

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Vliv epigenetických faktorů při indukci diapauzy**  
**hmyzu**

Diplomová práce

**Petr Hůla**

Školitel: prof. Ing. Vladimír Košťál CSc.

České Budějovice 2017

## Diplomová práce

Hůla, P., 2017: Vliv epigenetických faktorů při indukci diapauzy hmyzu. [An effect of epigenetic factors during insect diapause. Mgr. Thesis, in Czech] – 42 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### Anotace:

The aim of this study was to help answering the question whether the epigenetic modifications do influence induction of larval diapause in drosophilid fly, *Chymomyza costata*. The search in transcriptomic database revealed 210 genes potentially acting in epigenetic modifications. A single gene, *dpy-30*, showed by far most pronounced response to photoperiod. As a key component of H3K4 methyltransferase, the role of *dpy-30* was examined by measuring global histone methylation (on histone 3 lysine 4, H3K4) in photoperiodically sensitive 3rd instar larvae of *C. costata* using three different methods. Although statistically significant difference was seen in the methylation level under two different photoperiodic conditions (long day vs. short day), the histones in cell nuclei of two tissues (muscle, fat body) showed slightly higher level of methylation under short days, which was contrary to our expectation.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval 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 bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

České Budějovice, duben 2017

.....

Petr Hůla

## **Poděkování:**

Rád bych poděkoval především vedoucímu mé diplomové práce prof. Ing. Vladimíru Košťálovi CSc. za vedení, trpělivost a cenné rady při psaní diplomové práce. Dále bych rád poděkoval Mgr. Martině Dalíkové a celému týmu prof. Ing. Vladimíra Košťála CSc. za metodickou pomoc při experimentální části práce. V neposlední řadě děkuji svým rodičům, že mi umožnili studovat vysokou školu.

## Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	1
1.1. Sezónnost.....	1
1.2. Diapauza.....	2
<b>2. Epigenetika</b> .....	3
2.1. Úvod do epigenetiky.....	3
2.2. Epigenetické mechanismy-ncRNA .....	4
2.3. Epigenetické mechanismy-Metylace DNA.....	5
2.4. Epigenetické mechanismy-Modifikace histonů .....	6
2.5. Epigenetika a dormance .....	9
2.6. <i>Chymomyza costata</i> .....	10
2.7. Metylace H3K4.....	10
<b>3. Cíle práce</b> .....	12
<b>4. Metodika</b> .....	13
4.1. Práce s databází .....	13
4.2. Experimentální část – úvodní poznámky .....	13
4.3. Experimentální část - protokoly .....	14
4.4. Statistické metody.....	23
<b>5. Výsledky</b> .....	24
5.1. Data mining.....	24
5.2. Měření globální metylace histonů H3K4 (Abcam).....	26
5.3. Měření metylace globální H3K4 (Epigentek) .....	27
5.4. Imunodetekce metylovaných histonů protilátkou .....	28
<b>6. Diskuse</b> .....	29
<b>7. Závěry</b> .....	32
<b>8. Literatura</b> .....	33
<b>9. Příloha</b> .....	38

# 1. Úvod

## 1.1. Sezónnost

Zástupci třídy hmyzu (*Insecta*) jsou relativně malé ektotermní organismy, citlivé na sezónní změny prostředí. Sezónnost neboli cyklické změny prostředí, lze pozorovat téměř napříč všemi terestrickými habitaty. Tyto změny jsou způsobeny rotací Země kolem Slunce. Cyklické prodlužování a zkracování dne/noci, tzv. fotoperioda, je způsobena sklonem zemské osy (23,5°). Mezi intenzitou slunečního záření (kritický faktor pro přežití téměř veškerého života na Zemi) a fotoperiodou existuje přímý vztah. Spolehlivost, stabilita v geologickém čase a přesnost fotoperiodického signálu sehrály jednu z klíčových rolí v evoluci sezónnosti. Přibližně před sto lety vznikaly první fotoperiodické experimenty při pěstování rostlin (Garner a Allard, 1920), následované objevem vlivu fotoperiody na morfologické změny u obojživelníků (Marcowitch, 1923, 1924) a objevem fotoperiodické diapauzy u *Bombyx mori* a *Locusta migratoria* (Kogure, 1933; Sabrosky et al., 1933). Regulace životních cyklů fotoperiodickým signálem je dnes obecně přijímanou teorií u různých druhů organismů včetně hmyzu (Wilde, 1962; Tauber et al., 1986; Danks, 1987, 2013; Nelson et al., 2010).

S nepříznivými environmentálními podmínkami se hmyz vyrovnává neobyčejnou fenotypovou plasticitou. To zahrnuje především změny na úrovni chování, morfologické změny, migraci a dormanci (Andrewartha, 1952; Danilevsky, 1965; Wolda, 1988; Danks, 2013; Nijhout, 2003). Při zhoršení environmentálních podmínek nastávají změny v chování vedoucí k udržení aktivního způsobu života. Při překročení určité hranice změn, které již limitují aktivní způsob života (období zimy, letní suchá období nebo období záplav v tropických oblastech), se musí hmyz nehostinným podmínkám vyhnout. Existují v zásadě dvě strategie. Jednou z nich je migrace – únik před environmentální nepřízní v prostoru. Druhou, daleko častější strategií je dormance – vstup do klidového stavu a tedy vyhnutí se nepříznivým podmínkám v čase (Southwood, 1962).

## 1.2. Diapauza

Dormance se dělí na dvě kategorie - na kviescenci a diapauzu (Lees, 1955; Danks, 1987; Košťál, 2006). Kviescence nastává jako přímá reakce na limitující faktor prostředí v jakémkoliv bodě ontogeneze organismu např. nedostatek potravy, kyslíku, vody; vysoké či nízké teploty atd. Společně s ukončením působení limitujícího faktoru končí i kviescence.

Na druhou stranu je diapauza endogenně (vnitřně; hormonálně) řízený proces zastavení vývoje ve zcela určité fázi ontogeneze. Tento proces je vyvolaný specifickým stop signálem z prostředí (Lees, 1955). Analogií takového signálu je něco jako „červená na semaforu“. U hmyzu je stop signálem navozujícím diapauzu nejčastěji fotoperioda. Ta dává hmyzu možnost předvídat nadcházející nepříznivé období.

Diapauza se dále dělí na fakultativní a obligátní. Fakultativní diapauza je volitelná a závislá na přírodních faktorech. To znamená, že má organismus možnost rozhodnutí mezi zastavením vývoje nebo jeho pokračováním. Obligátní diapauza je naopak pevně vepsána do vývojového programu a je tedy nezávislá na okolních podmínkách prostředí.

Podíváme-li se na diapauzu z ekologického pohledu, je možné jí rozdělit na hibernaci (přezimování) a estivaci (letní diapauza) (Masaki, 1980). Oba dva typy jsou indukovány fotoperiodou. U obou eko-typů diapauzy nastává též velmi podobná série dějů začínající ukládáním energetických zásob, následovaná přesunem na vhodné stanoviště popřípadě migrací, až po fyziologické a metabolické změny a schopnosti zvýšené rezistence proti nepříznivým environmentálním podmínkám. Hibernace je typicky indukována krátkým dnem (resp. dlouhou nocí). Oproti tomu estivace je indukována dlouhým dnem (resp. krátkou nocí). Je třeba zmínit, že většina druhů organismů včetně hmyzu (Nelson et al., 2010) neměří délku dne, ale právě noci (Saunders, 2002). Detailní mechanismus zpracování fotoperiodické informace popisují ve své bakalářské práci (Hůla, 2015) a nebudu se jím zde tedy dále zabývat.

## 2. Epigenetika

### 2.1. Úvod do epigenetiky

Dědičnost genetické informace zakódované v podobě DNA, je předmětem studia již přes 60 let. Hlavním mezníkem byl rok 2000, kdy se podařilo zmapovat (osekvenovat) lidský genom v rámci Projektu lidského genomu (Human Genom Project, HGP) (Venter et al., 2001). Cílem HGP bylo zmapovat všechny geny lidského organismu, nalézt jejich pozici na chromozomu a zjistit, jak je celý proces genové exprese řízený. Zjednodušeně řečeno rozklíčovat mechanismus převodu informace obsažené v sekvenci DNA na proteiny, které dále tvoří základní struktury buněk.

Genom všech eukaryot obsahuje tisíce genů, ale pouze zlomek z nich je v daném okamžiku aktivně přepisován v procesu genové transkripce. Tato transkripční „aktivita“ genu záleží na mnoha faktorech – typu buňky, fázi buněčného cyklu, environmentálních vlivech a dokonce i na stáří buněk v okolí (Boeger; Hinrich, et al., 2005). Mechanismus genové exprese je velmi komplikovaný již u jednobuněčných organismů jako např. *Saccharomyces cerevisiae* (Grunstein a Gasser, 2013). Složitost celého systému exponenciálně roste u mnohobuněčných organismů.

U mnohobuněčného organismu nese téměř každá buňka stejnou genetickou informaci (Chin et al., 2003). Jak je tedy možné, že z jednoho typu buňky vznikají buňky s naprosto odlišnou funkcí např. fibroblast, neuron či svalová buňka? Určitá kontrola buněčného typu je udržována transkripčními faktory, které zapínají či vypínají geny (Medema et al., 2000). Nicméně to nevysvětluje skutečnost, že buňka při dělení produkuje pouze buňky stejného typu a má tedy určitou „buněčnou paměť“. Tu si můžeme představit, jako další vrstvu informací ovlivňující DNA a regulující aktivitu genů (Riggs a Pfeifer., 1992). Udržení této buněčné identity je pravděpodobně způsobeno tzv. „epigenetickými“ mechanismy.



Slovo epigenetika poprvé použil Conrad Waddington v roce 1942. Definoval epigenetiku jako vědní obor, který studuje interakce mezi geny, jejich produkty a následným projevem - fenotypem (Waddington, 2014).

Dnes je epigenetika chápána jako obor studující reverzibilní mitoticky a/nebo meioticky dědičné změny ve funkci genu, beze změny v sekvenci jaderné DNA (Russo et al. 1996). Změny ve funkci genu spočívají v malých kovalentních modifikacích chromatinu. A to především DNA a histonů. V počítačové analogii můžeme genom chápat jako hardware zatímco epigenom jako software. Hardware odvede všechnu práci, zatímco mu software říká co a kdy dělat. Existují tři hlavní mechanismy, řídící funkci genomu – nekódující RNA (ncRNA), metylace DNA a modifikace histonů (Gaszner a Felsenfeld, 2006). Nekódujícím RNA a metylaci DNA se budeme v této práci věnovat pouze zběžně, hlavním zaměřením budou modifikace histonů.

## 2.2. Epigenetické mechanismy-ncRNA

Nekódující RNA (ncRNA) může přímo ovlivnit genovou expresi nebo hraje roli v procesu modifikace histonů a metylace DNA (Mattick a Makunin, 2006). Dělí se na dva typy – krátké nekódující RNA a dlouhé nekódující RNA.

Krátké (20-24 nukleotidů dlouhé) ncRNA zastavují transkripci navázáním na messenger RNA (mRNA - specifická třída RNA, fungující jako nosič informace nezbytné pro tvorbu proteinů z DNA). Tím vytvoří dvouvláknovou RNA (která je podobná viru) a specifický komplex proteinů RISC (Couzin, 2002) tuto sekvenci označí a komplex DICER sekvenci zničí (Kaikkonene et al., 2011). Druhou možností inhibice transkripce je nepřesné navázání na mRNA a tím blokáce dalšího přepisu genu.

Dlouhé (>200 nukleotidů) ncRNA regulují genovou expresi ovlivněním produkce mRNA. Účastní se na utišování genů, dědičnosti epigenetických značek, diferenciaci zárodečných buněk a regulaci imunitního systému (Eddy, 2001).

### 2.3. Epigenetické mechanismy-Metylace DNA

Dalším mechanismem ovlivňujícím transkripci je metylace DNA. U eukaryot se DNA skládá ze 4 různě se opakujících bází – adenosinu, cytosinu, guaninu a thyminu (Sinden, 2012). Metylace DNA spočívá v navázání metylové skupiny na pyrimidinové jádro cytosinu, čímž vznikne 5-metylcytosin (Walsh a Bestor, 1999). Celý proces je katalyzován skupinou enzymů známých jako DNA metyltransferázy (DNMT) (Bestor, 2000). Tyto enzymy jsou dobrým příkladem „writerů“ epigenetického kódu. Jejich hlavní funkcí je navázat metyl na cytosin následovaný guaninem-vytvořit tedy specifický motiv CpG (Goldberg et al., 2007). Tato modifikace je též známá jako epigenetická značka (Weber a Schübeler, 2007). Jde o velmi častou modifikaci spojovanou s kontrolou genové exprese (především potlačením transkripce).

