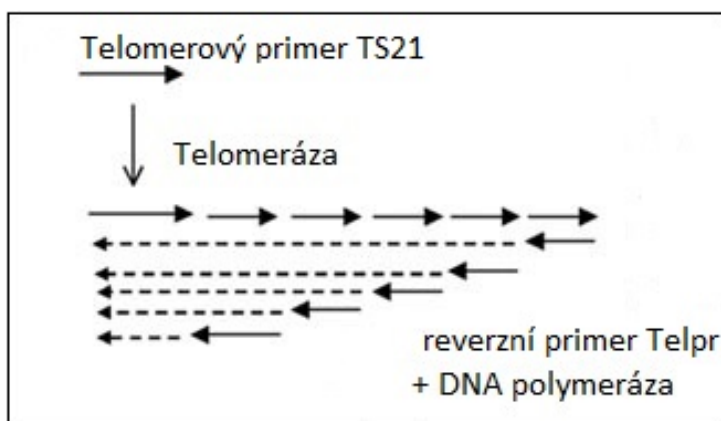
95 °C            15 s, denaturace DNA

60 °C            1 min, nasedání primerů,  
syntéza DNA, měření fluorescence

72 °C            3 min, závěrečná polymerace

50 - 99 °C      sestrojení křivky tání





**Obr. 13:** Princip TRAP, upraveno podle [106].

TS21	GAC AAT CCG TCG AGC AGA GTT
TELPR	CCG AAT TCA ACC CTA AAC CCT AAA CCC TAA ACC C

**Tabulka 16:** Sekvence primerů pro analýzu aktivity rostlinné telomerázy protokolem TRAP (viz kapitola 6.6) uvedené ve směru 5' → 3', klasická i qPCR.

## 5.8 Imunoprecipitace chromatinu

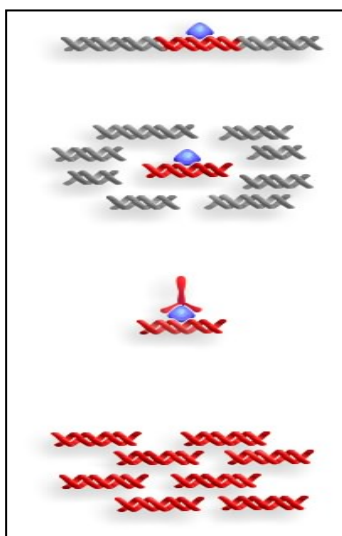
Chromatin je komplex DNA, histonů a proteinů nehistonové povahy nacházející se v jádře eukaryotických buněk. Studování vztahů mezi DNA a proteiny umožňuje experimentální technika zvaná chromatin imuno-precipitace – ChIP (Obr. 14). Můžeme tak získat informaci o místě aktivity mnoha enzymů, vazbě regulačních faktorů bílkovinné povahy, o epigenetických modifikacích histonů.

Pro získání chromatinimuno-precipitovaných frakcí byl zvolen Epiquik Plant Chip kit (Epigentek) navržený pro práci s rostlinným materiálem a při práci bylo postupováno dle doporučení daných výrobcem.

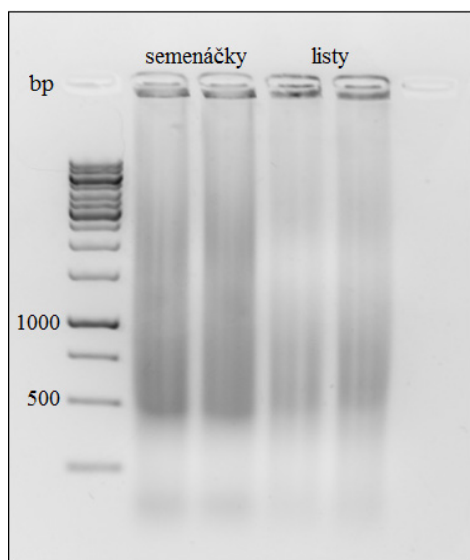
Prvním krokem ChIP je příprava biologického materiálu procesem zvaným „cross-link“, reakcí s 1% formaldehydem vzniká reverzibilní kovalentní vazba mezi DNA a proteiny. Následně je z dané tkáně vyizolován chromatin a protože se jedná o komplexní strukturu, musí být ultrazvukem nasonikován. Sonikace byla pečlivě zoptimalizována a chromatin byl sonikován 13 cyklů na stupeň medium sonikátorem (Bioruptor 1,5 ml, Diagenode) v ledové lázni (Obr. 15). Takto připravený chromatin je imunoprecipitován v „jamkách“ dodaných výrobcem, které byly aktivovány specificky zvolenou protilátkou proti epigenetické modifikaci našeho zájmu. Pro analýzu byly použity protilátky Anti-trimethyl-H3K4me3 (Abcam), Anti-dimethyl-H3K9me2

(Abcam), Anti-trimethyl-H3K27me3 (Millipore), Anti-acetyl-H3K9Ac (Abcam). Posledním krokem je přečištění immunoprecipitované DNA kolonkovou purifikací. S použitím kitu trvá tento proces zhruba 10 hodin.

Immunoprecipitovaná DNA může být analyzována mnoha způsoby – PCR, qPCR, hybridizací, sekvenováním. Naše ChIP frakce byly analyzovány klasickou PCR.



**Obr. 14:** Princip ChIP, upraveno podle [107], detaily viz text.



**Obr 15:** Snímek agaróзовé gelové elektroforézy (1,5% gel, 60 V, 70 min). Sonikovaný chromatin izolovaný z 12-denních semenáčků a listů *N. tabacum*.

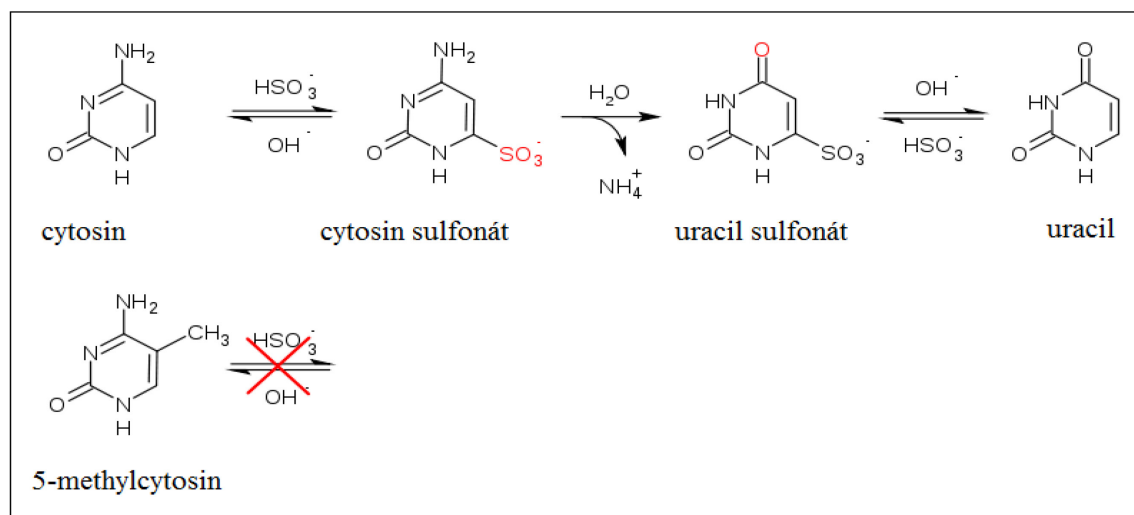


## 5.9 Analýza methylace DNA konverzí bisulfitem

Tato metoda umožňuje studovat úroveň methylace DNA v genomu. Principem je konverze nemethylovaných cytosinů na uracil během inkubace s bisulfitem sodným ( $\text{Na}(\text{HSO}_3)$ ), přičemž methylované cytosiny jsou vůči konverzi rezistentní (Obr. 16).

K bisulfitové konverzi byl použit EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen), bylo postupováno dle pokynů daných výrobcem a s užitím kitu trvá tento proces zhruba 6 hodin. Množství DNA vstupující do reakce je 1 -2  $\mu\text{g}$ , objem by neměl přesáhnout 20  $\mu\text{l}$ . Konverze probíhá v termocyklerech v přítomnosti vysokých koncentrací bisulfitových solí, při vysoké teplotě a nízkém pH. Tyto podmínky vedou k fragmentaci DNA, což je třeba zohlednit v následných analýzách. Po bisulfitové konverzi je DNA přečištěna kolonkovou purifikací.

DNA modifikovaná bisulfitem je dále analyzována PCR s primery, které umožňují amplifikaci původně methylované i nemethylované DNA (pokud primer nasedá na sekvenci s cytosinem, který mohl, ale nemusel být konvertován, je použita směs primerů obsahující na tomto místě v sekvenci A nebo G). Je třeba vzít v úvahu i fakt, že po konverzi bisulfitem nejsou vlákna DNA komplementární a je třeba analyzovat každé vlákno zvlášť. Produkty PCR jsou klonovány do plasmidového vektoru s použitím TOPO TA cloning® kitu (Invitrogen) a sekvenovány. Úroveň methylace DNA v genomu je určena po srovnání s původní sekvencí v programu CyMATE [108].



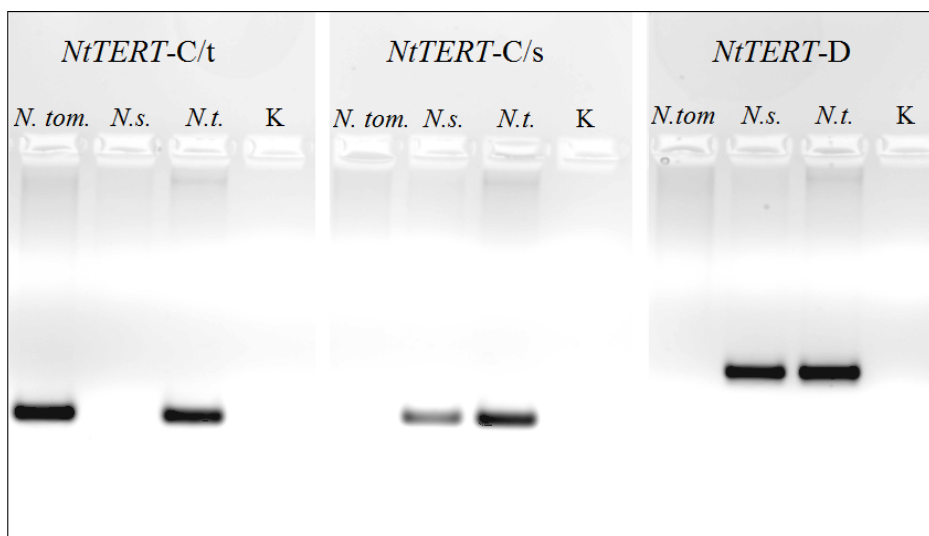
**Obr. 16:** Konverze DNA bisulfitem. Cytosin je hydrolyticky konvertován na uracil, oproti tomu methylová skupina 5-methylcytosinu stericky brání reakci s  $\text{NaHSO}_3$ , upraveno podle [109].

## 6 Výsledky

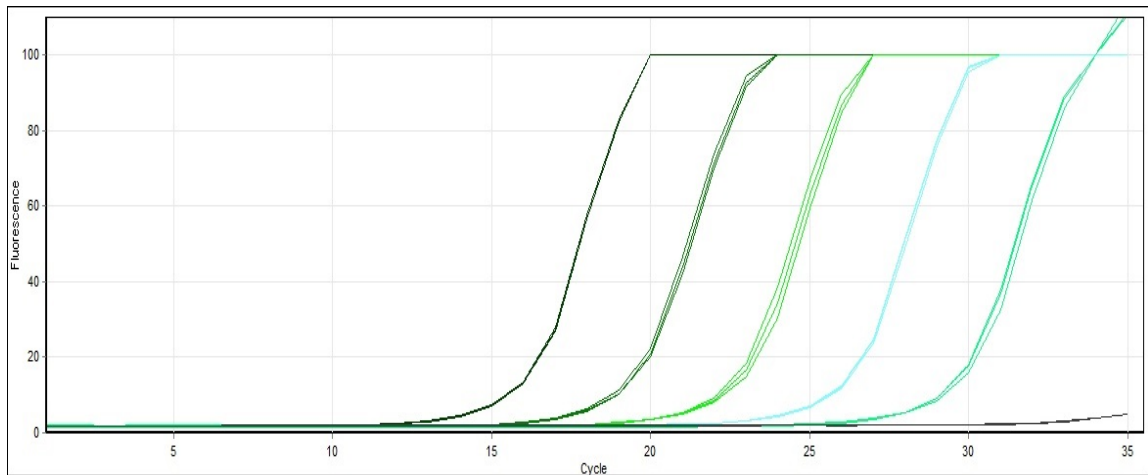
### 6.1 Optimalizace PCR pro specifickou amplifikaci sekvenčních variant genu *NtTERT*

Bylo testováno několik kombinací primerů, které zohledňovaly sekvenční identitu jednotlivých variant genu *NtTERT* v 9. exonu. Byly vybrány kombinace primerů, které specificky amplifikují příslušné varianty *NtTERT* v rodičovských genomech *N. tomentosiformis* a *N. sylvestris* (Obr. 17).

