

Helekalová Z., Evoluční a funkční analýza CenH3 genů u vybraných druhů z čeledi *Viciaceae* [Evolutionary and functional analysis of CenH3 genes in selected *Viciaceae* species], 44 pp., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

## Annotation

A Centromere is one of the most important chromosomal domains as it is essential for chromosome segregation during cell division. On a molecular level, it is defined by presence of kinetochore proteins, the most fundamental part of which is centromere-specific variant of histone H3, referred to as CenH3. The aim of this thesis was to identify the sequences encoding CenH3 histones in 13 legume species. The sequence identification was based on RT-PCR amplification of internal fragments using degenerate primers designed from conserved regions of previously characterized CenH3 sequences. Fragments at 5' and 3' termini were then amplified using 5' and 3' RACE methods. Complete coding sequences were obtained in 8 of 13 tested species, and in two additional species were amplified partial sequences of CenH3. Centromeric localization of CenH3 proteins in *Pisum sativum* and *Vicia faba* was confirmed by transformation experiments using fusion constructions of CenH3-coding sequences associated with YFP gene (yellow fluorescent protein).

Prohlašuji, že svoji magisterskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své magisterské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách.

30. dubna 2010 .....

## Poděkování

Mé poděkování patří především mému školiteli, Ing. Pavlu Neumannovi Ph.D., a to nejen za laskavý a přátelský přístup a trpělivost. Můj dík patří zároveň i RNDr. Jiřímu Macasovi Ph.D. a ostatním členům laboratoře molekulární cytogenetiky rostlin. V neposlední řadě děkuji za nejen morální podporu svým blízkým a své rodině.

# Obsah

I.	Cíle práce	3
II.	Úvod	4
III.	Materiály a metody	7
	i. Rostlinný materiál	7
	ii. Izolace RNA, změření koncentrace RNA	7
	iii. Ošetření RNA DNázou I a měření koncentrace RNA	8
	iv. Reverzní transkripce RNA a PCR amplifikace cDNA (RT-PCR)	8
	v. Klonování	10
	vi. Analyzování velikosti zaklonovaných fragmentů	10
	vii. Izolace plazmidů	11
	viii. Sekvenování	12
	ix. Amplifikace konců cDNA	13
	x. Příprava fúzních konstruktů	17
	xi. Transformace rostlin bakterií <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	18
IV.	Výsledky	20
	i. Analýza dostupných sekvencí CenH3 a navržení primerů pro RT-PCR	20
	ii. RT-PCR	20
	iii. Amplifikace 3' a 5' konců RNA metodou RACE	21
	iv. Získání celých sekvencí kódujících CenH3	23
	v. Ověření centromerické lokalizace CenH3 transkriptů	23
V.	Diskuze	25
VI.	Závěr	27
VII.	Obrazová a tabulková příloha	28
VIII.	Literatura	43

## Cíle práce

Cílem práce bylo studium genů kódujících CenH3. CenH3 protein představuje variantu histonu H3, která se nachází pouze v centromeře a je nepostradatelná pro její správnou funkci. Hlavním cílem bylo získat cDNA sekvence transkriptů CenH3 genů u vybraných druhů rostlin. Získání těchto sekvencí umožní sledovat evoluci CenH3 genů a pomůže identifikovat domény, popřípadě i jednotlivé aminokyseliny, nezbytné pro funkci CenH3 proteinů v daných druzích.

## Úvod

Genetická informace v podobě deoxyribonukleové kyseliny (DNA) všech eukaryotických organismů má podobu lineárních chromozomů, jejichž nedílnou součástí je i centromera, neboli místo primární konstriktce (cytogenetické vymezení této oblasti chromozomu). Existence centromery byla popsána ještě před znovuzobjevením Mendelových zákonů dědičnosti, neboť kolem roku 1880 si cytologové povšimli konstriktce, která svou lokalizací během mitózy odpovídá místu uchycení dělicího (achromatického) vřeténka (FLEMMING a kol. 1882; HENIKOFF, DALAL 2005). Centromera se funkčně uplatňuje zejména při buněčném dělení. V místě centromery dochází při dělení buňky k vytvoření kinetochoru, k němuž se připojují vlákna dělicího vřeténka, která odtáhnou dvě sesterské chromatidy k opačným pólům buňky. Proces rozdělení chromozómů při buněčném dělení musí probíhat zcela bezchybně, aby dceřinné buňky dostaly genetický materiál rovnoměrně (BLOOM, JOGLEKAR 2010). Každý chromozóm za standardního stavu disponuje právě jednou centromerou. Bylo pozorováno, že chromozómy bez centromer či jejich fragmenty bez centromer jsou ztráceny. Na druhé straně chromozomy s více než jednou centromerou bývají v průběhu segregace chromozómů roztrženy, přičemž výsledkem je opět ztráta části DNA.

Z hlediska DNA složení centromer jsou nejjednodušší bodové centromery u kvasinek (*Saccharomyces cerevisiae*) o velikosti pouhých 125 bází (NG, CARBON 1987; MALIK, HENIKOFF 2002). Většina ostatních druhů má ovšem centromery tvořené DNA o velikosti několika set až tisíců kilobází. U některých druhů majících tzv. holokinetické chromozomy (např. u nematod) jsou centromery dokonce rozptýlené po celé délce chromozómů (MALIK, HENIKOFF 2002). Výzkum centromerické DNA u řady druhů rostlin a živočichů ukázal, že centromery jsou ve většině případů tvořené satelitní DNA, jejíž velikost monomeru se blíží velikosti DNA připadající na jeden nukleozóm (TALBERT a kol. 2002). Charakteristickým znakem centromerických satelitních repetit je jejich rychlá divergence (HENIKOFF a kol. 2001, JIANG a kol. 2003). Zatímco pozice centromer je udržována po miliony let (DAWE, HENIKOFF 2006), centromerické sekvence nejsou často konzervované ani mezi blízkými příbuznými druhy (TALBERT a kol. 2002). Na druhé straně sekvence centromerické DNA mezi různými chromozómy stejného druhu vykazují velkou podobnost. Role centromerické satelitní DNA pro funkci centromer nebyla doposud uspokojivě vysvětlena, ale předpokládá se, že je spíše malá nebo dokonce žádná. Experimenty s inzercí centromerické DNA do jiných míst chromozómů ukázaly, že samotná centromerická DNA nepostačuje k vytvoření nové centromery. Naopak analýzou neocentromer bylo zjištěno, že nová centromera se může vytvořit i v místech, které nemají žádnou sekvenční podobnost s centromerickými sekvencemi daného druhu (MALIK, HENIKOFF 2002). Jakmile ale k nahrazení původní centromery neocentromerou jednou

dojde, je tato nová centromera stabilní a plně funkční, přestože její složení DNA je zcela jiné.

Na rozdíl od vysoké sekvenční variability centromerické DNA je proteinové složení centromer různých druhů velice podobné. Centromerické proteiny jsou součástí buď vnitřního nebo vnějšího kinetochoru (YU a kol. 2000; TALBERT a kol. 2002; HOOPEN a kol. 2002; ZHONG a kol. 2002; JIANG a kol. 2003). Vnější kinetochorové proteiny jsou přechodné a jejich přítomnost je nezbytná pouze během segregace chromozomů. Oproti tomu funkcí proteinů vnitřního kinetochoru je interakce se sekvencemi centromerické DNA a vytvoření specializovaného typu centromerického chromatinu (JIANG a kol. 2003). Základní složkou vnitřního kinetochoru je varianta H3 histonu nazývaná CenH3 (CHOO 2001; HENIKOFF a kol. 2001; JIANG a kol. 2003), která se nachází výhradně v centromerách. Protože histony CenH3 byly objeveny u více modelových organismů nezávisle na sobě, jsou pro tento typ histonu používány různé názvy u různých druhů: CenH3 u rostlin, CENP-A u člověka a dalších savců, Cid u drozofily, TetCENP u tetrahymeny, u kvasinky Cse4 (*S. cerevisiae*), *cnp1* a *sim2* u *S. pombe* (KAMAKA, BIGGINS 2008). Histony CenH3 nahrazují histon H3 v centromerických nukleozómech, takže histonový oktamer centromerického nukleozómu se sestává z dvojic histonů H2A, H2B, CenH3 a H4. Podrobným studiem centromerického chromatinu bylo zjištěno, že se nukleozómy obsahující histon CenH3 nachází v krátkých blocích, které se střídají s bloky nukleozómů obsahujících histon H3. V kondenzovaných chromozómech jsou bloky nukleozómů obsahujících histon H3 soustředěny uvnitř chromozómu, zatímco nukleozómy s histonem CenH3 jsou lokalizovány na periferii chromozómů a umožňují sestavení kompletního kinetochoru. (KAMAKA, BIGGINS 2008).

Struktura CenH3 je podobná jako u všech ostatních typů histonů obsahujících konzervovanou HFD doménu (histone fold domain) na C-konci a unikátní N-konec. Zatímco HFD doména histonových proteinů je klíčová pro sestavení funkčního nukleozómu, N-terminální konec histonů je důležitý především pro interakce s jinými proteiny (KAMAKA, BIGGINS 2008). U mnoha organismů jsou hlavní histonové proteiny kódované více geny (KAMAKA, BIGGINS 2008). Oproti tomu má většina dosud prostudovaných druhů pouze jeden gen pro CenH3. Histon CenH3 se od histonu H3 liší především sekvencí na N-konci, který je u CenH3 velmi variabilní a to i u blízké příbuzných druhů. Naopak HFD doména je sekvenčně podobná jak mezi CenH3 histony z různých druhů, tak mezi CenH3 a H3. Nicméně, na rozdíl od histonů H3, jejichž sekvence jsou téměř identické mezi všemi druhy euakaryot, jsou histony CenH3 variabilní i v úseku HFD domény. Část HFD domény histonu CenH3 v oblasti L1 smyčky zajišťuje lokalizaci CenH3 histonů v centromerách. Tato část HFD domény je zcela odlišná od příslušného úseku histonu H3 a je současně nejvíce variabilním úsekem mezi CenH3 histony z různých druhů.

Objev histonu CenH3 umožnil intenzivní studium centromer na molekulární úrovni, protože svou lokalizací zcela přesně vymezuje oblast chromozómu, na které se vytváří kinetochor. Protilátky vytvořené proti tomuto proteinu byly u řady druhů využity pro imunoprecipitaci centromerického chromatinu (ChIP) a následnou charakterizaci centromerické DNA. U některých druhů s kompletně osekvenovanými genomy byly pomocí ChIP určeny dokonce celé funkční domény centromer (HALL a kol. 2002). U rostlin byly sekvence histonů CenH3 popsány a využity pro studium centromer jen u několika málo druhů, jmenovitě rýže seté (*Oryza sativa*), kukuřice seté (*Zea mays*), pšenice seté (*Triticum aestivum*), ječmene obecného (*Hordeum vulgare*), cukrové třtiny (*Saccharum officinarum*), biky sněžné (*Luzula nivea*), sóji luštinaté (*Glycine max*) a *A. thaliana* (YU a kol. 2002, QI a kol. 2004, ALBERT a kol. 2005, ZHONG kol. 2002). Využití CenH3 pro studium centromer u širšího spektra druhů brání jednak velká variabilita v sekvencích CenH3 histonů mezi různými druhy a zároveň nedostatek těchto sekvencí v databázi GenBank.

Cílem této práce bylo získat a charakterizovat sekvence histonů CenH3 u 13 druhů čeledi *Viciaceae* a u některých z nich prokázat centromerickou lokalizaci. Druhy čeledi *Viciaceae* jsou v laboratoři molekulární cytogenetiky (Biologické centrum AV ČR, Ústav molekulární biologie rostlin) dlouhodobě používány jako modely pro studium složení a evoluce genomů rostlin. Identifikace sekvencí CenH3 histonů měla připravit půdu pro budoucí výzkum sekvenční struktury a evoluční dynamiky centromer těchto druhů. Strategie získání sekvencí kódujících histon CenH3 byla založena na amplifikaci relativně konzervované vnitřní části kódujícího úseku pomocí RT-PCR s degenerovanými primery, po níž následovala amplifikace konců metodami 3' a 5' RACE s druhově specifickými primery.

Předběžná analýza sekvencí kódujících CenH3 histon u rostlin odhalila značnou variabilitu i mezi poměrně blízce příbuznými druhy. Segmenty, které vykazovaly vyšší úroveň podobnosti mezi různými druhy, byly zároveň také podobné k sekvencím kódujícím histon H3. Pilotní experimenty provedené v laboratoři molekulární cytogenetiky ukázaly, že primery navržené z těchto nejvíce konzervovaných oblastí CenH3 amplifikují při RT-PCR reakcích přednostně sekvence kódující histon H3. Pro úspěšné řešení tohoto projektu bylo proto nutné navrhnout takové primery, které by byly univerzální pro co možná nejširší spektrum druhů čeledi *Viciaceae* a přitom co nejvíce specifické pouze pro sekvence CenH3. Pokusy se silně degenerovanými primery navrženými podle proteinových a DNA sekvencí širokého spektra rostlinných druhů nevedly k výraznému úspěchu. Proto jsme se zaměřili pouze na sekvence pocházející z druhů patřících do čeledi *Viciaceae*.

## Materiály a metody

### i. Rostlinný materiál

Semena vikve panonské cv. Dětenická (*Vicia pannonica*), bobu setého cv. Merkur (*Vicia faba*) a jetele lučního cv. Tábor (*Trifolium pratense*) byla zakoupena v Osiva Boršov. Semena hrachu setého cv. Terno (*Pisum sativum*) byla poskytnuta firmou Selgen Praha. Semena druhů cizrna beraní cv. Irenka (*Cicer arietinum*) a pískavice řecké seno cv. Hanka (*Trigonella foenum-graecum*) byla zakoupena ve Výzkumném ústavu pícninářském, Troubsko. Semena vikve seté cv. Ebena (*Vicia sativa*) byla získána ve Šlechtitelské stanici Horní Moštěnice. Semena vikve narbonské cv. Ikarda (*Vicia narbonensis*), vikve huňaté (*Vicia villosa*), vikve plotní (*Vicia sepium*), vikve cizí (*Vicia peregrina*) a vikve hrachorovité (*Vicia lathyroides*) byla získána v Agritec Šumperk a IPK Gatersleben (Německo). Semena komonice lékařské (*Melilotus officinalis*) byla sebrána z divoce rostoucích rostlin v chatové oblasti Želízkův Mlýn (Strážkovice, okres České Budějovice). Vzorke listů hrachoru široolistého (*Lathyrus latifolius*) byly poskytnuty paní Štěpančíkovou (laboratoř molekulární cytogenetiky, Ústav molekulární biologie rostlin, České Budějovice).

### ii. Izolace RNA

RNA byla izolována z listových pletiv pomocí extrakce Trizolem: 1 g mladých lístků zmražených v kapalném dusíku byl důkladně rozetřen v třecí misce a ve stále zmraženém stavu byl přemístěn do centrifugační zkumavky s 10 ml Trizolu (Trizol®Reagent, Invitrogen). Tato podchlazená směs Trizolu a homogenizovaného pletiva byla intenzivně 2 – 3 minuty protřepávána až do úplného rozmražení a poté byla inkubována 5 minut při pokojové teplotě. Následovalo přidání 2 ml chloroformu, intenzivní protřepání po dobu 15 vteřin, a inkubace 3 minuty při pokojové teplotě. Oddělení vodní fáze obsahující rozpuštěnou RNA bylo provedeno centrifugací vzorku při 4 °C, 8 500 xg, 10 minut (Centrifuga Avanti™ J-25 od firmy Beckman Coulter™, rotor JA 25.50). K odebrané svrchní vodní fázi bylo přidáno 6 ml chloroformu. Po intenzivním protřepání a následné inkubaci při pokojové teplotě po dobu 3 minut byl vzorek centrifugován za podmínek popsaných výše. Postup centrifugace, odebrání horní vodní fáze a přidání chloroformu byl opakován až do úplného vymizení prstence bílé sraženiny na rozhraní chloroformu a vodní fáze (zpravidla 2x – 3x). RNA byla vysrážena přidáním vychlazeného isopropanolu k odebrané vodní fázi v poměru 1:1. Po 20 – 30 minutové inkubaci při pokojové teplotě byl vzorek centrifugován při 4 °C, 10 000 xg, 10 minut. Získaný pelet RNA byl po odstranění supernatantu promyt 1 ml 75% ethanolu a centrifugován za předchozích podmínek. Po stočení a odstranění ethanolu byl pelet RNA vysušen a rozpuštěn ve 200 µl DEPC H<sub>2</sub>O.

Při práci s RNA byl používán pouze nový sterilní nebo důkladně vysterilizovaný laboratorní materiál. Byly využívány výhradně takové chemikálie, komerční roztoky a enzymy s certifikátem potvrzujícím absenci RNáz. Roztoky připravované v naší laboratoři a skleněné nádoby byly před sterilizací ošetřeny 1% DEPC (diethyl pyrokarbonát). Při manipulaci s RNA byla používána pouze pro práci s RNA určená sada pipet a sterilní špičky s filtrem od firmy Neptune.