Adrian Bird publikoval v roce 1985 klíčovou práci naznačující nenáhodné uspořádání motivu CpG napříč genomem. Většina CpG párů je koncentrována u určitých genů v oblasti promotoru (Bird, 1987). Oblast promotoru je sekvence DNA, na kterou se váže transkripční komplex a tím spustí transkripci genu. Oblasti s vysokou koncentrací CpG se nazývají CpG ostrovy (Gardiner-Garden a Frommer, 1987). Přibližně 60% genů kódujících proteiny leží v oblastech CpG ostrovů. Pokud jsou hladiny metylace na CpG ostrovech nízké, dojde k aktivaci genů, jestliže je tomu naopak, geny jsou utišené (Atequera, 2003).

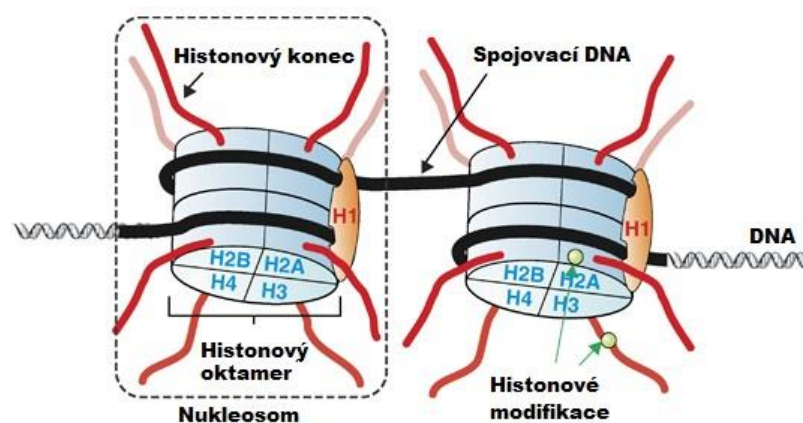
Metylace DNA tak přímo ovlivňuje genovou transkripci. Pokud je DNA metylována (DNMT naváže metyl na cytosin) dojde k reakci s MeCP2 (methyl CpG binding protein 2), (Meehan et al., 1992). Jakmile se MeCP2 naváže na 5-metylcytosin spustí se kaskáda reakcí vedoucí k vypnutí genu a tak zabránění transkripci (Nan et al., 1998). Pokud jsou DNA metyltransferázy typickým příkladem „writerů“ epigenetického kódu, MeCP2 je typickým zástupcem „readerů“ těchto značek. Jinými slovy „writery“ označí místo na genomu a „readery“ dají příkaz k dané akci. DNA se tímto mechanismem kondenzuje a není přístupná transkripci. To je zvláště důležité např. u neuronů, které mají jen omezenou funkci

regenerace. Není zde prostor pro chyby, a tak jsou určité geny kompletně potlačené po celou dobu vývoje, aby nezačaly produkovat např. hemoglobin nebo trávicí enzymy. U buněk dělicích se velmi často (např. kožní buňky) se vzor DNA metylace dědí na dceřinou buňku, dojde tak k potlačení stejných genů a kožní buňka zůstane kožní buňkou.

Mechanismus DNA metylace nebyl dlouhou dobu prokázán u všech eukaryot. Například u *Drosophila melanogaster* byla metylace DNA nalezena až ve spojení s ranými fázemi embryonálního vývoje (Lyko et al., 2000). Do té doby byla *D. melanogaster* považována za výjimku, u které tato modifikace genomu neprobíhá. Metylaci DNA můžeme najít např. i u rostlin (Finnegan et al., 2000) a filamentárních hub (Martienssen a Colot, 2001; Finnegan et al., 2000). Není tedy specifická pouze pro živočichy.

#### 2.4. Epigenetické mechanismy-Modifikace histonů

Jaderná DNA je různě organizovaná. Je namotána na proteinové molekuly zvané histony. Dohromady tvoří oktamerickou strukturu známou jako nukleosom (Richmond a Davey, 2003). Přibližně 75% histonového oktameru tvoří globulární strukturu, na které je namotána DNA. Zbýlých 25% tvoří histonové N-konce bohaté na lysin a arginin (Strahl a Allis, 2000). Na těchto N-koncích probíhá většina histonových modifikací (Gelato a Fischle, 2008). Zjednodušená struktura je naznačena na Obr. 1.



**Obr. 1:** Uspořádání DNA na nukleosomech. Nukleosom se skládá se z 8 histonových molekul a 8 histonových konců, omotaných 146 bázemi DNA (překresleno z Füllgrabe et al., 2011).

Jednotlivé nukleosomy mohou být kondenzované těsně u sebe – ve formě tzv. heterochromatinu nebo mohou existovat ve formě rozvolněné struktury – euchromatinu (Razin, 1998). Přechody mezi kondenzovanou a rozvolněnou strukturou chromatinu (i naopak) regulují právě modifikace histonových konců. Jedná se o malé kovalentní post-translační modifikace histonových aminokyselin, nejčastěji lysinu, ale také argininu (Strahl a Allis, 2000). Existuje několik typů modifikací histonů – acetylace, metylace, fosforylace, ubikvitinace, sumoylace a biotinizace (Bannister a Kouzarides, 2011). Mezi nejjednodušší modifikace na histonových koncích patří acetylace a metylace lysinových residuí (Gelato a Fischle, 2008). Acetylace lysinu je téměř vždy spojená s aktivací genové transkripce (Grunstein, 1997). Methylace lysinu je často spojována s aktivací chromatinu (rozvolněním), nicméně za určitých podmínek může chromatin deaktivovat (kondenzací) (Martin a Zhang, 2005). Mezi metylací a acetylací lysinu existuje vztah, ve kterém se mohou vzájemně zastupovat a podílet se společně na regulaci genomu (Winter a Fischle, 2010). Takovým příkladem je např. modifikace na histonu 3 (H3) lysinu 9 (K9). Pokud je H3K9 acetylovaný, dojde k aktivní transkripci chromatinu. Pokud je H3K9 metylovaný, dojde k potlačení transkripce (Winter a Fischle, 2010). Podobný vztah je i mezi histonovou ubikvitinací a metylací, není ale tak častý (Winter a Fischle, 2010).

Methylace lysinu se na histonech vyskytuje ve třech formách – monomethylace (me), dimethylace (me<sup>2</sup>) a trimethylace (me<sup>3</sup>) (Martin a Zhang, 2005). Díky této skutečnosti má methylace daleko více funkcí v regulaci genomu oproti acetylaci. Jako příklad poslouží methylace H3K4. Dimethylace H3K4 je spojována s rozvolněním chromatinu (DNA přístupná čtení), zatímco trimethylace H3K4 je téměř vždy přítomná při aktivní transkripci (Bernstein et al., 2002; Krogan et al., 2003; Ng et al., 2003; Shilatifard, 2008). Funkce methylace se mění i s pozicí metylovaného lysinu. Jak již bylo zmíněno výše, H3K4me<sup>3</sup> aktivuje transkripci. Když se metyluje stejný histon 3 na lysinu 9 (H3K9), dojde k potlačení transkripce (Armstrong, 2013). Jednotlivé histonové modifikace a jejich funkce jsou shrnuty v tabulce I.

Tab. I: Přehled histonových modifikací a jejich funkcí (podle Armstrong, 2013).

Modifikace	Histon	Pozice AMK	Funkce
Acetylace	H2A	Lysin 4	Aktivace transkripce
		Lysin 5	Aktivace transkripce
	H2B	Lysin 11 ( <i>S. cerevisiae</i> )	Aktivace transkripce
		Lysin 12 (savci)	Aktivace transkripce
		Lysin 15 (savci)	Aktivace transkripce
		Lysin 20	Aktivace transkripce
		Lysin 4 ( <i>S. cerevisiae</i> )	Aktivace transkripce
	H3	Lysin 9	Aktivace transkripce
		Lysin 14	Aktivace transkripce
		Lysin 18	Aktivace transkripce, oprava DNA
		Lysin 23	Aktivace transkripce, oprava DNA
		Lysin 27	Aktivace transkripce
		Lysin 56 ( <i>S. cerevisiae</i> )	Oprava DNA
	H4	Lysin 5	Přemístění histonů, aktivace transkripce, oprava DNA
		Lysin 8	Aktivace transkripce, oprava DNA
		Lysin 12	Aktivace transkripce, přemístění histonů
		Lysin 16	Aktivace transkripce, oprava DNA
		Lysin 91 ( <i>S. cerevisiae</i> )	Agregace chromozomu
	Metylace	H1	Lysin 26
H3		Lysin 4	Rozvolnění chromatinu (me2), Aktivace transkripce (me3)
		Arginin 8	Potlačení transkripce
		Lysin 9	Potlačení transkripce (me3)
		Arginin 17	Aktivace transkripce
		Lysin 27	Utišení transkripce, inaktivace X (me3)
		Lysin 36	Aktivace transkripce
		Lysin 79	Značka euchromatinu, aktivace transkripce
H4		Arginin 3	Aktivace transkripce
		Lysin 20	Utišení transkripce (me2), formace heterochromatinu (me3)
	Lysin 59	Utišení transkripce	
Fosforylace	H1	Serin 27	Aktivace transkripce, rozvolnění chromatinu
	H2A	Serin 1	Mitóza, rozvolnění chromatinu, potlačení transkripce
		Serin 139	Oprava DNA
	H2B	Serin 10	Apoptóza
		Serin 14	Apoptóza, oprava DNA
		Serin 33 ( <i>D. melanogaster</i> )	Aktivace transkripce
	H3	Threonin 3	Mitóza
		Serin 10	Aktivace transkripce
		Threonin 11	Mitóza
Serin 28		Mitóza	
H4	Serin 1	Mitóza, rozvolnění chromatinu, oprava DNA	
Ubikvitinace	H2A	Lysin 119	Spermatogeneze
	H2B	Lysin 120	Meióza
Sumoylace	H2A	Lysin 126 ( <i>S. cerevisiae</i> )	Potlačení transkripce
	H2B	Lysin 6 ( <i>S. cerevisiae</i> )	Potlačení transkripce
Biotinizace	H3	Lysin 4	Role v genové expresi nejasná
		Lysin 9	Role v genové expresi nejasná
		Lysin 18	Role v genové expresi nejasná
	H4	Lysin 12	Odpověď na poškození DNA

## 2.5. Epigenetika a dormance

Jelikož hrají epigenetické faktory důležitou roli při odpovědi organismu na změny prostředí, je velmi pravděpodobné, že budou hrát též roli v procesech dormance. Například deacetylase histonů se podílí na represi transkripce při hibernaci u sýslů (Storey, 2006) nebo při estivaci pouštních žab (Hudson et al., 2008). Metylace histonů se účastní regulace embryonální diapauzy u halančíků *Austrofundulus limnaeus* (Toni a Padilla, 2016). U korýše *Artemia* je metylací H4K20 regulována buněčná kviescence (Dai et al., 2017) Příkladem z rostlinné říše jsou víceleté trvalé rostliny, jejichž dormance zahrnuje procesy modifikace histonů, DNA metylaci i ncRNA (Ríos et al., 2014).

V problematice indukce hmyzí diapauzy epigenetickými vlivy je zatím k dispozici jen velmi málo informací. V současné chvíli se v příslušné literatuře dá nalézt pouze 5 prací, jež se experimentálně zabývají epigenetickými modifikacemi v souvislosti s diapauzou hmyzu. Prvním příkladem je indukce pupariální diapauzy za účasti ncRNA a acetylase H3 u mouchy *Sarcophaga bullata* (Reynolds et al., 2013; Reynolds et al., 2016). Dalším příkladem je regulace pupariální diapauzy pomocí metylace histonů u motýla *Helicoverpa armigera* (Lu et al., 2013). U včely *Megachile rotundata* byla před vstupem do diapauzy zjištěna aktivace systému Polycomb, který je důležitý pro remodelaci chromatinu (kondenzaci či rozvolnění) (Yokum et al., 2015). Poslední příklad poukazuje na regulaci diapauzy u vosy *Nasonia vitripennis*, jež je doprovázena změnami metylace DNA (Pegoraro et al., 2016).

Z výše zmíněných studií je tedy možné usoudit, že různé epigenetické modifikace hrají jistou, patrně důležitou roli v regulaci hmyzí diapauzy. Znalosti jsou ovšem pouze velmi povrchní. Všechny uvedené práce jsou víceméně popisné, předběžné a neposkytují přesný funkční průkaz účasti epigenetických faktorů na regulaci hmyzí diapauzy.

Pro experimentální část mé diplomové práce byl vybrán holarktický druh octomilky *Chymomyza costata*, která je taxonomicky příbuzná

octomilce *Drosophila melanogaster*, ale zároveň je ekologicky velmi odlišná, jelikož je silně sezónní a prodělává larvální

## 2.6. *Chymomyza costata*

Jedná se o octomilku patřící do čeledi *Drosophilidae*. Oproti příbuzné *Drosophila melanogaster* se nejedná o druh tropický, ale holarktický. Je tedy silně sezónní, v teplejších částech svého areálu výskytu s více generacemi ročně (Hackman et al., 1970). Larvální stádia divokého kmene (*wt*) této octomilky jsou fotoperiodicky citlivá (maximálně 2-3 den 3. instaru) (Košťál et al., 2000) a při vystavení podmínkám krátkého dne (světlo 12h / tma 12h) vstupují do fakultativní diapauzy. Za podmínek dlouhého dne (světlo 16h / tma 8h) larvy pokračují ve vývoji (dochází k pupariaci) (Riihimaa a Kimura, 1989).