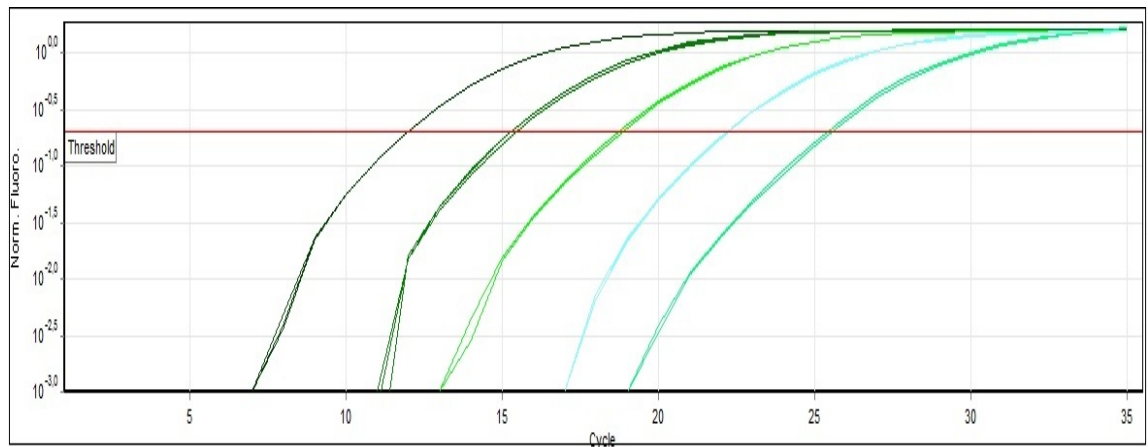
Vhodnost použitých primerů a reakčních podmínek byla ověřena sestrojením kalibračních křivek v programu cykleru Rotorgene6000, kdy je možno zjistit efektivitu reakce. Jako templáty byly použity dekadicky ředěné produkty klasických PCR, každé ředění bylo analyzováno v triplikátu (Obr. 18, 19). Program vytvořil logaritmickou závislost hodnot fluorescence (která je úměrná koncentraci templátové DNA) na hodnotách Ct, efektivita reakce se odečítá ze sklonu křivky (Obr. 20, 21, 22).



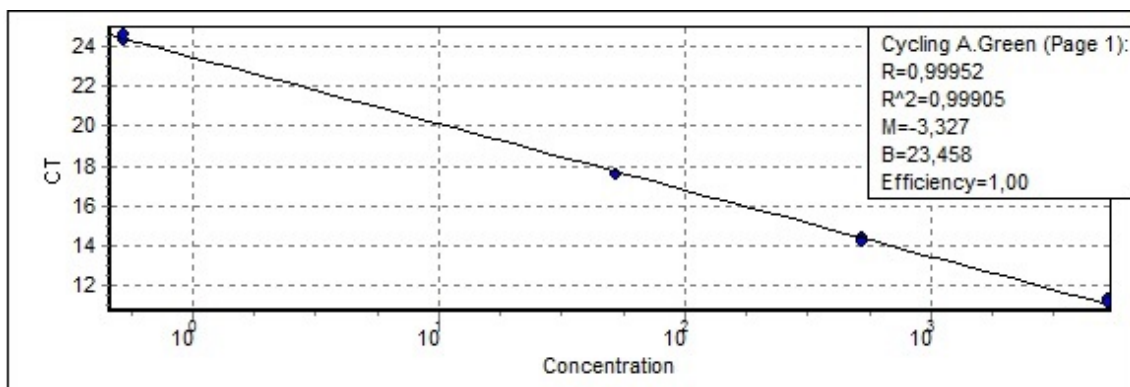
**Obr. 17:** Agarózová gelová elektroforéza, test specifity primerů (navržených do 9. exonu) amplifikujících sekvenční varianty *NtTERT* v genomech *N. tomentosiformis* (*N. tom.*), *N. sylvestris* (*N.s.*) a *N. tabacum* (*N. t.*), K – negativní kontrola (PCR bez templátu).



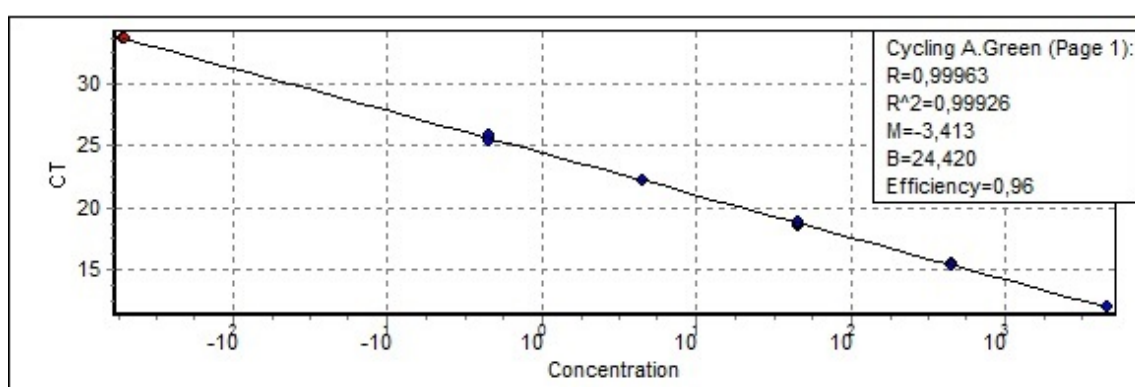
**Obr. 18:** Výstup z kvantitativní analýzy pro konstrukci kalibrační křivky, amplifikace *NtTERT-C/s*. Barevně jsou odlišena dekadická ředění templátu (produkt klasické PCR), černá křivka – negativní kontrola (PCR bez přídavku templátu). Osa x – počet cyklů PCR; osa y – relativní hodnota fluorescence.



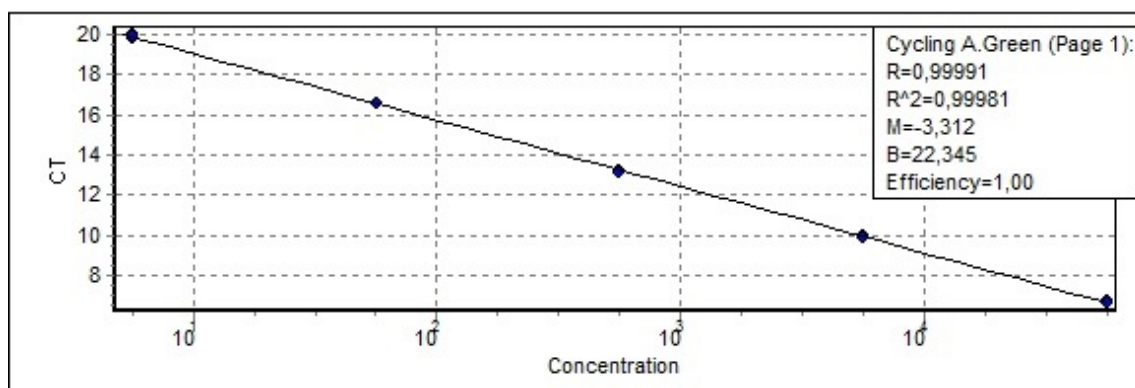
**Obr. 19:** Výstup z kvantitativní analýzy pro konstrukci kalibrační křivky, amplifikace *NtTERT-C/s*. Barevně jsou odlišena dekadická ředění templátu (produkt klasické PCR). Logaritmičnými křivkami v jejich lineární části je proložen tzv. threshold a následně jsou odečteny hodnoty Ct (průsečík threshold a derivace amplifikačních křivek). V tomto bodě mají vzorky stejnou úroveň fluorescence, ale této úrovně dosáhly v rozdílném cyklu, Ct. Osa x – počet cyklů PCR; osa y – normalizovaná hodnota fluorescence.



**Obr. 20:** Kalibrační křivka pro sekvenční variantu *NtTERT-C/t*, sada primerů Nt\_9exFw3 a Nt\_9exCA\_1C-31R. Efektivita reakce = 100 %.



**Obr. 21:** Kalibrační křivka pro sekvenční variantu *NtTERT-C/s*, sada primerů Nt\_9exFw3 a Nt\_9exCB\_1C-31R. Efektivita reakce = 96 %.

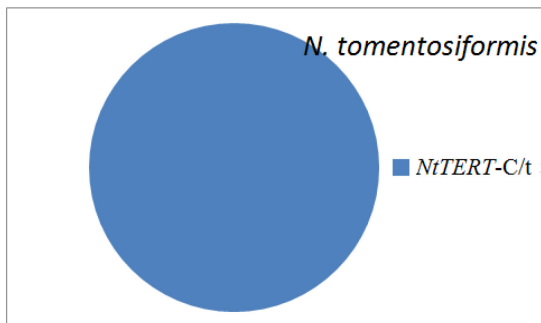


**Obr. 22:** Kalibrační křivka pro sekvenční variantu *NtTERT-D*, sada primerů Nt\_9exFw3 a Nt\_9exD\_1C-31R. Efektivita reakce = 100 %.

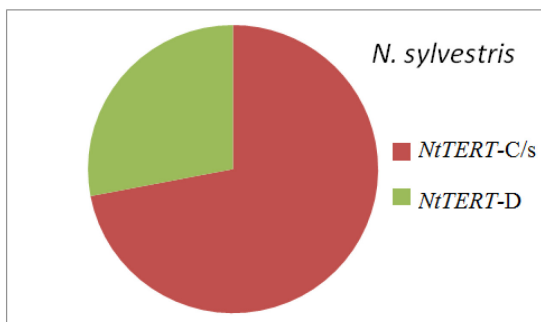
## 6.2 Zastoupení sekvenčních variant genu *NtTERT* v genomu studovaných rostlin

Cílem tohoto experimentu bylo určení podílu sekvenčních variant *NtTERT* v genomu *N. tabacum* a v „rodičovských genomech“ *N. sylvestris* a *N. tomentosiformis*. Jak již bylo řečeno v úvodu, *N. tomentosiformis* je donorem jedné sekvenční varianty *NtTERT-C/t* a *N. sylvestris* dvou sekvenčních variant *NtTERT-C/s* a *NtTERT-D*.

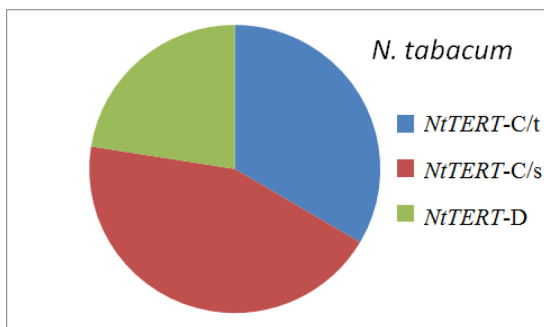
K tomuto účelu bylo využito qPCR se specifickými primery, templátem byla DNA izolovaná z jednotlivých rostlin (3 rostliny od každého druhu). V souladu s publikovanými daty [8] a výsledky získanými klasickou PCR byla v genomu *N. tomentosiformis* identifikována pouze varianta *NtTERT-C/t* (Obr. 23), při reakcích s ostatními kombinacemi primerů nevznikal žádný produkt. *N. sylvestris* obsahuje dvě sekvenční varianty *TERT*, přičemž v nadbytku je varianta *NtTERT-C/s*, přes 70 % (Obr. 24). V genomu *N. tabacum* jsou sekvenční varianty genu *TERT* zastoupeny v následujících poměrech: *NtTERT-C/t* asi 33 %, *NtTERT-C/s* asi 44 %, *NtTERT-D* asi 23 % (Obr. 25).



**Obr. 23:** *N. tomentosiformis* obsahuje v genomu jednu sekvenční variantu genu *TERT*: *NtTERT-C/t*.



**Obr. 24:** *N. sylvestris* obsahuje v genomu 72 % *NtTERT-C/s* a 28 % *NtTERT-D*.

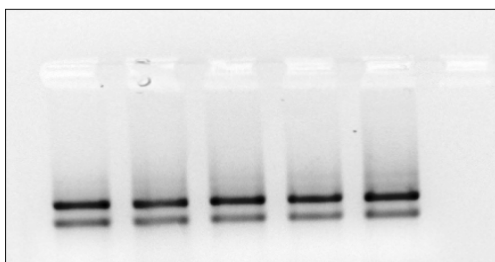


**Obr. 25:** *N. tabacum* obsahuje v genomu 33 % *NtTERT-C/t*, 44 % *NtTERT-C/s* a 23 % *NtTERT-D*.

### 6.3 Izolace a kontrola kvality RNA

RNA byla izolována z pletiv *N. tabacum*, a to ze semenáčků, kořínků, listů, pupenů, 1. a 4. pasáže kalusů (kalus založený z 12-denních semenáčků *N. tabacum*, kultivovaných na médiu s hormony indukujícími dediferenciaci 1 měsíc (1. pasáž), resp. 4 měsíce (4. pasáž)), ze tří pylových stádií, tří stádií pylových láček a ze semenáčků klíčících v přítomnosti hormonů. RNA byla také izolována z pletiv *N. sylvestris*, konkrétně semenáčků, kořínků, listů a pupenů a ze semenáčků *N. tomentosiformis*.

Mimo pylová stádia a stádia pylových láček, kdy pro nedostatek materiálu byl analyzován pouze 1 vzorek, bylo vždy analyzováno minimálně 5 paralelních vzorků od každého pletiva, v případě 1. a 4. pasáže kalusů byly zpracovány 2 paralelně kultivované vzorky. Kvalita a koncentrace RNA byly ověřeny gelovou elektroforézou (příklady na Obr. 26) a spektrofotometrickým měřením.



**Obr. 26:** Vyizolované vzorky RNA z pupenů *N. tabacum*. Kvalitní vzorky RNA jsou charakteristické intaktními proužky 25S rRNA a 18S rRNA, přičemž horní proužek (25S rRNA) je silnější.

#### 6.4 Analýza transkripce sekvenčních variant genu *NtTERT*

Cílem transkripční studie byla analýza aktivity jednotlivých sekvenčních variant *NtTERT* v pletivech *N. tabacum* a *N. sylvestris* s rozdílnou telomerázovou aktivitou. Analýza byla provedena pomocí qRT-PCR.

Relativní kvantifikace transkripce sekvenční varianty *NtTERT-C/t* v pletivech *N. tabacum* (Obr. 27) ukázala vyšší hladinu tohoto transkriptu v kořincích, pupenech a kalusech ve srovnání s 12-semenáčky, oproti tomu v listech a zralém pylu byla úroveň transkripce této varianty nižší. Relativní kvantifikace transkripce varianty *NtTERT-C/s* (Obr. 28) v pletivech *N. tabacum* ukázala opět vyšší hladinu tohoto transkriptu v kořincích a v pupenech ve srovnání s 12-denními semenáčky, ale nižší nebo srovnatelnou v listech a kalusech. Hladina transkripce varianty *NtTERT-C/s* byla ve zralém pylu překvapivě vysoká. Transkript sekvenční varianty *NtTERT-D* v pletivech *N. tabacum* byl detekován pouze v 12-denních semenáčcích a v kořincích, úroveň tohoto transkriptu byla v ostatních pletivech pod úrovní detekce. Relativní množství transkriptu varianty *NtTERT-D* bylo v kořincích nižší ve srovnání s 12-denními semenáčky (Obr. 29).

