

# Biofyzikální ústav

Akademie věd České republiky, v. v. i.

23. 11. 2015, konferenční sál hotelu Sladovna v Černé Hoře

## Struktura a funkce buňky v normě a patologii

*Metodické postupy vhodné pro studium epigenetických procesů*

### PROGRAM:

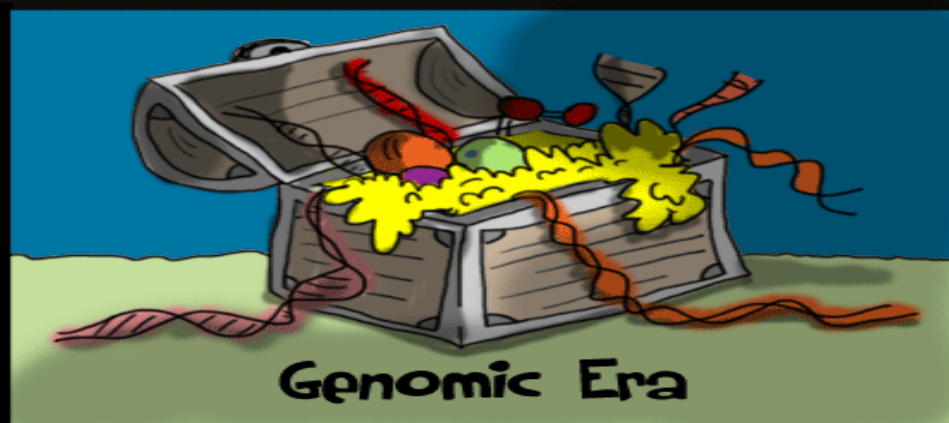
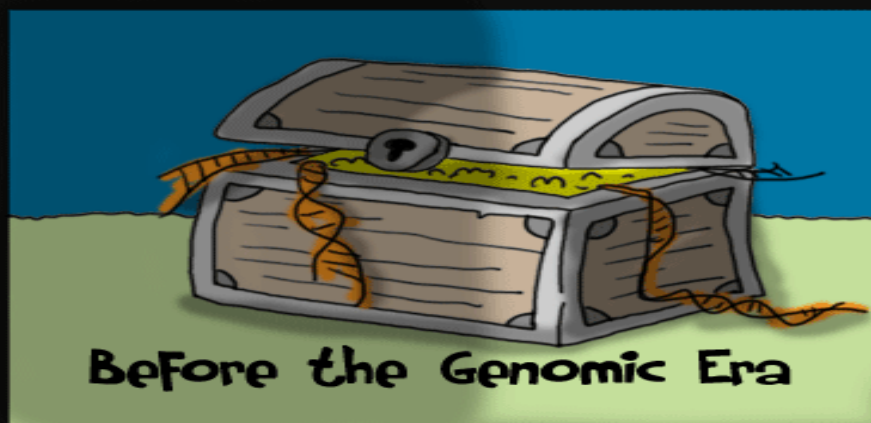
11.00	<b>Odjezd od Biofyzikálního ústavu</b> (doprava zajištěna)
12.00 – 13.00	<b>Kovařík Aleš (BFÚ, DME):</b> Molekulární přenašeče epigenetické informace v eukaryotické buňce a jejich evoluce
13.00 – 14.30	<b>Oběd</b>
14.30 – 15.00	<b>Dobešová Eva (BFÚ, DME):</b> Epigenetické umlčování ribozomálních RNA genů u allotetraploidních rostlin <i>Tragopogon mirus</i>
15.00 – 15.30	<b>Rodriguez Jose (BFÚ, DRDG):</b> Moderní metodologické přístupy epigenetické analýze: Modifikace DNA a histonů
15.30 – 16.00	<b>Vondráček Jan (BFÚ, DC):</b> Mechanismy transkripční regulace cytochromů P450 rodiny 1 a jejich úloha v biotransformaci karcinogenů
16.00 – 16.30	<b>Zapletal Ondřej (BFÚ, DC):</b> Produkt komenzální střevní mikroflóry, butyrát, moduluje bioaktivaci a genotoxicitu polyaromatických uhlovodíků v buňkách tlustého střeva prostřednictvím inhibice histon deacetyláz
16.30 – 16.50	<b>Krátký Stanislav (ÚPT):</b> Elektronová litografie
16.50 – 17.10	<b>Krejčí Jana (BFÚ, DMCC):</b> Epigenetické znaky myších a krysích mozků
17.10 – 17.30	<b>Bártová Eva (BFÚ, DMCC):</b> Reparace DNA a efekty HDAC a PRMT1 inhibitorů
17.30 – 18.30	<b>Diskuze</b>
19.00 – 20.30	<b>Večeře</b>
20.30	<b>Odjezd do Brna</b> (doprava zajištěna)