## 2.7. Metylace H3K4

Naše předchozí RNAseq data naznačují u *C. costata* možnou regulaci vývoje epigenetickými procesy, zahrnujícími modifikace histonů, alternativní sestřih mRNA (z jednoho genu vznikne více proteinů) a malé ncRNA (Poupardin et al., 2015). Tato RNAseq studie měla za cíl charakterizovat globální vzor genové exprese v raných fázích diapauzy u *C. costata*. Blíže, najít geny spojené s indukcí diapauzy u larválních fotosenzitivních stádií raného 3. instaru (Košťál et al., 2000). Z této práce vyplynula následující pravděpodobná kaskáda reakcí vedoucí k indukcii diapauzy.

Fotoperiodický signál krátkého dne inhibuje enzymatickou aktivitu produktů genů *spook* a *spookier*, a tím syntézu důležitého vývojového hormonu 20-hydroxy ekdyzonu, za současné down-regulace ekdyzonového receptoru (*ecr*). To pravděpodobně vede ke snížení transkripce tzv. časných genů (early genes – *broad*, *E74*) a pozdních genů (late genes – *vrille*, *dpy-30*, *ago-2*), což jsou vesměs transkripční faktory, regulující expresi dalších několika stovek až tisíců cílových genů. To vše vede ke zpomalení až zastavení buněčného cyklu v primordiálních imaginálních strukturách

(imaginálních terčích), dále k restrukturalizaci metabolismu (např. syntéze zásobních proteinů, ochraně před oxidativním stresem, stabilizaci redoxní rovnováhy atd.) a finálně až k celkovému zastavení vývoje = k diapauze.

Jedním z nejvíce down-regulovaných genů (až 25x) za podmínek krátkého dne (a rovněž v reakci na přenos do dlouhého dne), byl gen *dpy-30* (Poupardin et al., 2015). Tento gen je důležitou podjednotkou enzymatického komplexu metyltransferázy, která je nezbytná pro globální metylaci H3K4 u kvasinek, červů, hmyzu i savců (Cho et al., 2007; Dehé et al., 2006; Hsu a Meyer, 1994; Jiang et al., 2011). Jak již bylo dříve zmíněno metylace H3K4 je spojena s rozvolněním chromatinu a transkripční aktivací. V roce 2013 bylo zjištěno, že DPY-30 je klíčovým regulátorem proliferace lidských embryonálních buněk. U buněk s inaktivovaným DPY-30 došlo k zastavení proliferace a současné down-regulaci mnoha genů zahrnující procesy buněčného růstu, buněčného cyklu, DNA rekombinaci a replikaci (Simboeck et al., 2013). Tato skutečnost je velmi podobná výsledkům RNAseq studie u *C. costata* a vedla nás k bližšímu zkoumání globální metylace H3K4 jakožto možného faktoru, indukujícího larvální diapauzu.



### 3. Cíle práce

Hlavním cílem mé diplomové práce bylo otevřít otázku epigenetických vlivů na indukci larvální diapauzy u mušky *Chymomyza costata*.

- (1) Najít v databázi mRNA transkriptů *C. costata* všechny geny účastnící se epigenetických modifikací.
- (2) Zjistit rozdíly v expresi těchto genů v závislosti na fotoperiodických podmínkách (prohledáním výsledkové databáze).
- (3) Vypracovat metodu měření úrovně celkové metylace H3K4 buněčných jader vybraných tkání *C. costata*.
- (4) Zjistit, zdali existuje rozdíl v metylaci H3K4 mezi larvami chovanými za LD (přímý vývoj) nebo za SD (diapauza).

## 4. Metodika

### 4.1. Práce s databází

Teoretická část práce vycházela z výsledkové databáze předchozí RNAseq studie (Tab. S1, Poupardin et al., 2015), za použití genové databáze FlyBase. Pomocí tzv. „GO terminologie“ (gene ontology terms) byly cíleně vyhledány geny zapojené do epigenetických modifikací, především do modifikací histonů.

Díky relativně blízké příbuznosti *C. costata* a *D. melanogaster* bylo možné nalézt strukturní homology drosophilích genů v transkriptomické Illuminia RNAseq databázi *C. costata* (Poupardin et al., 2015). Všechny strukturní homology jsme selektivně vybrali a posoudili rozdíly ve fotoperiodicky-indukované expresi. Ačkoli několik genů vykazovalo statisticky významné rozdíly v expresi, experimentálně jsme se soustředili na jediný gen, vykazující velmi silné rozdíly. Transkript genu *dpy-30* byl až 25x down-regulovaný za podmínek krátkého dne (a rovněž v reakci na přenos do krátkého dne). Jak již bylo zmíněno, tento gen je nepostradatelnou součástí metyltransferázy potřebné k metylaci histonů H3K4. To nás vedlo k experimentální práci a měření metylace H3K4.

### 4.2. Experimentální část – úvodní poznámky

Pro experimentální část byly použity tkáně (sval, tukové těleso) cca osm dní starých larev třetího instaru *C. costata* (*wt*). Larvy byly krmeny dietou složenou z kukuřičného škrobu, ječného sladu, agaru, sušených kvasinek, parabenu (metyl-4-hydroxybenzoát) a vody. Larvy byly chovány za fotoperiodických podmínek – LD (16 h světlo:8 hodin tma) - vývoj a SD (12 h světlo:12 hodin tma) – indukce diapauzy; 18°C. Za podmínek LD je osm dní stará larva 3. instaru již plně rozhodnutá o svém osudu – vývoji (wandering fáze – larvy vylézají z diety a připravují se na kuklení). Ve stejném čase byly odebrány stejně staré larvy (cca 8 dní starý 3. instar), chované za podmínek SD.

Tkáně larev byly vypitvány ve fyziologickém roztoku (PBS, phosphate buffer saline) pod binolupou. Ačkoli jsme dbali na striktní čistotu tkání, jednotlivé tkáně hmyzu jsou složeny z různých typů buněk. Jelikož nejsou komerční epigenetické kity určené pro práci s hmyzími tkáněmi, ale spíše se savčími, v první fázi experimentování bylo nutné vytvořit a optimalizovat protokol pro získání relativně čisté jaderné frakce. Postupně byla vyvinuta metoda, poskytující stálé výtěžky buněčných jader s histonovým proteinem z několika různých hmyzích tkání.

Imunodetekce metylovaných histonů v jádrech je založena na metodě pro detekci synaptonemálního komplexu, vyvinutého M.I. Pigozzim (Univerzita Buenos Aires). Jádra byla navázána na sklíčko SuperFrost (Fisher) a barvena protilátkou H3K4me3 (Abcam), DAPI v DABCU (Fisher). Poté byla vyfocena pod fluorescenčním mikroskopem a dále zpracována v programu ImageJ.

#### 4.3. Experimentální část - protokoly

V následujícím textu jsou uvedeny finální verze již ověřených a optimalizovaných protokolů. Alternativní verze jednotlivých kroků, jež byly během práce testovány a optimalizovány, nebudou z důvodů stručnosti uváděny. U komerčních kitů není známo přesné složení používaných reagensů, jednotlivé složky jsou tedy označeny heslovitě.

#### 4.3.1. Protokol na získání jaderné frakce

##### Chemikálie:

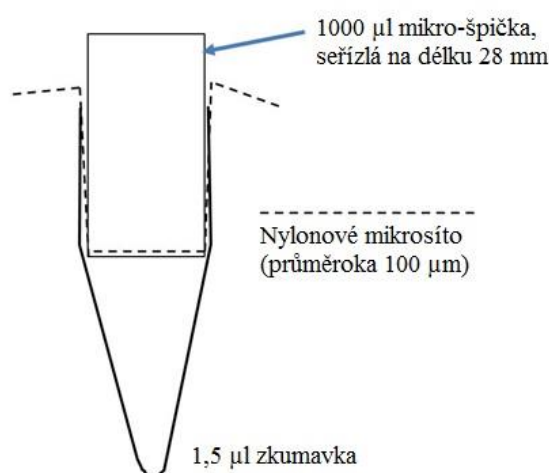
Homogenizační pufr: Tris 50 mM/pH 7,4; Sacharóza 0,25 mM;  $Mg^{2+}$  5 mM

Kolagenáza (GIBCO, 270 jednotek/mg): 4 jednotky/mg tkáně

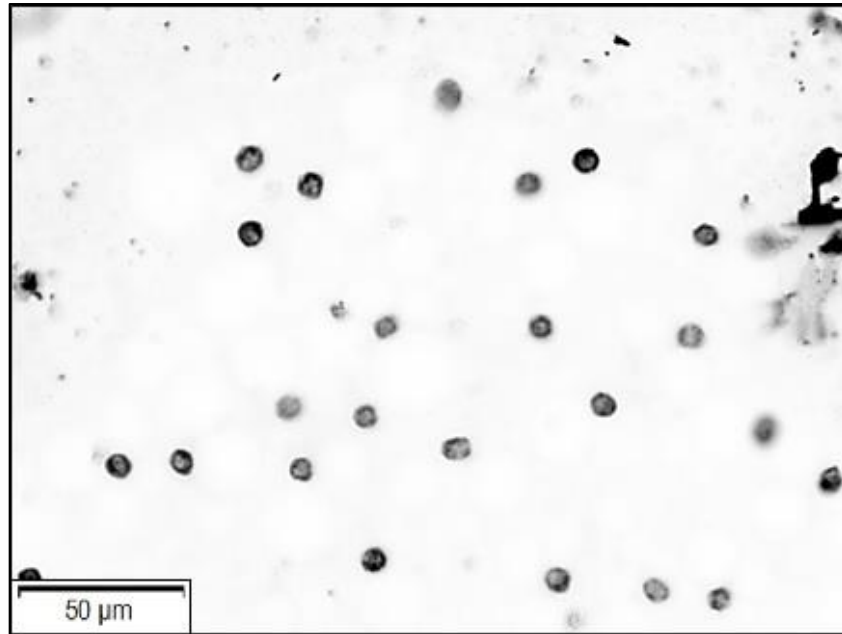
Fosfátový pufr: PBS, pH 7,4

##### Postup:

1) Připrav si sítku ve zkumavce dle následujícího nákresu.



- 2) Vypitvej čistě tkáně pod ledově chladným PBS; 10 tkání/vzorek.
- 3) Přenes tkáně do 500 µl homogenizačního pufru; možnost skladování tkání -80°C.
- 4) Pomalu nech vzorky roztát na ledu.
- 5) Zhomogenizuj tkáně pomocí ručního, baterií poháněného homogenizátoru; 1 min na ledu; všechna tkáň musí být dobře zhomogenizována.
- 6) Přidej 200 µl roztoku kolagenázy; vortex.
- 7) Inkubuj 10 min/37°C/rotační míchačka zkumavek.
- 8) Inkubuj 1 minutu na ledu.
- 9) Přepipetuj celý vzorek na připravené mikro síto; stoč 5 sekund.
- 10) Odstraň síto; stoč 10 000g/2 min/4°C; jádra vytvoří peletu.
- 11) Opatrně odstraň supernatant; ponech přibližně 5-10 µl supernatantu.
- 12) Použij peletu obsahující jádra k dalším analýzám



**Obr. 2:** Jádra tukového tělesa obarvená DAPI a převedena do stupňů šedi. Obrázek ilustruje získání velmi čisté jaderné frakce bez větších nečistot.