Obrázek 30 ukazuje podíl transkriptů variant *NtTERT-C/t*, *NtTERT-C/s* a *NtTERT-D* v 12-denních semenáčcích, listech, kořincích a pupenech *N. tabacum*. V listech, jako v jediném pletivu mírně převažuje podíl varianty *NtTERT-C/s* (53 %) nad *NtTERT-C/t* (47 %). Ve 12-denních semenáčcích je hladina varianty *NtTERT-C/t* mírně vyšší (46,5 %) ve srovnání s *NtTERT-C/s* (35,5 %), nejnižší podíl v transkriptomu 12-denních semenáčků tvoří varianta *NtTERT-D* (18 %). V kořincích převažuje podíl varianty *NtTERT-C/t* (57 %) nad variantami *NtTERT-C/s* (32 %) a *NtTERT-D* (11 %). V pupenech převládá varianta *NtTERT-C/t* (61 %) nad *NtTERT-C/s* (39 %), transkripce varianty *NtTERT-D* je v tomto pletivu pod hladinou detekce.

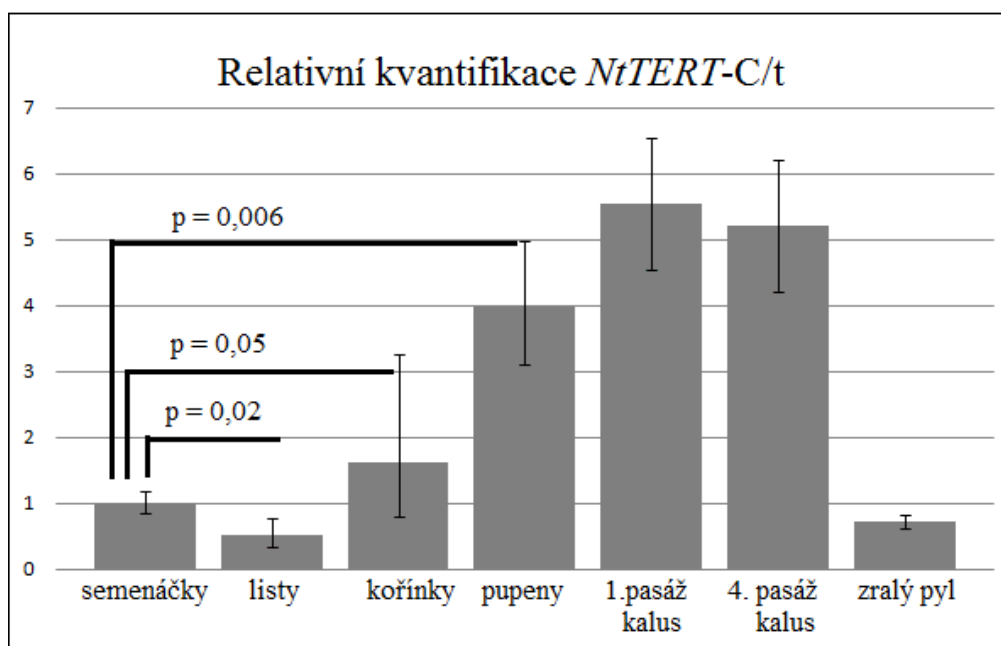
Podíl variant *NtTERT-C/t* a *NtTERT-C/s* v transkriptomu 1. a 4. pasáže kalusů ukazuje obrázek 31. V obou pasážích jasně převládá podíl varianty *NtTERT-C/t* nad variantou *NtTERT-C/s*: 1. pasáž *NtTERT-C/t* 88 %, *NtTERT-C/s* 12 %, 4. pasáž *NtTERT-C/t* 81 %, *NtTERT-C/s* 19 %.

Ve třetím a pátém stádiu nezralého pylu a ve zralém pylu výrazně převládá podíl transkriptu *NtTERT-C/s* nad *NtTERT-C/t*: pylové stádium 3 *NtTERT-C/t* 20 % a *NtTERT-C/s* 80 %, pylové stádium 5 *NtTERT-C/t* 15 % a *NtTERT-C/s* 85 %, zralý pyl *NtTERT-C/t* 11 % a *NtTERT-C/s* 89 % (Obr. 32). Obdobně tomu tak je i u pylových

láček: pylová láčka kultivovaná 30 min *NtTERT-C/t* 12 % a *NtTERT-C/s* 88 %, pylová láčka kultivovaná 4 hodiny *NtTERT-C/t* 10 % a *NtTERT-C/s* 90 %, u pylové láčky kultivované 24 hodin nebyla transkripce varianty *NtTERT-C/t* vůbec detekována (Obr. 33).

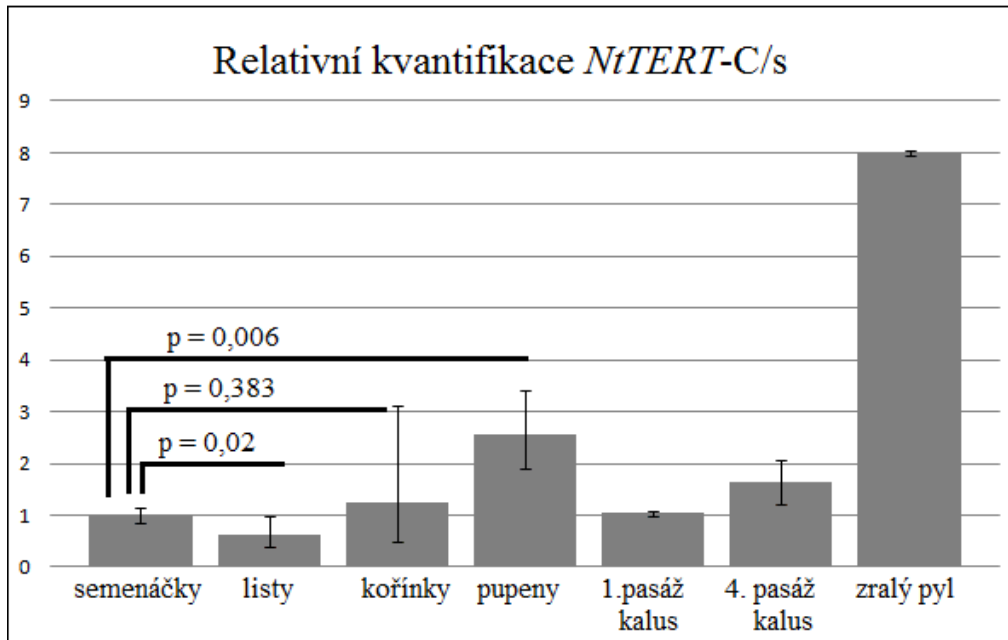
Relativní kvantifikace transkripce sekvenční varianty *NtTERT-C/s* v pletivech *N. sylvestris* (Obr. 34) ukázala vyšší hladinu tohoto transkriptu v mladých listech, kořincích a pupenech ve srovnání s 12-semenáčky. Relativní kvantifikace transkripce sekvenční varianty *NtTERT-D* v pletivech *N. sylvestris* (Obr. 35) je ve všech analyzovaných pletivech na podobné úrovni, nepatrně vyšší je pak v listech. Velká chybová úsečka listů je dána problematickým určením stáří této tkáně.

Obrázek 36 ukazuje podíl variant *NtTERT-C/s* a *NtTERT-D* v transkriptomu 12-denních semenáčků, mladých lisů, kořínků a pupenů *N. sylvestris*. U všech pletiv jednoznačně převládá podíl varianty *NtTERT-C/s*: 12-denní semenáčky *NtTERT-C/s* 88 % a *NtTERT-D* 12 %, mladé listy *NtTERT-C/s* 91 % a *NtTERT-D* 9 %, kořínky *NtTERT-C/s* 92 % a *NtTERT-D* 8 %, pupeny *NtTERT-C/s* 98 % a *NtTERT-D* 2 %.

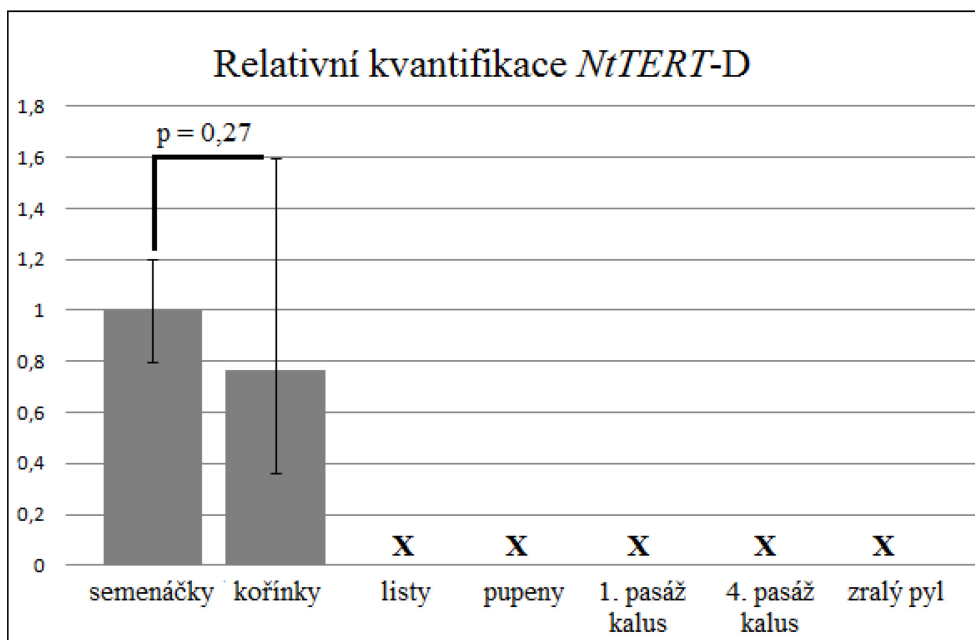


**Obr. 27:** Relativní kvantifikace transkripce sekvenční varianty *NtTERT-C/t* v pletivech modelové rostliny *N. tabacum*. Vzátaženo k transkripci 12-denních semenáčků, p = hodnota statistické významnosti (p ≤ 0,05 statisticky významný rozdíl na 95 %, p ≤ 0,01 statisticky významný rozdíl na 99 %).

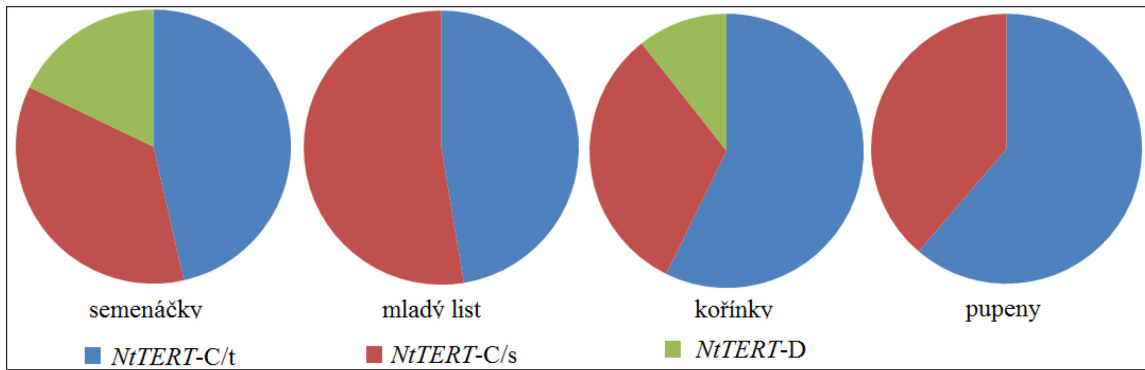




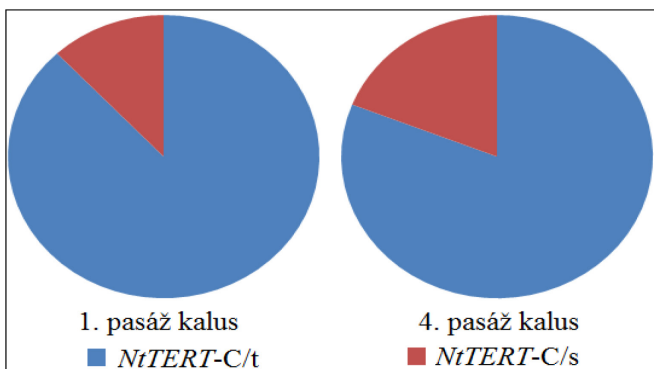
**Obr. 28:** Relativní kvantifikace transkripce sekvenční varianty *NtTERT-C/s* v pletivech modelové rostliny *N. tabacum*. Vztaženo k transkripci 12-denních semenáčků, p = hodnota statistické významnosti ( $p \leq 0,05$  statisticky významný rozdíl na 95 %,  $p \leq 0,01$  statisticky významný rozdíl na 99 %).



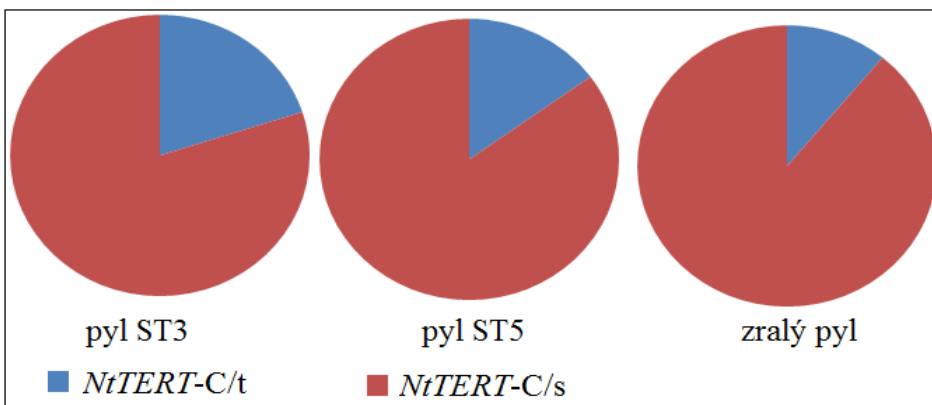
**Obr 29:** Relativní kvantifikace transkripce sekvenční varianty *NtTERT-D* v pletivech modelové rostliny *N. tabacum*. Vztaženo k transkripci 12-denních semenáčků, p = hodnota statistické významnosti ( $p \leq 0,05$  statisticky významný rozdíl na 95 %,  $p \leq 0,01$  statisticky významný rozdíl na 99 %). Varianta *NtTERT-D* nebyla detekována v pupenech, 1. a 4. pasáži kalusů, ve zralém pylu a v listech.