### **iii. Ošetření RNA DNázou I a měření koncentrace RNA**

Potenciální kontaminace DNA byla v RNA vzorcích odstraněna pomocí kitu Turbo DNA-free™ (Ambion) podle postupu doporučeného výrobcem. Do mikrozkušavky na 1,5 ml byly napipetovány následující složky:

1) RNA	5 µg
2) 10x koncentrovaný pufr	5 µl
3) Dnáza I (2U/µl)	1 µl
4) H <sub>2</sub> O	objem zbývající do 50 µl

Reakční směs byla inkubována při teplotě 37 °C po dobu 30 minut. Reakce byla ukončena přidáním 5 µl inaktivačního činidla (součást kitu). Vzorek byl dále inkubován 2 minuty při pokojové teplotě za občasného protřepávání a následně stočen na centrifuze (centrifuga Hettich UNIVERSAL 32 R) při 20 °C, 14 000 ot./min., 10 min. Supernatant byl odebrán do nové mikrozkušavky a znovu centrifugován za předchozích podmínek. Koncentrace RNA byla měřena spektrofotometricky pomocí přístroje Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA).

### **iv. Reverzní transkripce RNA a PCR amplifikace cDNA (RT-PCR)**

Reverzní transkripce, tj. přepis RNA do cDNA, byla provedena pomocí kitu „Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit“ od firmy Roche podle návodu výrobce. Pro každou reakci s reverzní transkriptázou (RT+) byla provedena negativní kontrola bez reverzní transkriptázy (RT-), která měla po PCR amplifikaci odhalit potenciální kontaminaci DNA v RNA vzorcích. Vzorky byly inkubovány za daných teplot pomocí přístroje DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler od firmy BIO RAD. Nejprve byla namíchána směs A, která byla inkubována při teplotě 65 °C po dobu 10 minut.

Směs A	RT+	RT-
DNázou I ošetřená RNA (1 µg/µl)	5 µl	5 µl
primer 3'RACE_oligoT (50 µM) (5' GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT TTT TTV 3')	1 µl	1 µl
H <sub>2</sub> O	5,4	5,4
celkový objem	11,4 µl	11,4 µl



Po zchlazení mikrozkušavek se směsí A na ledu bylo ke každému vzorku přidáno 8,6 µl směsi B.

Směs B	RT+	RT-
5x koncentrovaný pufr	4 µl	4 µl
inhibitor Rnáz (40U/µl)	0,5 µl	0,5 µl
směs deoxyribonukleotidů (10 mM)	2 µl	2 µl
DTT (0,1 M)	1 µl	1 µl
reverzní transkriptáza (10U/µl)	1,1 µl	0
H <sub>2</sub> O	0	1,1 µl
celkový objem	8,6 µl	8,6 µl

Reverzní transkripce byla provedena za následujících podmínek: 45 °C - 50 min, 50 °C - 10 min. Reakce byla zastavena zahřátím na 85 °C po dobu 10 min a následným zchlazením vzorků na 4 °C.

cDNA získaná z RT+ reakcí byla použita jako templát pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR; Polymerase Chain Reaction). Jako negativní kontrola byla ke každému vzorku RT+ udělána reakce RT- (bez reverzní transkriptázy). Použité primery na RT-PCR zobrazuje tab. 1.

Rozpis na PCR pro 1 reakci: (objem jedné reakce = 20 µl)

1) templát	0,5 µl
2) dNTPs (2mM)	2 µl
3) 10x koncentrovaný PCR pufr	2 µl
4) MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0,6 µl
5) primer F (4µM)	1 µl
6) primer R (4µM)	1 µl
7) Taq polymeráza (5U/ µl)*	0,16 µl *Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen)
8) H <sub>2</sub> O	12,74 µl

Profil PCR:

1) 94 °C	3 min	
2) 94 °C	30 s	
3) 55 °C	30 s	→ kroky 2 – 4 byly opakovány 34x
4) 72 °C	40 s	
5) 72 °C	10 min	

Produkty RT-PCR byly analyzovány na 1% agarózovém gelu.

## v. Klonování

Ke klonování DNA byl použit kit „TOPO TA Cloning Kit For Sequencing“ s vektorem pCR4-TOPO a kompetentními buňkami One Shot TOP10 (Invitrogen, USA). Klonovací reakce složená z 0,5 µl solného roztoku (1,2M NaCl s 0,06M MgCl<sub>2</sub>), 2 µl DNA a 0,5 µl klonovacího vektoru pCR4-TOPO byla inkubována 30 minut při pokojové teplotě. Po jejím zchlazení na ledu bylo k reakci přidáno 17 - 25 µl pozvolna na ledu rozmražených kompetentních buněk. Směs klonovací reakce a kompetentních buněk byla inkubována 10 minut na ledu. Transformace buněk byla provedena umístěním vzorků na 30 vteřin do vodní lázně o teplotě 42 °C. Po tomto teplotním šoku bylo ke vzorkům přidáno po 150 µl média SOC předeřátého na 37 °C a vzorky byly inkubovány na třepačce 1 hodinu při teplotě 37 °C a frekvenci 220 ot./min (třepačka Classic C24 od firmy New Brunswick Scientific). Transformované bakterie byly sterilně vysety na Petriho misky s LB médiem (LB Agar, Sigma) obsahujícím antibiotikum kanamycin (SERVA) nebo carbenicilin (Carbenyciline disodium; Duchefa Biochemie) o koncentraci 50 mg/l. Petriho misky byly inkubovány 16 - 20 hodin v termoboxu při teplotě 37 °C. Po dobu nejvýše jednoho měsíce byly získané bakteriální kolonie uchovávány na Petriho miskách při 4 °C, dlouhodobě byly jednotlivé klony uskladněny při -80 °C. V případě dlouhodobého uchovávání byly dané kolonie napěstovány v roztoku 7,5% glycerolu v LB médiu s příslušným antibiotikem v mikrotitračních destičkách.

## vi. Analyzování velikosti zaklonovaných fragmentů

Velikost zaklonovaných fragmentů (neboli inzertů) v klonovacím vektoru byla zjišťována pomocí PCR reakcí, v níž byly použity primery M13F (sekvence TGTAACACGACGGCCAGT) a M13R (sekvence AGGAAACAGCTATGACCATG). Jako templát byl použit malý vzorek bakteriální kolonie nebo zásobní kultury bakterií. Z každé varianty klonování bylo testováno zpravidla 8 – 24 bakteriálních kolonií, přičemž počet vybraných kolonií byl přímo úměrný variabilitě klonovaných PCR produktů. PCR reakce byla provedena s použitím přístroje DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler od firmy BIO RAD.

Rozpis PCR z bakteriálních kolonií pro 1 reakci: (objem jedné reakce = 10 µl)

1) dNTPs	2mM	1 µl	
2) 10x koncentrovaný pufr		1 µl	
3) MgCl <sub>2</sub>	25mM	0,6 µl	
4) primer M13F	4µM	0,5 µl	
5) primer M13R	4µM	0,5 µl	
6) Taq polymeráza (5U/ µl)*		0,08 µl	*aTaq Polymerase (Promega)
7) H <sub>2</sub> O		6,32 µl	

Reakční profil PCR z bakteriálních kolonií:

- 1) 94 °C            3 min
- 2) 94 °C            30 s
- 3) 55 °C            30 s        → kroky 2 – 4 opakovány 35x
- 4) 72 °C            40 s
- 5) 72 °C            10 min

Produkty PCR reakce byly analyzovány na 1,5% agarózovém gelu. Pro další práci byly vybírány pouze klony nesoucí fragmenty očekávané velikosti.

### **vii. Izolace plazmidů**

Na izolaci plazmidů byl použit kit „Wizard Plus Minipreps DNA Purification System“ od firmy Promega (USA) a během izolace byla používána centrifuga Hettich UNIVERSAL 32 R. Nejprve byly bakterie inokulovány do tekutého LB média (3 ml) s antibiotikem (kanamycin nebo carbenicilin o koncentraci 50 mg/l) a inkubovány na třepačce po dobu 14 - 16 hodin při teplotě 37 °C a frekvenci 220 ot./min (třepačka Classic C24 od firmy New Brunswick Scientific). Bakterie z narostlé kultury byly stočeny v 2 ml mikrozkušavce (20 °C, 14 000 ot./min, 10 minut). Po odpipetování supernatantu byl bakteriální pelet resuspendován v 250 µl resuspendačního roztoku (50mM Tris-HCl o pH 7,5; 10mM EDTA; 100 µg/ml RNázy A). K suspenzi bakterií bylo přidáno 250 µl denaturačního roztoku (0,2M NaOH; 1% SDS) a 10 µl alkalické proteázy. Po opatrném promíchání obsahu mikrozkušavek opakovaným převrácením byly vzorky inkubovány 5 minut při pokojové teplotě. Ke každému vzorku bylo nakonec přidáno 350 µl neutralizačního roztoku (1,32M octan draselný o pH 4,8). Vzniklá sraženina byla stočena (20 °C, 14 000 ot./min, 10 minut) na dno mikrozkušavky a jednotlivé supernatanty byly přelity do kolonek vsazených do nových mikrozkušavek. Při následné centrifugaci (20 °C, 14 000 ot./min, 1 min) zůstala DNA zachycena v kolonkách, zatímco zbytek roztoku byl zachycen v mikrozkušavkách. Obsah mikrozkušavek byl odstraněn, do kolonek bylo napipetováno po 750 µl promývacího roztoku (80mM octan draselný; 8,3mM Tris-HCl o pH 7,5; 40µM EDTA; 55% ethanol) a vzorky byly centrifugovány (20 °C, 14 000 ot./min, 1 min). Stejný postup byl zopakován s 250 µl promývacího roztoku s rozdílem že centrifugace trvala 2 minuty. Nakonec byly kolonky dány do 1,5ml mikrozkušavek a DNA byla z kolonek uvolněna přidáním 50 µl sterilní H<sub>2</sub>O do kolonek a následnou centrifugací (20 °C, 12 000 ot./min, 1 min). Koncentrace plazmidů byla změřena spektrofotometricky pomocí přístroje Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA). Plazmidy byly analyzovány na 0,7% agarózovém gelu a skladovány v mrazícím boxu při teplotě - 20°C.

### **viii. Sekvenování**

Na sekvenační reakci byl použit kit „BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“ (Applied Biosystems), vzorky byly inkubovány za daných teplot pomocí přístroje DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler od firmy BIO RAD.

Rozpis sekvenační reakce: (o objemu 10  $\mu$ l)

- |                                      |                               |
|--------------------------------------|-------------------------------|
| 1) 4 $\mu$ M primer (M13F nebo M13R) | 1,25 $\mu$ l                  |
| 2) pufr                              | 1,50 $\mu$ l                  |
| 3) BigDye                            | 1,00 $\mu$ l                  |
| 4) DMSO                              | 0,50 $\mu$ l                  |
| 5) plazmidová DNA                    | 50-150 ng                     |
| 6) H <sub>2</sub> O                  | objem zbývající do 10 $\mu$ l |

Profil sekvenační reakce:

- |          |                                |                             |
|----------|--------------------------------|-----------------------------|
| 1) 96 °C | 3 min                          |                             |
| 2) 96 °C | 10 s                           |                             |
| 3) 58 °C | 4 min                          | → kroky 1 – 3 opakovány 49x |
| 4) 72 °C | 7 min                          |                             |
| 5) 4 °C  | do vyjmutí vzorků z termocyklu |                             |

Sekvenační reakce byly přečištěny pomocí kitu AgenCourt CleanSEQ (Beckman Coulter Genomics, USA). Ke každému vzorku sekvenační reakce bylo přidáno 10  $\mu$ l magnetických kuliček z kitu a 42  $\mu$ l 85% ethanolu. Vzorky byly promíchány pipetou a umístěny na 3 – 5 minut do magnetického stojánku, kde magnetické kuličky s navázanou DNA vytvořily prstenec na stěně mikrozkuhavky. Po odstranění supernatantu byly kuličky promyty 200  $\mu$ l 85% ethanolu. Poté byl veškerý ethanol odpipetován, vzorky byly vyndány z magnetického stojánku a magnetické kuličky byly resuspendovány v 75  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. Nakonec byly mikrozkuhavky vloženy zpět do magnetického stojánku a supernatant s uvolněnou DNA byl odpipetován do nových mikrozkuhovek. Přečištěné produkty sekvenační reakce byly odeslány do laboratoře Dr. Doležela (UEB Olomouc), kde byly analyzovány na kapilárním sekvenátoru. Získané sekvence byly zpracovány v programu Staden (STADEN a kol. 1998). Vzájemné porovnání sekvencí CenH3 z různých druhů bylo provedeno pomocí programů ClustalX (LARKIN a kol. 2007) a Muscle (EDGAR 2004). Segmenty konzervované mezi různými CenH3 histony byly zvýrazněny v programu boxshade (součást softwaru EMBOSS; RICE a kol. 2000).

## ix. Amplifikace konců cDNA

Amplifikace 3' a 5' konců cDNA byla provedena metodami 3' a 5' RACE. Narozdíl od RT-PCR předcházelo reverzní transkripci RNA do cDNA několik kroků (kroky 1 - 4), jejichž smyslem bylo umožnit ligaci adapteru pouze na 5' konce celých mRNA molekul (obr. 1). Po reverzní transkripci upravených RNA molekul do cDNA následovala PCR amplifikace pomocí druhově specifických CenH3 primerů a primerů komplementárních k sekvencím na 3' a 5' koncích cDNA (tab. 5, tab. 6). Schematické znázornění 3' a 5' RACE zobrazuje obr. 2.

### 1. Ošetření RNA DNázou I:

Potenciální kontaminace DNA byla v RNA vzorcích odstraněna pomocí Dnázy I (Ambion). Do mikrozkušavky na 1,5 ml byly napipetovány následující složky:

- |                           |                          |
|---------------------------|--------------------------|
| 1) RNA                    | 15 µg                    |
| 2) 10x koncentrovaný pufr | 5 µl                     |
| 3) DNáza I (2U/µl)        | 1 µl                     |
| 4) DEPC H <sub>2</sub> O  | objem zbývající do 50 µl |

Mikrozkušavky s reakční směsí byly inkubovány při 37 °C po dobu 30 minut. Reakce byla zastavena přidáním 5 µl 25mM EDTA (Life Technologies). RNA byla přečištěna postupnou extrakcí ve fenol-chloroformu (5:1) a chloroformu a nakonec vysrážena přidáním jednoho objemu isopropanolu a 1/10 objemu 3M octanu sodného (pH 5,5). Vysrážená RNA byla zcentrifugována (4 °C, 14 000 ot./min, 15 min; centrifuga Hettich UNIVERSAL 32 R) na dno mikrozkušavky. RNA pelet byl promyt 200 µl 70% ethanolu, vysušen a nakonec rozpuštěn v 8 µl DEPC H<sub>2</sub>O. Před dalším použitím byla pro každý vzorek změřena koncentrace RNA a zhodnocena její kvalita na 1% agarózovém gelu.

### 2. Defosforylace RNA

Účelem defosforylace RNA bylo odstranit fosfátovou skupinu z 5' konců nekódujících RNA a částečně degradovaných molekul mRNA a tím znemožnit jejich pozdější ligaci k adapteru a následnou amplifikaci v dalších krocích RACE. Nepoškozené molekuly mRNA zůstaly v tomto kroku nedotčeny, protože jejich 5' konec byl chráněn čepičkou.

Složení reakční směsi:

- |                             |                          |  |
|-----------------------------|--------------------------|--|
| 1) RNA                      | 5 µg                     |  |
| 2) 10x koncentrovaný pufr   | 1 µl                     |  |
| 3) Inhibitor RNáz (40U/µl)* | 1 µl                     | *Protector RNase Inhibitor, 40U/µl (Roche) |
| 4) CIP (20U/µl)             | 0,5 µl                   |  |
| 5) DEPC H <sub>2</sub> O    | objem zbývající do 10 µl |  |

CIP = Calf Intestine Alkaline Phosphatase, 20U/µl (Invitrogen)

Defosforylační reakce byly inkubovány při 50 °C po dobu 60 minut. Defosforylovaná RNA byla přečištěna způsobem popsaným v bodě 1. Pro zvýšení účinnosti srážení isopropanolem byly navíc přidány 4 µl roztoku glykogenu (5mg/µl). RNA byla nakonec rozpuštěna v 8,75 µl DEPC H<sub>2</sub>O. 1 µl RNA byl odebrán pro kontrolu kvality na 1% agarózovém gelu.

### 3. Odstranění mRNA čepičky

Cílem tohoto kroku bylo odstranit čepičku a zpřístupnit tak fosfátovou skupinu na 5' koncích mRNA molekul.