#### **4.3.2. Měření globální metylace H3K4 (kit ab115056, Abcam)**

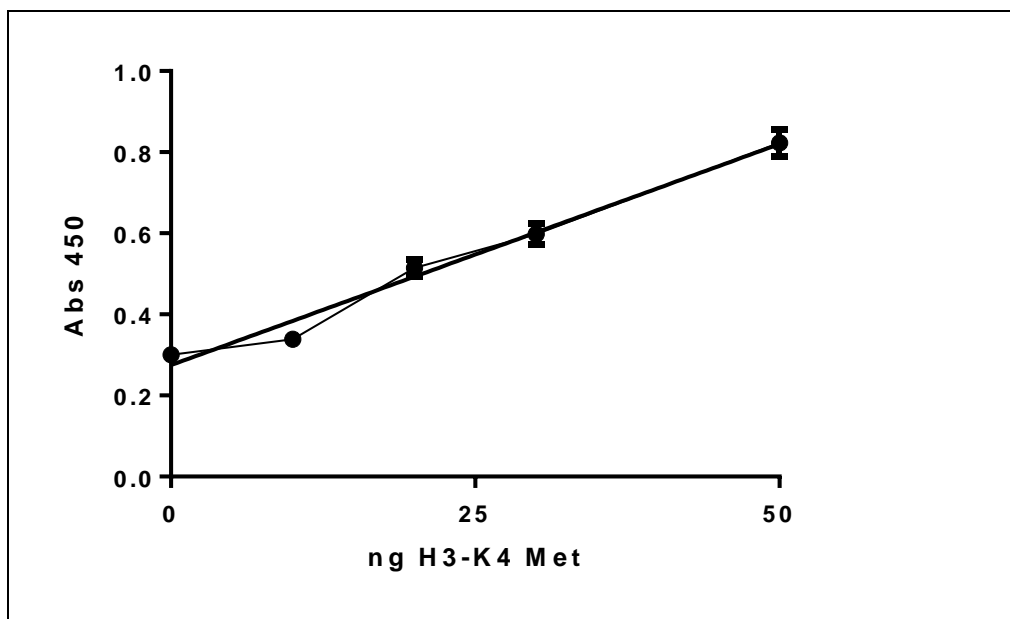
##### Reagencie:

Součást kitu: Extrakční pufr, protilátkový pufr, vymývací pufr, protilátka, substrát, zastavovací roztok, histonový extrakt (standard),

Ostatní: aceton, destilovaná voda

##### Postup:

- 1) Vezmi jadernou frakci a přidej 30  $\mu$ l extrakčního pufru; mix; vortex; rozpust' peletu vzniklou předchozím protokolem na získání jader.
- 2) Inkubuj 30 min/led.
- 3) Stoč 10 000g/5 min/4°C; jádra vytvoří peletu; odstraň supernatant.
- 4) Přidej 300  $\mu$ l acetonu; inkubuj přes noc/-20°C.
- 5) Stoč 15 000g/2 min/4°C; odstraň úplně aceton.
- 6) Suš 10 min při pokojové teplotě; všechen aceton se musí odpařit!
- 7) Rozpusť peletu v 15  $\mu$ l destilované vody.
- 8) Vezmi 5  $\mu$ l a změř ve vzorku množství proteinů metodou BCA.
- 9) Nařed' druhých 5  $\mu$ l destilovanou vodou na 1  $\mu$ g proteinu/1  $\mu$ l.
- 10) Připrav si pozitivní kontrolu (kalibrační křivku); metylované histony (standard) nařed' protilátkovým pufrem (0 – 100 ng).
- 11) Přidej 50  $\mu$ l protilátkového pufru do každé jamky na destičce.
- 12) Přidej 1  $\mu$ l vzorku; přidej 1  $\mu$ l pozitivní kontroly (do označených jamek); mix; překryj parafilmem; inkubuj 1,5 h při pokojové teplotě.
- 13) Odstraň obsah jamek; 3 x promyj 150  $\mu$ l promývacího pufru.
- 14) Nařed' protilátku (1:1000) protilátkovým pufrem; přidej 50  $\mu$ l protilátky do každé jamky; inkubuj 60 min/20°C/orbitální shaker.
- 15) Odstraň obsah jamek; 6 x promyj 150  $\mu$ l promývacího pufru.
- 16) Přidej 100  $\mu$ l substrátu; inkubuj 2 – 10 min po tmě; sleduj barevný průběh.
- 17) Přidej 50  $\mu$ l zastavovacího roztoku; změř absorbanci při 450 nm.



**Obr. 3:** Kalibrační křivka – závislost absorbance (450 nm) na množství metylovaných histonů H3K4. Kalibrační křivka byla vytvořena za použití standardního roztoku metylovaných histonů, který byl součástí kitu Abcam ab115056 v rozmezí 0-50 ng.

#### **4.3.3. Měření metylace H3K4 (kit P-3017-96, Epigentek)**

##### Reagencie:

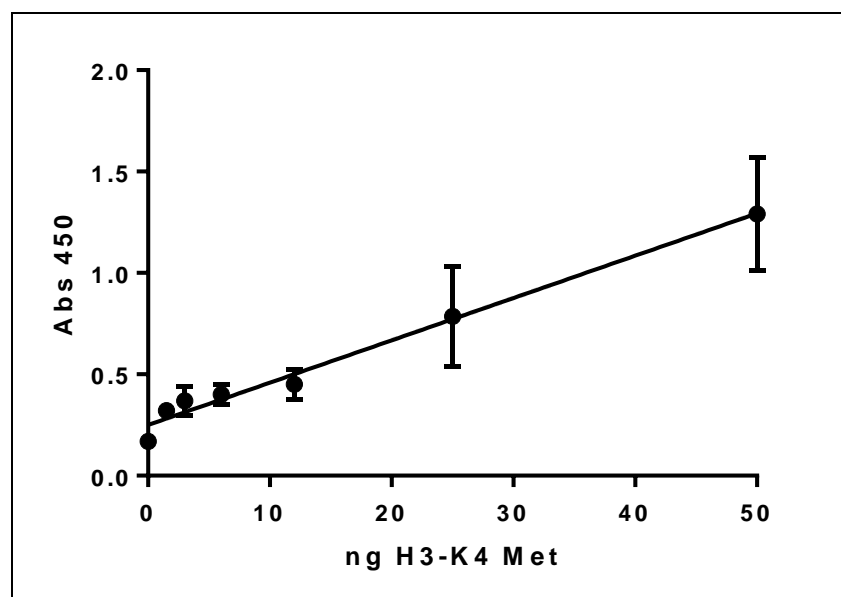
Součást kitu: GD1dil; GD2/gol; GD3dil; GD4; GD5; GD7dil; GD8dil; GD9; GD10; histonový extrakt (standard)

Ostatní: glycerol 0,25 mM; aceton; HCl; 100% TCA

##### Postup:

- 1) Vezmi jadernou frakci a přidej 30  $\mu$ l GD1dil a 90  $\mu$ l GD2/gol; mix; vortex; rozpust' peletu vzniklou předchozím protokolem na získání jader; inkubuj 5 min/led.
- 2) Stoč 20 000g/5 min/4°C; vezmi supernatant (cca 120  $\mu$ l); přepipetuj do nových zkumavek; přidej 100% TCA v poměru 1:3.
- 3) Inkubuj 30 min/led; stoč 15 000g/5 min/4°C; odstraň supernatant.
- 4) Přidej 1 ml acetonu 0,1% HCl; inkubuj 1 min/led; stoč 15 000g/2 min/4°C; odstraň supernatant; opakuj 2 x (celkem 3x)!
- 5) Promyj peletu čistým acetonem; inkubuj 1 min/led.
- 6) Stoč 15 000g/2 min/4°C; odstraň supernatant; suš 10 min při pokojové teplotě; všechnen aceton se musí odpařit!
- 7) Rozpusť peletu v 15  $\mu$ l destilované vody; vezmi 5  $\mu$ l a změř ve vzorku množství proteinů metodou BCA.
- 8) Nařed' druhých 5  $\mu$ l destilovanou vodou na 1  $\mu$ g proteinu/1  $\mu$ l.
- 9) Připrav si pozitivní kontrolu (kalibrační křivku).
- 10) Přidej 5  $\mu$ l vzorku; přidej 5  $\mu$ l pozitivní kontroly; inkubuj 90 min/37°C.
- 11) Přidej 150  $\mu$ l GD5 (blokace); inkubuj 45 min/37°C/orbital shaker
- 12) Odstraň obsah destičky; 3 x promyj 150  $\mu$ l GD3dil.
- 13) Přidej 50  $\mu$ l GD7dil (primární protilátka, 1  $\mu$ g/ml); inkubuj 60 min/pokojová teplota/ orbital shaker.
- 14) Odstraň obsah destičky; 4 x promyj 150  $\mu$ l GD3dil. Přidej 50  $\mu$ l GD8dil (sekundární protilátka); inkubuj 30 min/pokojová teplota.
- 15) Odstraň obsah destičky; 5 x promyj 150  $\mu$ l GD3dil.
- 16) Přidej 100  $\mu$ l GD9 (substrát); inkubuj 2-5 min po tmě; sleduj průběh.
- 17) Přidej 50  $\mu$ l GD10; změř absorbanci při 450 nm.





**Obr. 4:** Kalibrační křivka – závislost absorbance (450 nm) na množství metylovaných histonů H3K4. Kalibrační křivka byla vytvořena za použití standardního roztoku metylovaných histonů, který byl součástí kitu Epigentek P-3017-96 v rozmezí 0-50 ng.

#### 4.3.3.1. Imunodetekce H3K4me3 histonů (protilátka ab8580, Abcam)

##### Reagencie:

10 x KCM: KCl 120 mM; NaCl 20 mM; Tris 10 mM; EDTA 0,5 mM

KCM Triton X-100: nařed' 10 x KCM; Triton X-100 0,1%; pH 8,5

Fixáž: Sacharóza 190 mM; paraformaldehyd 1%

PhotoFlo: Kodak PhotoFlo 0,4%; pH 8,0

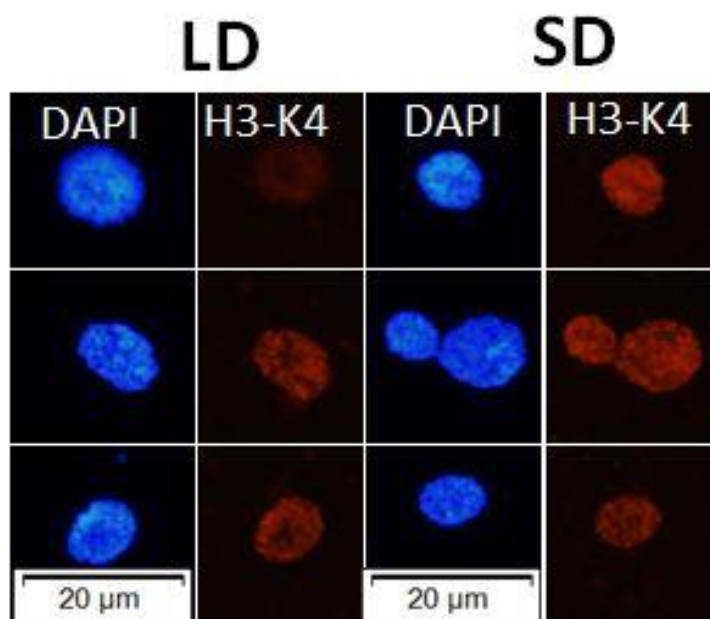
Blokační roztok: KCM; kozí sérum

Primární protilátka: ředění 1:125 v KCM + 10% blokační roztok

Sekundární protilátka: ředění 1:500 v KCM + 5% blokační roztok

##### Postup:

- 1) Vezmi 20  $\mu$ l jaderné frakce a smíchej s 20  $\mu$ l KCM přímo na sklíčku.
- 2) Inkubuj 10 min/pokojeová teplota; přidej 20  $\mu$ l fixáže; rozprostři fixáž rovnoměrně; inkubuj 1 h/4°C/vlhká komůrka.
- 3) Odstraň tekutinu ze sklíčka; promyj v PhotoFlo 2 min/pokojeová teplota; nech uschnout (10-15 min); možno skladovat 2 měsíce -80°C.
- 4) Promývání- přidej 1 mL KCM na sklíčko; inkubuj 5 min/pokojeová teplota; opakuj 3x.
- 5) Přidej 95  $\mu$ l blokačního roztoku; přikryj krycím sklíčkem (24x50 mm); vyvaruj se tvorby bublin; inkubuj přes noc/4°C/vlhká komůrka.
- 6) Promývání - odstraň krycí sklíčko; přidej 1 mL KCM na sklíčko; inkubuj 5 min/pokojeová teplota; opakuj 3x.
- 7) Přidej 50  $\mu$ l sekundární protilátky přikryj krycím sklíčkem (24x50 mm); vyvaruj se tvorby bublin; inkubuj 1 h/pokojeová teplota/vlhká komůrka.
- 8) Promývání - odstraň krycí sklíčko; přidej 1 mL KCM na sklíčko; inkubuj 5 min/pokojeová teplota; opakuj 3x.
- 9) Odstraň tekutinu ze sklíčka; promyj v PhotoFlo 30 s/pokojeová teplota; nech uschnout (10-15 min).
- 10) Přidej kapku DAPI v DABCU; přikryj krycím sklíčkem; zalakuj okraje lakem na nehty.