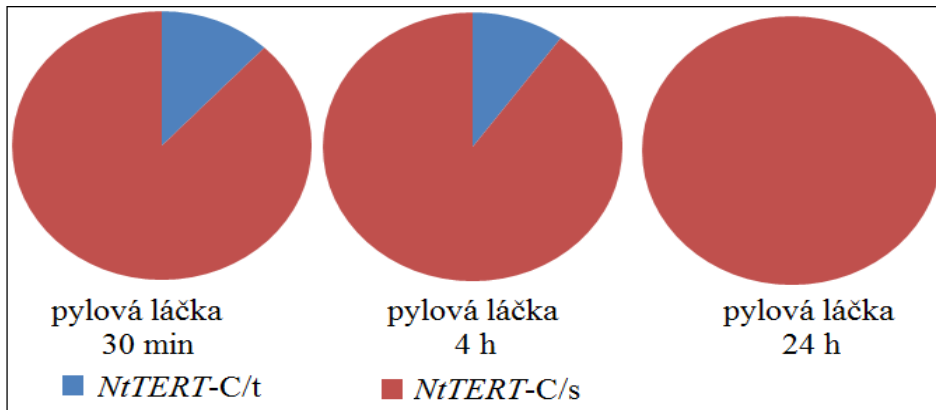
**Obr. 30:** Relativní zastoupení transkriptů sekvenčních variant *NtTERT-C/t*, *NtTERT-C/s* a *NtTERT-D* v pletivech modelové rostliny *N. tabacum*.



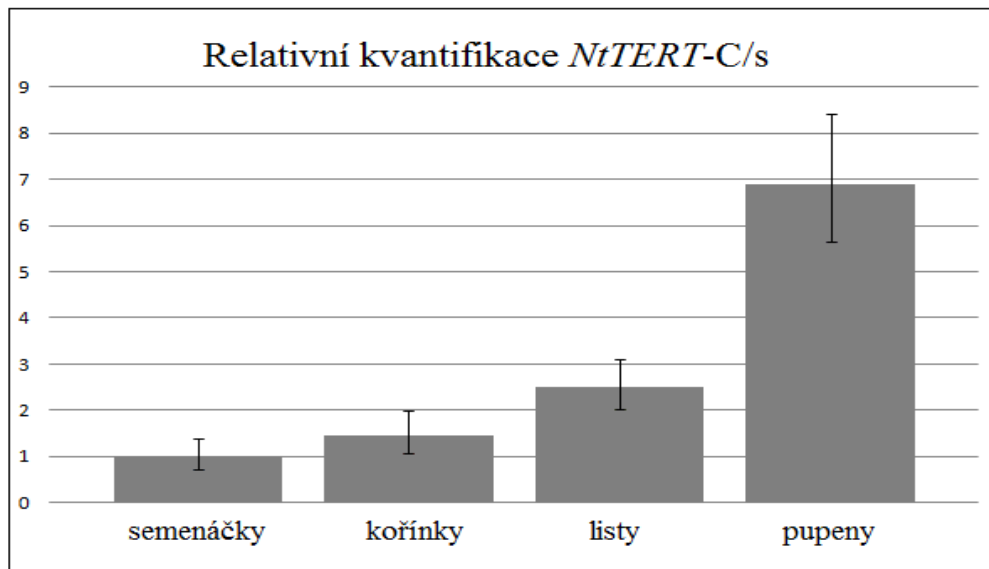
**Obr 31:** Relativní zastoupení transkriptů sekvenčních variant *NtTERT-C/t*, *NtTERT-C/s* v 1. a 4. pasáži kalusů *N. tabacum*.



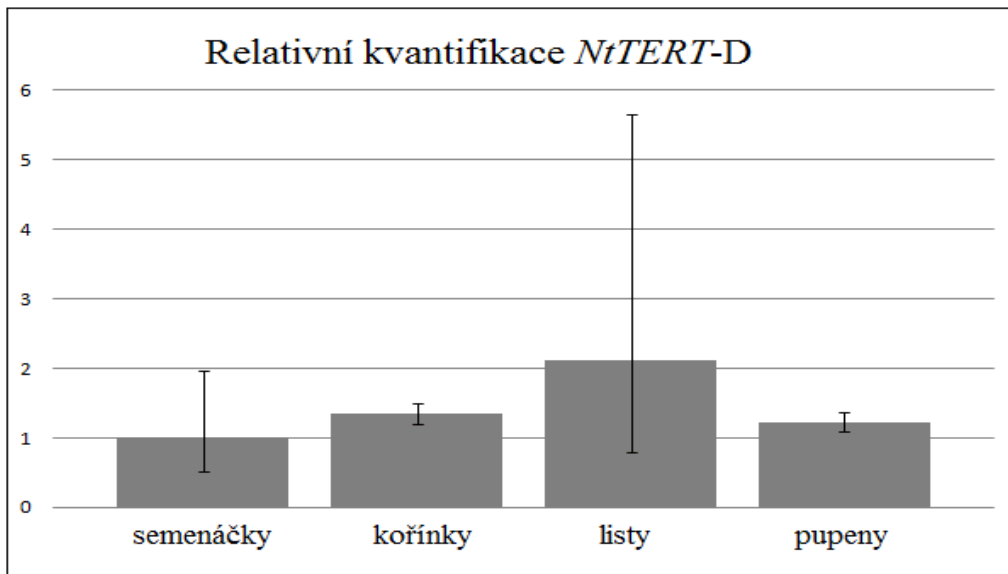
**Obr 32:** Relativní zastoupení transkriptů sekvenčních variant *NtTERT-C/t*, *NtTERT-C/s* v pylu a pylových stádiích v modelové rostlině *N. tabacum*. Je patrný úbytek varianty *NtTERT-C/t* během zrání pylu, nejvyšší podíl obsahuje pylové stádium 3, nejnižší ve zralém pylu.



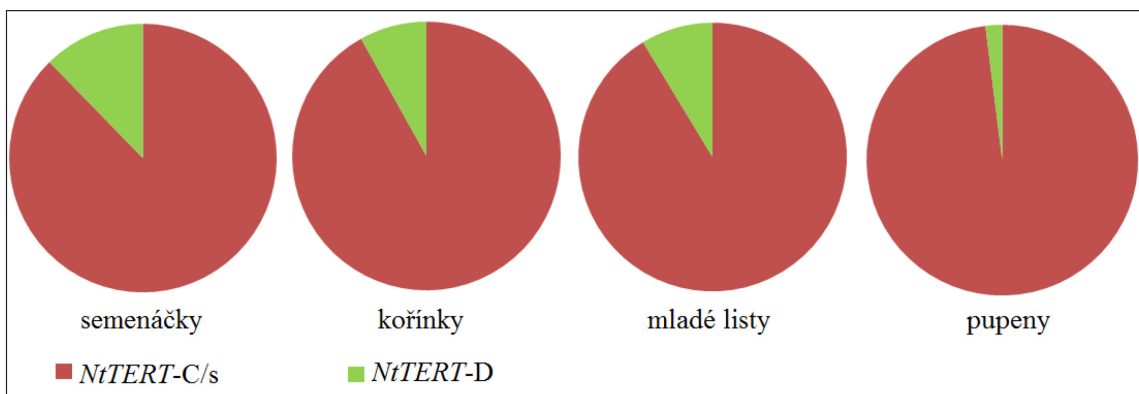
**Obr. 33:** Relativní zastoupení transkriptů sekvenčních variant *NtTERT-C/t*, *NtTERT-C/s* v pylových láčkách v modelové rostlině *N. tabacum*. Během kultivace pylových láček dochází k úbytku sekvenční varianty *NtTERT-C/t*.



**Obr. 34:** Relativní kvantifikace transkripce sekvenční varianty *NtTERT-C/s* v pletivech *N. sylvestris*. Vzátaženo k transkripci 12-denních semenáčků. Transkripce této varianty oproti semenáčkům byla zvýšená ve všech analyzovaných pletivech.



**Obr 35:** Relativní kvantifikace transkripce sekvenční varianty *NtTERT-D* v pletivech *N. sylvestris*. Vztaženo k transkripci 12-denních semenáčků. Úroveň tohoto transkriptu je přibližně srovnatelná u všech analyzovaných pletiv.



**Obr 36:** Relativní zastoupení transkriptů sekvenčních variant *NtTERT-C/s* a *NtTERT-D* v pletivech *N. sylvestris*. Podíl varianty *NtTERT-D* v transkriptomu jednotlivých pletiv není výrazný a dominuje tak varianta *NtTERT-C/s*.

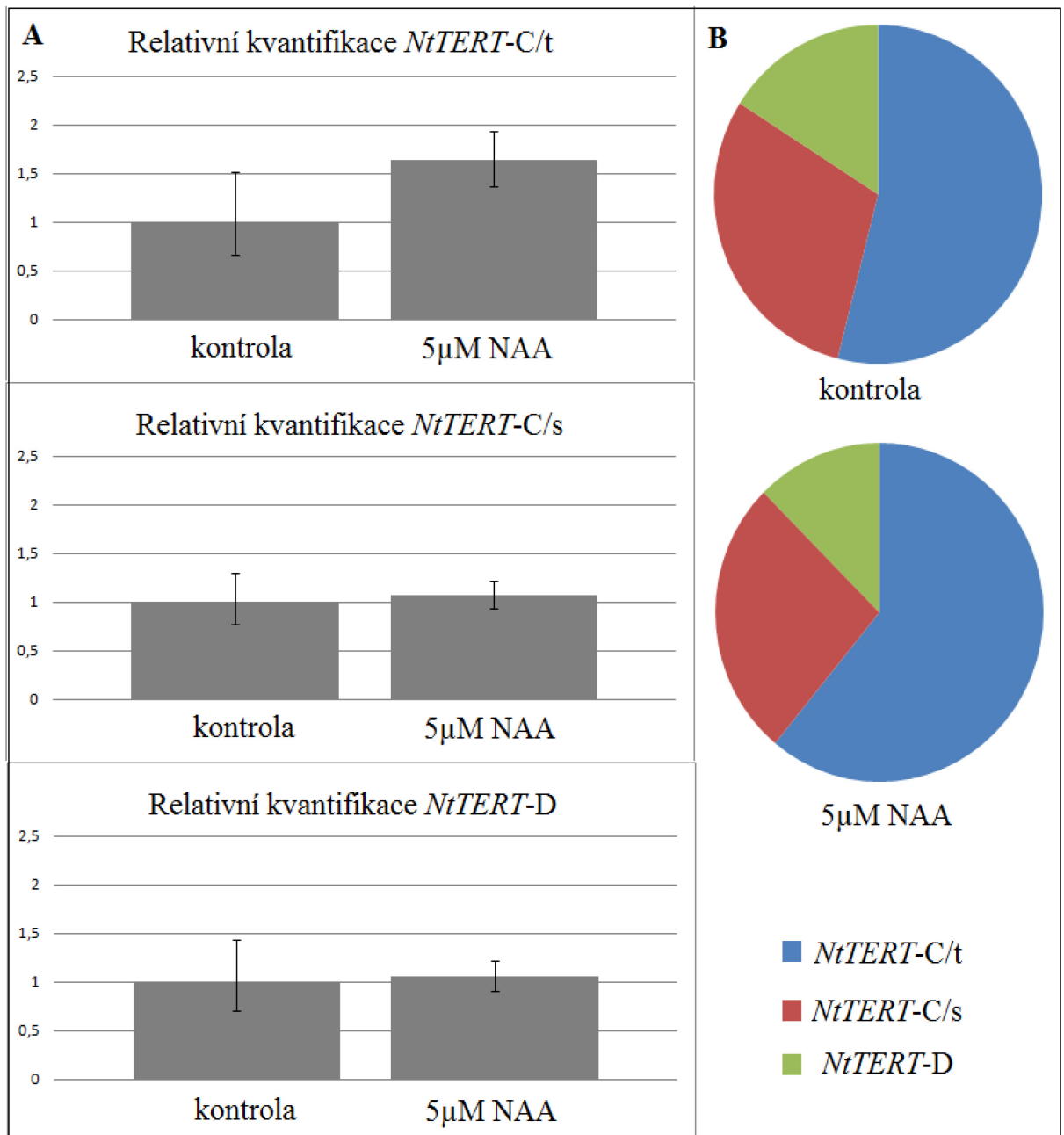
## 6.5 Analýza transkripce sekvenčních variant genu *NtTERT* v semenáčcích klíčících v přítomnosti rostlinných hormonů

Jelikož byl publikován vliv hormonů na aktivitu telomerázy [67], [68], [65], [66] bylo cílem tohoto experimentu zjistit, zda mají hormony vliv na podíl transkripce jednotlivých sekvenčních variant *NtTERT* v semenáčcích *N. tabacum*.