Složení reakční směsi:

- |                            |         |  |
|----------------------------|---------|--|
| 1) Defosforylovaná RNA     | 7,75 µl |  |
| 2) 10x koncentrovaný pufr  | 1,0 µl  |  |
| 3) Inhibitor RNáz (40U/µl) | 1,0 µl  |  |
| 4) TAP (10U/µl)            | 0,25 µl | TAP...Tobacco Acid Phosphatase, 10U/µl (Epicentre) |

Vzorky s namíchanými reakčními směsmi byly inkubovány při 37 °C po dobu 60 minut. Přečištění a vysrážení RNA bylo provedeno stejně jako v kroku 1. RNA byla nakonec rozpuštěna v 7,75 µl DEPC H<sub>2</sub>O, z čehož byl 1 µl RNA opět odebrán pro kontrolu kvality RNA na 1% agarózovém gelu.

### 4. Ligace adapteru

Vzorky s 6,75 µl RNA z předchozího kroku byly smíchány s 0,25 µl RNA adapteru GeneRacer\_RNA\_oligo (sekvence CGACUGGAGCACGAGGACACUGACAUGGACUGAAGGAGUAGAAA) a následně inkubovány 5 minut při 65 °C za účelem rozvolnění sekundárních struktur RNA. Vzorky byly poté zchlazeny na ledu a ke každému z nich bylo přidáno:

- |                            |      |   |
|----------------------------|------|---|
| 1) 10x koncentrovaný pufr  | 1 µl |   |
| 2) ATP (10mM)              | 1 µl |   |
| 3) Inhibitor RNáz (40U/µl) | 1 µl |   |
| 4) T4 RNA ligáza (5U/µl)*  | 1 µl | * T4 RNA Ligase 5U/µl (New England Biolabs) |

Vzorky byly inkubovány 60 minut při 37 °C. Přečištění a vysrážení RNA bylo provedeno stejně jako v kroku 1. RNA byla nakonec rozpuštěna v 9 µl DEPC H<sub>2</sub>O. 1 µl od každého vzorku byl odebrán pro kontrolu kvality RNA na 1% agarózovém gelu.

### 5. Reverzní transkripce

Reverzní transkripce byla provedena pomocí kitu „SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR“ (Invitrogen, USA) podle návodu výrobce. Nejprve byly připraveny vzorky s 10 µl roztoku A, k nimž bylo po 5-minutové inkubaci při 65 °C a následném zchlazení na ledu přidáno

10  $\mu$ l roztoku B.

roztok A:

- |                                 |           |
|---------------------------------|-----------|
| 1) RNA s naligovanými adaptéry  | 8 $\mu$ l |
| 2) dNTPs (2mM)                  | 1 $\mu$ l |
| 3) primer 3'_RACE_oligoT (50mM) | 1 $\mu$ l |
- (5' GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT TTV 3')

roztok B:

- |                                       |           |
|---------------------------------------|-----------|
| 1) 10x koncentrovaný pufr             | 2 $\mu$ l |
| 2) MgCl <sub>2</sub> (25mM)           | 4 $\mu$ l |
| 3) DTT (0,1 M)                        | 2 $\mu$ l |
| 4) RnaseOut (40U/ $\mu$ l)            | 1 $\mu$ l |
| 5) SuperScript III RT (200U/ $\mu$ l) | 1 $\mu$ l |

Vzorky s kompletní reakční směsí byly inkubovány 50 minut při 50 °C. Reakce byla zastavena zahřátím vzorků na 85 °C po dobu 5 minut. Po zchlazení na ledu byl ke každému vzorku přidán 1  $\mu$ l Rnázy H (RNase H 2U/ $\mu$ l, Invitrogen) a RNA templát byl odstraněn následnou inkubací vzorků po dobu 20 minut při teplotě 37 °C.

### 3' RACE

Pomocí 3' RACE byly amplifikovány fragmenty na 3' koncích transkriptů CenH3 genů. Pro každý druh byly podle získaných vnitřních sekvencí CenH3 transkriptů navrženy 3 forward primery (tab. 3, tab. 5). Jako reverse primer byl použit AUAP\_3'RACE (tab. 5). Vzorky na 3' i 5' RACE reakce byly inkubovány na přístroji DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler od firmy BIO RAD.

Složení 3' RACE reakce (15  $\mu$ l):

- |                                     |              |
|-------------------------------------|--------------|
| 1) dNTPs (2mM)                      | 1,5 $\mu$ l  |
| 2) 10x koncentrovaný pufr           | 1,5 $\mu$ l  |
| 3) MgCl <sub>2</sub> (50mM)         | 0,45 $\mu$ l |
| 4) forward primer (4 $\mu$ M)       | 0,5 $\mu$ l  |
| 5) AUAP_3'RACE (4 $\mu$ M)          | 0,5 $\mu$ l  |
| 6) Platinum Taq polym.(5U/ $\mu$ l) | 0,12 $\mu$ l |
| 7) H <sub>2</sub> O                 | 9,93 $\mu$ l |
| 8) cDNA templát *                   | 0,5 $\mu$ l  |

\* Ke každé kombinaci primerů u 3' RACE byla udělána negativní kontrola, ve které byl templát nahrazen 0,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O.

#### Profil reakce 3' RACE:

- 1) 94 °C                    3 min
- 2) 94 °C                    30 s
- 3) 55 °C                    30 s     → kroky 2 – 4 opakovány 35x
- 4) 72 °C                    3 min
- 5) 72 °C                    10 min
- 6) 4 °C                     do vyjmutí vzorků z termocykleru

Produkty reakce byly vyhodnoceny na 1% agarózovém gelu. Protože u některých reakcí 3' RACE bylo získáno buď příliš málo produktu, nebo naopak velké množství nespecifických produktů, byla u některých variant 3' RACE provedena ještě tzv. nested PCR. Při nested PCR byl jako templát použit produkt první amplifikace, přičemž byl použit forward primer z vnitřní části fragmentu amplifikovaného v první reakci. Primer AUAP\_3'RACE a amplifikační podmínky zůstaly stejné jako u první reakce.

#### 5' RACE

Pomocí 5' RACE byly amplifikovány fragmenty na 5' koncích transkriptů CenH3 genů. Pro každý druh byly podle získaných vnitřních sekvencí CenH3 transkriptů navrženy 3 reverse primery (tab. 4, tab. 6). Dva forward primery, RACER\_PN1 a RACER\_PN2, byly navrženy podle sekvence RNA adapteru naligovaného na 5' konec mRNA molekul (tab. 6). Složení 5' RACE reakce bylo téměř shodné s 3' RACE reakcí - rozdíl byl pouze v použitých primerech:

#### Složení 5' RACE reakce (15 $\mu$ l):

- |                                      |              |
|--------------------------------------|--------------|
| 1) dNTPs (2mM)                       | 1,5 $\mu$ l  |
| 2) 10x koncentrovaný pufr            | 1,5 $\mu$ l  |
| 3) MgCl <sub>2</sub> (50mM)          | 0,45 $\mu$ l |
| 4) RACER_PN1 (4 $\mu$ M)             | 0,5 $\mu$ l  |
| 5) reverse primer (4 $\mu$ M)        | 0,5 $\mu$ l  |
| 6) Platinum Taq polym. (5U/ $\mu$ l) | 0,12 $\mu$ l |
| 7) H <sub>2</sub> O                  | 9,93 $\mu$ l |
| 8) cDNA templát *                    | 0,5 $\mu$ l  |

\* Ke každé kombinaci primerů u 5' RACE byla udělána negativní kontrola, ve které byl templát nahrazen 0,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O.



Profil 5' RACE reakce:

- 1) 94 °C            3 min
- 2) 94 °C            30 s
- 3) 58 °C            30 s     → kroky 2 – 4 opakovány 2x
- 4) 72 °C            3 min
- 5) 94 °C            30 s
- 6) 57 °C            30 s     → kroky 5 – 7 opakovány 2x
- 7) 72 °C            3 min
- 8) 94 °C            30 s
- 9) 56 °C            30 s     → kroky 8 – 10 opakovány 2x
- 10) 72 °C           3 min
- 11) 94 °C           30 s
- 12) 55 °C           30 s     → kroky 11 – 13 opakovány 35x
- 13) 72 °C           3 min
- 14) 72 °C           10 min
- 15) 4 °C            do vyjmutí vzorků z termocyklu

Produkty 5' RACE reakcí byly vyhodnoceny na 1% agarózovém gelu. Ve většině případů nebyl po první 5' RACE reakci získán produkt v dostatečném množství a kvalitě. Proto po první reakci následovala ještě nested PCR, při které byl použit reverse primer z vnitřní části fragmentu amplifikovaného v první reakci a RACER\_PN1 byl vyměněn za RACER\_PN2. Profil reakce zůstal stejný jako při první amplifikaci. V případě nested PCR bylo zařazeno několik negativních kontrol (reakce jen s jedním primerem, a to s templátem nebo bez templátu), jejichž cílem bylo odhalit falešné produkty reakce.

#### **x. Příprava fúzních konstruktů**

Pro přípravu fúzních konstruktů byl použit rekombinační systém klonování Gateway. Fragments DNA kódující celý CenH3 protein byly získány RT-PCR amplifikací s použitím druhově specifických primerů (tab. 7) a následně byly zaklonovány do vstupního vektoru pCR8/GW/TOPO (Invitrogen). Po osekvenování a ověření správné orientace inzertu ve vektoru byly z vybraných klonů vyzolovány plazmidy pro rekombinační reakci s cílovým vektorem nesoucím kazetu s reportérovým genem (kit Gateway®LR Clonase™Enzyme Mix, Invitrogen). V této práci byly použity dva druhy cílových vektorů, pEarleyGate101 (pro sekvence CenH3 bez stop kodonu) a pEarleyGate104 (pro sekvence CenH3 se stop kodonem), obsahující stejný reportérový gen pro žlutý fluorescenční protein (YFP), ale lišící se jeho polohou (obr. 3) - souhrnný postup na obr. 4.

Složení rekombinační reakce:

plazmid 1 ( pCR8/GW/TOPO s inzertem kódujícím CenH3)	50 ng
plazmid 2 ( pEarleyGate101 nebo pEarleyGate104)	50 ng
klonáza*	1 $\mu$ l
TE pufr (pH 8)	objem zbývající do 5 $\mu$ l

\* Gateway LR Clonase<sup>TM</sup>II Enzyme Mix (Invitrogen)

Vzorky obsahující reakční směs byly inkubovány 1 hodinu při 37 °C. Poté bylo ke každému vzorku přidáno 0,5  $\mu$ l proteinázy K a inkubace při 37 °C pokračovala dalších 15 minut. Produkty této rekombinační reakce byly přímo transformovány do TOP10 buněk (transformace kompetentních buněk je popsána výše).

#### **xi. Transformace rostlin bakterií *Agrobacterium tumefaciens***

Pro transformační experimenty byl použit kmen *A. tumefaciens* A4-24 obsahující Ri plazmid z *A. rhizogenes*, jehož T-DNA má po vpravení do rostlinného genomu schopnost indukovat růst kořenů. Do tohoto kmene bakterie byl navíc vpraven příslušný rekombinantní plazmid pEarleyGate nesoucí v T-DNA oblasti konstrukt kódující fúzní protein CenH3 s YFP. Transformace bakterií plazmidem pEarleyGate byla provedena podle metody popsané Earleym a kol. (2006).

Semena vybraných druhů roslin byla opláchnuta v Erlenmeyerově baňce v 200 ml destilované vody s 10 -15 ml jaru a poté sterilizována nejprve 4 minuty ve 100 ml 70% ethanolu a poté v roztoku Sava (Savo : H<sub>2</sub>O = 1 : 9) dvakrát 20 minut. Po důkladném opláchnutí sterilní vodou byla semínka předklíčena po dobu 4 – 5 dnů na plotnách s mediem následujícího složení (na 1litr): 10 g agaru, 5 g sacharózy, 1 g kvasničného autolyzátu. Rostliny určené pro transformaci byly pěstované ve sterilních krabičkách na ½ MS mediu (MURASHIGE, SKOOG 1962) s 0,8% agarem bez sacharózy.

Transformace byla provedena na 7 – 10 dnů starých rostlinách. Bakteriální kultura *A. tumefaciens* byla napěstována v 5 ml LB média s kanamycinem (50mg/ml) na třepače při 28 °C po dobu 14 – 16 hodin (Incubator Shaker Series innova®44, New Brunswick Scientific). Z narostlé bakteriální kultury byly odpipetovány 2 ml do 2ml mikrozkušavek a bakterie byly stočeny na centrifuze při 20 °C, 7 000 ot./min, 3 minuty (centrifuga Hettich UNIVERSAL 32 R). Po odstranění supernatantu byly bakterie resuspendovány v 210  $\mu$ l LB média a pomocí inzulínové injekce aplikovány do rostlinek. Vpich a poškrábání pletiva v okolí vpichu (se zanecháním kapičky bakteriálního inokula) bylo provedeno v oblasti prvního a druhého internodia. Po přibližně 10 dnech byly na rostlinkách pozorovány v místě inokulace první kořínky (tzv. hairy roots). Po dalších 10 - 15 dnech byly jednotlivé kořínky sterilně přeneseny na Petriho misky s B5 mediem (Duchefa Biochemie Gamborg

B5 Medium Including Vitamins) s antibiotiky ticarcilin (Ticarcilin Disodium Mixture 15:1, 500 mg/l; Duchefa Biochemie), cefotaxim (Cefotaxime Na-Salt, 200 mg/l; SERVA) a glufosinátem (Glufosinate Amonium, 50  $\mu$ l/l) a heribicidem BASTA. Transformované kořínky byly prohlíženy na fluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse 600 a konfokálním mikroskopu Olympus.

## Výsledky

### **i. Analýza dostupných sekvencí CenH3 a navržení primerů pro RT-PCR**

Na základě dřívějších experimentů z laboratoře molekulární cytogenetiky nám byly již známy sekvence CenH3 z hrachu (*Pisum sativum*) a tolíce (*Medicago truncatula*). Dále byla v databázi GenBank nalezena jedna EST sekvence CenH3 ze sóji (*Glycine max*) a jedna genomická sekvence ze štirovníku růžkatého (*Lotus japonicus*). Po srovnání DNA sekvencí z těchto čtyř druhů bylo možné navrhnout tři částečně degenerované primery z každé strany vnitřní části kódující sekvence (tab. 1, obr. 5). Velký důraz při navrhování těchto primerů byl kladen na to, aby sekvence na jejich 3' koncích nekódovaly tytéž aminokyseliny, které se nacházejí v odpovídajících úsecích histonu H3.

### **ii. RT-PCR**

Pomocí RT-PCR s částečně degenerovanými primery jsme se pokusili amplifikovat vnitřní části sekvencí kódujících CenH3. Celkem bylo testováno 13 druhů: *Cicer arietinum*, *Vicia pannonica*, *Trigonella foenum-graceum*, *Melilotus officinalis*, *Lathyrus latifolius*, *Vicia faba*, *Vicia peregrina*, *Vicia lathyroides*, *Vicia sativa*, *Vicia narbonensis*, *Vicia villosa*, *Vicia sepium*, *Trifolium pratense* (tab. 2). Do RT-PCR experimentů byl zařazen také *Pisum sativum*, který sloužil jako pozitivní kontrola pro ověření funkčnosti navržených primerů. Testovací reakce na tomto druhu ukázaly, že u 8 z 9 možných kombinací primerů (tři primery z jedné strany × tři primery z druhé strany = 9) bylo možné amplifikovat produkty očekávané velikosti. Postupným zkoušením těchto primerů na dalších druzích byly získány produkty očekávané velikosti alespoň u jedné z kombinací u všech 13 testovaných druhů (obr. 6).

RT-PCR produkty z vybraných reakcí byly klonovány a z každé varianty klonování bylo sekvenováno několik klonů obsahujících inzerty předpokládané délky. Analýza získaných sekvencí ukázala velkou podobnost k dříve nalezené CenH3 sekvenci hrachu u 10 ze 13 druhů (*C. arietinum*, *V. pannonica*, *L. latifolius*, *V. faba*, *V. peregrina*, *V. lathyroides*, *V. narbonensis*, *V. villosa*, *V. sepium*, *T. pratense*; obr. 7). Všechny osekvenované klony tří zbývajících druhů, tedy *T. foenum-graceum*, *M. officinalis* a *V. sativa*, obsahovaly fragmenty jiných genů než CenH3.