**Obr. 5:** Ukázka barvení jader tukového tělesa protilátkou H3K4me3 a DAPI za různých fotoperiodických podmínek.

#### 4.4. Statistické metody

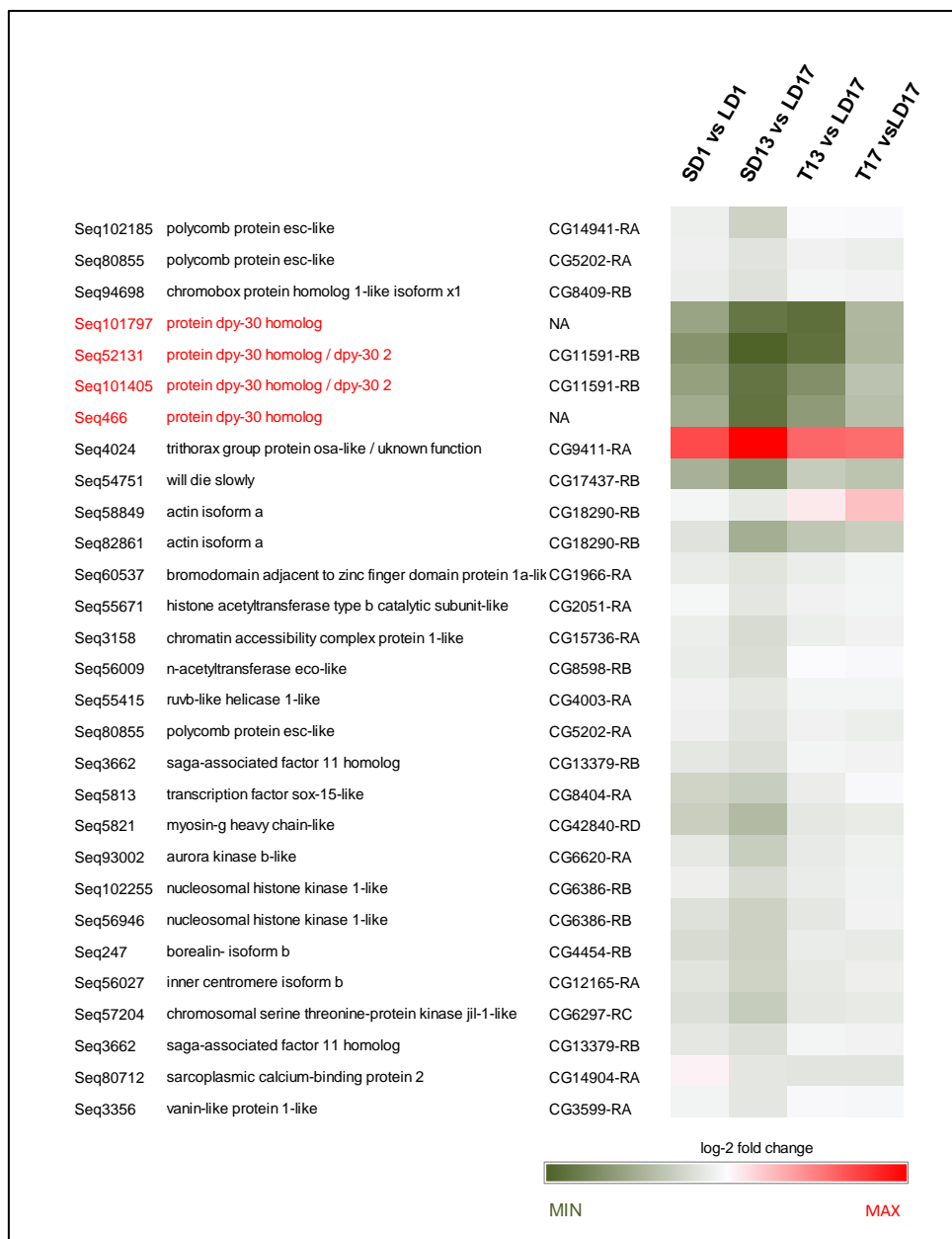
U obou komerčních kitů bylo celkové množství metylace H3K4 vztaženo na nanogram celkového jaderného proteinu. Variance rozptylu naměřených hodnot byla posouzena pomocí F testu, a pokud tato variace byla statisticky významně rozdílná u porovnávaných souborů, byl následně použit nepárový t-test s Welchovou korekcí. Pokud variace obou souborů byla stejná, byl použit standardní nepárový t-test.

U imunodetekce metylovaných H3K4me3 byl porovnáván signál H3K4me3 vůči signálu DAPI, v obou případech po odečtení signálu pozadí. Relativní intenzita signálu ( $H3K4me3 / DAPI$ ) byla nejdříve prověřena testem normality (D'Agostino & Pearson). Protože rozdělení neměla normální charakter, byla statisticky testována neparametrickým Mann Whitneyho testem. Všechny analýzy byly zpracovány pomocí softwaru Prism 6 (GraphPad).

## 5. Výsledky

### 5.1. Data mining

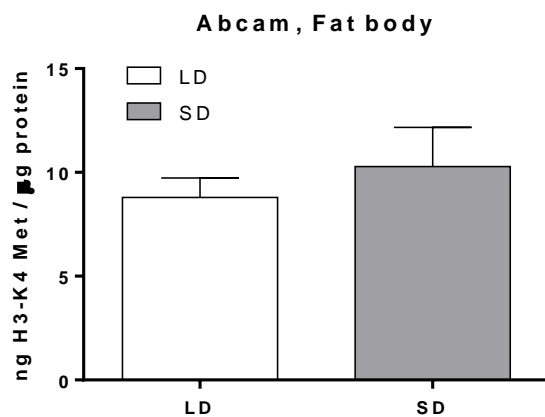
Hledání ve výsledkové databázi mRNA transkriptů *C. costata* vyústilo v identifikaci celkem 210 strukturních homologů epigenetických regulačních faktorů s vlivem na modifikaci histonů. Kompletní seznam všech nalezených sekvencí je uveden v příloze i s příslušnou analýzou fotoperiodicky podmíněných rozdílů v expresi. Heat mapa (Obr. 6) ukazuje pouze vybrané sekvence, a to ty, u nichž byl nalezen statisticky významný rozdíl v expresi pod vlivem fotoperiodického signálu. Naprostá většina sekvencí vykazovala down-regulaci za krátkého dne, popřípadě v reakci na přenos z dlouhého do krátkého dne. Nejsilnější down-regulace byla pozorována u čtyř různých sekvencí kódujících gen *dpy-30*. V závislosti na konkrétní sekvenci a konkrétním fotoperiodickém experimentu byla down-regulace genu *dpy-30* zhruba 4 až 25 ti násobná.



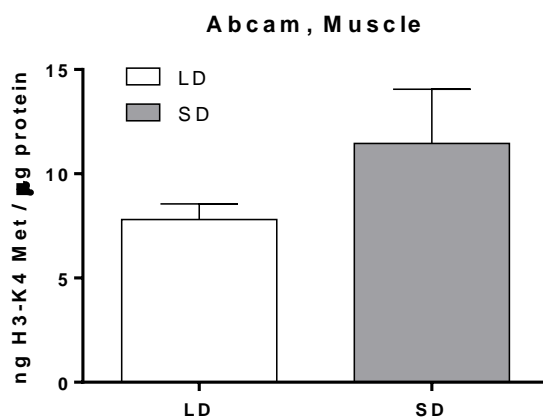
**Obr. 6:** Heat mapa znázorňující relativní rozdíl (log<sub>2</sub> fold change) v expresi příslušného genu u 3 dny starých larev 3. instaru larev v závislosti na fotoperiodických podmínkách [SD, krátký den; LD, dlouhý den; T, transfer z dlouhého do krátkého dne; číslice za písmenem ukazuje denní (Zeitgeber) čas v hodinách]. Data jsou vybrána z publikované výsledkové databáze (Poupardin et al., 2015). Heat mapa obsahuje pouze vybrané transkripty, u nichž byl nalezen statisticky významný rozdíl v expresi. Kompletní data-set (s číselnými hodnotami) všech transkriptů kódujících možné epigenetické faktory u *C. costata* je uveden v příloze této diplomové práce. Červeně je vyznačen gen *dpy-30*, u něž byl pozorován největší vliv fotoperiodických podmínek na expresi.

## 5.2. Měření globální metylace histonů H3K4 (Abcam)

Porovnání fotoperiodického vlivu na metylaci H3K4 u dvou tkání – tukového tělesa (fat body, Obr. 7) a svalu (muscle, Obr. 8) - u 8 dní starých larev 3. instaru.



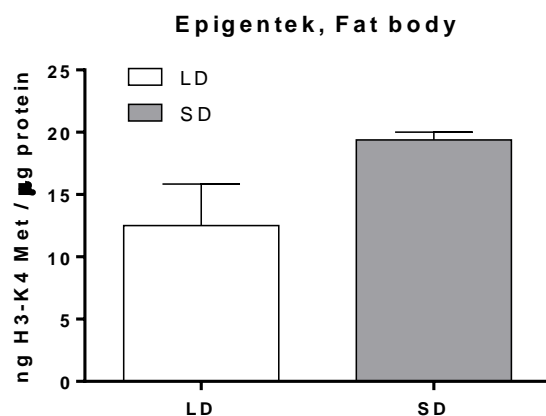
**Obr. 7:** Celkové množství metylovaných histonů vztahované na celkové množství jaderného proteinu v jádrech tukového tělesa. Statisticky nevýznamný rozdíl mezi larvami LD (vývoj) a SD (diapauza),  $p=0,2056$ , ns, (nepárový t-test).



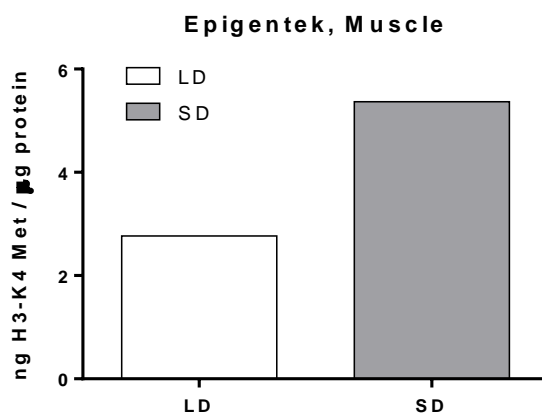
**Obr. 8:** Celkové množství metylovaných histonů vztahované na celkové množství jaderného proteinu v jádrech svalu. Statisticky významný rozdíl mezi larvami LD (vývoj) a SD (diapauza),  $p=0,0363$ , \* (nepárový t-test).

### 5.3. Měření metylace globální H3K4 (Epigentek)

Porovnání fotoperiodického vlivu na metylaci H3K4 u dvou tkání – tukového tělesa (fat body, Obr. 9) a svalu (muscle, Obr. 10) - u 8 dní starých larev 3. instaru.



**Obr. 9:** Celkové množství metylovaných histonů vztahované na celkové množství jaderného proteinu v jádrech tukového tělesa. Statisticky významný rozdíl mezi larvami LD (vývoj) a SD (diapauza),  $p=0,0238$ , \* (nepárový t-test s Welchovou korekturou).

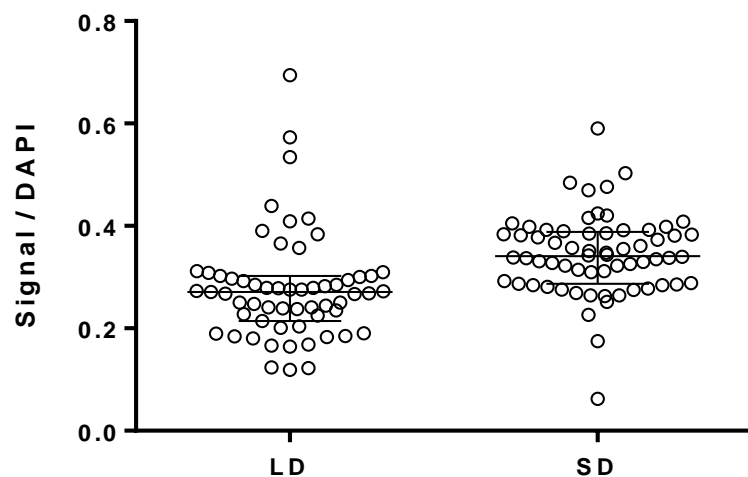


**Obr. 10:** Celkové množství metylovaných histonů vztahované na celkové množství jaderného proteinu v jádrech svalu. Rozdíl mezi larvami LD (vývoj) a SD (diapauza). Statistický test nebyl proveden, neboť k dispozici bylo pouze jediné opakování experimentu.



#### 5.4. Imunodetekce metylovaných histonů protilátkou

Porovnání relativního signálu H3K4me3 (v grafu H3K4me3=signal) jader tukového tělesa 8 dní starých larev 3. instaru vůči signálu DAPI (Obr. 11). Od signálu H3K4me3 i DAPI bylo odečteno pozadí.



**Obr. 11:** Porovnání relativní intenzity signálu metylovaných histonů H3K4 vůči signálu DAPI v jádrech tukového tělesa. Statisticky významný rozdíl mezi larvami LD (vývoj) a SD (diapauza),  $p < 0,0001$ , \*\*\*\* (Mann Whitney test).

## 6. Diskuse

Analýza výsledkové databáze shrnující vliv fotoperiodického signálu na genovou expresi u *C. costata* (Poupardin et al., 2015) naznačila, že modifikace histonů, a to specificky, metylace lysinu K4 u histonu H3 (H3K4) by mohla hrát významnou roli při indukci diapauzy.

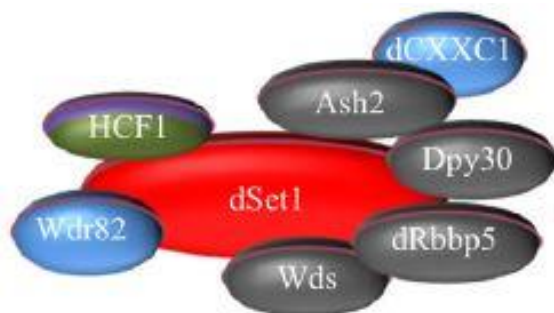
Trimetylace H3K4 (H3K4me3) je téměř vždy přítomna při rozvolnění chromatinu a aktivní transkripci (Bernstein et al., 2002; Krogan et al., 2003; Ng et al., 2003; Shilatifard, 2008). Aktivní přepis genomu je spjatý s přímým vývojem (např. proliferace primordiálních buněk), zatímco celkové snížení transkripce na celé úrovni organismu, a tak celkové zpomalení až zastavení vývoje, je spojeno se vstupem do diapauzy (Košťál et al., 2000).