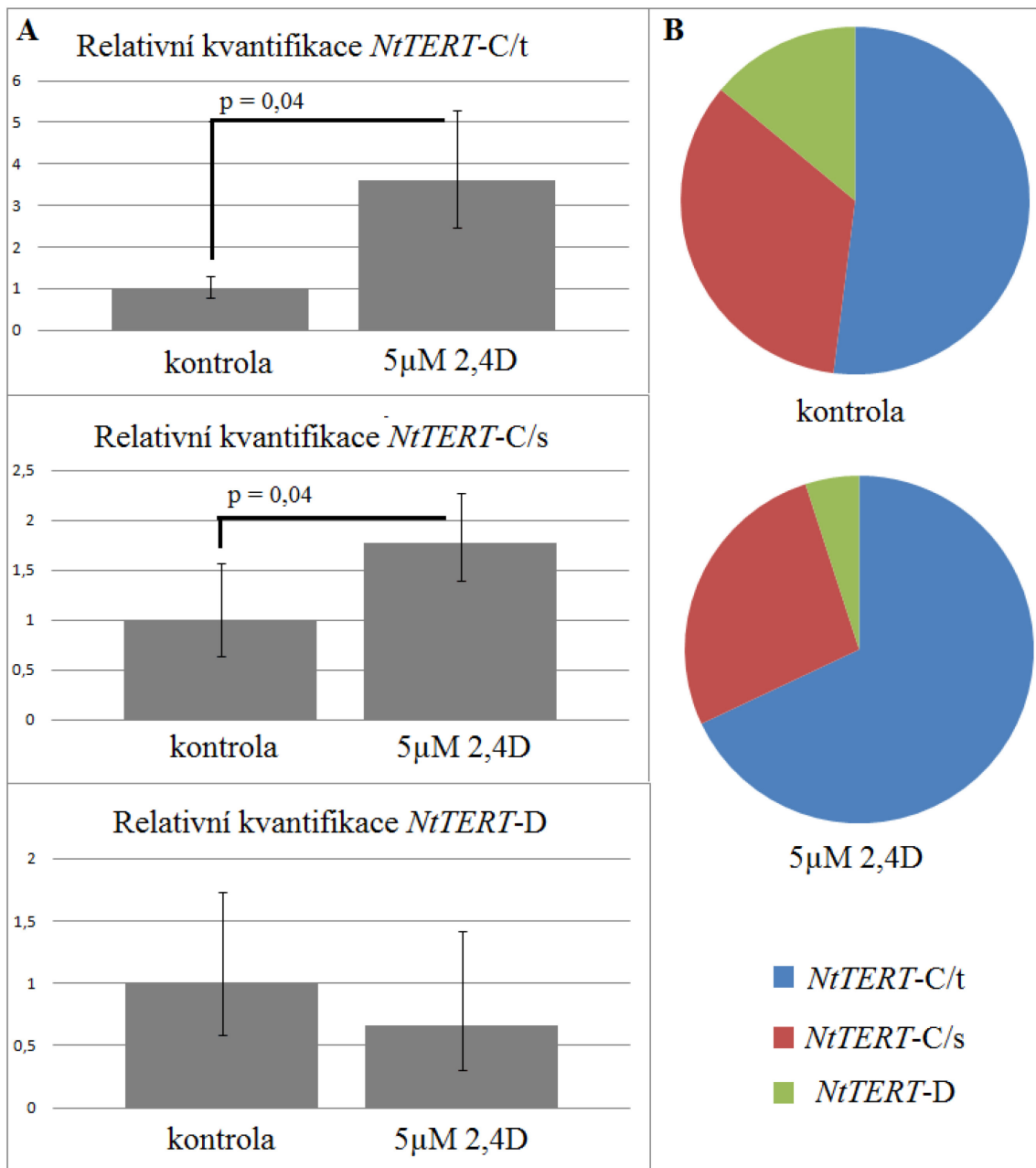
NAA je syntetickým auxinem, jedná se tak o pozitivní regulátor dělení. Přítomnost 5 $\mu$ M NAA indukovala mírný nárůst varianty *NtTERT-C/t* na úkor zbývajících variant (Obr. 37, část A), což je patrné i v relativním zastoupení podílu těchto variant (Obr. 37, část B).

2,4D je také syntetickým auxinem. Relativní kvantifikace ukazuje, že užití 5 $\mu$ M 2,4D vyvolalo u semenáčků statisticky významný nárůst transkripce variant *NtTERT-C/t* a *NtTERT-C/s*, ale pokles *NtTERT-D* ve srovnání s kontrolními semenáčky (Obr. 38, část A). Relativní zastoupení těchto variant v transkriptomu 12-denních semenáčků tento efekt potvrzuje (Obr. 38, část B).

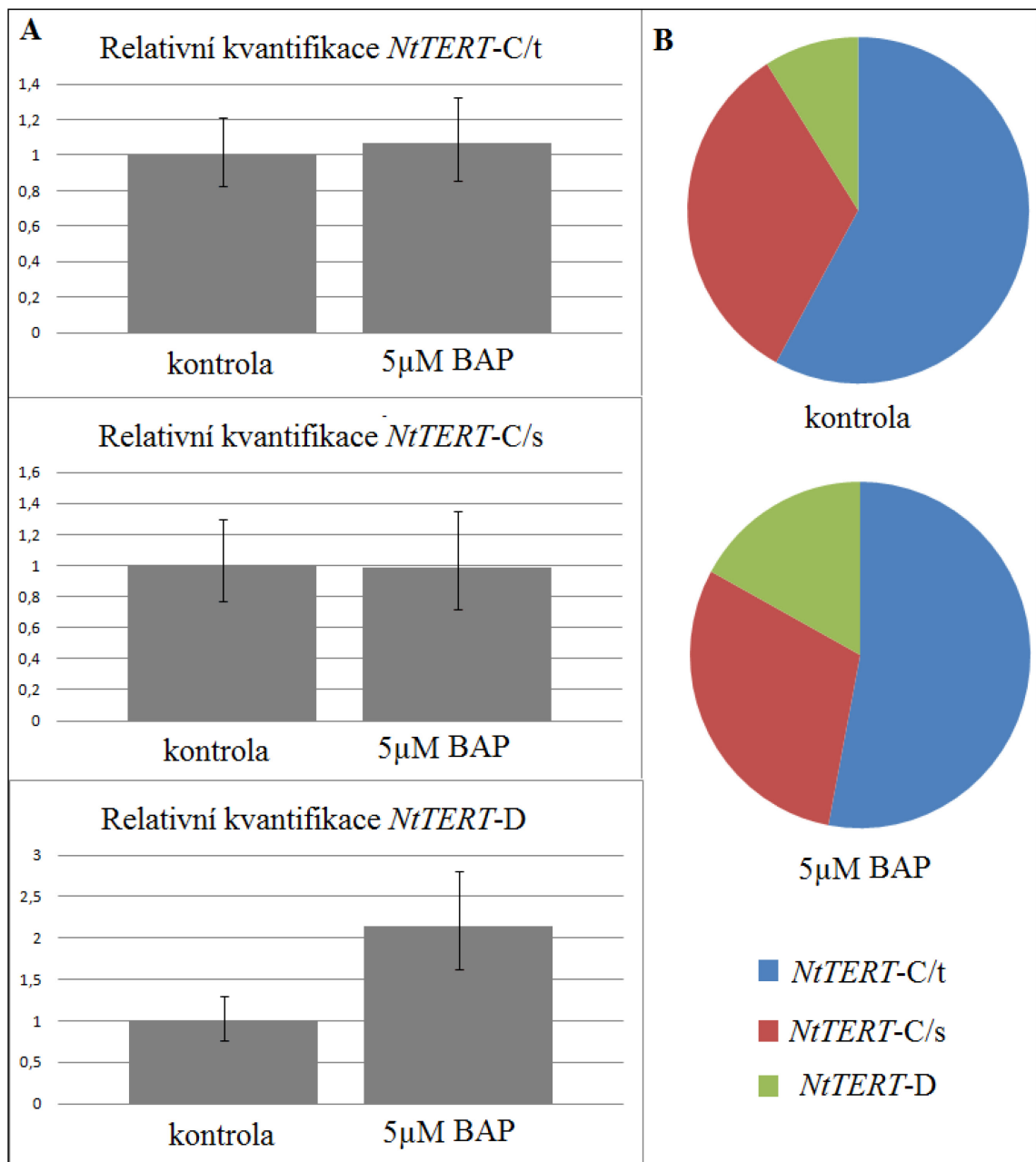
Přítomnost 5 $\mu$ M syntetického cytokininu BAP neměla výrazný vliv na transkripci variant *NtTERT-C/t* a *NtTERT-C/s* (Obr. 39, část A) ve srovnání s kontrolními semenáčky, došlo k mírnému nárůstu transkripce *NtTERT-D*, tento efekt se odráží i v relativním zastoupení variant v transkriptomu 12-denních semenáčků (Obr. 39, část B).



**Obr. 37:** Transkripce sekvenčních variant *NtTERT* v semenáčcích klíčících v přítomnosti 5µM NAA a kontrolních, klíčících bez hormonu **A:** Relativní kvantifikace transkripce variant *NtTERT-C/t*, *NtTERT-C/s* a *NtTERT-D*. **B:** Relativní zastoupení variant *NtTERT*.



**Obr. 38:** Transkripce variant *NtTERT* v semenáčcích klíčících v přítomnosti 5µM 2,4D a kontrolních, klíčících bez hormonu **A:** Relativní kvantifikace transkripce *NtTERT-C/t*, *NtTERT-C/s* a *NtTERT-D*. **B:** Relativní zastoupení variant *NtTERT*.



**Obr. 39:** Transkripce variant *NtTERT* v semenáčcích klíčících v přítomnosti 5µM BAP a kontrolních, klíčících bez hormonu **A:** Relativní kvantifikace transkripce *NtTERT-C/t*, *NtTERT-C/s* a *NtTERT-D*. **B:** Relativní zastoupení variant *NtTERT*.

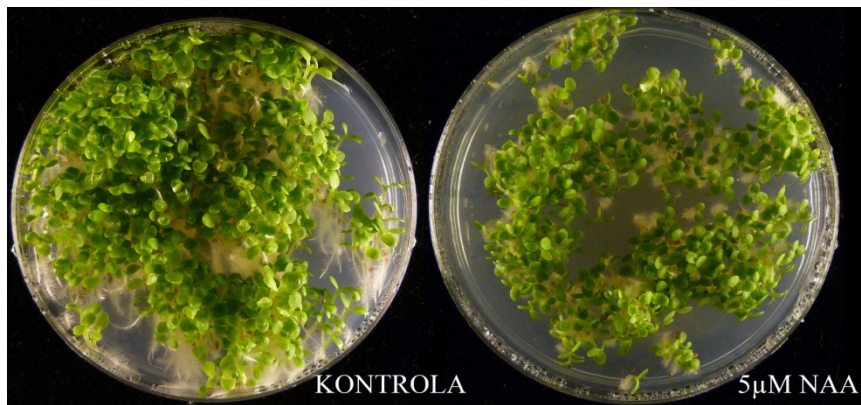


## 6.6 Fenotyp rostlin klíčících v přítomnosti hormonů

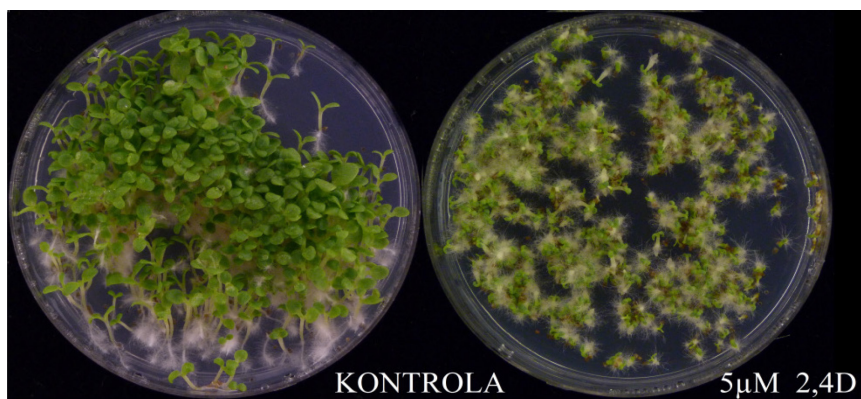
Semenáčky *N. tabacum* byly během klíčení v přítomnosti rostlinných hormonů průběžně foceny a byl sledován vliv hormonů NAA, 2,4D a BAP na jejich fenotyp.

Syntetické auxiny NAA a 2,4D způsobovaly pozdní klíčivost semenáčků, které byly oproti kontrolním rostlinám drobnější (Obr. 40, 41), výraznější fenotypové změny byly pozorovány u semenáčků klíčících v přítomnosti 2,4D (Obr. 41).

U syntetického cytokininu BAP byla stejně jako u NAA a 2,4D pozorována pozdní klíčivost, nejvíce patrnou fenotypovou změnou byly velmi krátké kořínky (Obr. 42).



Obr. 40: Rostliny *N. tabacum*, které klíčily v přítomnosti 5µM NAA.



Obr. 41: Rostliny *N. tabacum*, které klíčily v přítomnosti 5µM 2,4D.



**Obr. 42:** Rostliny *N. tabacum*, které klíčily v přítomnosti 5µM BAP.

## 6.7 Analýza aktivity telomerázy

Protože transkripce *TERT* odráží aktivitu telomerázy v pletivech/tkáních [47], byla aktivita tohoto enzymu stanovena protokolem TRAP.

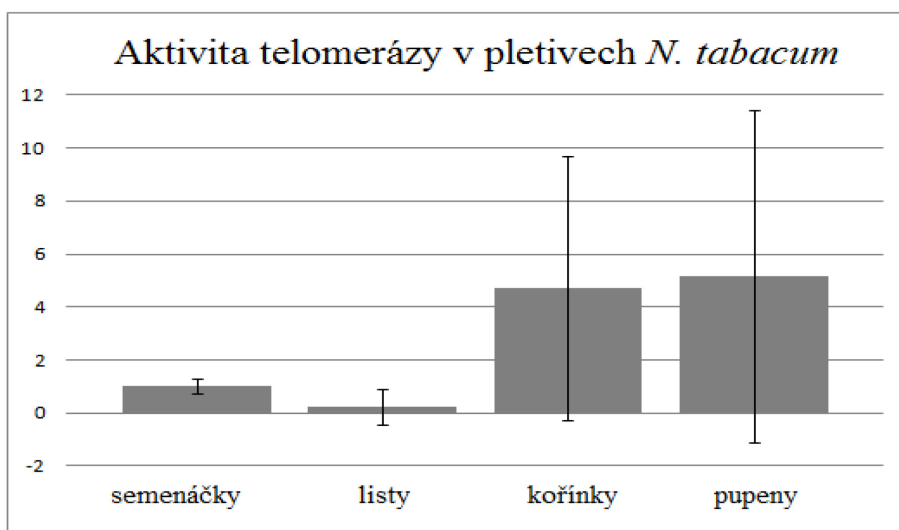
Proliferující pletiva jako kořínky a pupeny jsou pletivy s vysokou aktivitou telomerázy. Oproti tomu plně maturované listy jsou pletivem s předpokládanou nízkou aktivitou (Obr. 43) [7], [97], v nediferenciovaných buňkách – kalusech byla aktivita telomerázy srovnatelná se semenáčky (Polanská P., nepublikované výsledky).