Tabulka č. 2: Přehled RT-PCR reakcí u daných druhů

	<i>Pisum sativum</i>			<i>Cicer arietinum</i>			<i>Vicia pannonica</i>			<i>T. foenum-graceum</i>			<i>Melilotus officinalis</i>			<i>Lathyrus latifolius</i>			<i>Vicia faba</i>		
	12F	13F	14F	12F	13F	14F	12F	13F	14F	12F	13F	14F	12F	13F	14F	12F	13F	14F	12F	13F	14F
11R	+	+	+	+	X	N	+	+	N	+	X	X	+	X	X	+	+	N	X	+	X
15R	X	+	+	N	N	N	N	N	N	N	X	X	N	X	X	N	N	N	N	X	X
16R	+	+	+	N	X	N	N	X	N	+	X	X	+	X	X	+	X	N	+	+	X
	<i>Vicia peregrina</i>			<i>Vicia lathyroides</i>			<i>Vicia sativa</i>			<i>Vicia narbonensis</i>			<i>Vicia villosa</i>			<i>Vicia sepium</i>			<i>Trifolium pratense</i>		
	12F	13F	14F	12F	13F	14F	12F	13F	14F	12F	13F	14F	12F	13F	14F	12F	13F	14F	12F	13F	14F
11R	X	+	X	X	X	X	X	X	X	X	+	X	X	+	X	X	+	X	X	X	X
15R	N	X	X	N	X	X	N	X	X	N	X	X	N	X	X	N	X	X	N	X	X
16R	+	+	X	+	+	X	+	X	X	X	+	X	X	+	X	X	+	X	X	+	X

Vysvětlivky: 12F, 13F, 14F.....primery CenH3\_Legume12F, CenH3\_Legume13F, CenH3\_Legume14F  
 11R, 15R, 16R.....primery CenH3\_Legume11R, CenH3\_Legume15R, CenH3\_Legume16R  
 +.....klonovatelný produkt X.....bez produktu N.....neamplifikováno    .....zaklonováno

### iii. Amplifikace 3' a 5' konců RNA metodou RACE

Pomocí RT-PCR byly získány pouze vnitřní fragmenty sekvencí kódujících CenH3 histon. K získání sekvencí nacházejících se na 3' a 5' koncích mRNA transkribované z CenH3 genu byla použita metoda 3' a 5' RACE. Primery pro RACE byly navrženy ze tří různých oblastí sekvencí RT-PCR produktů (obr. 7). Narozdíl od RT-PCR primerů byly primery pro RACE specifické pro každý druh, i když v některých případech bylo možné díky vysoké sekvenční podobnosti použít stejné primery u více druhů. Pro každou ze tří vybraných oblastí byl navržen jeden primer v orientaci forward a k němu komplementární primer v orientaci reverse (tab. 3, tab. 4). Reakce 3' a 5' RACE byly provedeny pro všech 10 druhů, u nichž byla získána vnitřní sekvence transkriptů CenH3 genů. V obrazové příloze jsou ukázány produkty 3' a 5' RACE na příkladu *T. pratense* (obr. 8), přičemž produkty reakcí nested 3' a 5' RACE jsou zobrazeny u téhož druhu (obr. 9A, obr. 9B).

Fragmenty nacházející se na 3' konci mRNA transkribovaných z CenH3 genů byly amplifikovány metodou 3' RACE. 3' RACE reakce byly provedeny pomocí forward primerů použitých v kombinaci s primerem AUAP\_3'RACE. Primer AUAP\_3'RACE byl identický k 5' části primeru 3'RACE\_oligoT, který byl použit k reverzní transkripci RNA z poly-A sekvencí na 3' koncích mRNA (obr. 2). U každého druhu byly testovány všechny tři kombinace forward primerů s

primerem AUAP\_3'RACE (tab. 3). Kromě toho bylo zařazeno i vícero druhů negativních kontrol – reakce obsahující pouze jeden primer a reakce bez templátové cDNA. Tyto reakce měly za cíl odhalit nespecifické produkty vznikající amplifikací pouze jedním primerem a případné kontaminace vzorků cizí DNA. Vzhledem k tomu, že v každém vzorku cDNA zůstal i primer 3' RACE\_oligoT, bylo menší množství produktu získáno také v řadě reakcí s jedním forward primerem (obr. 8, č. 1 - 6). Kvůli příliš velkému pozadí nespecifických produktů následovala po 3' RACE reakci ještě nested 3' RACE (obr. 9A). Použití nested 3' RACE zvýšilo množství kýženého produktu z 3' konce CenH3 mRNA a naopak výrazně snížilo množství amplifikačních artefaktů. Zařazení negativních kontrol s pouze jedním primerem pomohlo odhalit artefakty reakce, které vznikly amplifikací z pouze jednoho primeru. Ke klonování byly pak vybrány takové reakce, při kterých vznikly produkty amplifikované oběma primery. Pro sekvenování byly vybrány klony s velikostí inzertů odrážejících pokud možno celé velikostní spektrum produktů 3' RACE nebo nested 3' RACE. Sekvence z 3' konce mRNA kódující CenH3 byly získány u 8 z 10 testovaných druhů (*C. arietinum*, *V. villosa*, *V. narbonensis*, *V. sepium*, *V. faba*, *V. lathyroides*, *L. latifolius*, *V. pannonica*). U zbylých dvou druhů (*V. peregrina*, *T. pratense*) nebyly zatím získány sekvence, které by byly identifikovány jako CenH3 3' konec.

Metodou 5' RACE byly získány fragmenty nacházející se na 5' konci mRNA transkribovaných z CenH3 genů (obr. 2). 5' RACE reakce byly provedeny pomocí reverse primerů použitých v kombinaci s primerem Racer\_PN1. U 5' RACE reakcí bylo množství amplifikačních artefaktů ještě větší než v případě 3' RACE (obr. 8). Místo očekávaného jednoho, popřípadě několika málo proužků, byla po elektroforéze 5' RACE produktů v agarózovém gelu pozorována pouze stopa indikující velkou rozmanitost naamplifikovaných produktů. Proto bylo nutné využít metodu nested 5' RACE (obr. 9B), při které byly použity reverse primery v kombinaci s primerem Racer\_PN2. Přestože množství amplifikačních artefaktů po nested 5' RACE bylo stále vysoké, bylo možné odhadnout ty produkty, u nichž bylo pravěpodobné, že se jedná o fragmenty z 5' konců transkriptů CenH3 genů. Klonováním a sekvenováním takových produktů byly získány sekvence CenH3 u 8 z 10 testovaných druhů (*C. arietinum*, *V. villosa*, *V. narbonensis*, *V. sepium*, *V. faba*, *V. lathyroides*, *L. latifolius*, *V. pannonica*). U zbylých dvou druhů (*V. peregrina*, *T. pratense*) nebyly prozatím získány sekvence, které by byly identifikovány jako CenH3 5' konec.

#### **iv. Získání celých sekvencí kódujících CenH3**

Kombinací sekvencí produktů RT-PCR s produkty 3' a 5' RACE bylo možné sestavit celou sekvenci kódující CenH3 histon u celkem 8 druhů (*L. latifolius*, *V. villosa*, *V. narbonensis*, *V. faba*, *V. sepium*, *V. pannonica*, *C. arietinum*, *V. lathyroides*). Pro potvrzení správnosti těchto zrekonstruovaných sekvencí byly z konců kódujících sekvencí všech 8 druhů navrženy primery pro amplifikaci celého kódujícího úseku CenH3 pomocí RT-PCR (tab. 7). Produkty očekávané velikosti byly získány u všech druhů. Negativní kontroly, v nichž chyběl cDNA templát, zůstaly bez produktu, čímž byla vyloučena možnost kontaminace vzorků cizí DNA. Získané produkty byly zaklonovány a několik klonů z každého druhu bylo osekvenováno. Obdržené sekvence byly identické k sekvencím zrekonstruovaným ze sekvencí produktů RT-PCR s produkty 3' a 5' RACE, čímž byl jednoznačně potvrzen jejich druhový původ.

Proteinové sekvence CenH3 histonů odvozené ze získaných DNA sekvencí z různých druhů leguminóz měly mezi sebou velkou podobnost pouze v tzv. HFD doméně (histone fold domain) na C-konci proteinu (obr. 10 A). Oproti tomu sekvence na N-konci se značně lišily nejen v sekvenci, ale i v délce, přestože všechny druhy pocházely ze stejné podčeledi *Papilionoideae*. Značně překvapivým zjištěním byla velice krátká délka sekvence před HFD doménou u všech 8 nově osekvenovaných druhů, přičemž srovnatelně krátká sekvence v této oblasti byla pozorována i u dříve osekvenovaných druhů *P. sativum* a *M. truncatula*.

#### **v. Ověření centromerické lokalizace CenH3**

Centromerická lokalizace CenH3 histonů byla ověřována pomocí transformace rostlin DNA konstrukty kódujícími fúzní protein CenH3 s YFP. Tyto konstrukty byly připraveny z CenH3-kódujících sekvencí z leguminóz *Pisum sativum*<sup>1</sup> a *Vicia faba* a pro kontrolu také z *Arabidopsis thaliana*. Pro každý druh byly připraveny dva konstrukty, jeden pro fúzi CenH3 s YFP na N-konci (YFP-CenH3) a druhý pro fúzní protein CenH3 s YFP na C-konci (CenH3-YFP). K přípravě konstruktů byly použity vektory pEarleyGate101 (fúze na C-konci CenH3) a pEarleyGate104 (fúze na N-konci CenH3), které umožňují systém klonování na principu rekombinačního systému Gateway (obr. 3, obr. 4; EARLEY a kol. 2006). Sekvence kódující CenH3 histon u *A. thaliana* byla amplifikována pomocí RT-PCR primerem Athal\_F1 (sekvence ATGGCGAGAACCAAGCATC) v kombinaci s primery Athal\_R1stop (sekvence TCACCATGGTCTGCCTTTTC) a Athal\_R2nostop (sekvence CCATGGTCTGCCTTTTCCT). Druhy *P. sativum* a *V. faba* byly transformovány všemi šesti připravenými konstrukty pomocí *Agrobacterium tumefaciens* (kmen A4-24) obsahujícím navíc Ri

1 Konstrukty s CenH3 *P. sativum* dělala v roce 2008 Veronika Steinbauerová\* a tytéž konstrukty byly použity i v této práci. \*Laboratoř Molekulární cytogenetiky rostlin, Biologické centrum AV ČR, Ústav molekulární biologie rostlin, Branišovská 31/1160, České Budějovice.

plazmid pro indukci hairy root kultur. Celkem bylo odvozeno 29 – 55 nezávisle transformovaných hairy root kultur pro každý druh a konstrukt. Signály YFP v centromerické oblasti jader kořenových buněk byly pozorovány u většiny kultur, které byly transformovány fúzními konstrukty obsahujícími CenH3 z *P. sativum* a *V. faba*, a to i v případě, že CenH3 z jednoho druhu byl použit pro transformaci druhého druhu (obr. 11, tab. 8). U transformace *P. sativum* a *V. faba* fúzními konstrukty z téhož druhu, jako byla transformovaná rostlina, byla v případě pozitivní exprese YFP pozorována striktní lokalizace centromerických oblastí na chromozómech daných druhů<sup>2</sup>. Když byly rostliny *P. sativum* transformovány fúzními konstrukty z *V. faba* a naopak, tak byl fluorescenční signál lokalizován většinou v jádrech i v centromerách. Při porovnání C a N fúzí byl pozorován větší podíl kořínků s YFP signálem u fúze CenH3-YFP. Tento jev byl pozorován u obou druhů a u všech konstruktů (tab. 8). V kořincích transformovaných konstrukty obsahujícími CenH3 z *A. thaliana* byl pozorován pouze difúzní signál YFP v oblasti jádra, v centromerické oblasti však nikoliv. Neschopnost fúzního CenH3 z *A. thaliana* značit centromery *P. sativum* a *V. faba* korelovala s velkou odlišností proteinových CenH3 sekvencí těchto druhů v oblasti smyčky L1 (obr. 10 B), která je klíčová pro centromerickou lokalizaci CenH3.

Tabulka 8:

Rostlina	Druh fúze	Typ exprese YFP					Celkový počet nezávislých transformací
		pozitivní exprese	jádra a centromery	centromery	jádra	bez exprese	
<i>V. faba</i>	PS CenH3-YFP	49	47	2		6	55
	PS CenH3-YFP	9	7	1	1	21	30
	VF CenH3-YFP	23	7	16		14	36
	FR CenH3-YFP	2			2	36	38
	AT CenH3-YFP	9			9	19	28
	AT CenH3-YFP	10			10	10	20
<i>P. sativum</i>	VF CenH3-YFP	7	6	1		15	22
	VF CenH3-YFP	3			3	44	47
	AT CenH3-YFP	1			1	16	17
	AT CenH3-YFP	6			6	9	15

Vysvětlivky: PS... *Pisum sativum*  
 VF... *Vicia faba*  
 AT... *Arabidopsis thaliana*

2 Transformaci rostlin *P. sativum* fúzními konstrukty *P. sativum* udělala v roce 2008 Veronika Steinbauerová, Laboratoř Molekulární cytogenetiky rostlin, Biologické centrum AV ČR, Ústav molekulární biologie rostlin, Branišovská 31/1160, České Budějovice.



## Diskuze

Pro studium centromer na molekulární úrovni je nezbytné mít vhodné molekulární markery. Ideálním markerem funkční domény centromery, tj. oblasti chromozómu, na které se vytváří kinetochor, je histon CenH3 (WIELAND a kol. 2004). Tato varianta histonu H3 byla nalezena v centromerách všech dosud studovaných druhů. Ovšem na rozdíl od histonů H3, které jsou mimořádně konzervované u všech druhů eukaryot, jsou histony CenH3 mezidruhově značně sekvenčně variabilní (KAMAKA, BIGGINS 2008). U rostlin byly sekvence histonů CenH3 popsány a využité pro studium centromer jen u několika málo druhů, jmenovitě rýže seté (*Oryza sativa*), kukuřice seté (*Zea mays*), pšenice seté (*Triticum aestivum*), ječmene obecného (*Hordeum vulgare*), cukrové třtiny (*Saccharum officinarum*), biky sněžné (*Luzula nivea*), sóji luštinaté (*Glycine max*) a *Arabidopsis thaliana* (YU a kol. 2002, QI a kol. 2004, ALBERT a kol. 2005, ZHONG kol. 2002). Kromě těchto v literatuře popsanych sekvencí je možné vyhledat CenH3 sekvence z několika dalších druhů rostlin v databázi GenBank.

Velká sekvenční různorodost CenH3 sekvencí neumožnila navrhnout univerzální primery pro amplifikaci celé kódující sekvence u širšího spektra druhů. Naše strategie byla proto založena na amplifikaci relativně konzervované vnitřní části kódujícího úseku pomocí RT-PCR s degenerovanými primery, po níž následovala amplifikace konců metodami 3' a 5' RACE s druhově specifickými primery. Degenerované primery byly navrženy podle sekvencí CenH3 ze čtyř druhů leguminóz, z nichž dvě byly nalezeny v databázi GenBank (*Glycine max* a *Lotus japonicus*) a dvě byly získány v rámci předběžných experimentů provedených v laboratoři molekulární cytogenetiky (*Pisum sativum* a *Medicago truncatula*). Pomocí RT-PCR se podařilo amplifikovat vnitřní část CenH3 kódující sekvence u 10 z celkem 13 druhů leguminóz vybraných pro tuto práci. Celé kódující sekvence byly poté získány u 8 z nich a to *L. latifolius*, *V. villosa*, *V. narbonensis*, *V. faba*, *V. sepium*, *V. pannonica*, *C. arietinum*, *V. lathyroides*. Společně se čtyřmi dříve získanými sekvencemi a jednou dodatečně objevenou sekvencí CenH3 z vigny čínské (*Vigna unguiculata*) v databázi GenBank byly shromážděny sekvence z celkem 13 různých druhů čeledi *Viciaceae*. Takové množství CenH3 sekvencí nebylo popsáno v literatuře nebo uloženo v databázi GenBank pro žádnou jinou čeleď rostlin.

Sekvence histonů CenH3 z různých druhů leguminóz měly podle očekávání velkou podobnost po celé délce HFD domény na C-konci proteinu. Oproti tomu sekvence na N-koncích proteinu vykazovaly značnou variabilitu. Tato variabilita spočívala nejen v rozdílných sekvencích N-konců, ale především v jejich různé délce. Ta byla u druhů rodu *Vicia* pouhých 12 aminokyselin, což je více než 4x méně než u *Lotus japonicus*, *Vigna unguiculata*, nebo *Glycine max*. Podobně krátké

sekvence nebyly dosud pozorovány ani u žádného jiného druhu rostlin. Velké rozdíly v sekvenci i délce N-konců CenH3 silně naznačují, že kromě několika málo poměrně konzervovaných aminokyselin na úplném N-konci proteinu nemá většina aminokyselin v této části CenH3 zřejmě žádný funkční význam.