Dostupná literatura o vlivu epigenetických faktorů na regulaci hmyzí sezónnosti nebo diapauzy ukazuje, že tyto vlivy se sice na regulaci v jednotlivých specifických případech pravděpodobně podílejí, ale zároveň literatura neumožňuje žádné jednotící shrnutí. U jednotlivých druhů hmyzu byly pozorovány různé typy epigenetických modifikací. Jednou z hlavních epigenetických modifikací regulující indukci diapauzy, je dle dostupné literatury změna metylace DNA. Bylo zjištěno, že tento epigenetický mechanismus se pravděpodobně účastní regulace diapauzy u *Sarcophaga bullata* (Reynolds et al., 2013; Reynolds et al., 2016) a *Nasonia vitripennis* (Pegoraro et al., 2016). Další epigenetickou modifikací ovlivňující indukci diapauzy je dle literatury metylace histonů. A to metylace H3K27 u *Helicoverpa armigera* (Lu et al., 2013) a *Megachile rotundata* (Yokum et al., 2015), která ovlivňuje proteinový represivní komplex polycomb 2 (PRC2) a extra sex comb (ESC). Tyto dva komplexy ovlivňují transkripci genu *ptth* a tak přímo ovlivňují syntézu prothoracikotropního hormonu (Lu et al., 2013).

Naše zaměření na metylaci H3K4 tedy nevycházelo ani tak z literárních údajů, jako právě z předchozí transkriptomické analýzy fotoperiodismu specificky u *C. costata*. Vycházeli jsme z toho, že několikanásobný rozdíl v

expresi genu *dpy-30* může být reflektován na úrovni enzymatické aktivity jeho produktu a může tedy způsobit pozorovatelný rozdíl v celkové úrovni metylace histonů v různých tkáních. Vzhledem ke známé funkci proteinu DPY-30 v komplexu metyltransferázy, jsme předpokládali nižší úroveň metylace za krátkého dne, tedy při vstupu do diapauzy. Tento předpoklad jsme se rozhodli testovat experimentálně.

Podle studie z roku 2013 (Simboeck et al., 2013) je *dpy-30* jedním z hlavních regulátorů proliferace lidských embryonálních buněk. Při inaktivaci *dpy-30* v metyltransferázovém komplexu došlo k zastavení proliferace a současné down-regulaci mnoha genů zahrnující procesy buněčného růstu, buněčného cyklu, DNA rekombinaci a replikaci (Simboeck et al., 2013). Na Obr. 12 můžeme vidět schéma metyltransferázového komplexu u *D. melanogaster* a pozici DPY-30.



**Obr. 12:** Metyltransferázový komplex Set1/COMPASS u *Drosophila melanogaster*.

Naše výsledková databáze obsahuje i některé další komponenty metyltransferázy. Jedním z nich je *Ash2*, který ale nevykazuje žádné statisticky významné rozdíly v expresi. Druhým je *Set1*, který také nevykazuje signifikantní rozdíly v expresi. Třetím genem je *wds*, který je statisticky významně down-regulovaný za podmínek krátkého dne (a rovněž v reakci na přenos do krátkého dne), tedy vykazuje fotoperiodickou odpověď velmi podobnou genu *dpy-30*.

Je tedy vidět, že různé komponenty jediného systému vykazují rozdílnou odpověď na fotoperiodický signál. Vliv genové exprese na enzymatickou aktivitu komplexního produktu lze tedy jen stěží předpovídat.

Oproti našemu očekávání, celková úroveň metylace H3K4 nejenže nebyla nižší za krátkého dne než za dlouhého dne, ale naopak výsledky všech tří metodicky různých přístupů ukázaly sice mírně, ale statisticky významně vyšší hladinu metylace H3K4 v jádrech svalů i tukového tělesa za krátkého dne. Naše výsledky je nutno považovat pouze za předběžné. Ukazují to, co je známo obecně, že úměra mezi expresí genu a aktivitou jeho produktu nemusí být jednoznačná a přímá (Feder and Walser, 2005).

Navíc, ačkoli celková kvantitativní úroveň metylace v závislosti na fotoperiodickém signálu byla u tkání larev *C. costata* podobná, lokalizace metylačního signálu (kvalitativní úroveň) se v rámci genomu mohla i výrazně lišit. Je známo, že se za různých biologických podmínek na genomu mění pozice epigenetických značek, a to jak při metylaci DNA, tak při modifikacích histonů (Park, 2009). Kvantifikací celkové metylace H3K4, tedy nelze přesně posoudit její funkci.

Kromě toho, epigenetické modifikace typicky pracují ve vzájemné kooperaci. To znamená, že pro posouzení jejich skutečného vlivu by bylo potřeba sledovat více různých typů modifikací najednou, a to u různých tkání (jež mohou na stejný signál reagovat rozdílně) (Jones a Takai, 2001), a navíc za využití metod, které umožňují přesnou lokalizaci každé epigenetické značky v rámci genomu. Prvním krokem je samozřejmě znalost struktury genomu, což je ovšem krok, který dosud u *C. costata* nebyl dokončen.

## 7. Závěry

- V databázi mRNA transkriptů *C. costata* bylo nalezeno celkem 210 sekvencí, které pravděpodobně kódují strukturní homology epigenetických regulačních faktorů s vlivem na modifikaci histonů.
- Analýza exprese v závislosti na fotoperiodickém signálu identifikovala gen *dpy-30* (komponent metyltransferázy histonů) jako výrazného kandidáta pro další analýzu.
- Analýza celkové úrovně metylace histonu H3K4 v buněčných jádrech dvou různých tkání larev *C. costata* našla statisticky významný rozdíl mezi larvami chovanými za krátkého dne (diapauza) a dlouhého dne (přímý vývoj).
- Oproti našemu předpokladu (vycházejícímu z exprese genu *dpy-30*) byla celková úroveň metylace H3K4 mírně vyšší za krátkého dne než za dlouhého dne.

## 8. Literatura

ANDREWARTHA, H. G. Diapause in relation to the ecology of insects. *Biological Reviews*, 1952, 27.1: 50-107.

ANTEQUERA, Francisco. Structure, function and evolution of CpG island promoters. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2003, 60.8: 1647-1658.

ARMSTRONG, Lyle. *Epigenetics*. Garland science, 2013.

BANNISTER, Andrew J.; KOUZARIDES, Tony. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research*, 2011, 21.3: 381-395.

BERNSTEIN, Bradley E., et al. Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99.13: 8695-8700.

BESTOR, Timothy H. The DNA methyltransferases of mammals. *Human molecular genetics*, 2000, 9.16: 2395-2402.

BIRD, Adrian P. CpG islands as gene markers in the vertebrate nucleus. *Trends in Genetics*, 1987, 3: 342-347.

BIRD, Adrian, et al. A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell*, 1985, 40.1: 91-99.

BOEGER, Hinrich, et al. Structural basis of eukaryotic gene transcription. *FEBS letters*, 2005, 579.4: 899-903.

COUZIN, Jennifer. *Small RNAs make big splash*. 2002.

DAI, Li, et al. SETD4 Regulates Cell Quiescence and Catalyzes the Trimethylation of H4K20 during Diapause Formation in *Artemia*. *Molecular and Cellular Biology*, 2017, 37.7: e00453-16.

DANILEVSKII, Aleksandr Sergeevich, et al. *Photoperiodism and seasonal development of insects*. Photoperiodism and seasonal development of insects., 1965.

DANKS, Hugh V., et al. *Insect dormancy: an ecological perspective*. Biological Survey of Canada (Terrestrial Artropods), 1987.

DANKS, Hugh Victor (ed.). *Insect life-cycle polymorphism: theory, evolution and ecological consequences for seasonality and diapause control*. Springer Science & Business Media, 2013.

DE WILDE, J. Photoperiodism in insects and mites. *Annual review of entomology*, 1962, 7.1: 1-26.

DEHÉ, Pierre-Marie, et al. Protein interactions within the Set1 complex and their roles in the regulation of histone 3 lysine 4 methylation. *Journal of biological chemistry*, 2006, 281.46: 35404-35412.

- EDDY, Sean R. Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nature Reviews Genetics*, 2001, 2.12: 919-929.
- FEDER, M. E.; WALSER, J.-C. The biological limitations of transcriptomics in elucidating stress and stress responses. *Journal of evolutionary biology*, 2005, 18.4: 901-910.
- FINNEGAN, E. Jean; PEACOCK, W. James; DENNIS, Elizabeth S. DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes. *Current opinion in genetics & development*, 2000, 10.2: 217-223.
- FÜLLGRABE, J.; KAVANAGH, E.; JOSEPH, B. Histone onco-modifications. *Oncogene*, 2011, 30.31: 3391-3403.
- GARDINER-GARDEN, M.; FROMMER, M. CpG islands in vertebrate genomes. *Journal of molecular biology*, 1987, 196.2: 261-282.
- GARNER, Wightman Wells; ALLARD, Harry Ardell. Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants 1. *Monthly Weather Review*, 1920, 48.7: 415-415.
- GASZNER, Miklos; FELSENFELD, Gary. Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nature Reviews Genetics*, 2006, 7.9: 703-713.
- GELATO, Kathy A.; FISCHLE, Wolfgang. Role of histone modifications in defining chromatin structure and function. *Biological chemistry*, 2008, 389.4: 353-363.
- GOLDBERG, Aaron D.; ALLIS, C. David; BERNSTEIN, Emily. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*, 2007, 128.4: 635-638.
- GRUNSTEIN, Michael. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*, 1997, 389.6649: 349-352.
- GRUNSTEIN, Michael; GASSER, Susan M. Epigenetics in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2013, 5.7: a017491.
- HACKMAN, W., et al. On the biology and karyology of *Chymomyza costata* Zetterstedt, with reference to the taxonomy and distribution of various species of *Chymomyza* (Dipt., Drosophilidae). *Ann Entomol Fenn*, 1970, 36: 1-9.
- HSU, David R.; MEYER, Barbara J. The dpy-30 gene encodes an essential component of the *Caenorhabditis elegans* dosage compensation machinery. *Genetics*, 1994, 137.4: 999-1018.
- HUDSON, Nicholas J., et al. Epigenetic silencers are enriched in dormant desert frog muscle. *Journal of Comparative Physiology B*, 2008, 178.6: 729-734.
- HŮLA, P. Denní a cirkadiánní rytmicita chování a fyziologických funkcí u larev mušky *Chymomyza costata*. Bakalářská práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2015.
- CHIN, Jason W., et al. An expanded eukaryotic genetic code. *Science*, 2003, 301.5635: 964-967.

- CHO, Young-Wook, et al. PTIP associates with MLL3-and MLL4-containing histone H3 lysine 4 methyltransferase complex. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282.28: 20395-20406.
- JIANG, Hao, et al. Role for Dpy-30 in ES cell-fate specification by regulation of H3K4 methylation within bivalent domains. *Cell*, 2011, 144.4: 513-525.
- JONES, Peter A.; TAKAI, Daiya. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*, 2001, 293.5532: 1068-1070.
- KAIKKONEN, Minna U.; LAM, Michael TY; GLASS, Christopher K. Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovascular research*, 2011, 90.3: 430-440.
- KOGURE, Makita. The influence of light and temperature on certain characters of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of the Department of Agriculture, Kyushu Imperial University*, 1933, 4.1: 1-93.
- KOŠTÁL, Vladimír, et al. Circadian component influences the photoperiodic induction of diapause in a drosophilid fly, *Chymomyza costata*. *Journal of insect physiology*, 2000, 46.6: 887-896.
- KOŠTÁL, Vladimír. Eco-physiological phases of insect diapause. *Journal of Insect Physiology*, 2006, 52.2: 113-127.
- KROGAN, Nevan J., et al. The Paf1 complex is required for histone H3 methylation by COMPASS and Dot1p: linking transcriptional elongation to histone methylation. *Molecular cell*, 2003, 11.3: 721-729.
- LEES, A. D. *The physiology of diapause in arthropods*, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 150pp, 1955.
- LU, Yu-Xuan; DENLINGER, David L.; XU, Wei-Hua. Polycomb repressive complex 2 (PRC2) protein ESC regulates insect developmental timing by mediating H3K27me3 and activating prothoracicotropic hormone gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288.32: 23554-23564. LYKO, Frank;
- MARCOVITCH, S. Plant lice and light exposure. *Science*, 1923, 58.1513: 537-538.
- MARCOVITCH, S. The migration of the Aphididae and the appearance of the sexual forms as affected by the relative length of daily light exposure. *J. agric. Res*, 1924, 27.5: 13-522.
- MARTIENSSEN, Robert A.; COLOT, Vincent. DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. *Science*, 2001, 293.5532: 1070-1074.
- MARTIN, Cyrus; ZHANG, Yi. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2005, 6.11: 838-849.
- MASAKI, Sinzo. Summer diapause. *Annual Review of Entomology*, 1980, 25.1: 1-25.
- MATTICK, John S.; MAKUNIN, Igor V. Non-coding RNA. *Human molecular genetics*, 2006, 15.suppl 1: R17-R29.