Relativizace vzorků při kvantitativní analýze aktivity telomerázy je provedena měřením koncentrace proteinů v telomerázovém extraktu, což je ve srovnání s extrémní citlivostí qPCR metoda značně necitlivá a paralelní analýzy tak mohou být zatíženy relativně velkou chybou. Vysoké směrodatné odchylky v analýzách kořenů a pupenů mohou odrážet subjektivní chybu ve sklizni paralelních vzorků (pupeny rozdílného stáří, kořínky různých délek).

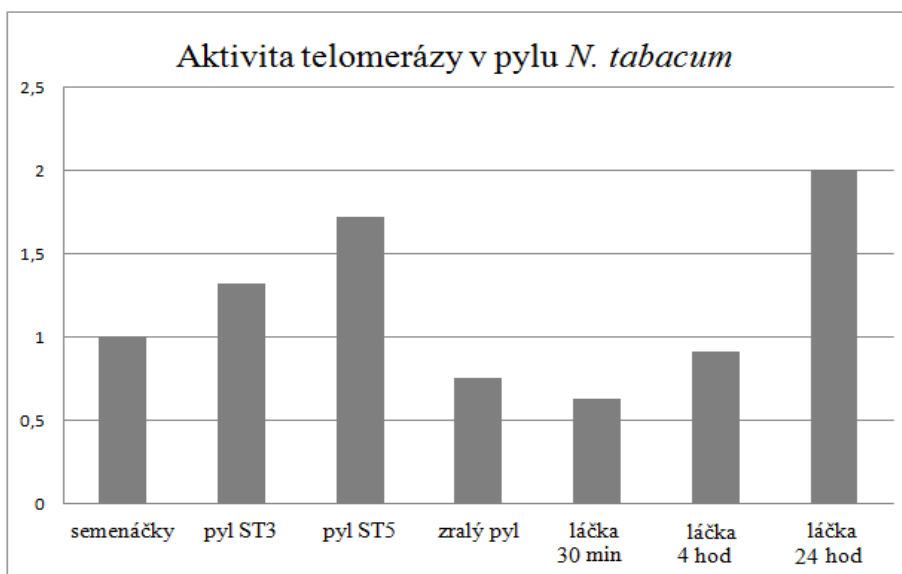
Byla také stanovena aktivita telomerázy v pylových stádiích (ST3, ST5, zralý pyl) a pylových láčkách (kultivovaných 30 min, 4 hodiny a 24 hodin) *N. tabacum*. Ve všech pylových stádiích je aktivita telomerázy srovnatelná s 12-denními semenáčky, překvapivě vyšší telomerázovou aktivitu vykazuje stádium 5 oproti stádiu 3. Aktivita telomerázy v pylové láčce kultivované 30 min je srovnatelná s aktivitou ve zralém pylu a s časem kultivace pylových láček aktivita telomerázy roste (Obr. 44).

Obrázek 45 ukazuje aktivitu telomerázy v semenáčcích *N. tabacum* klíčících v přítomnosti rostlinných hormonů, syntetických auxinů - 5µM NAA a 5µM 2,4D a syntetického cytokininu - 5µM BAP. Aktivita telomerázy semenáčků klíčících s

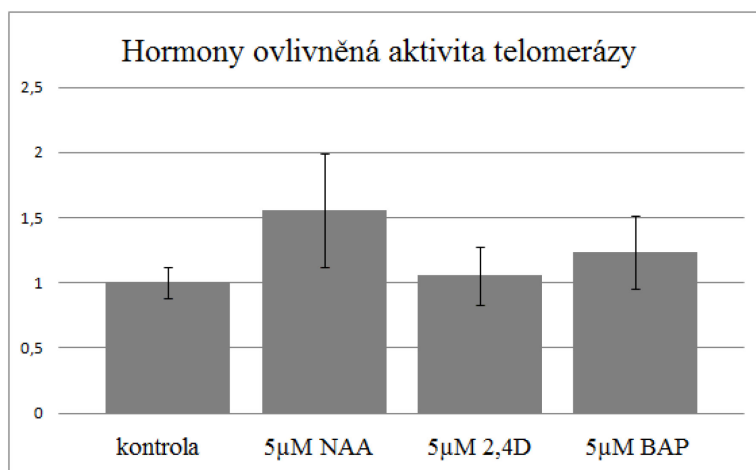
hormonem byla ve srovnání s kontrolními semenáčky (klíčících bez hormonu) na stejné úrovni, přítomnost hormonu v během klíčení nevyvolala žádné změny.



**Obr. 43:** Aktivita telomerázy v pletivech modelové rostliny *N. tabacum*. Vztaženo k aktivitě telomerázy ve 12-denních semenáčcích. Telomerázová aktivita v listech je jednoznačně nižší ve srovnání se semenáčky a vyšší v kořínkách a v pupenech.



**Obr. 44:** Aktivita telomerázy v pylových stádiích a stádiích pylových láček *N. tabacum* byla vztažena k aktivitě telomerázy ve 12-denních semenáčcích *N. tabacum*. Od každého stádia byla analyzována pouze 1 biologická replika.



**Obr. 45:** Aktivita telomerázy v 12-denních semenáčcích *N. tabacum* klíčících v přítomnosti syntetických auxinů NAA a 2,4D a syntetického cytokininu BAP vztažená k aktivitě kontrolních rostlin klíčících na médiu bez hormonu. Přítomnost hormonů v době klíčení neměla výrazný vliv na aktivitu telomerázy.

## 6.8 Epigenetická analýza *NtTERT*

Metodou chromatin imunoprecipitace (ChIP) byly studovány histonové modifikace regulační sekvence genu *NtTERT* (oblast ve směru 5' od počátku transkripce, tzv. „upstream“ oblast) v pletivu s vysokou aktivitou telomerázy (12-denní semenáčky) a nízkou aktivitou telomerázy (dospělé listy). Pracovali jsme s kitem EpiQuik Plant ChIP Kit (Epigentek) a při analýze jsme se potýkali s technickými problémy (nízká koncentrace DNA ve vzorku „Input“ – vzorek bez použití protilátky), což výrazně komplikovalo interpretaci následných PCR. Byly použity protilátky proti modifikacím, které se vyskytují v rostlinném euchromatinu (H3K9Ac, H3K9me3), heterochromatinu (H3K9me1) a v chromatinu vývojově umlčených genů (H3K27me3). Primery pro PCR z „upstream“ oblasti genu *TERT* byly na základě sekvenčních dat získaných Dr. Evou Sýkorovou z BFÚ AV ČR, v.v.i., navrženy tak, aby specificky amplifikovaly varianty *NtTERT-C/t* a *NtTERT-C/s*, protože i v této oblasti byly nalezeny sekvenční rozdíly. Nebyly pozorovány výrazné rozdíly v epigenetickém profilu regulačních oblastí mezi variantami *NtTERT-C/t* a *NtTERT-C/s*. Chromatin semenáčků je asociován s euchromatinovými modifikacemi H3K9Ac a H3K9me3. V regulační oblasti *NtTERT* v listech byl chromatin asociován s heterochromatinovou modifikací H3K9me1. Co se týče H3K27me3, tato značka byla nalezena na histonech asociovaných s genem *NtTERT* ve všech vzorcích, překvapivá byla vysoká hladina v semenáčcích ve variantě *NtTERT-*

C/s. Tyto výsledky jsou shrnuty v tabulce 17 a budou následně ověřeny alternativním protokolem pro ChIP, který byl pro pletiva *N. tabacum* již zoptimalizován.

Studium methylace DNA vyžadovalo návrh specifických primerů pro amplifikaci regulační oblasti genu *NtTERT* ve vzorcích DNA po modifikaci bisulfitem. PCR se sadami primerů: BGS\_1521\_Rev\_deg a BGS\_1284\_Fw\_deg, BGS\_1521\_Rev\_deg a BGS\_772\_Fw\_deg se doposud nepodařilo zoptimalizovat (byla zoptimalizována PCR na genomové DNA, ale reakce nefungovala na vzorcích DNA po modifikaci bisulfitem) a tyto analýzy budou předmětem dalšího testování.

	H3K9Ac	H3K9me3	H3K9me1	H3K27me3
<i>NtTERT</i> -C/t semenáčky	++	++		+
<i>NtTERT</i> -C/t listy	+	+	+	+
<i>NtTERT</i> -C/s semenáčky	++	++	+	++
<i>NtTERT</i> -C/s listy	+	+	++	+

**Tabulka 17:** Analýza modifikací chromatinu v regulační oblasti genu *NtTERT* v listech a semenáčcích *N. tabacum*. + značí intenzitu bandu PCR produktu.

## 7 Diskuse

Telomeráza je enzymový ribonukleoproteinový komplex zodpovědný za prodlužování telomer. Jedním z klíčových mechanismů regulace telomerázy v organismu je transkripce genu *TERT*, kódujícího katalytickou podjednotku. Bylo prokázáno, že transkripce *TERT* koreluje s aktivitou telomerázy v pletivech/tkáních různých organismů [7], [47], [48]. *N. tabacum* je z hlediska studia telomerázy unikátním modelovým organismem, v jeho genomu bylo identifikováno více sekvenčních variant genu *TERT* [8]. Analýza zastoupení těchto sekvenčních variant v genomu *N. tabacum* ukázala, že nejvíce zastoupenou sekvenční variantou je varianta z ancestrálního mateřského genomu *N. sylvestris* *NtTERT-C/s*, následována variantou z otcovského genomu *N. tomentosiformis* *NtTERT-C/t*, nejmenší podíl v genomu zastupuje pseudogen *NtTERT-D* z mateřského genomu.

Relativní kvantifikace transkripce sekvenčních variant genu *NtTERT* v pletivech *N. tabacum* ukázala trend nárůstu varianty *NtTERT-C/t* v rostlinných pletivech s vyšší telomerázovou aktivitou. Obdobný trend byl v některých pletivech pozorován i u sekvenční varianty *NtTERT-C/s*, ale např. v kalusech transkripce této varianty nekoreluje s aktivitou telomerázy; v kalusech je aktivita telomerázy srovnatelná se semenáčky, ale množství transkriptu varianty *NtTERT-C/s* je výrazně nižší. Aktivita telomerázy v rostlinných pletivech *N. tabacum* tak lépe odpovídá transkripčnímu profilu varianty *NtTERT-C/t*. Relativní zastoupení variant *NtTERT-C/t* a *NtTERT-C/s* v transkriptomu daného pletiva také potvrzuje převahu transkripce *NtTERT-C/t* v pletivech s vysokou telomerázovou aktivitou; v listech, jakožto v telomeráza- negativním pletivu, je více zastoupen transkript *NtTERT-C/s*, ale v telomeráza- pozitivních pletivech - v kořincích, pupenech a kalusech, převládá transkripce varianty *NtTERT-C/t* nad *NtTERT-C/s*. Tato data tedy ukazují, že pro aktivitu telomerázy je determinující varianta *NtTERT-C/t*.

V transkriptomu pylu a pylových láček *N. tabacum* nečekaně převažuje vysoký podíl transkriptu *NtTERT-C/s* a se zráním pylu a s časem *in vitro* kultivace pylových láček dochází k úbytku podílu varianty *NtTERT-C/t*. Transkript *NtTERT-D* nebyl v žádném pylovém stádiu ani stádiu pylové láčky detekován. Transkripce varianty *NtTERT-C/t* v tomto případě nekoreluje s aktivitou telomerázy a transkripční profil pylových stádií a stádií pylových láček ukazuje na jiný způsob regulace transkripce a zapojení variant *NtTERT* ve srovnání s pletivem *N. tabacum*. Tento problém bude předmětem dalšího výzkumu.

Zajímavý je transkripční profil pseudogenu *NtTERT-D*. Transkript byl detekován ve 12-denních semenáčcích a kořincích *N. tabacum* a transkripce v kořincích byla oproti semenáčkům snižena. To by mohlo znamenat, že čím vyšší je telomerázová aktivita v daném pletivu, tím nižší je podíl transkriptu *NtTERT-D*. Pro ověření této hypotézy byla analyzována transkripce variant *NtTERT-C/s* a *NtTERT-D* v pletivech *N. sylvestris*.

Relativní vyhodnocení transkripce varianty *NtTERT-C/s* v pletivech *N. sylvestris* ukazuje vyšší transkripci této varianty v kořincích a pupenech oproti 12-denním semenáčkům a překvapivě vysokou hladinu tohoto transkriptu v listech. Vysvětlením může být fakt, že pro analýzu transkripce byly sklizeny velice mladé listy, stejný výsledek byl pozorováno i při analogických analýzách provedených na modelové rostlině *A. thaliana* [97]. Relativní transkripce varianty *NtTERT-D* byla v analyzovaných pletivech na stejné úrovni pouze mírně zvýšená v listech.

V transkriptomu jednotlivých pletiv *N. sylvestris* jednoznačně převažuje transkripce varianty *NtTERT-C/s*, transkripce varianty *NtTERT-D* je velice nízká. Nicméně podíl transkriptu *NtTERT-D* stejně jako v pletivech *N. tabacum* klesá se zvyšující se aktivitou telomerázy v daném pletivu (největší je ve 12-denních semenáčcích, nejmenší je v pupenech). To tedy ukazuje na možné zapojení tohoto pseudogenu do negativní regulace aktivity telomerázy například na úrovni RNA interference [8].

Do komplexního systému regulace telomerázy jsou zapojeny i hormony, u rostlin zejména auxiny [65]. Analýza vlivu hormonů v době klíčení semenáčků *N. tabacum* na transkripci sekvenčních variant *NtTERT* tak představuje první funkční studii v tomto modelovém systému. Přítomnost auxinu, fytohormonu podporují dělení buněk a tím i růst, vedla ke zvýšení podílu sekvenční varianty *NtTERT-C/t* v transkriptomu 12-denních semenáčků *N. tabacum*. Efekt nárůstu transkripce *NtTERT-C/t* je výraznější u semenáčků klíčících v přítomnosti 5 $\mu$ M 2,4D. U syntetického auxinu NAA se často diskutuje o jeho nízké účinnosti, proto pravděpodobně použitá 5 $\mu$ M koncentrace NAA nebyla dostatečná a lze očekávat, že zvýšení koncentrace by vedlo ke stejně „výraznému“ výsledku jako v případě 2,4D. Transkripce variant *NtTERT* v semenáčcích klíčících v přítomnosti syntetického cytokininu BAP nebyla tímto fytohormonem výrazněji ovlivněna, došlo pouze k mírnému nárůstu transkripce pseudogenu *NtTERT-D*. Tento výsledek tedy potvrzuje specifický vliv auxinů na transkripci *TERT*. Kontrola transkripce genu *TERT* je ale pouze jedním z mnoha regulačních mechanismů aktivity

telomerázy v buňkách a syntetické auxiny v době klíčení nezpůsobily nárůst telomerázové aktivity vůči kontrolním semenáčkům klíčících bez hormonu.