# Plán přednášky

- Epigenetická pojetí ontogeneze
- Kovalentní modifikátory chromatinu a krátké molekuly RNA
- Epigenetická transgenerační paměť
- Epigenetické změny provázející dediferenciaci buněk
- Inhibitory epigenetických drah



# Postgenomická éra ve vědě otevírá další záhady



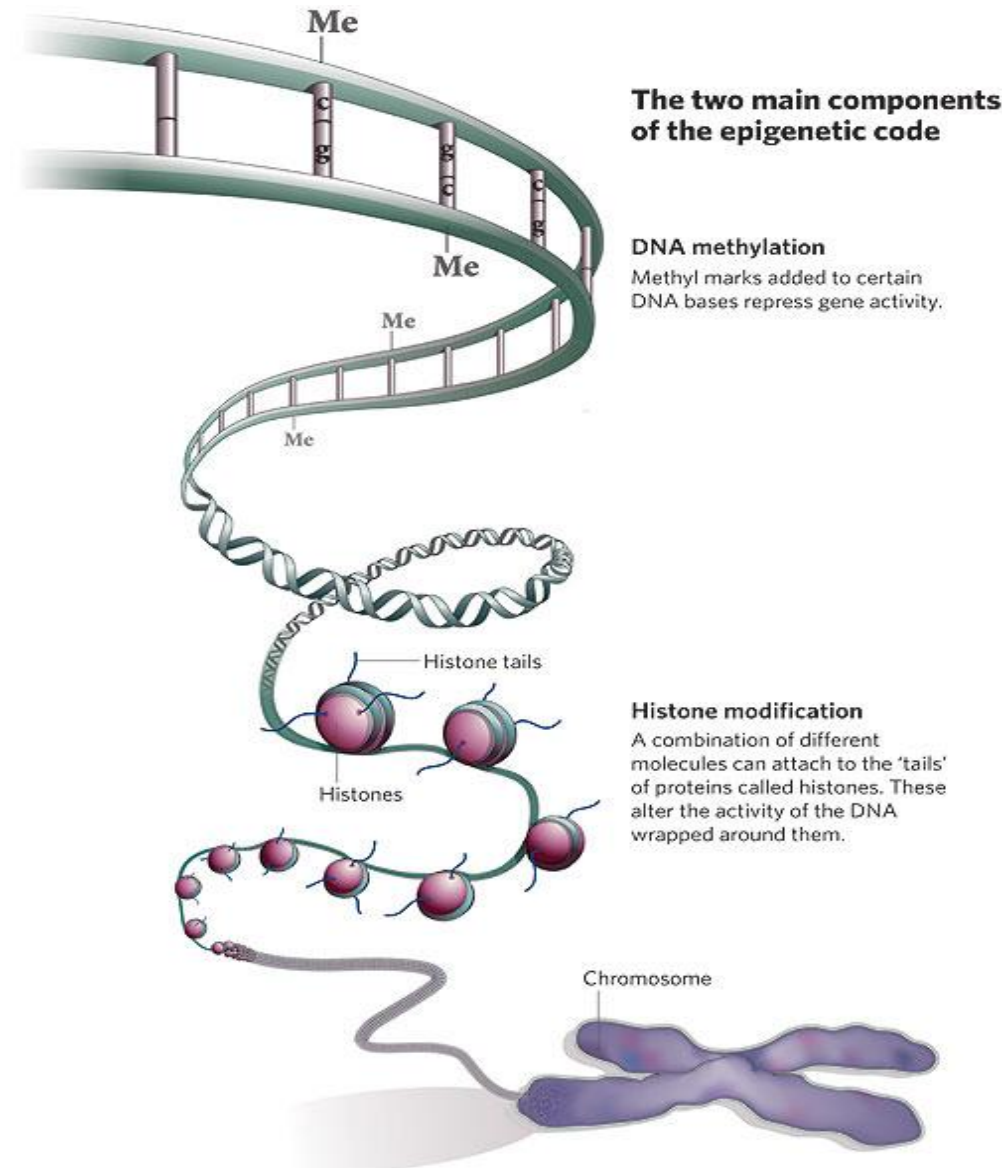


Genetika je podstatně složitější než jsme si (Mendel, Watson, Crick ...) mysleli.