MEDEMA, René H., et al. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature*, 2000, 404.6779: 782-787.

MEEHAN, RICHARD, et al. Transcriptional repression by methylation of CpG. *J Cell Sci*, 1992, 1992.Supplement 16: 9-14.

MOHAN, Man, et al. The COMPASS family of H3K4 methylases in *Drosophila*. *Molecular and cellular biology*, 2011, 31.21: 4310-4318.

NAN, Xinsheng, et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, 1998, 393.6683: 386-389.

NELSON, Randy J.; DENLINGER, David L.; SOMERS, David E. (ed.). *Photoperiodism: the biological calendar*. Oxford University Press, 2010.

NG, Huck Hui, et al. Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Molecular cell*, 2003, 11.3: 709-719.

NIJHOUT, H. Frederik. Development and evolution of adaptive polyphenisms. *Evolution & development*, 2003, 5.1: 9-18.

PARK, Peter J. ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology. *Nature Reviews Genetics*, 2009, 10.10: 669-680.

POUPARDIN, Rodolphe, et al. Early transcriptional events linked to induction of diapause revealed by RNAseq in larvae of drosophilid fly, *Chymomyza costata*. *BMC genomics*, 2015, 16.1: 720.

RAMSAHOYE, Bernard H.; JAENISCH, Rudolf. Development: DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 2000, 408.6812: 538-540.

RAZIN, Aharon. CpG methylation, chromatin structure and gene silencing—a three-way connection. *The EMBO journal*, 1998, 17.17: 4905-4908.

REYNOLDS, J. A.; BAUTISTA-JIMENEZ, Robin; DENLINGER, D. L. Changes in histone acetylation as potential mediators of pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga bullata*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 2016, 76: 29-37.

REYNOLDS, Julie A., et al. Transcriptional evidence for small RNA regulation of pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga bullata*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 2013, 43.10: 982-989.

RIGGS, Arthur D.; PFEIFER, Gerd P. X-chromosome inactivation and cell memory. *Trends in Genetics*, 1992, 8.5: 169-174.

RICHMOND, Timothy J.; DAVEY, Curt A. The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature*, 2003, 423.6936: 145-150.

RIIHIMAA, ARI J.; KIMURA, MASAHITO T. Genetics of the photoperiodic larval diapause in *Chymomyza costata* (Diptera; Drosophilidae). *Hereditas*, 1989, 110.3: 193-200.

RÍOS, Gabino, et al. Epigenetic regulation of bud dormancy events in perennial plants. *Frontiers in plant science*, 2014, 5: 247.

- RUSSO, Vincenzo EA; MARTIENSSEN, Robert A.; RIGGS, Arthur D. Epigenetic mechanisms of gene regulation. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996.
- SABROSKY, Curtis W.; LARSON, Iva; NABOURS, Robert K. Experiments with light upon reproduction, growth and diapause in grouse locusts (Acrididae, Tetriginae). Transactions of the Kansas Academy of Science (1903-), 1933, 36: 298-300.
- SAUNDERS, David Stanley. Insect clocks. Elsevier, 2002.
- SHILATIFARD, Ali. Molecular implementation and physiological roles for histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation. Current opinion in cell biology, 2008, 20.3: 341-348.
- SIMBOECK, Elisabeth, et al. DPY30 regulates pathways in cellular senescence through ID protein expression. The EMBO journal, 2013, 32.16: 2217-2230.
- SINDEN, Richard R. DNA structure and function. Elsevier, 2012.
- STOREY, Kenneth B., et al. Evidence for a reduced transcriptional state during hibernation in ground squirrels. Cryobiology, 2006, 53.3: 310-318.
- STRAHL, Brian D.; ALLIS, C. David. The language of covalent histone modifications. Nature, 2000, 403.6765: 41-45.
- TAUBER, Maurice J.; TAUBER, Catherine A.; MASAKI, Shinzō. Seasonal adaptations of insects. Oxford University Press on Demand, 1986.
- TONI, Lee S.; PADILLA, Pamela A. Developmentally arrested *Austrofundulus limnaeus* embryos have changes in post-translational modifications of histone H3. Journal of Experimental Biology, 2016, 219.4: 544-552.
- VENTER, J. Craig, et al. The sequence of the human genome. science, 2001, 291.5507: 1304-1351.
- WADDINGTON, Conrad Hal. The strategy of the genes. Routledge, 2014.
- WALSH, Colum P.; BESTOR, Timothy H. Cytosine methylation and mammalian development. Genes & development, 1999, 13.1: 26-34.
- WEBER, Michael; SCHÜBELER, Dirk. Genomic patterns of DNA methylation: targets and function of an epigenetic mark. Current opinion in cell biology, 2007, 19.3: 273-280.
- WINTER, Stefan; FISCHLE, Wolfgang. Epigenetic markers and their cross-talk. Essays in biochemistry, 2010, 48: 45-61.
- WOLDA, H. Insect seasonality: why?. Annual review of ecology and systematics, 1988, 19.1: 1-18.
- YOCUM, George D., et al. Key molecular processes of the diapause to post-diapause quiescence transition in the alfalfa leafcutting bee *Megachile rotundata* identified by comparative transcriptome analysis. Physiological Entomology, 2015, 40.2: 103-112.



**Příloha: Pokračování**

GO:0051568	histone H3-K4 methylation	CG10931	CG10931	NF	or homeotic discs isoform c	CG6887-RC	-0.24	-0.35	-0.36	-0.23
	ash1	Seq6354	Seq6354	Seq6354	or homeotic discs isoform c	CG6887-RC	-0.24	-0.35	-0.36	-0.23
	ash2	Seq6887	CG6887	Seq6887	ash2 histone methyltransferase complex subunit ash2-like isoform x1	CG6677-RC	0.32	0.42	0.29	0.12
			CG6677	Seq80654	ash2 histone methyltransferase complex subunit ash2-like isoform x1	CG6677-RC	0.31	0.51	0.38	0.27
				Seq80653	ash2 histone methyltransferase complex subunit ash2-like isoform x1	CG6677-RC	0.19	0.47	0.36	0.17
				Seq928	ash2 histone methyltransferase complex subunit ash2-like isoform x1	CG6677-RC	0.23	0.43	0.36	0.10
				Seq81585	ash2 histone methyltransferase complex subunit ash2-like isoform x1	CG6677-RC	0.36	0.37	0.26	0.24
	Bbb5	CG5585	CG5585	Seq5585	retinoblastoma-binding protein 5-like	CG5585-RA	-0.05	-0.12	0.04	0.03
	Dpy-30L1	CG6444	CG6444	Seq5389	protein dpy-30 homolog	CG6444-RA	-0.15	-0.43	0.21	0.14
			name search	Seq101797	protein dpy-30 homolog	NA	-2.87	-1	-4.37	-1
				Seq2131	protein dpy-30 homolog / dpy-30.2	CG11591-RB	-3.44	-1	-5.07	-1
				Seq101405	protein dpy-30 homolog / dpy-30.2	CG11591-RB	-3.02	-1	-4.42	-1
				Seq466	protein dpy-30 homolog	NA	-2.65	-1	-4.50	-1
	Lpt	CG5591	CG5591	Seq9374	lost phds of trr	CG5591-RA	-0.23	-0.25	-0.22	-0.12
	Mmn1	CG13778	CG13778	Seq94416	menin isoform a	CG13778-RC	-0.03	0.06	-0.20	0.05
	Nco6	CG14023	CG14023	Seq107389	isoform f	CG14023-RF	-0.04	0.06	-0.20	-0.06
	nej	CG15319	CG15319	Seq94855	isoform b	CG15319-RC	-0.10	0.10	-0.15	-0.25
				Seq81631	isoform e	CG15319-RE	-0.03	-0.13	-0.54	-0.33
	Ptip	CG32133	CG32133	Seq94854	histone acetyltransferase p300-like isoform x2	CG15319-RD	-0.16	-0.44	-0.28	-0.07
	Sbf	CG6939	CG6939	Seq110664	dna topoisomerase 2-binding protein 1-like	CG32133-RA	-0.24	-0.22	-0.38	-0.25
	Set1	CG40351	CG40351	Seq4695	set domain binding isoform b	CG6939-RB	-0.24	-0.23	-0.09	0.00
	trr	CG3848	CG3848	Seq5208	histone-lysine n-methyltransferase trithorax-like	CG40351-RE	-0.17	-0.11	0.00	-0.09
	trx	CG8651	CG8651	Seq80789	histone-lysine n-methyltransferase trithorax-like	CG3848-RC	-0.11	-0.19	-0.19	-0.06
				Seq82621	histone-lysine n-methyltransferase trithorax-like	CG8651-RD	-0.05	-0.01	-0.13	0.07
				Seq93542	histone-lysine n-methyltransferase trithorax-like	CG8651-RD	-0.10	-0.07	-0.30	-0.05
			name search	Seq4024	trithorax group protein osa-like / unknown function	CG9411-RA	0.71	1	1	0.60
				Seq95208	histone-lysine n-methyltransferase trithorax-like / Set1	CG40351-RE	-0.17	-0.11	0.00	-0.09
	Utx	CG5640	CG5640	Seq5921	histone-lysine n-methyltransferase trithorax-related	CG3848-RC	-0.11	-0.19	-0.19	-0.06
	Wdr8	CG17293	CG17293	Seq81939	lysine-specific demethylase 3b-like isoform x2	CG5640-RD	-0.36	-0.25	-0.17	-0.10
	wds	CG17437	CG17437	Seq3834	gtp-binding protein 10 homolog	CG17293-RA	-0.26	-0.23	0.02	0.04
				Seq81922	protein will die slowly-like	CG17437-RB	-0.43	-0.36	-0.14	-0.23
	yki	CG4005	CG4005	Seq54751	will die slowly	CG17437-RB	-2.44	-1	-1.56	-1.87
				Seq560	isoform g	CG4005-RD	0.09	0.14	-0.06	-0.01
				Seq82497	protein yorkie-like	CG4005-RG	0.04	-0.02	0.03	-0.12
				Seq111687	isoform d	CG4005-RD	-0.19	-0.25	0.01	-0.10
GO:0034968	histone lysine methylation	CG10931	CG10931	NF						
		CG4565	CG4565	Seq56077	lysine-specific demethylase 3b-like	CG8165-RA	0.09	-0.07	-0.10	-0.02
GO:0016577	histone demethylation	JHDW2	CG8165	Seq57140	jmjc domain-containing histone demethylation protein 1-like	CG11033-RB	-0.04	-0.23	-0.15	-0.10
		Kdm2	CG11033	Seq59697	histone demethylase isoform a	CG15835-RA	-0.39	-0.40	-0.24	-0.23
		Kdm4A	CG15835	Seq58282	histone demethylase isoform b	CG33182-RD	0.17	0.34	0.03	0.03
		Kdm4B	CG33182	Seq113442	histone demethylase isoform b	CG33182-RE	0.30	0.51	0.07	0.09
		ltd	CG9088	Seq58026	lysine-specific demethylase lid-like	CG9088-RE	-0.05	-0.18	-0.11	-0.03
		Su(var)3-3	CG17149	Seq56165	spermine oxidase-like	CG17149-RA	-0.22	-0.15	0.01	-0.01
				Seq82915	rest corepressor-like isoform x2	CG42687-RC	-0.23	-0.27	-0.14	-0.14
				Seq5069	rest corepressor-like isoform x2	CG42687-RF	-0.28	-0.30	0.10	0.08
				Seq54342	protein frt1 homolog	CG6480-RA	-0.36	-0.39	0.01	-0.03