Na rozdíl od modelové rostliny *A. thaliana*, kde je chromatin genu *TERT* v euchromatinovém stavu v pletivech s vysokou i nízkou aktivitou telomerázy a epigenetické mechanismy tak nejsou pravděpodobně přímo zapojeny do regulace transkripce tohoto genu [97], naše předběžné výsledky ukazují výraznější změny struktury chromatinu *TERT* v pletivech *N. tabacum*.

Pro studium histonových modifikací byl použit EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen). Tento kit je optimalizován pro pletiva *A. thaliana* a my jsme se během práce s pletivou *N. tabacum* potýkali s mnoha technickými problémy, získané výsledky tak nejsou dostatečně věrohodné a budou proto zopakovány s využitím alternativního protokolu (podle Dr. Werner Aufsatz z Gregor Mendel Institute of Molecular Plant Biology, Vídeň, Rakousko).

Co se týče methylace regulačních oblastí genu *TERT*, podle některých studií je promotor *hTERT* v lidských nádorových buňkách s aktivní telomerázou hypermethylovaný a ve zdravých buňkách hypometylovaný, což je ve zdánlivém rozporu s obecně přijímanou teorií - spojení methylace DNA v promotorových oblastech s umlčením příslušného genu [110]. Bisulfitové sekvenování rakovinných buněk ukázalo, že promotor *hTERT* je v místě počátku transkripce velmi málo nebo vůbec methylován, přestože oblasti proti směru transkripce vykazovaly vysokou hladinu methylace DNA [111]. Tyto poznatky vedly k hypotéze, že k zajištění transkripce *hTERT* stačí, aby nebyla methylována krátká oblast v okolí počátku transkripce, která je nezbytná k vazbě příslušných transkripčních faktorů, a že umlčení transkripce *hTERT* koreluje se zvýšením methylace DNA v tomto lokusu. Nicméně vztah mezi methylací DNA a regulací *hTERT* nebyl doposud zcela objasněn. U *A. thaliana* byla v oblasti promotoru genu *AtTERT* stanovena nízká hladina methylace DNA v pletivech s aktivní a neaktivní telomerázou, což ukazuje, že methylace DNA se na regulaci tohoto genu výrazně nepodílí [97]. Tyto výsledky jsou ve shodě s methylačním profilem *A. thaliana* [88], který ukazuje nízkou úroveň methylace DNA v této oblasti. *N. tabacum* je ale ve srovnání s *A. thaliana* rostlinou s vysokou úrovní methylace v genomu, methylované cytosiny se vyskytují ve všech sekvenčních motivech, proto návrh a optimalizace primerů je v tomto případě relativně obtížným úkolem a bude předmětem další práce.



Naznačená souvislost mezi hladinou transkriptů variant *NtTERT* a aktivitou telomerázy by představovala zajímavý a unikátní systém jemné regulace tohoto enzymového komplexu. Nicméně pro potvrzení těchto hypotéz by bylo třeba provést funkční studii. Možným přístupem může být využití metod umožňujících editaci genomu, např. zinc finger nukleáz, TALEN (Transcription activator-like effector nucleases) nebo CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats asociovaných s Cas geny), umělých restričních enzymů vzniklých spojením specificky navržené DNA vazebné domény a DNA štěpící domény. Vyřazením jedné nebo více sekvenčních variant *NtTERT* lze by bylo možno jednoznačně prokázat jejich zapojení do regulace telomerázy.

Tyto výsledky přispívají k dotvoření obrazu evoluce, organizace a regulace telomerázy v rozdílných modelových organismech. Dále rozšiřují představy o komplexním systému epigenetických modifikací a jejich vlivu na regulaci exprese genů a v tomto specifickém případě přeneseně i na stabilitu telomer, pro které je aktivita telomerázy jedním z klíčových faktorů.

## 8 Závěr

Konce eukaryotických chromozomů jsou tvořeny telomerami. Ty formují speciální struktury, díky kterým nejsou konce chromozomů rozpoznávány jako dvouřetězcové zlomy DNA a nepodléhají reparačním procesům. Telomery také chrání kódující úseky genomu před ztrátou při replikaci DNA. Jejich délka je pro život buňky kritická, příliš krátké telomery jsou jedním z faktorů, díky kterým buňka vstupuje do apoptózy. V proliferujících pletivech/tkáních je detekována vysoká aktivita telomerázy, enzymového komplexu prodlužujícího telomery.

*N. tabacum* představuje z hlediska studia telomer a telomerázy unikátní systém, v jeho genomu byly detekovány tři sekvenční varianty kódující proteinovou podjednotku telomerázy NtTERT zodpovědnou za prodlužování telomer podle telomerové RNA.

Kovalentní modifikace DNA a histonů ovlivňují vlastnosti chromatinu daného lokusu a jsou zapojeny do regulace genové transkripce. V tomto případě bylo studováno zapojení těchto modifikací do vývojové regulace aktivity telomerázy v pletivech *N. tabacum*.

Byla stanovena hladina transkripce sekvenčních variant *NtTERT-C/t*, *NtTERT-C/s* a *NtTERT-D* v pletivech *N. tabacum* a *N. sylvestris*, data byla korelována s rozdílnou aktivitou telomerázy v těchto pletivech. Byla provedena studie zabývající se vlivem fytohormonů auxinů a cytokininů na transkripci variant *NtTERT* v semenáčcích *N. tabacum*.

Ze získaných dat vyplývá, že pro aktivitu telomerázy je pravděpodobně determinující varianta *NtTERT-C/t* a varianta *NtTERT-D* je zapojena do negativní regulace telomerázy v rostlinných pletivech. Byl prokázán specifický vliv auxinů na transkripci variant *NtTERT*, klíčení semenáčků *N. tabacum* v jejich přítomnosti podpořilo transkripci varianty *NtTERT-C/t*. Epigenetická studie ukazuje na rozdílné histonové modifikace asociované s chromatinem genu *NtTERT* v telomeráza-pozitivních a telomeráza-negativních pletivech. Tyto pokusy, stejně jako studium methylace DNA v regulačních oblastech genu *NtTERT* budou předmětem dalšího výzkumu.

Předpokládá se, že výsledky získané v rámci této diplomové práce budou publikovány v odborném vědeckém časopise a projekt také uspěl v soutěži Projekt rektora -kategorie C- Podpora vynikajících diplomových prací.

## 9 Literatura

- [1] Murad L., Lim K.Y., Christopodulou V., Matyášek R., Lichtenstein C.P., Kovařík A., Leitch A.R., The origin of tobacco's T genome is traced to a particular lineage within *Nicotiana tomentosiformis* (Solanaceae), *American Journal of Botany* 89 (2002) 921-928.
- [2] Lim K.Y., Genome evolution in allotetraploid *Nicotiana*, *Biological Journal of the Linnean Society* 82 (2004) 599–606.
- [3] Clarkson J.J., Kelly L.J., Leitch A.R., Knapp S., Chase M.W., Nuclear glutamine synthetase evolution in *Nicotiana*: phylogenetics and the origins of allotetraploid and homoploid (diploid) hybrids, *Molecular Phylogenetics Evolution* 55 (2010) 99-112.
- [4] Koukalová B., Reich J., Matyášek R., Kuhrová V., Bezděk M., A BamHI family of highly repeated DNA sequences of *Nicotiana tabacum*, *Theoretical Applied Genetics* 78 (1989) 77-80.
- [5] Fajkus J., Kovařík A., Kralovics R., Bezděk M., Organization of telomeric and ubtelomeric chromatin in the higher plant *Nicotiana tabacum*, *Molecular and General Genetics* 247 (1995) 633-638.
- [6] Fajkus J., Kralovics R., Kovařík A., Fajkusová L., The telomeric sequence is directly attached to the HRS60 subtelomeric tandem repeat in tobacco chromosomes, *FEBS Letters* 364 (1995) 33-35.
- [7] Fajkus J., Kovařík A., Kralovics R., Telomerase activity in plant cells, *FEBS Letters* 391 (1996) 307-309.
- [8] Sýkorová E., Fulnečková J., Mokroš P., Fajkus J., M. Fojtová, Peška V., Three TERT genes in *Nicotiana tabacum*, *Chromosome Research* 20 (2012) 381-394.
- [9] Makarov V.L., Hirose Y., Langmore J.P., Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening, *Cell* 88 (1997) 657-666.
- [10] McElligott R., Wellinger R.J., The terminal DNA structure of mammalian chromosomes, *EMBO Journal* 16 (1997) 3705-3714.
- [11] Blackburn E.H., Gall J.G., A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*, *Journal of Molecular Biology* 120 (1978) 33-53.

- [12] Richards E.J., Ausubel F.M., Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*, *Cell* 53 (1988) 127-136.
- [13] Moyzis R.K., Buckingham J.M., Cram L.S., Dani M., Deaven L.L., Jones M.D., Meyne J., Ratliff R.L., Wu J.R., A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes, *Proceedings of National Academy of Science USA* 85 (1988) 6622-6626.
- [14] Shakirov E.V., Shippen D.E., Length regulation and dynamics of individual telomere tracts in wild-type *Arabidopsis*, *Plant Cell* 16 (2004) 1959-1967.
- [15] Uchida W., Matsunaga S., Sugiyama R., Kawano S., Interstitial telomere-like repeats in the *Arabidopsis thaliana* genome, *Genes and Genetics Systems* 77 (2002) 63-67.
- [16] Horvath M.P., Schweiker V.L., Bevilacqua J.M., Ruggles J.A., Schultz S.C., Crystal structure of the *Oxytricha nova* telomere end binding protein complexed with single strand DNA, *Cell* 95 (1998) 963-974.
- [17] Griffith J.D., Comeau L., Rosenfield S., Stansel R.M., Bianchi A., Moss H., de Lange T., Mammalian telomeres end in a large duplex loop, *Cell* 97 (1999) 503-514.
- [18] Kazda A., Zellinger B., Rossler M., Derboven E., Kusenda B., Říha K., end protection by blunt-ended telomeres, *Genes and Development* 26 (2012) 1703-1713.
- [19] Olovnikov A.M., Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides, *Doklady Akademii Nauk SSSR* 201 (1971) 1496-1499.
- [20] Olovnikov A.M., A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon, *Journal of Theoretical Biology* 41 (1973) 181-190.
- [21] Sfeir A., Telomeres at a glance, *Journal of Cell Science* 125 (2012) 4173-4178.
- [22] Hayflick L., Moorhead P.S., The serial cultivation of human diploid cell strains, *Experimental Cell Research* 25 (1961) 585-621.
- [23] Hayflick L., The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains, *Experimental Cell Research* 37 (1965) 614-636.
- [24] Sýkorová E., Fajkus J., Structure-function relationships in telomerase genes, *Biology of the Cell* 101 (2009) 375-392, 371 p following 392.

- [25] Lingner J., Cech T.R., Purification of telomerase from *Euplotes aediculatus*: requirement of a primer 3' overhang, *Proceedings of National Academy of Science USA* 93 (1996) 10712-10717.
- [26] Azzalin C.M., Reichenbach P., Khoriantuli L., Giulotto E., Lingner J., Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends, *Science* 318 (2007) 798-801.
- [27] Luke B., Panza A., Redon S., Iglesias N., Li Z., Lingner J., The Rat1p 5' to 3' exonuclease degrades telomeric repeat-containing RNA and promotes telomere elongation in *Saccharomyces cerevisiae*, *Molecular Cell* 32 (2008) 465-477.
- [28] Schoeftner S., Blasco M.A., Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II, *National Cell Biology* 10 (2008) 228-236.
- [29] Cusanelli E., Romero C.A., Chartrand P., Telomeric noncoding RNA TERRA is induced by telomere shortening to nucleate telomerase molecules at short telomeres, *Molecular Cell* 51 (2013) 780-791.
- [30] Vrbský J., Akimcheva S., Watson J.M., Turner T.L., Daxinger L., Vyskot B., Aufsatz W., Říha K., siRNA-mediated methylation of *Arabidopsis* telomeres, *PLOS Genetics* 6 (2010) e1000986.
- [31] Majerová E., Mandáková T., Vu G.T., Fajkus J., Lysák M.A., Fojtová M., Chromatin features of plant telomeric sequences at terminal vs. internal positions, *Frontiers in Plant Science* 5 (2014) 593.
- [32] Greider C.W., Blackburn E.H., Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts, *Cell* 43 (1985) 405-413.
- [33] Fitzgerald M.S., Říha K., Gao F., Ren S., McKnight T.D., Shippen D.E., Disruption of the telomerase catalytic subunit gene from *Arabidopsis* inactivates telomerase and leads to a slow loss of telomeric DNA, *Proceedings of National Academy Science USA* 96 (1999) 14813-14818.
- [34] Říha K., McKnight T.D., Griffing L.R., Shippen D.E., Living with genome instability: plant responses to telomere dysfunction, *Science* 291 (2001) 1797-1800.
- [35] Široký J., Zlucová J., Říha K., Shippen D.E., Vyskot B., Rearrangements of ribosomal DNA clusters in late generation telomerase-deficient *Arabidopsis*, *Chromosoma* 112 (2003) 116-123.