Jednoznačný důkaz prokazující centromerickou lokalizaci CenH3 histonů byl získán pomocí transformace rostlin *P. sativum* a *V. faba* DNA konstrukty obsahujícími sekvence kódující CenH3 z těchto dvou druhů ve fúzi s genem pro YFP. U obou druhů byly fúzní CenH3 proteiny lokalizovány v centromerách nezávisle na tom, zda byl pro transformaci použit konstrukt obsahující CenH3-kódující sekvenci ze stejného nebo heterologního druhu. Ovšem při transformaci fúzními konstrukty heterologního druhu byla pozorována kromě centromerické lokalizace signálu i emise fluorescenčního signálu z celého jádra. To také dokazuje, že malé mezidruhové rozdíly v CenH3 sekvencích nebrání centromerické lokalizaci v heterologních druzích, což se shoduje s experimenty u tabáku a *A. thaliana* (NAGAKI a kol. 2010). Na druhé straně bylo zjištěno, že sekvencně již značně odlišný CenH3 histon z *A. thaliana* nemá schopnost specifické integrace do centromerického chromatinu dvou testovaných druhů leguminóz. Dřívější experimenty provedené na jiných druzích ukázaly, že pro lokalizaci CenH3 v centromerách je klíčová sekvence L1 smyčky HFD domény. Vzájemná podobnost sekvencí této oblasti mezi *P. sativum* a *V. faba* a jejich velká odlišnost od *A. thaliana* jsou proto v naprostém souladu se zjištěným typem lokalizace daných CenH3 histonů v heterologních druzích. Přestože L1 smyčka HFD domény je v kontaktu s DNA (VERMAAK a kol. 2002), centromerická lokalizace histonu CenH3 není podmíněna specifickou interakcí s centromerickou DNA (HENIKOFF, DALAL 2005; WIELAND a kol. 2004). Mechanismus, kterým dochází k akumulaci CenH3 histonů specificky v centromerách, nebyl ovšem dosud objasněn.

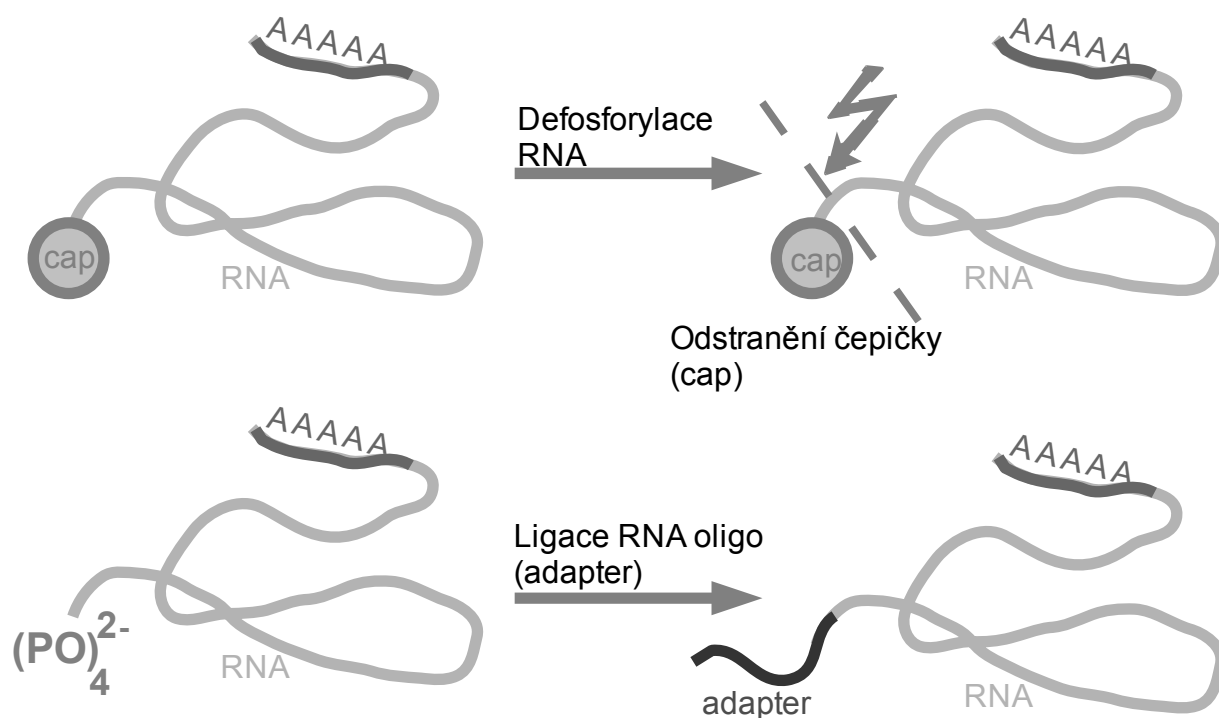
## Závěr

Pomocí RT-PCR byly získány vnitřní úseky kódujících sekvencí transkriptů CenH3 genů u 10 ze 13 testovaných druhů čeledi *Viciaceae*. U osmi z nich se podařilo metodami 5' a 3' RACE získat také fragmenty na 5' a 3' koncích těchto transkriptů a posléze zrekonstruovat celé sekvence kódující CenH3 histon. Centromerická lokalizace CenH3 histonů nalezených u *P. sativum* a *V. faba* byla prokázána experimentálně pomocí fúzních konstruktů s YFP. Získané sekvence CenH3 histonů budou v brzké době použity k vytvoření specifických protilátek, které umožní studovat centromery druhů čeledi *Viciaceae* na molekulární úrovni pomocí metod *in situ* imunodetekce a ChIP-seq (sekvenování DNA získané imunoprecipitací chromatinu). Na základě srovnání CenH3 sekvencí popsaných v této práci bude možné navrhnout více univerzální primery, které umožní amplifikaci fragmentů CenH3 u ještě širšího spektra druhů čeledi *Viciaceae*.

## Obrazová a tabulková příloha

Tabulka 1: Primery na RT-PCR

Název primeru	Sekvence primeru
CenH3_Legume12F	NNNNNATGGSKAGARTBAAGCAC
CenH3_Legume13F	DRWKGCGCTTCGSGAGAT
CenH3_Legume14F	GAACDRWKGCGCTTCGCG
CenH3_Legume11R	CCARCTCAAKRTCCTTTTTTCATAAG
CenH3_Legume15R	CAAAGYCTTCCTATTCCTSBAAG
CenH3_Legume16R	GWGCATYCCABCTTCAAACAT



Obr. 1: Příprava templátu na 3' a 5' RACE

Příprava templátu na 3' a 5' RACE se sestává z defosforylace RNA, odstranění čepičky na 5' konci mRNA čímž se právě v tomto místě exponuje volná fosfátová skupina, ligace adapteru na volnou fosfátovou skupinu. Tedy na neúplné fragmenty RNA, které nemají čepičku, nemůže být adapter naligován.

Tabulka 2 je vyobrazena v textu (str. 21)

Tabulka 3: primery 3' RACE

Druh	1. 3' RACE primer	2. 3' RACE primer	3. 3' RACE primer
<i>V. pannonica</i>	CenH3_Vpan2F	CenH3_Vpan1F	CenH3_Legume16F
<i>V. villosa</i>	CenH3_Vvil1F	CenH3_Vvil2Fa CenH3_Vvil2Fb	CenH3_Legume16F
<i>V. sepium</i>	CenH3_Legume17F	CenH3_Legume14F	CenH3_Vsepium1F
<i>V. lathyroides</i>	CenH3_Legume17F	CenH3_Legume15F	CenH3_Legume16F
<i>V. narbonensis</i>	CenH3_Legume17F	CenH3_Legume14F	CenH3_Vnarb1F
<i>V. faba</i>	CenH3_Legume17F	CenH3_Legume15F	CenH3_Legume16F
<i>V. peregrina</i>	CenH3_Vpere3F	CenH3_Vpere1F	CenH3_Vpere2F
<i>C. arietinum</i>	CenH3_Cicer3F	CenH3_Cicer1F	CenH3_Cicer2F
<i>L. latifolius</i>	CenH3_Llat1F	CenH3_Legume15F	CenH3_Legume16F
<i>T. pratense</i>	CenH3_TrifP1F	CenH3_TrifP2F	CenH3_TrifP3F

Tabulka 4: primery 5' RACE

Druh	1. 5' RACE primer	2. 5' RACE primer	3. 5' RACE primer
<i>V. pannonica</i>	CenH3_Vpan2R	CenH3_Vpan1R	CenH3_Legume19R
<i>V. villosa</i>	CenH3_Vvil1R	CenH3_Vvil2Ra CenH3_Vvil2Rb	CenH3_Legume19R
<i>V. sepium</i>	CenH3_Legume20R	CenH3_Legume17R	CenH3_Vsepium1R
<i>V. lathyroides</i>	CenH3_Legume20R	CenH3_Legume18R	CenH3_Legume19R
<i>V. narbonensis</i>	CenH3_Legume20R	CenH3_Legume17R	CenH3_Vnarb1R
<i>V. faba</i>	CenH3_Legume20R	CenH3_Legume18R	CenH3_Legume19R
<i>V. peregrina</i>	CenH3_Vpere3R	CenH3_Vpere1R	CenH3_Vpere2R
<i>C. arietinum</i>	CenH3_Cicer3R	CenH3_Cicer1R	CenH3_Cicer2R
<i>L. latifolius</i>	CenH3_Llat1R	CenH3_Legume17R	CenH3_Legume19R
<i>T. pratense</i>	CenH3_TrifP1R	CenH3_TrifP2R	CenH3_TrifP3R

Tabulka 5: sekvence 3' RACE primerů

Název primeru	Sekvence primeru
CenH3_Vpan2F	CAAAAAGCTGTCAAATTACTTATAACC
CenH3_Vvil1F	CAAAAATCTGTCAAATTACTTATACCAT
CenH3_Legume17F	CAAAAAACTTTCAAATTAATTATACCAT
CenH3_Vpere3F	CAAAGGATGTTAAATTGCTTATAACC
CenH3_Cicer3F	CAAAGACTTTCAATTTGGTTATAACC
CenH3_Llat1F	CAAAAAACTTTCCAATTACTTATACCWT
CenH3_Vpan1F	GAAATTACCAACCAAGTATCTTCAT
CenH3_Vvil2Fa	AATTACAAACCAACTTTCTTCATTG
CenH3_Vvil2Fb	AATTACAAATCAATTATCTTCATTGG
CenH3_Legume14F	AGGGAAATTACAAATCAAGTATCTTC
CenH3_Legume15F	AAATTACAAACCAAGTATCTTCATTG
CenH3_Vpere1F	ATTACAAACCAATTATCGTCACTG
CenH3_Cicer1F	CAGATTACGAACCAAACATCTTC
CenH3_Legume16F	CATTGGTTACACGCTGGAC
CenH3_Vsepium1F	ATTGGTTACGCGCTGGAC
CenH3_Vnarb1F	GTCGGTACTCGCTGGAC
CenH3_Vpere2F	CACTGGTTACACGCTGGTC
CenH3_Cicer2F	TCACATGTCTCACGTTGGTC
CenH3_TrifP1F	CAAAAAACTGTTAATTTACTTATAACCTTG
CenH3_TrifP2F	AGATTACAAACCAATTTTCAACC
CenH3_TrifP3F	AGGTCTCACGCTGGACGG
CenH3_MedT1F	CAAAGGCTGTAACTTGCTTAT
CenH3_MedT2F	AGATTACAAACCAACTATCTATGGAG
CenH3_MedT_3F	GGAGGTATCACGTTGGACG
AUAP_3'RACE	GGCCACGCGTCGACTAGTAC

Tabulka 6: sekvence 5' RACE primerů

Název primeru	Sekvence primeru
CenH3_Vpan2R	GGTATAAGTAATTTGACAGCTTTTTG
CenH3_Vvil1R	ATGGTATAAGTAATTTGACAGATTTTTG
CenH3_Legume20R	ATGGTATAATTAATTTGAAAGTTTTTTG
CenH3_Vpere3R	GGTATAAGCAATTTAACATCCTTTTTG
CenH3_Cicer3R	GGTATAACCAAATTGAAAGTCTTTTTG
CenH3_Llat1R	AWGGTATAAGTAATTGGAAAGTTTTTTG
CenH3_Vpan1R	ATGAAGATACTTGGTTGGTAATTC
CenH3_Vvil2Ra	CAATGAAGAAAGTTGGTTTGTAATT
CenH3_Vvil2Rb	CCAATGAAGATAATTGATTTGTAATT
CenH3_Legume17R	GAAGATACTTGATTTGTAATTTCCCT
CenH3_Legume18R	CAATGAAGATACTTGGTTTGTAATTT
CenH3_Vpere1R	CAGTGACGATAATTGGTTTGTAAT
CenH3_Cicer1R	GAAGATGTTTGGTTCGTAATCTG
CenH3_Legume19R	GTCCAGCGTGTAACCAATG
CenH3_Vsepium1R	GTCCAGCGCGTAACCAAT
CenH3_Vnarb1R	GTCCAGCGAGTAACCGAC
CenH3_Vpere2R	GACCAGCGTGTAACCAGTG
CenH3_Cicer2R	GACCAACGTGAGACATGTGA
CenH3_TrifP1R	CAAGGTATAAGTAAATTAACAGTTTTTTG
CenH3_TrifP2R	GGTTGAAAATTGGTTTGTAATCT
CenH3_TrifP3R	CCGTCCAGCGTGAGACCT
CenH3_MedT1R	ATAAGCAAGTTAACAGCCTTTTTG
CenH3_MedT2R	CTCCATAGATAGTTGGTTTGTAATCT
CenH3_MedT_3R	CGTCCAACGTGATACCTCC
RACER_PN1	GGAGCACGAGGACACTGA
RACER_PN2	CACTGACATGGACTGAAGGA

## 3'RACE



## 5'RACE

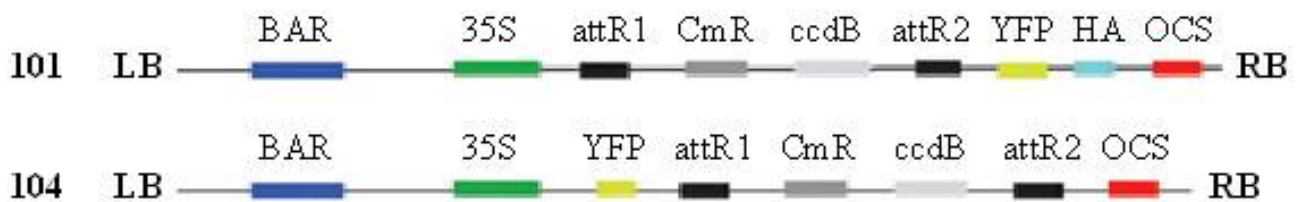
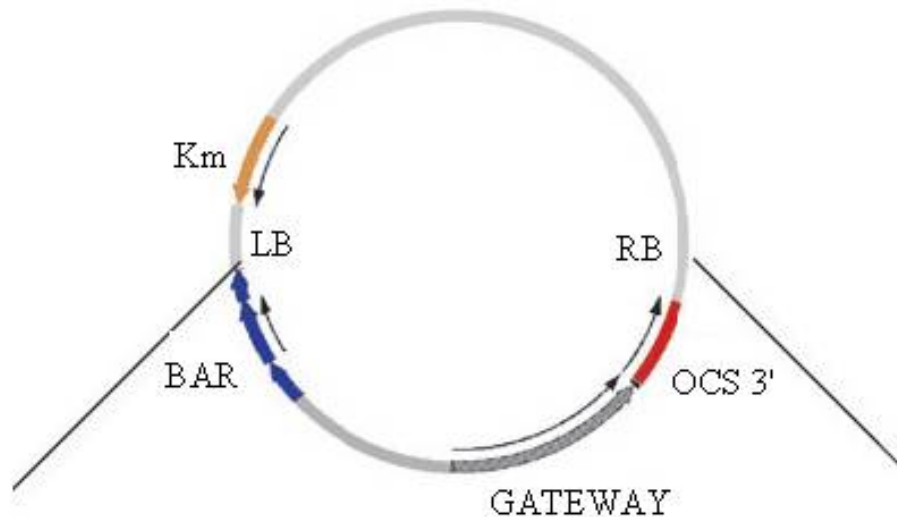


Vysvětlivky:

- .....adapter.
- .....neznámá sekvence
- .....známá vnitřní sekvence CenH3
- 1.▶ .....primer forward      ◀3' .....AUAP\_3'RACE
- ◀1. ....primer reverse      1.▶ .....RACER\_PN1
- .....produkty RACE      2.▶ .....RACER\_PN2