Příloha: Pokračování										
Eip3	CG15433	Seq107359	probable elongator complex protein 3-like	CG15433-RA	-0.20	-0.23	0.16	0.10		
enok	CG11290	Seq60512	isoform c	CG11290-RA	0.06	0.19	-0.02	-0.04		
Gas41	CG9207	Seq65299	yeast domain-containing protein 4-like	CG9207-RA	-0.03	-0.17	0.01	0.00		
Gen5	CG4107	Seq80388	histone acetyltransferase kat2a-like	CG4107-RA	-0.05	-0.11	-0.01	-0.12		
HDAC3	CG2128	Seq85405	histone deacetylase 3-like	CG2128-RA	-0.32	-0.41	-0.08	-0.07		
HDAC4	CG1770	Seq95012	histone deacetylase 4-like isoform x3	CG1770-RG	0.12	0.05	-0.06	-0.07		
Ing3	CG6632	Seq55951	inhibitor of growth protein 3-like	CG6632-RA	-0.18	-0.37	-0.35	-0.19		
Moos2	CG10238	Seq89340	molybdopterin synthase catalytic subunit-like	CG10238-RA	-0.29	-0.24	0.18	0.09		
mof	CG3025	Seq81143	males-absent on the first	CG3025-RA	-0.12	-0.02	-0.30	-0.15		
		Seq4620	males-absent on the first	CG3025-RA	-0.02	-0.37	-0.14	-0.11		
MRG15	CG6363	Seq55431	nu4 complex subunit eat3 homolog	CG6363-RA	-0.24	-0.58	-0.15	-0.20		
MigBP	CG13746	Seq5710	guanine nucleotide-binding protein subunit gamma-1-like isoform x1	CG13746-RA	-0.16	-0.08	0.07	0.02		
		Seq60469	guanine nucleotide-binding protein subunit gamma-1-like isoform x1	CG13746-RA	-0.04	-0.11	0.08	-0.02		
mnl-1	CG10385	Seq93594	protein male-specific lethal-1-like	CG10385-RA	-0.13	-0.12	-0.11	0.00		
Naa60	CG18177	Seq93851	n-alpha-acetyltransferase 60-like	CG18177-RC	0.23	0.17	0.08	-0.06		
		Seq2883	n-alpha-acetyltransferase 60-like	CG18177-RB	-0.23	0.12	0.28	0.13		
		Seq2882	n-alpha-acetyltransferase 60-like	CG18177-RB	-0.17	0.08	0.12	0.01		
		Seq69551	n-alpha-acetyltransferase 60-like	CG18177-RA	0.00	-0.23	-0.15	0.05		
NC2β	CG4185	NF								
Nipped-A	CG33554	Seq60531	nipped- isoform e	CG33554-RE	-0.02	-0.03	-0.04	-0.05		
pont	CG4003	Seq55415	ruvb-like helicase 1-like	CG4003-RA	-0.35	-0.67	-0.24	-0.24		
rept	CG9750	Seq6943	isoform b	CG9750-RB	-0.24	-0.25	-0.01	-0.05		
Sgf29	CG30390	NF								
		Seq80855	polycomb protein esc-like	CG5202-RA	-0.40	-0.76	-0.34	-0.45		
		Seq3662	saga-associated factor 11 homolog	CG13379-RB	-0.68	-0.92	-0.24	-0.31		
		Seq5813	transcription factor sox-15-like	CG8404-RA	-1.31	-1.50	-0.47	-0.11		
		Seq3821	myosin-g heavy chain-like	CG42840-RD	-1.49	-2.16	-0.67	-0.55		
		Seq66018	saga complex subunit spt3-like	CG3169-RA	-0.18	-0.32	-0.19	-0.24		
Spt3	CG3169	Seq3814	CG6506	CG6506-RA	-0.23	-0.28	-0.15	-0.30		
Spt7	CG6506	Seq80536	isoform a	CG17689-RA	-0.27	-0.19	-0.33	-0.14		
Spt20	CG17689	Seq1340	transcription initiation factor ttfid subunit 1-like isoform x1	CG17603-RE	-0.13	-0.15	-0.05	-0.03		
Taf1	CG17603	Seq80973	transcription initiation factor ttfid subunit 10-like	CG3069-RA	-0.21	-0.57	0.01	-0.08		
Taf10b	CG3069	Seq101695	ttf-assoociated factor isoform a	CG17358-RA	-0.18	-0.28	-0.15	-0.17		
Taf12	CG17358	Seq55981	histone acetyltransferase tip60-like isoform x2	CG6121-RC	-0.02	-0.55	-0.19	-0.12		
Tip60	CG6121	Seq59674	isoform b	CG9007-RB	-0.05	-0.09	-0.30	-0.11		
upSET	CG9007	Seq5744	transcription elongation factor b polypeptide 3-like	CG4448-RA	-0.30	-0.29	-0.13	-0.13		
wda	CG4448	NF								
YL-1	CG4621									

GO:0016575	Priloha: Pokračování	histone deacetylation
HDAC1	CG471	Seq4686 histone deacetylase 3-like
HDAC3	CG2128	Seq5405 histone deacetylase 3-like
HDAC4	CG1770	Seq6012 histone deacetylase 4-like isoform x3
HDAC6	CG6170	Seq82001 histone deacetylase 6-like isoform x2
		Seq109434 histone deacetylase 6-like isoform x2
		Seq113121 histone deacetylase 6-like isoform x1
HDAC11	CG3119	NF
	<b>name search</b>	Seq56262 histone deacetylase 11-like
		there is a lot of various histone deacetylases in our RNAeq database ...
Sirt1	CG5216	Seq60083 nad-dependent histone deacetylase sir2-like
		Seq80083 nad-dependent histone deacetylase sir2-like
Sirt2	CG5085	Seq80029 nad-dependent deacetylase sirtuin 2 homolog
Sirt4	CG3187	Seq54641 nad-dependent protein deacetylase sir4-like
Sirt6	CG6284	Seq56273 nad-dependent protein deacetylase sir6-like
		CG6284-RB
		CG7012-RC
		CG7471-RA
		CG2128-RA
		CG1770-RG
		CG6170-RF
		CG6170-RD
		CG6170-RC
		CG7012-RC
		CG5216-RA
		CG5216-RA
		CG5085-RA
		CG3187-RC
		CG6284-RB
		CG7012-RC
		CG7471-RA
		CG2128-RA
		CG1770-RG
		CG6170-RF
		CG6170-RD
		CG6170-RC
		CG7012-RC
		CG5216-RA
		CG5216-RA
		CG5085-RA
		CG3187-RC
		CG6284-RB
		CG7012-RC
		CG7471-RA
		CG2128-RA
		CG1770-RG
		CG6170-RF
		CG6170-RD
		CG6170-RC
		CG7012-RC
		CG5216-RA
		CG5216-RA
		CG5085-RA
		CG3187-RC
		CG6284-RB
		CG7012-RC
		CG7471-RA
		CG2128-RA
		CG1770-RG
		CG6170-RF
		CG6170-RD
		CG6170-RC
		CG7012-RC
		CG5216-RA
		CG5216-RA
		CG5085-RA
		CG3187-RC
		CG6284-RB
		CG7012-RC
		CG7471-RA
		CG2128-RA
		CG1770-RG
		CG6170-RF
		CG6170-RD
		CG6170-RC
		CG7012-RC
		CG5216-RA
		CG5216-RA
		CG5085-RA
		CG3187-RC
		CG6284-RB
		CG7012-RC
		CG7471-RA
		CG2128-RA
		CG1770-RG
		CG6170-RF
		CG6170-RD
		CG6170-RC
		CG7012-RC
		CG5216-RA
		CG5216-RA
		CG5085-RA
		CG3187-RC
		CG6284-RB
		CG7012-RC
		CG7471-RA
		CG2128-RA
		CG1770-RG
		CG6170-RF
		CG6170-RD
		CG6170-RC
		CG7012-RC
		CG5216-RA
		CG5216-RA
		CG5085-RA
		CG3187-RC
		CG6284-RB
		CG7012-RC
		CG7471-RA
		CG2128-RA
		CG1770-RG
		CG6170-RF
		CG6170-RD
		CG6170-RC
		CG7012-RC
		CG5216-RA
		CG5216-RA
		CG5085-RA
		CG3187-RC
		CG6284-RB
		CG7012-RC
		CG7471-RA
		CG2128-RA
		CG1770-RG
		CG6170-RF
		CG6170-RD
		CG6170-RC
		CG7012-RC
		CG5216-RA
		CG5216-RA
		CG5085-RA
		CG3187-RC
		CG6284-RB
		CG7012-RC
		CG7471-RA
		CG2128-RA
		CG1770-RG
		CG6170-RF
		CG6170-RD
		CG6170-RC
		CG7012-RC
		CG5216-RA
		CG5216-RA
		CG5085-RA
		CG3187-RC
		CG6284-RB
		CG7012-RC
		CG7471-RA
		CG2128-RA
		CG1770-RG
		CG6170-RF
		CG6170-RD
		CG6170-RC
		CG7012-RC
		CG5216-RA
		CG5216-RA
		CG5085-RA
		CG3187-RC
		CG6284-RB
		CG7012-RC
		CG7471-RA
		CG2128-RA
		CG1770-RG
		CG6170-RF
		CG6170-RD
		CG6170-RC
		CG7012-RC
		CG5216-RA
		CG5216-RA
		CG5085-RA
		CG3187-RC
		CG6284-RB
		CG7012-RC
		CG7471-RA
		CG2128-RA
		CG1770-RG
		CG6170-RF
		CG6170-RD
		CG6170-RC
		CG7012-RC
		CG5216-RA
		CG5216-RA
		CG5085-RA
		CG3187-RC
		CG6284-RB
		CG7012-RC
		CG7471-RA
		CG2128-RA
		CG1770-RG
		CG6170-RF
		CG6170-RD
		CG6170-RC
		CG7012-RC
		CG5216-RA
		CG5216-RA
		CG5085-RA
		CG3187-RC
		CG6284-RB
		CG7012-RC
		CG7471-RA
		CG2128-RA
		CG1770-RG
		CG6170-RF
		CG6170-RD
		CG6170-RC
		CG7012-RC
		CG5216-RA
		CG5216-RA
		CG5085-RA
		CG3187-RC
		CG6284-RB
		CG7012-RC
		CG7471-RA
		CG2128-RA
		CG1770-RG
		CG6170-RF
		CG6170-RD
		CG6170-RC
		CG7012-RC
		CG5216-RA
		CG5216-RA
		CG5085-RA
		CG3187-RC
		CG6284-RB
		CG7012-RC
		CG7471-RA
		CG2128-RA
		CG1770-RG
		CG6170-RF
		CG6170-RD
		CG6170-RC
		CG7012-RC
		CG5216-RA
		CG5216-RA
		CG5085-RA
		CG3187-RC
		CG6284-RB
		CG7012-RC
		CG7471-RA
		CG2128-RA
		CG1770-RG
		CG6170-RF
		CG6170-RD
		CG6170-RC
		CG7012-RC
		CG5216-RA
		CG5216-RA
		CG5085-RA
		CG3187-RC
		CG6284-RB
		CG7012-RC
		CG7471-RA
		CG2128-RA
		CG1770-RG
		CG6170-RF
		CG6170-RD
		CG6170-RC
		CG7012-RC
		CG5216-RA
		CG5216-RA
		CG5085-RA
		CG3187-RC
		CG6284-RB
		CG7012-RC
		CG7471-RA
		CG2128-RA
		CG1770-RG
		CG6170-RF
		CG6170-RD
		CG6170-RC
		CG7012-RC
		CG5216-RA
		CG5216-RA
		CG5085-RA
		CG3187-RC
		CG6284-RB
		CG7012-RC
		CG7471-RA
		CG2128-RA
		CG1770-RG
		CG6170-RF
		CG6170-RD
		CG6170-RC
		CG7012-RC
		CG5216-RA
		CG5216-RA
		CG5085-RA
		CG3187-RC
		CG6284-RB
		CG7012-RC
		CG7471-RA
		CG2128-RA
		CG1770-RG
		CG6170-RF
		CG6170-RD
		CG6170-RC
		CG7012-RC
		CG5216-RA
		CG5216-RA
		CG5085-RA
		CG3187-RC
		CG6284-RB
		CG7012-RC
		CG7471-RA
		CG2128-RA
		CG1770-RG
		CG6170-RF
		CG6170-RD
		CG6170-RC
		CG7012-RC
		CG5216-RA
		CG5216-RA
		CG5085-RA
		CG3187-RC
		CG6284-RB
		CG7012-RC
		CG7471-RA
		CG2128-RA
		CG1770-RG
		CG6170-RF
		CG6170-RD
		CG6170-RC
		CG7012-RC
		CG5216-RA
		CG5216-RA
		CG5085-RA
		CG3187-RC
		CG6284-RB
		CG7012-RC
		CG7471-RA
		CG2128-RA
		CG1770-RG
		CG6170-RF
		CG6170-RD
		CG6170-RC
		CG7012-RC
		CG5216-RA
		CG5216-RA
		CG5085-RA
		CG3187-RC
		CG6284-RB
		CG7012-RC
		CG7471-RA
		CG2128-RA
		CG1770-RG
		CG6170-RF
		CG6170-RD
		CG6170-RC
		CG7012-RC
		CG5216-RA
		CG5216-RA
		CG5085-RA
		CG3187-RC
		CG6284-RB
		CG7012-RC
		CG7471-RA
		CG2128-RA
		CG1770-RG
		CG6170-RF
		CG6170-RD
		CG6170-RC
		CG7012-RC
		CG5216-RA
		CG5216-RA
		CG5085-RA
		CG3187-RC
		CG6284-RB
		CG7012-RC
		CG7471-RA
		CG2128-RA
		CG1770-RG
		CG6170-RF
		CG6170-RD
		CG6170-RC
		CG7012-RC
		CG5216-RA
		CG5216-RA
		CG5085-RA
		CG3187-RC
		CG6284-RB
		CG7012-RC
		CG7471-RA
		CG2128-RA
		CG1770-RG
		CG6170-RF
		CG6170-RD
		CG6170-RC
		CG7012-RC
		CG5216-RA
		CG5216-RA
		CG5085-RA
		CG3187-RC
		CG6284-RB
		CG7012-RC
		CG7471-RA
		CG2128-RA
		CG1770-RG
		CG6170-RF
		CG6170-RD
		CG6170-RC
		CG7012-RC
		CG5216-RA
		CG5216-RA