- [36] Fajkus J., SÝkorovÁ E., Leitch A.R., Telomeres in evolution and evolution of telomeres, *Chromosome Research* 13 (2005) 469-479.
- [37] Ručková E., Friml J., Procházková Schrupfová P., Fajkus J., Role of alternative telomere lengthening unmasked in telomerase knock-out mutant plants, *Plant Molecular Biology* 66 (2008) 637-646.
- [38] Chung H.K., Cheong C., Song J., Lee H.W., Extratelomeric functions of telomerase, *Current Molecular Medicine* 5 (2005) 233-241.
- [39] Bollmann F.M., The many faces of telomerase: emerging extratelomeric effects, *Bioessays* 30 (2008) 728-732.
- [40] Cong Y., Shay J.W., Actions of human telomerase beyond telomeres, *Cell Research* 18 (2008) 725-732.
- [41] Lingner J., Hughes T.R., Shevchenko A., Mann M., Lundblad V., Cech T.R., Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase, *Science* 276 (1997) 561-567.
- [42] <http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch7C.htm>. [cited 2014 1. 12.]
- [43] Cifuentes-Rojas C., Kannan K., Tseng L., Shippen D.E., Two RNA subunits and POT1a are components of Arabidopsis telomerase, *Proceedings of National Academy of Science USA* 108 (2011) 73-78.
- [44] Karamysheva Z., Wang L., Shrode T., Bednenko J., Hurley L.A., Shippen D.E., Developmentally programmed gene elimination in *Euplotes crassus* facilitates a switch in the telomerase catalytic subunit, *Cell* 113 (2003) 565-576.
- [45] Soder A.I., Hoare S.F., Muir S., Going J.J., Parkinson E.K., Keith W.N., Amplification, increased dosage and in situ expression of the telomerase RNA gene in human cancer, *Oncogene* 14 (1997) 1013-1021.
- [46] Saretzki G., Petersen S., Petersen I., Kolble K., von Zglinicki T., hTERT gene dosage correlates with telomerase activity in human lung cancer cell lines, *Cancer Letters* 176 (2002) 81-91.
- [47] Fitzgerald M.S., McKnight T.D., Shippen D.E., Characterization and developmental patterns of telomerase expression in plants, *Proceedings of National Academy of Science USA* 93 (1996) 14422-14427.
- [48] Heller K., Kilian A., Piatyszek M.A., Kleinhofs A., Telomerase activity in plant extracts, *Molecular and General Genetics* 252 (1996) 342-345.
- [49] Shats I., Milyavsky M., Tang X., Stambolsky P., Erez N., Brosh R., Kogan I., Braunstein I., Tzukerman M., Ginsberg D., Rotter V., p53-dependent down-

- regulation of telomerase is mediated by p21waf1, *The Journal Biological Chemistry* 279 (2004) 50976-50985.
- [50] Xu D., Wang Q., Gruber A., Bjorkholm M., Chen Z., Zaid A., Selivanova G., Peterson C., Wiman K.G., Pisa P., Downregulation of telomerase reverse transcriptase mRNA expression by wild type p53 in human tumor cells, *Oncogene* 19 (2000) 5123-5133.
- [51] Kyo S., Takakura M., Fujiwara T., Inoue M., Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers, *Cancer Science* 99 (2008) 1528-1538.
- [52] Cairney C.J., Keith W.N., Telomerase redefined: integrated regulation of hTR and hTERT for telomere maintenance and telomerase activity, *Biochimie* 90 (2008) 13-23.
- [53] Rohde V., Sattler H.P., Bund T., Bonkhoff H., Fixemer T., Bachmann C., Lensch R., Unteregger G., Stoeckle M., Wullich B., Expression of the human telomerase reverse transcriptase is not related to telomerase activity in normal and malignant renal tissue, *Clinical Cancer Research* 6 (2000) 4803-4809.
- [54] Counter C.M., Hahn W.C., Wei W., Caddle S.D., Beijersbergen R.L., Lansdorp P.M., Šedivý J.M., Weinberg R.A., Dissociation among in vitro telomerase activity, telomere maintenance, and cellular immortalization, *Proceedings of National Academy of Science USA* 95 (1998) 14723-14728.
- [55] Holt S.E., Aisner D.L., Shay J.W., Wright W.E., Lack of cell cycle regulation of telomerase activity in human cells, *Proceedings of National Academy of Science USA* 94 (1997) 10687-10692.
- [56] Yi X., Tesmer V.M., Savre-Train I., Shay J.W., Wright W.E., Both transcriptional and posttranscriptional mechanisms regulate human telomerase template RNA levels, *Molecular Cell Biology* 19 (1999) 3989-3997.
- [57] Kang S.S., Kwon T., Kwon D.Y., Do S.I., Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit, *The Journal of Biological Chemistry* 274 (1999) 13085-13090.
- [58] Oguchi K., Tamura K., Takahashi H., Characterization of *Oryza sativa* telomerase reverse transcriptase and possible role of its phosphorylation in the control of telomerase activity, *Gene* 342 (2004) 57-66.

- [59] Kim J.H., Park S.M., Kang M.R., Oh S.Y., Lee T.H., Muller M.T., Chung I.K., Ubiquitin ligase MKRN1 modulates telomere length homeostasis through a proteolysis of hTERT, *Genes Development* 19 (2005) 776-781.
- [60] Garcia C.K., Wright W.E., Shay J.W., Human diseases of telomerase dysfunction: insights into tissue aging, *Nucleic Acids Research* 35 (2007) 7406-7416.
- [61] Nelson N.D., Bertuch A.A., Dyskeratosis congenita as a disorder of telomere maintenance, *Mutation Research* 730 (2012) 43-51.
- [62] Majerská J., Sýkorová E., Fajkus J., Non-telomeric activities of telomerase, *Molecular BioSystems* 7 (2011) 1013-1023.
- [63] Kyo S., Takakura M., Kanaya T., Zhuo W., Fujimoto K., Nishio Y., Orimo A., Inoue M., Estrogen activates telomerase, *Cancer Research* 59 (1999) 5917-5921.
- [64] Kimura A., Ohmichi M., Kawagoe J., Kyo S., Mabuchi S., Takahashi T., Ohshima C., Arimoto-Ishida E., Nishio Y., Inoue M., Kurachi H., Tasaka K., Murata Y., Induction of hTERT expression and phosphorylation by estrogen via Akt cascade in human ovarian cancer cell lines, *Oncogene* 23 (2004) 4505-4515.
- [65] Tamura K., Liu H., Takahashi H., Auxin induction of cell cycle regulated activity of tobacco telomerase, *Journal of Biological Chemistry* 274 (1999) 20997-21002.
- [66] Yang S.W., Jin E., Chung I.K., Kim W.T., Cell cycle-dependent regulation of telomerase activity by auxin, abscisic acid and protein phosphorylation in tobacco BY-2 suspension culture cells, *Plant Journal* 29 (2002) 617-626.
- [67] Ren S., Johnston J.S., Shippen D.E., McKnight T.D., TELOMERASE ACTIVATOR1 induces telomerase activity and potentiates responses to auxin in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 16 (2004) 2910-2922.
- [68] Ren S., Mandadi K.K., Boedeker A.L., Rathore K.S., McKnight T.D., Regulation of telomerase in *Arabidopsis* by BT2, an apparent target of TELOMERASE ACTIVATOR1, *Plant Cell* 19 (2007) 23-31.
- [69] Strahl B.D., Allis C.D., The language of covalent histone modifications, *Nature* 403 (2000) 41-45.
- [70] Turner B.M., Histone acetylation and an epigenetic code, *Bioessays* 22 (2000) 836-845.
- [71] Rando O.J., Combinatorial complexity in chromatin structure and function: revisiting the histone code, *Current Opinion in Genetics and Development* 22 (2012) 148-155.



- [72] Carrozza M.J., Utley R.T., Workman J.L., Cote J., The diverse functions of histone acetyltransferase complexes, *Trends in Genetics* 19 (2003) 321-329.
- [73] Parthun M.R., Widom J., Gottschling D.E., The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: links to chromatin replication and histone metabolism, *Cell* 87 (1996) 85-94.
- [74] <http://www.atdbio.com/content/56/Epigenetics>. [cited 2014 1.12].
- [75] Munshi A., Shafi G., Aliya N., Jyothy A., Histone modifications dictate specific biological readouts, *Journal of Genetics and Genomics* 36 (2009) 75-88.
- [76] Fransz P., Ten Hoopen R., Tessadori F., Composition and formation of heterochromatin in *Arabidopsis thaliana*, *Chromosome Research* 14 (2006) 71-82.
- [77]. Berger S.L, The complex language of chromatin regulation during transcription, *Nature* 447 (2007) 407-412.
- [78] Li B., Carey M., Workman J.L., The role of chromatin during transcription, *Cell* 128 (2007) 707-719.
- [79] Kouzarides T., Chromatin modifications and their function, *Cell* 128 (2007) 693-705.
- [80] Zhang X., Bernatavichute Y.V., Cokus S., Pellegrini M., Jacobsen S.E., Genome-wide analysis of mono-, di- and trimethylation of histone H3 lysine 4 in *Arabidopsis thaliana*, *Genome Biology* 10 (2009) R62.
- [81] Kolasinska-Zwierz P., Down T., Latorre I., Liu T., Liu X.S., Ahringer J., Differential chromatin marking of introns and expressed exons by H3K36me3, *Nature Genetics* 41 (2009) 376-381.
- [82] Sims R.J., 3rd and Reinberg D., Processing the H3K36me3 signature, *Nature Genetics* 41 (2009) 270-271.
- [83] Robzyk K., Recht J., Osley M.A., Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast, *Science* 287 (2000) 501-504.
- [84] Camporeale G., Shubert E.E., Sarath G., Cerny R., Zempleni J., K8 and K12 are biotinylated in human histone H4, *European Journal of Biochemistry* 271 (2004) 2257-2263.
- [85] Polanská P., Methylace rostlinných telomerových sekvencí, *Bakalářská práce*, MU, Brno 2011.
- [86] Henderson I.R., Jacobsen S.E., Epigenetic inheritance in plants, *Nature* 447 (2007) 418-424.

- [87] Lister R., Pelizzola M., Dowen R.H., Hawkins R.D., Hon G., Tonti-Filippini J., Nery J.R., Lee L., Ye Z., Ngo Q.M., Edsall L., Antosiewicz-Bourget J., Stewart R., Ruotti V., Millar A.H., Thomson J.A., Ren B., Ecker J.R., Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences, *Nature* 462 (2009) 315-322.
- [88] Zhang X., Yazaki J., Sundaresan A., Cokus S., Chan S.W., Chen H., Henderson I.R., Shinn P., Pellegrini M., Jacobsen S.E., Ecker J.R., Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in arabidopsis, *Cell* 126 (2006) 1189-1201.
- [89] Barbes C., Sanchez J., Yebra M.J., Robert-Gero M., Hardisson C., Effects of sinefungin and S-adenosylhomocysteine on DNA and protein methyltransferases from *Streptomyces* and other bacteria, *FEMS Microbiology Letters* 57 (1990) 239-243.
- [90] <http://watcut.uwaterloo.ca/webnotes/Metabolism/C1CobalaminMethylations.html>. [cited 2014 1.12.]
- [91] Baubec T., Pečinka A., Rozhon W., Mittelsten Scheid O., Effective, homogeneous and transient interference with cytosine methylation in plant genomic DNA by zebularine, *Plant Journal* 57 (2009) 542-554.
- [92] Santi D.V., Garrett C.E., Barr P.J., On the mechanism of inhibition of DNA-cytosine methyltransferases by cytosine analogs, *Cell* 33 (1983) 9-10.
- [93] Fojtová M., Kovařík A., Votruba I., Holý A., Evaluation of the impact of S-adenosylhomocysteine metabolic pools on cytosine methylation of the tobacco genome, *European Journal of Biochemistry* 252 (1998) 347-352.
- [94] Wang S., Zhu J., Evidence for a relief of repression mechanism for activation of the human telomerase reverse transcriptase promoter, *The Journal of Biological Chemistry* 278 (2003) 18842-18850.
- [95] Wang S., Hu C., Zhu J., Transcriptional silencing of a novel hTERT reporter locus during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells, *Molecular Biology of the Cell* 18 (2007) 669-677.
- [96] Wick M., Zubov D., Hagen G., Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT), *Gene* 232 (1999) 97-106.
- [97] Ogrocká A., Sýkorová E., Fajkus J., Fojtová M., Developmental silencing of the AtTERT gene is associated with increased H3K27me3 loading and maintenance

- of its euchromatic environment, *The Journal of Experimental Botany* 63 (2012) 4233-4241.
- [98] Tupý J., Alterations in polyadenylated RNA during pollen maturation and germination, *BIOLOGIA PLANTARUM* 24 (1982) 331-340.
- [99] Tupý J., Developmental changes in gene expression during pollen differentiation and maturation in *Nicotiana tabacum* L, *BIOLOGIA PLANTARUM* 25 (1983) 231-237.
- [100] <http://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/references/ambion-tech-support/nuclease-enzymes/turbo-dna-free-second-digest-protocol.html>. [cited 2014 1.12.]
- [101] Dellaporta S., Wood J., Hicks J., A plant DNA mini preparation: Version II., *Plant Molecular Biology Reporter* 1 (1983) 19-21.
- [102] <http://eu.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR>. [cited 2014 1.12.]
- [103] Bustin S.A., (Ed.), *A-Z of quantitative PCR*, University Line (IUL) La Jolla, CA, USA, 2004.
- [104] Bustin S.A., Beneš V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubišta M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T., The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments, *Clinical Chemistry* 55 (2009) 611-622.
- [105] Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2-nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1987.
- [106] [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762003000500018](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762003000500018). [cited 2014 1.12.]
- [107] <http://www.bio.brandeis.edu/haberlab/jehsite/chIP.html>. [cited 2014 1.12.]
- [108] Hetzl J., Foerster A.M., Raidl G., Mittelsten Scheid O., CyMATE: a new tool for methylation analysis of plant genomic DNA after bisulphite sequencing, *Plant Journal* 51 (2007) 526-536.
- [109] [http://en.wikipedia.org/wiki/Combined\\_bisulfite\\_restriction\\_analysis](http://en.wikipedia.org/wiki/Combined_bisulfite_restriction_analysis). [cited 2014 1.12.]
- [110] Devereux T.R., Horikawa I., Anna C.H., Annab L.A., Afshari C.A., Barrett J.C., DNA methylation analysis of the promoter region of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene, *Cancer Research* 59 (1999) 6087-6090.
- [111] Zinn R.L., Pruitt K., Eguchi S., Baylin S.B., Herman J.G., hTERT is expressed in cancer cell lines despite promoter DNA methylation by preservation of

unmethylated DNA and active chromatin around the transcription start site,  
Cancer Research 67 (2007) 194-201.