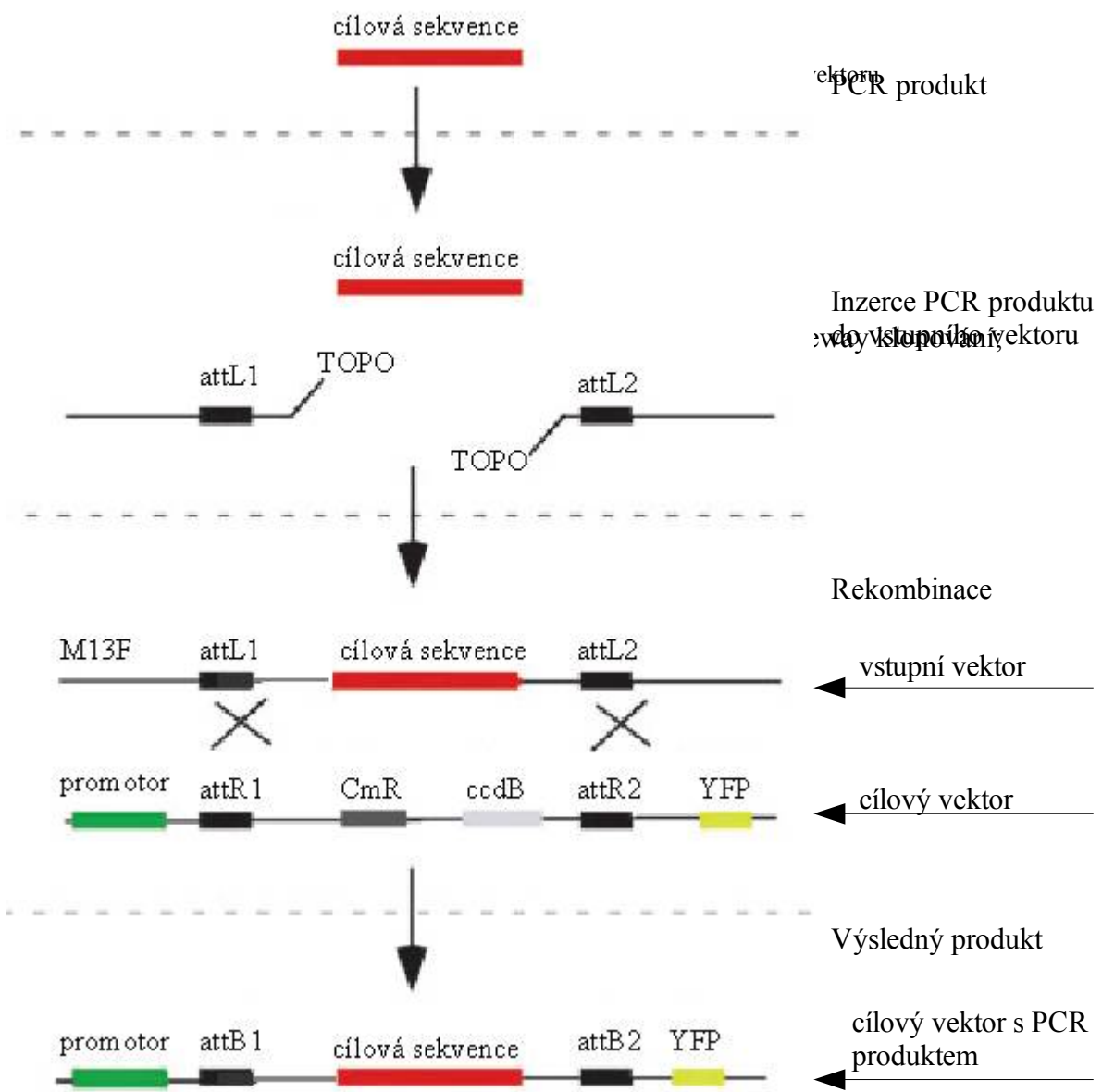
Obr. 2: Schematické znázornění 3' a 5' RACE

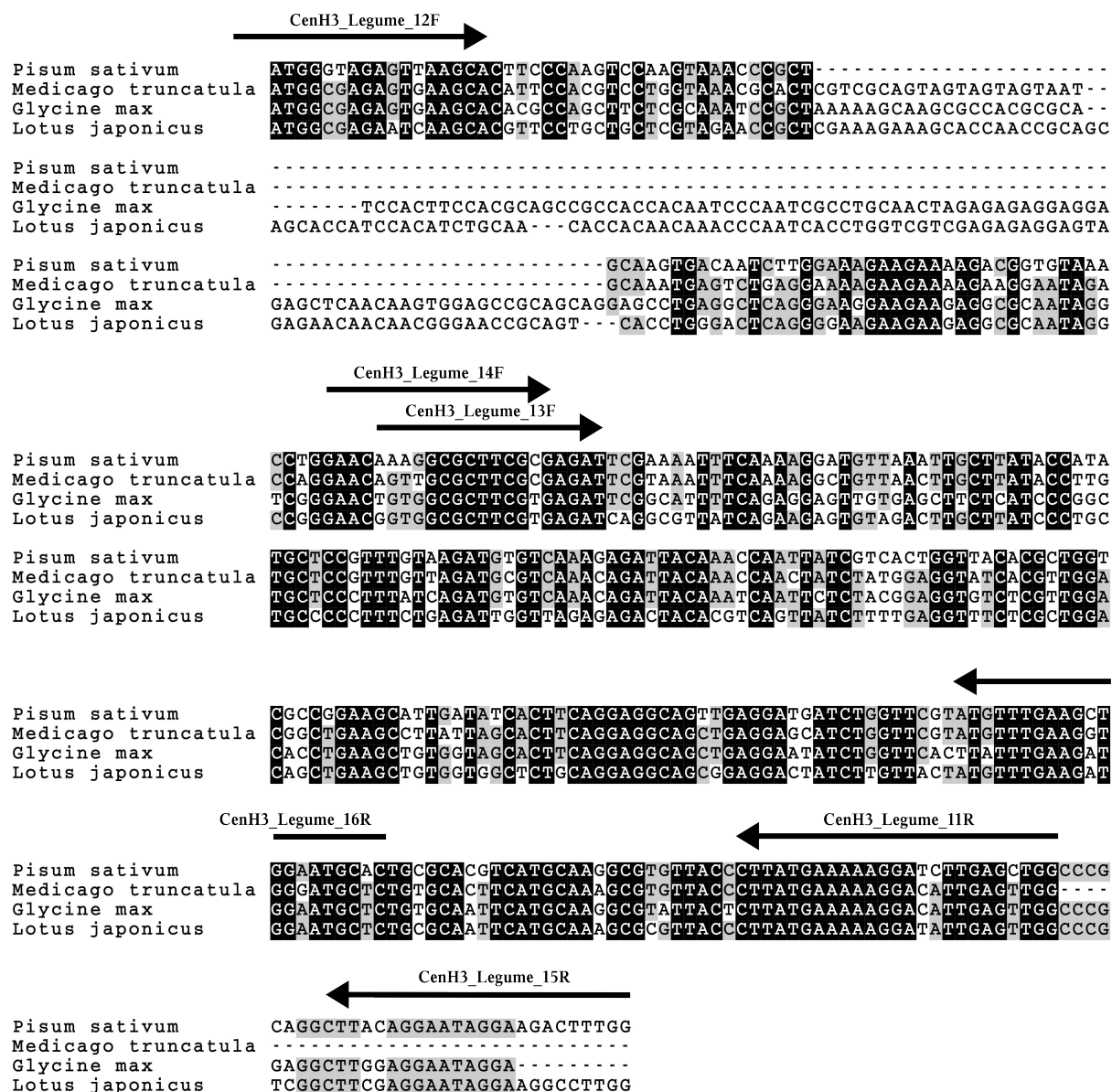




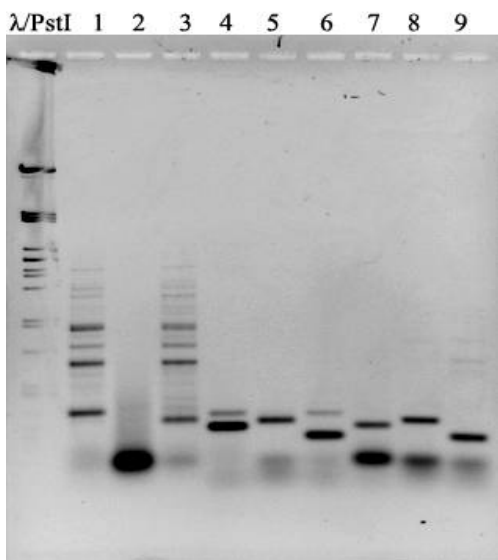
- Vysvětlivky:
- |       |  |
|-------|--|
| LB    | levý okraj T-DNA sekvence  |
| RB    | pravý okraj T-DNA sekvence   |
| BAR   | „Basta herbicide rezistance“ - gen pro rezistenci k herbicidu Basta                  |
| Km    | gen pro rezistenci k antibiotiku kanamycin   |
| 35S   | promotor z viru květákové mozaiky (CaMV)   |
| attR1 | rekombinační místo   |
| CmR   | gen pro rezistenci k antibiotiku chloramfenikol                                      |
| ccdB  | gen letální pro některé kmeny <i>E. coli</i> (např. TOP10)                           |
| attR2 | rekombinační místo   |
| YFP   | sekvence kódující žlutý fluorescenční protein  |
| HA    | sekvence kódující HA peptid, na nějž jsou dostupné protilátky na proteinovou detekci |
| OCS   | sekvence z 3' konce genu pro oktopinsyntázu s polyadenylačním signálem               |

Obr. 3: Entry vektory pro Gateway klonování; převzato z Earley a kol. 2006





Obr. 5: Srovnání kódujících sekvencí CenH3 genů druhů *Pisum sativum*, *Medicago truncatula*, *Glycine max*, *Lotus japonicus* s vyznačenými místy, z nichž byly navrhovány primery na RT-PCR.



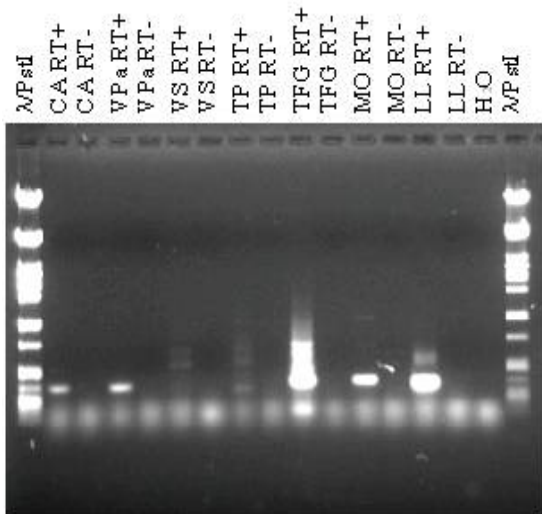
Vysvětlivky:

- λ/PstI DNA fága lambda štěpená enzymem PstI
- RT+ produkt RT-PCR
- RT- negativní kontrola RT-PCR reakce
- CA *C. arietinum*
- Vpa *V. pannonica*
- VS *V. sativa*
- TP *T. pratense*
- TFG *T. foenum-graceum*
- MO *M. officinalis*
- LL *L. latifolius*
- VN *V. narbonensis*
- VF *V. faba*
- VV *V. villosa*
- VSe *V. sepium*
- Vpe *V. peregrina*
- PS *P. sativum*
- VL *V. lathyroides*

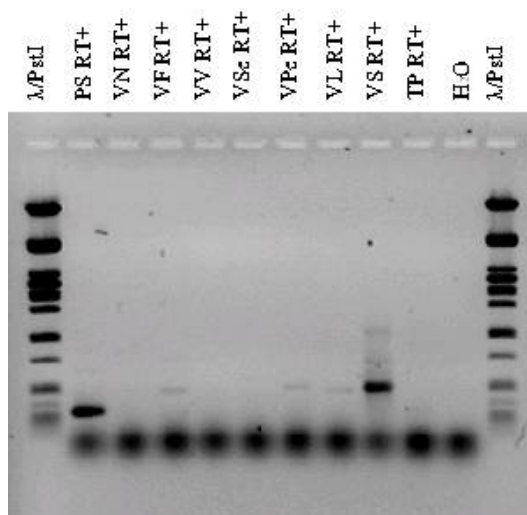
Obr. 6A – produkty RT-PCR byly amplifikovány primery:

- 1 CenH3\_Legume12F+CenH3\_Legume11R
- 2 CenH3\_Legume12F+CenH3\_Legume15R
- 3 CenH3\_Legume12F+CenH3\_Legume16R
- 4 CenH3\_Legume13F+CenH3\_Legume11R
- 5 CenH3\_Legume13F+CenH3\_Legume15R
- 6 CenH3\_Legume13F+CenH3\_Legume16R
- 7 CenH3\_Legume14F+CenH3\_Legume11R
- 8 CenH3\_Legume14F+CenH3\_Legume15R
- 9 CenH3\_Legume14F+CenH3\_Legume16R

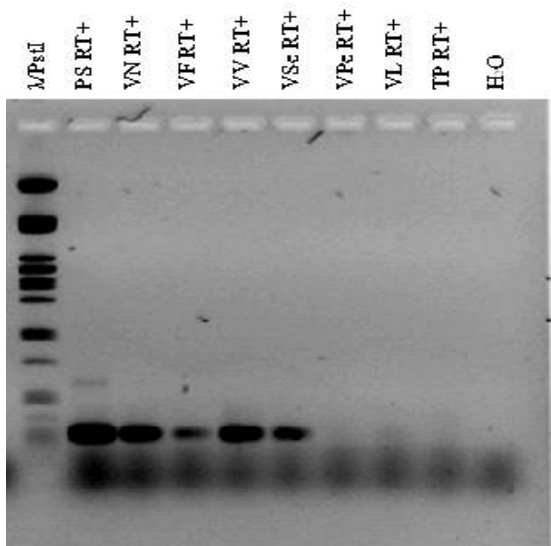
Obr. 6 A: RT-PCR *P. sativum*



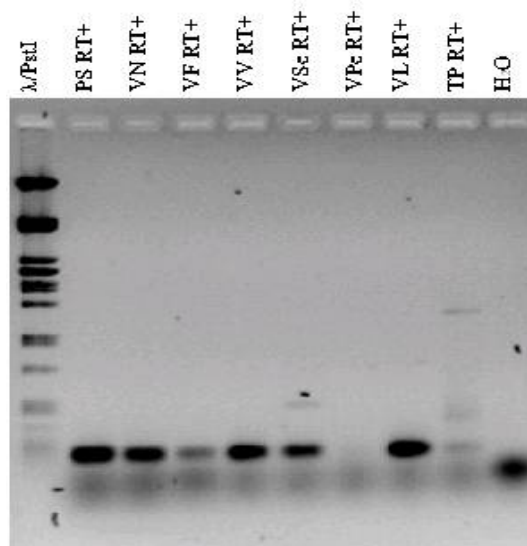
Obr. 6B: RT-PCR daných druhů amplifikovaná primery CenH3\_Legume12F + CenH3\_Legume 11R



Obr. 6C: RT-PCR daných druhů amplifikovaná primery CenH3\_Legume\_12F + CenH3\_Legume 16R



Obr. 6D: RT-PCR daných druhů amplifikovaná primery CenH3\_Legume13F + CenH3\_Legume11R



Obr. 6E: RT-PCR daných druhů amplifikovaná primery CenH3\_Legume13F + CenH3\_Legume16R

Obr. 6: Produkty RT-PCR očekávané velikosti CenH3 proteinu

```

Pisum sativum      ATGGGTAGAGTTAAGCACTTCCCAAGTCCAAGTAAACCCGCTGCAAGTGACAATCTTGGAAAGAA
Cicer arietinum    ATGGGTAGAGTGAAGCACATTCTCTCTCTCGTAATCGCGCTGTAAGTGAGGATCAGAAACATAA
Trifolium pratense -----
Vicia peregrina    -----
Vicia pannonica    ATGGGTAGAGTCAAGCACACACCACGTC-----ACGCGCTGAGAATCAGGCAAAGAA
Vicia villosa      -----
Lathyrus latifolius 1 -----
Lathyrus latifolius 2 -----
Vicia narbonensis -----
Vicia sepium       -----
Vicia faba         -----
Vicia lathyroides -----

```

```

Pisum sativum      GAAAAGACGGTGTAAACCTGGAACAAAGCGGCTTCGGCAGATTCGAAAATTTCAAAGGATGTTA
Cicer arietinum    GAAAAGACGCAATAAGCCTGGAACAGTAGCGCTTCGGCAGATTCGTCGTTTCAAAGACTTTCA
Trifolium pratense -----AGAGCGCCTTCGGCAGATTCGTAATTTCAAAGGATGTTA
Vicia peregrina    -----GGAGCGCCTTCGGCAGATTCGAAAATTTCAAAGGATGTTA
Vicia pannonica    GAAAAGACGGAATAAACCCGGAACCGTTCGGCTTCGGCAGATTCGAAAATTTCAAAGGATGTTA
Vicia villosa      -----GGAGCGCCTTCGGCAGATTCGAAAATTTCAAAGGATGTTA
Lathyrus latifolius 1 -----AAAGCGCCTTCGGCAGATTCAGGAAATTAACAAAAACTTTCC
Lathyrus latifolius 2 -----AGAGCGCCTTCGGCAGATTCAGGAAATTAACAAAAACTTTCC
Vicia narbonensis -----GGAGCGCCTTCGGCAGATTCGAAAATTTCAAAGGATGTTA
Vicia sepium       -----AGAGCGCCTTCGGCAGATTCGAAAATTTCAAAGGATGTTA
Vicia faba         -----GGTTCGGCTTCGGCAGATTCGAAAATTTCAAAGGATGTTA
Vicia lathyroides -----GAACGGTTCGGCTTCGGCAGATTCGAAAATTTCAAAGGATGTTA

```

```

Pisum sativum      AATTGCTTATACCATA TGCTCCGTTTGTAAAGATGTGTCAAAGAGATTACAAACCAATTATCGTCA
Cicer arietinum    ATTTGCTTATACCAGCTGCTCCATTTTATAAGATGCTCAAAACAGATTACGAAACAAACACTTTCA
Trifolium pratense AATTACTTATACCTTGCTCCATTTGTAAAGATGTGTAGACAGATTACAAACCAATTTTCAACC
Vicia peregrina    AATTGCTTATACCATA TGCTCCGTTTGTAAAGATGTGTCAAAGAGATTACAAACCAATTATCGTCA
Vicia pannonica    AATTACTTATACCATA TGCTCCGTTTGTAAAGACTTGTCAAGGAAATTACAAACCAAGTATCTTCA
Vicia villosa      AATTACTTATACCNTATGCTCCGTTTCGTAAAGAGTTGTCAAGGAAATTACAAANCAANTNTCTTCA
Lathyrus latifolius 1 AATTACTTATACCNTATGCTCCGTTTCGTAAAGATGTGTCAAGGAAATTACAAACCAAGTATCTTCA
Lathyrus latifolius 2 AATTACTTATACCATA TGCTCCGTTTGTAAAGATGTGTCAAGGAAATTACAAACCAAGTATCTTCA
Vicia narbonensis AATTAAATTATACCATA TGCTCCGTTTNGTAAGAGTTGTCAAGGAAATTACAAATCAAGTATCTTCA
Vicia sepium       AATTAAATTATACCATA TGCTCCGTTTNGTAAGAGTTGTCAAGGAAATTACAAATCAAGTATCTTCA
Vicia faba         AATTAAATTATACCATA TGCTCCGTTTTCGTAAAGAGTTGTCAAGGAAATTACAAACCAAGTATCTTCA
Vicia lathyroides AATTAAATTATACCATA TGCTCCGTTTTCGTAAAGAGTTGTCAAGGAAATTACAAACCAAGTATCTTCA

```

```

Pisum sativum      CTGGTTACACGCTGGTTCGCCGGAAGCATGATATCACTTCAGGAGGCAGTTGAGGATGATCTGGT
Cicer arietinum    CATGCTCACGTTGGTTCGCCGGAAGCAGTAATAGCACTTCAGGAGGCGGCTGAGGATTAATCTGGT
Trifolium pratense CAGGTTACACGCTGGACGGCTGAAGCCTTACAAGCACTTCAGGAGGCAGCTGAGGACCATCTGGT
Vicia peregrina    CTGGTTACACGCTGGTTCGCCGGAAGCATGATATCACTTCAGGAGGCAGTTGAGGATGATCTGGT
Vicia pannonica    TTGGTTACACGCTGGACGCCCGGAAGCATTGGTCTCGCTTCAAGAGGCAGCTGAGGATTTGCTAGT
Vicia villosa      TTGGTTACACGCTGGACGCCCGGAAGCATGATATCACTTCAGGAGGCAGCTGAGGATTTGCTAGT
Lathyrus latifolius 1 TTGGTTACACGCTGGACGCCCGGAAGCATTGGTCTCGCTTCAAGAGGCAGCTGAGGATTTGCTAGT
Lathyrus latifolius 2 TTGGTTACACGCTGGACGCCCGGAAGCATTGGTCTCGCTTCAAGAGGCAGCTGAGGATTTGCTAGT
Vicia narbonensis TCGGTTACTCGCTGGACGCCCGGAAGCATTGCANTCGCTTCAAGAGGCAGCTGAGGATTTGCTAGT
Vicia sepium       TTGGTTACGCGCTGGACGCCCGGAAGCATTGCANTCGCTTCAAGAGGCAGCTGAGGATTTGCTAGT
Vicia faba         TTGGTTACACGCTGGACGCCCGGAAGCATTGCANTCGCTTCAAGAGGCAGCTGAGGATTTGCTAGT
Vicia lathyroides TTGGTTACACGCTGGACGCCCGGAAGCATTGCANTCGCTTCAAGAGGCAGCTGAGGATTTGCTAGT

```

```

Pisum sativum      TCGTATGTTTGAAGCTGGAATGCACTGCGCACGTCATGCAAGGCGTGTACCCTTATGAAAAAGG
Cicer arietinum    TCATATGTTTGAAGCTGGAATGCTATGTCGCCCTTCATGCAAGGCGTATTACCCTTATGAAAAAGG
Trifolium pratense TCGTATGTTTGAAGCTGGGATGCTC-----
Vicia peregrina    TCGTATGTTTGAAGCTGGAATGCTC-----
Vicia pannonica    TCGAATGTTTGAAGCAGGATGCTCTGTGCACCTTCATGCAAAGCGTGTACCCTTATGAAAAAGG
Vicia villosa      TCGAATGTTTGAAGCNGGATGCTCTGCGCACTTCATGCAAAGCGTGTACCCTTATGAAAAAGG
Lathyrus latifolius 1 TCGAATGTTTGAAGCTGGATGCTCTGCGCACTTCATGCAAAGCGTGTACCCTTATGAAAAAGG
Lathyrus latifolius 2 TCGAATGTTTGAAGCTGGATGCTCTGCGCACTTCATGCAAAGCGTGTACCCTTATGAAAAAGG
Vicia narbonensis TCGAATGTTTGAAGCTGGATGCTCTGCGCACTTCATGCAAAGCGTGTACCCTTATGAAAAAGG
Vicia sepium       TCGAATGTTTGAAGCTGGATGCTCTGCGCACTTCATGCAAAGCGTGTACCCTTATGAAAAAGG
Vicia faba         TCGAATGTTTGAAGCTGGATGCTCTGCGCACTTCATGCAAAGCGTGTACCCTTATGAAAAAGG
Vicia lathyroides CCGAATGTTTGAAGCTGGATGCTC-----

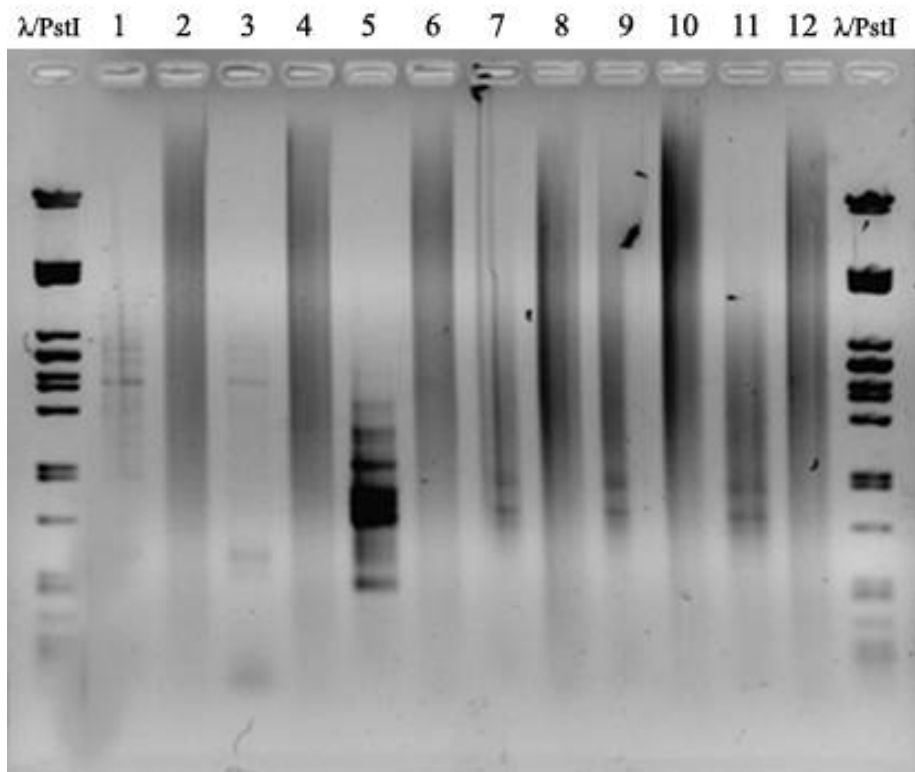
```

```

Pisum sativum      ATCTTGAGCTGGCCCGCAGGCTTACAGGAATAGGAAGACTTTGG
Cicer arietinum    ACATTGAGCTGG-----
Trifolium pratense -----
Vicia peregrina    -----
Vicia pannonica    -----
Vicia villosa      ATATTGAGCTGG-----
Vicia villosa      ACCTTGAGCTGG-----
Lathyrus latifolius 1 ACCTTGAGCTGG-----
Lathyrus latifolius 2 ACCTTGAGCTGG-----
Vicia narbonensis ACATTGAGCTGG-----
Vicia sepium       ACCTTGAGCTGG-----
Vicia faba         ACATTGAGCTGG-----
Vicia lathyroides -----

```

Obr 7: Vnitřní CenH3 sekvence získané RT-PCR s přidanou sekvencí *P. sativum*. Na obrázku jsou vyznačena místa, z nichž byly navrhovány primery na 3' a 5' RACE.



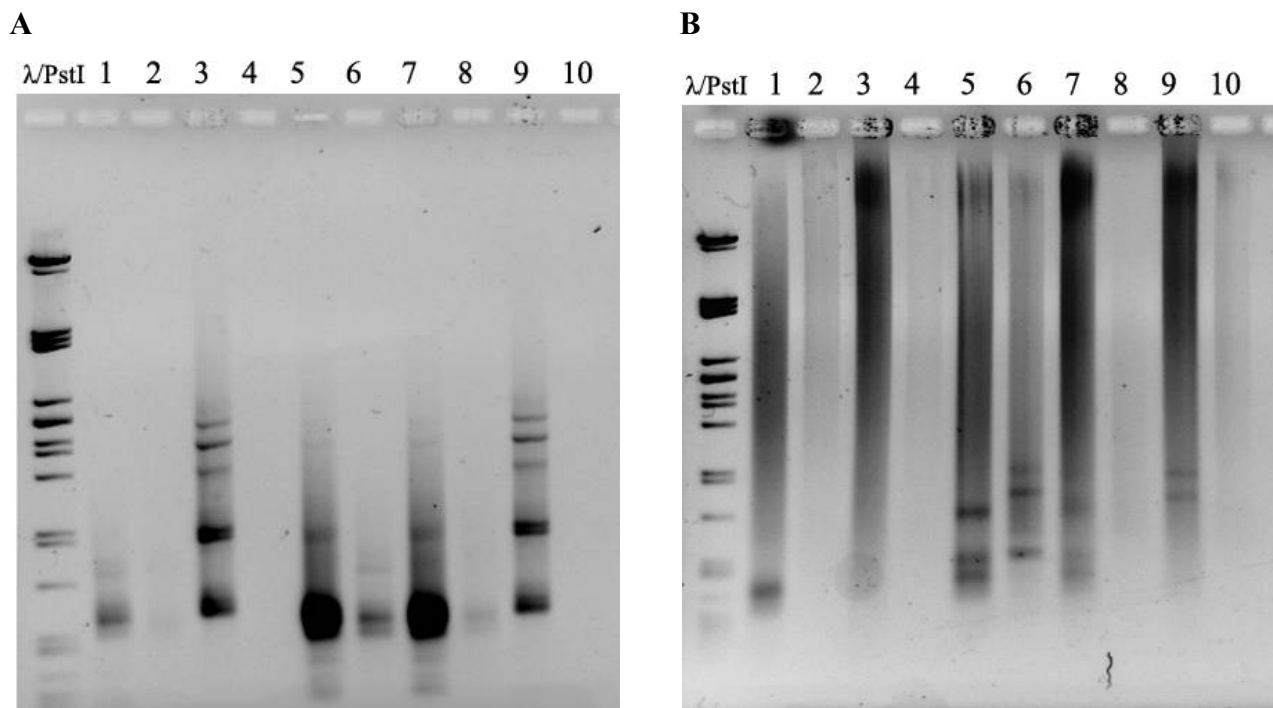
Obr. 8: 3' a 5' RACE na 1% agarózovém gelu *Trifolium pratense*

Produkty č. 1 – 6 jsou 3' RACE, 7 – 12 5' RACE; λ/PstI je DNA fága lambda štěpená enzymem PstI

Produkty byly amplifikovány těmito primery:

1. CenH3\_TrifP1F + AUAP\_3'RACE, 2. CenH3\_TrifP1F, 3. CenH3\_TrifP2F + AUAP\_3'RACE, 4. CenH3\_TrifP2F,
5. CenH3\_TrifP3F + AUAP\_3'RACE, 6. CenH3\_TrifP3F, 7. CenH3\_TrifP1R + RACER\_PN1, 8. CenH3\_TrifP1R,
9. CenH3\_TrifP2R + RACER\_PN1, 10. CenH3\_TrifP2R, 11. CenH3\_TrifP3R RACER\_PN1, 12. CenH3\_TrifP3R

Na nested reakci byly vybrány produkty č. 1 a 3 na 3' RACE, na nested 5' RACE byly vybrány produkty č. 7 a 9.



Obr. 9: Produkty nested RACE reakcí na 1% agarózovém gelu druhu *T. pratense*  
 $\lambda$ /PstI je DNA fága lambda štěpená enzymem PstI

#### A) 3' RACE

Produkty byly amplifikovány těmito primery: 1. CenH3\_TrifP2F + AUAP\_3'RACE, 2. CenH3\_TrifP2F, 3. AUAP\_3'RACE, 4. bez primerů, 5. CenH3\_TrifP3F + AUAP\_3'RACE, 6. CenH3\_TrifP3F, 7. CenH3\_TrifP3F + AUAP\_3'RACE, 8. CenH3\_TrifP3F, 9. AUAP\_3'RACE, 10. bez primerů. Templátem pro reakce 1. - 6. byl produkt amplifikovaný primery CenH3\_TrifP1F + AUAP\_3'RACE (vzorek č. 1 na obr. 8), templátem pro reakce 7. - 10. byl produkt amplifikovaný primery CenH3\_TrifP2F + AUAP\_3'RACE (vzorek č. 3 na obr. 8).

#### B) 5' RACE

Produkty byly amplifikovány těmito primery: 1. CenH3\_TrifP2R + RACER\_PN2, 2. CenH3\_TrifP2R, 3. RACER\_PN2, 4. bez primerů, 5. CenH3\_TrifP3R + RACER\_PN2, 6. CenH3\_TrifP3R, 7. CenH3\_TrifP3R + RACER\_PN2, 8. CenH3\_TrifP3R, 9. RACER\_PN2, 10. bez primerů. Templátem pro reakce 1. - 6. byl produkt amplifikovaný primery CenH3\_TrifP1R + RACER\_PN1 (vzorek č. 7 na obr. 8), templátem pro reakce 7. - 10. byl produkt amplifikovaný primery CenH3\_TrifP2R + RACER\_PN1 (vzorek č. 9 na obr. 8).

U 3' i 5' RACE reakce byly zaklonovány v obou případech produkty č. 1 a 5. Tyto vzorky byly amplifikovány dvěma primery a zároveň bylo amplifikováno relativně malé množství artefaktů vzhledem k produktům očekávané délky.

Tabulka 7: Primery na celé kódující sekvence CenH3 daných druhů

Druh	Název primeru	Sekvence primeru
<i>L. latifolius</i>	CenH3_Llat_start1	ATGGCCAGAGTTAAACAAAAACC
	CenH3_Llat_end1	CGGATCATGCTCTCACCAT
	CenH3_Llat_end2	CGGATCATGCTCTACCAA
	CenH3_Llat_end3	AAAGCTTAAACAATCTTCACTTTTCAA
<i>V. villosa</i>	CenH3_Vvill_start1	ATGGCGAGAGTTAAACAAAAACC
	CenH3_Vvill_end1	TCACCAAGGTCTTGCTATCCC
	CenH3_Vvill_end2	CCAAGGTCTTGCTATCCCG
<i>V. narbonensis</i>	CenH3_Vnarb-sep-faba-lath_start1	ATGGCGAGAGTTAAACAAACACC
	CenH3_Vnarb-faba-lath_end1	TCACCAAGGTCTTCCTATTCCG
	CenH3_Vnarb-faba_end2	CCAAGGTCTTCCTATTCCGGTA
<i>V. faba</i>	CenH3_Vnarb-sep-faba-lath_start1	ATGGCGAGAGTTAAACAAACACC
	CenH3_Vnarb-faba-lath_end1	TCACCAAGGTCTTCCTATTCCG
	CenH3_Vnarb-faba_end2	CCAAGGTCTTCCTATTCCGGTA
<i>V. sepium</i>	CenH3_Vnarb-sep-faba-lath_start1	ATGGCGAGAGTTAAACAAACACC
	CenH3_Vsepium_end1	TCACCAAGGTCTTCCTATTCCAG
	CenH3_Vsepium_end2	CCAAGGTCTTCCTATTCCAGTAAGC
<i>V. pannonica</i>	CenH3_Vpan_start1	ATGGCGAGAGTTAAGCAAACAC
	CenH3_Vpan_end1	TCACCAAGGTCTTCCTATCCC
	CenH3_Vpan_end2	CCAAGGTCTTCCTATCCCG
<i>C. arietinum</i>	CenH3_CicerA_start1	ATGGCTAGAGTTAAGCACATTCCT
	CenH3_CicerA_end1	TCACCAAGGCCTTCCTATTC
	CenH3_CicerA_end2	CCAAGGCCTTCCTATTCCTG
<i>V. lathyroides</i>	CenH3_Vnarb-sep-faba-lath_start1	ATGGCGAGAGTTAAACAAACACC
	CenH3_Vnarb-faba-lath_end1	TCACCAAGGTCTTCCTATTCCG
	CenH3_Vlathy_end2	CCAAGGTCTTCCTATTCCGG



**A**

	N-konec	HFD
Lotus japonicus	MARIKHVPAARRTARKKAPTAAAPSTSATPQQTQSPGRRERSREQQREPQSPGTQGGKKR	
Vigna unguiculata	MARVKHTPASLKVGGKKVSRASTSTPQQSPATRSRRRAQEEEPQEEAAAAAPQTQGRKKK	
Medicago truncatula	MARVKHIPRPGKRTRRSSSSNAN-----ESEEKKR	
Glycine max	MARVKHTPASRKSARKQAPRASTST-QPPPQSQSPATRRERRAQVEPQQEPEAQGRKKR	
Pisum sativum	MGRVKHFPSPSKPAAS-----DNLGKKR	
Cicer arietinum	MARVKHIPPPNRRAVS-----EDQKHKR	
Vicia villosa	MARVKQKPRHAR-----VDQEKKR	
Vicia narbonensis	MARVKQTPRPAR-----EIQEKKR	
Vicia sepium	MARVKQTPRPAR-----ETQEKKR	
Vicia faba	MARVKQTPRPAR-----ETQEKKR	
Vicia lathyroides	MARVKQTPRPAR-----ETQEKKR	
Lathyrus latifolius	MARVKQKPRHAR-----ENQEKKR	
Vicia pannonica	MARVKQTPRPAR-----ENXAKKR	
Lotus japonicus	RNRPGTVALREIRRYOKSVDLLIPAAFLRLVRETTRQLSFEVSRWTAEAVVALQEAED	
Vigna unguiculata	RSKPGTALREIRHFQKSKLLIPAAPIRCVKQITHQFSTEVSRWTPEAVVALQEAEEE	
Medicago truncatula	RNRPGTVALREIRKFQKAVNLLIPCAPIVRCVKQITNQLSMEVSRWTAEALLALQEAEEE	
Glycine max	RNRSGTVALREIRHFORSCELLIPAAPIRCVKQITNQFSTEVSRWTPEAVVALQEAEEE	
Pisum sativum	RCKPGTKALREIRKFQKDVKLLIPYAPFVRCVKQITNQLSSLVTRWSPALISLOEAVED	
Cicer arietinum	RNKP GTVALREIRRFQKTFNLVIPAAPIRCVKQITNQTSSSHVSRWSPEAVIALQEAED	
Vicia villosa	RNTPGTVALREIRKLOKSVKLLIPYAPFVRCVKQITNQXSSLVTRWTPALISLOEAED	
Vicia narbonensis	RNKP GTVALREIRKMOKTFKLIIPYAPFVRCVKQITNOVSSVTRWTPGALISLOEAED	
Vicia sepium	RNKP GTVALREIRKLOKTFKLIIPYAPFVRCVKQITNOVSSLVTRWTPGALISLOEAED	
Vicia faba	RNKP GTVALREIRKMOKTFKLIIPYAPFVRCVKQITNOVSSLVTRWTPGALISLOEAED	
Vicia lathyroides	RNKP GTVALREIRKLOKTFKLIIPYAPFVRCVKQITNOVSSLVTRWTPGALMSLOEAED	
Lathyrus latifolius	RNKP GTVALREIRKLOKTFQLLIPYAPFVRCVKQITNOVSSLVTRWTPGALLSLOEAED	
Vicia pannonica	RNKP GTVALREIRKLOKAVKLLIPYAPFVRLVREITNOVSSLVTRWTPGALVLSLOEAED	
Lotus japonicus	YLVTFEDCMLCAIHAKRVTLMKKDIELARRLGGIGRPW	
Vigna unguiculata	CLVHLFEDCMLCAIHARRITLMTKDIQIARRLGGIGRPW	
Medicago truncatula	HLVRMFEGCMLCALHAKRVTLMKKDLELTRRLTGIGCAR	
Glycine max	YLVHLFEDCMLCAIHARRITLTMKKDIELARRLGGIGRPW	
Pisum sativum	DLVRMFEAGMHCARHARRVTLMKKDLELTRRLTGIGRLW	
Cicer arietinum	YLVHMFENGCMLCALHARRITLTMKKDIELTRRLTGIGRPW	
Vicia villosa	CLVRMFEAGWLCALHAKRVTLMKKDIELTRRLTGIGRPW	
Vicia narbonensis	CLVRMFEAGWLCALHAKRVTLMKKDIELTRRLTGIGRPW	
Vicia sepium	CLVRMFEAGWLCALHAKRVTLMKKDIELTRRLTGIGRPW	
Vicia faba	CLVRMFEAGWLCALHAKRVTLMKKDIELTRRLTGIGRPW	
Vicia lathyroides	CLVRMFEAGWLCALHAKRVTLMKKDIELTRRLTGIGRPW	
Lathyrus latifolius	CLVRMFEAGWLCALHAKRVTLMKKDIELTRRLTGIGRPW	
Vicia pannonica	CLVRMFEAGWLCALHAKRVTLMKKDIELTRRLTGIGRPW	

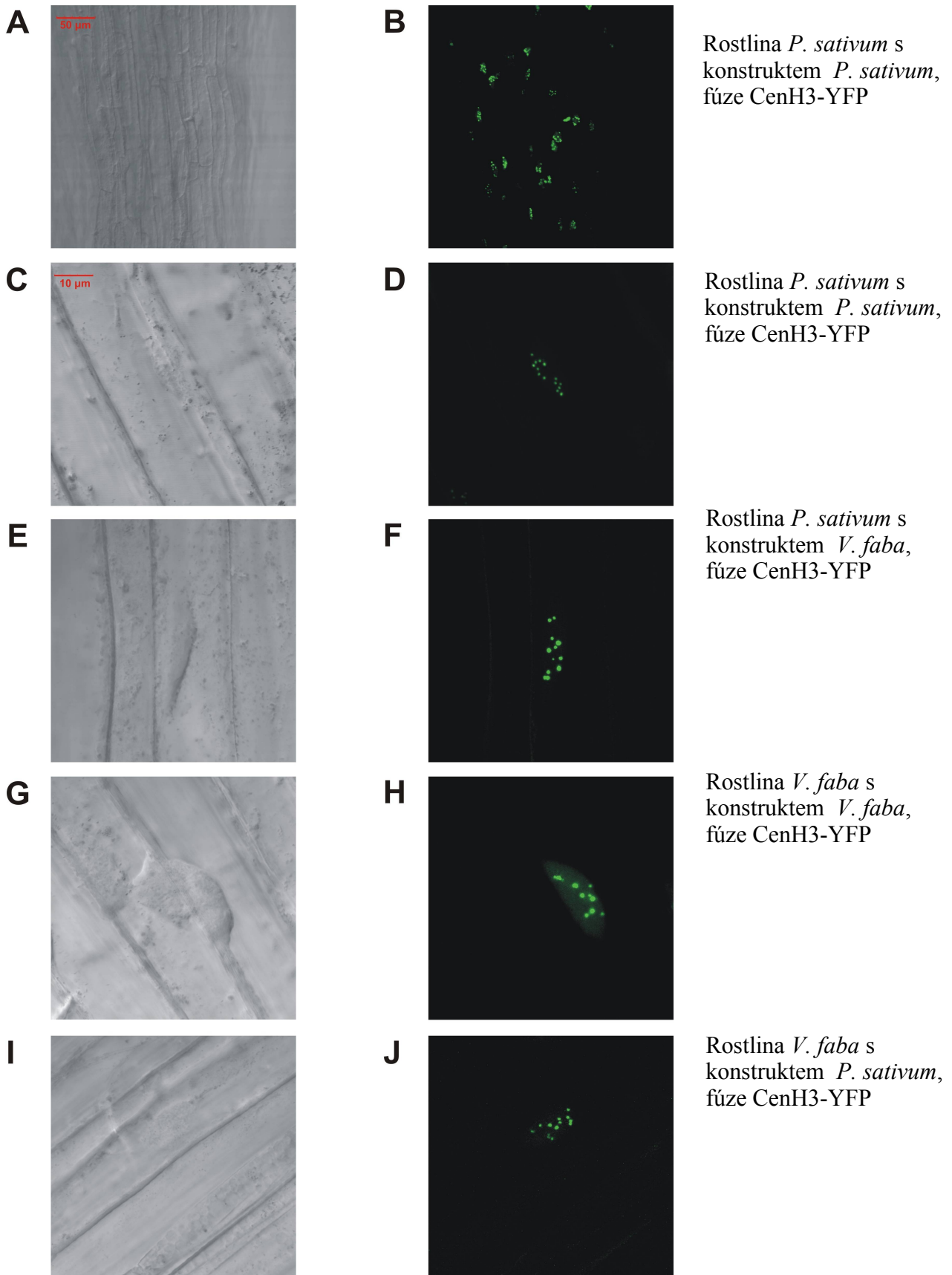
**B**

Arabidopsis thaliana	MARTKHRVTRSQRNQTDAAAGASSQAAGPTTTPTRRGEGGDNTQQTNP TTSPATGTRR
Vicia faba	MARVKQ-----TP-----
Pisum sativum	MGRVKH-----FP-----
Arabidopsis thaliana	GAKRSRQAMPGRSQKKSRYRYPGTVALKEIRHFQKQTNLLIPAAASFIREVRSITHTMLAPP
Vicia faba	--RHAR-----ETQEKKKRRNKP GTVALREIRKMOKTFKLIIPYAPFVRCVKQITNOVSS-S
Pisum sativum	--SPSKPAASDNLGKKKRRCKP GTKALREIRKFQKDVKLLIPYAPFVRCVKQITNOVSS-S
Arabidopsis thaliana	QINRWTAEEALVALQEAEDYLVGLFSDSMLCAIHARRVTLMRKDFELARRLGGKGRPW
Vicia faba	LVTRWTPGALISLOEAEDCLVRMFEAGWLCALHAKRVTLMKKDIELTRRLTGIGRPW
Pisum sativum	LVTRWSPEALISLOEAVEDDLVRMFEAGMHCARHARRVTLMKKDLELTRRLTGIGRLW

Obr. 10: Proteinové sekvence CenH3 genů u druhů čeledi *Viciaceae*

A) Proteinové sekvence CenH3 druhů, z nichž byly navrhovány primery na RT-PCR v porovnání spolu se sekvencemi nově získanými.

B) Srovnání CenH3 sekvencí *A. thaliana*, *V. faba* a *P. sativum* spolu s vyznačenou HFD doménou tvořenou strukturami  $\alpha$ -helixů (označeny helix N, helix 1 – 3) a smyček (označeny L0, L1 a L2).



Obr. 11: Transformované kořinky *P. sativum* a *V. faba* s fúzními konstrukty CenH3

Obr. A, C, E, G a I jsou v Nomarského zobrazení, obr. B, D, F, H, J jsou tytéž snímky (odpovídající si v řádcích) ve fluorescenčním zobrazení. Snímky byly pořízeny na konfokálním mikroskopu Olympus; zvětšení je shodné u A, B (měřítko na obr. A), pro obr. C – J je měřítko na obr. C.

## Literatura

- Albert, V. A., Soltis, D. E., Carlson, J. E. a kol.: Floral gene resources from basal angiosperms for comparative genomics research. *BMC Plant Biology*, 2005, **5**:5
- Bloom, K., Joglekar, A.: Towards building a chromosome segregation machine. *Nature*, 2010, **463**: 446 – 456
- Dawe, R. K., Henikoff, S.: Centromeres put epigenetics in the driver's seat. *TRENDS in biochemical sciences*, 2006, **31** (12): 662 – 669
- Earley, K. W., Haag, J. R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K., Pikaard, C. S.: Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *The Plant Journal*, 2006, **45**: 616 – 629
- Edgar R. C. :MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 2004, **32**(5):1792 – 1797.
- Flemming, W.: Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung. Leipzig: FCW Vogel, 1882
- Hall, I. M., Shankaranarayana, G. D., Noma, K., Ayoub, A., Cohen. A., Grewal, S. I. S.: Establishment and maintenance of heterochromatin domain. *Science*, 2002, **297**: 2232 – 2237
- Henikoff, S. Ahmad, K., Malik, H. S.: The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA. *Science*, 2001, **293**: 1098 – 1102
- Henikoff, S., Dalal, Y.: Centromeric chromatin: what makes it unique? *Current Opinion in Genetics & Development*, 2005, **15**: 177 –184
- Hoopen, R., Schleker, T., Manteuffel, R., Schubert, I.: Transient CENP-E-like kinetochore proteins in plants. *Chromosome Research*, 2002, **10**(7): 561 –570
- Choo, K. H. A.: Domain organization at the centromere and neocentromere. *Developmental Cell*, 2001, **1**(2): 165 – 177
- Jiang, J., Birchler, J. A., Parrott, W. A., Dawe, R. K.: A molecular view of plant centromeres. *TRENDS in Plant Science*, 2003, **8** (12): 570 – 575
- Kamaka, R.T., Biggins, S.: Histone variants: deviantns? *Genes & Development*, 2008, **19**: 295 –310
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., Higgins, D. G.: Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 2007, **23**: 2947 – 2948
- Malik, S. H., Henikoff, S.: Conflict begets complexity: the evolution of centromeres. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2002, **12**: 711 – 718
- Murashige, T., Skoog, F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 1962, **15**(3): 473-497.

- Nagaki, K., Terada, K., Wakimoto, M., Kashihara, K., Murata, M.: Centromere targeting of alien CENH3s in Arabidopsis and tobacco cells. *Chromosome Research*, 2010, **18**: 203 – 211
- Ng, R., Carbon, J: Mutational and *in vitro* protein-binding studies on centromere DNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 1987, **7**: 4522 – 4534
- Qi, L. L., Echalier, B., Chao, S. a kol.: A chromosome bin map of 16 000 expressed sequence tag loci and distribution of genes among the three genomes of polyploid wheat. *Genetics*, 2004, **168**: 701 – 712
- Rice, P., Longden, I., Bleasby, A.: EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics*, 2000, **16(6)**: 276 – 277.
- Staden, R., Beal K. F., Bonfield, J. K.: The Staden package, 1998. *Methods in Molecular Biology*, 2000, **132**: 115 – 130.
- Talbert, P. B., Masuelli, R., Tyagi, A. P., Comai, L., Henikoff S.: Centromeric Localization and Adaptive Evolution of an Arabidopsis Histone H3 Variant. *The Plant Cell*, 2002, **14**: 1053 – 1066
- Vermaak, D., Ahmad, K., Henikoff, S.: Maintenance of chromatin states: an open-and-shut case. *Current Opinion in Cell Biology*, 2003, **15**: 266 – 274
- Vermaak, D., Hayden, H. S., Henikoff, S.: Centromere targeting element within the histone fold domain of Cid. *Molecular and Cellular Biology*, 2002, **22(21)**: 7553 – 7561
- Wang, X., Wang, B., Liu, L., Cui, X., Yang, J., Wang, H., Jiang, H., Luo, B., Long, Z., Dou, W., Zhang, N., Peng, D.: Isolation of high quality RNA and construction of suppression subtractive hybridization library from ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaud). *Molecular Biology Reports*, 2010, **37(4)**: 2099 – 2103
- Wieland, G., Orthaus, S., Ohndorf, S., Diekman, S., Hemmerich, P.: Functional Complementation of Human Centromere Protein A (CENP-A) by Cse4p from *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 2004, **24(15)**: 6620 – 6630
- Yu, H., Dawe, R. K., Hiatt, E. N.: The plant kinetochore. *Trends in Plant Science*, 2000, **5(12)**: 543 – 547
- Yu, J., Hu, S., Wang, J. a kol.: A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L, ssp *indica*). *Science*, 2002, **296**: 79 – 92
- Zhong, C. X., Marshall, J. B., Topp, Ch., Mroczek, R., Kato, A., Nagaki, K., Birchler, J. A., Jiang, J., Dawe, R. K.: Centromeric retroelements and satellites interacts with maize kinetochore protein CENH3. *The Plant Cell*, 2002, **14**: 2825 – 2836