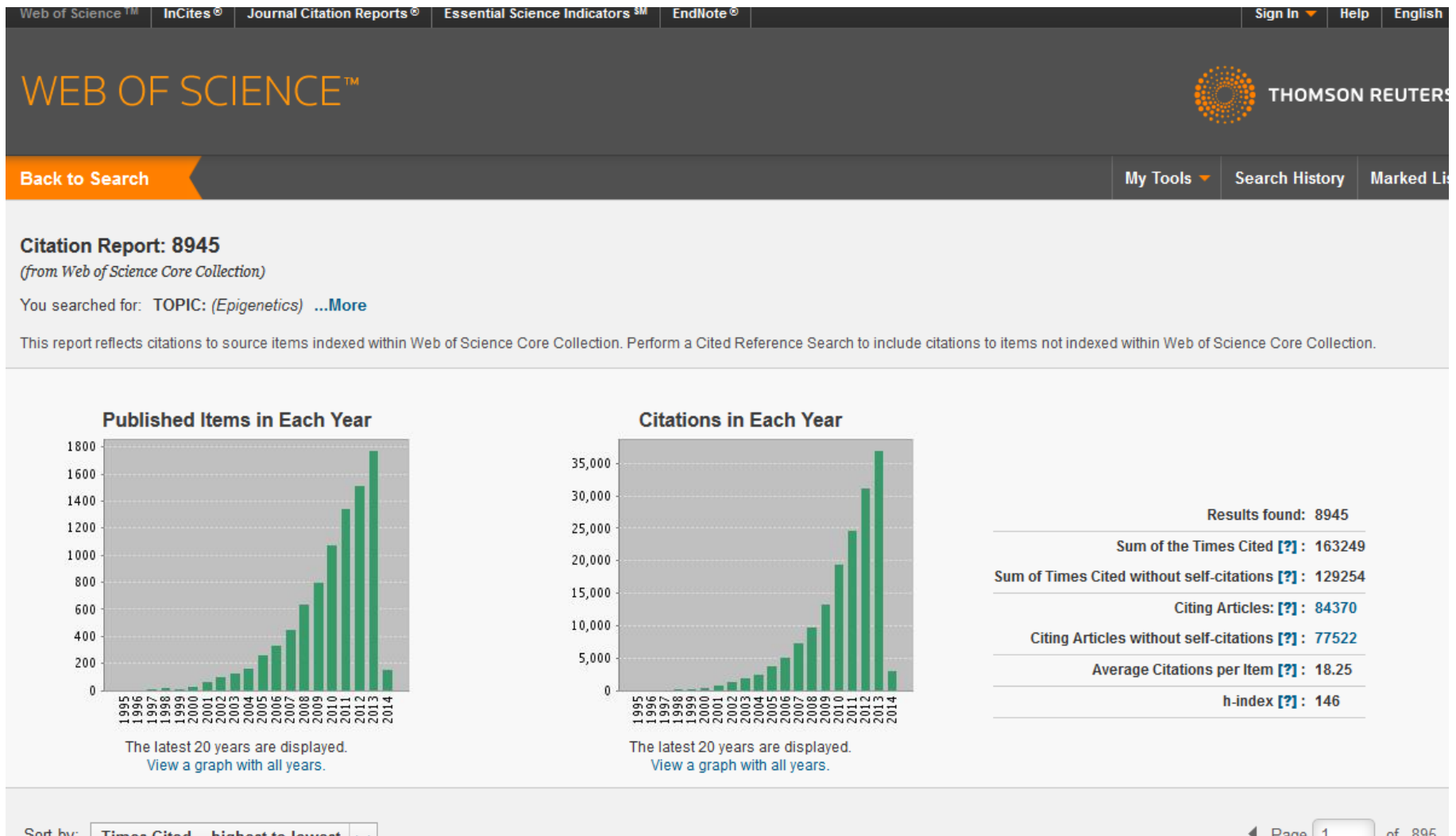
## Jedna z možných definicí epigenetiky:

Mitoticky nebo meioticky dědičná změna, která není vázána na primární sekvenci DNA, nýbrž je dána jinými úpravami, které ovlivňují aktivitu (expresi) genů – struktura chromatinu („chromatinová dědičnost“), metylace bází v DNA, acetylace histonů, regulační aktivity molekul RNA, konformace proteinu.

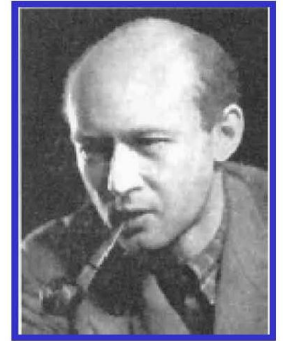
Berger *et al.* (2009) *Genes Dev.*



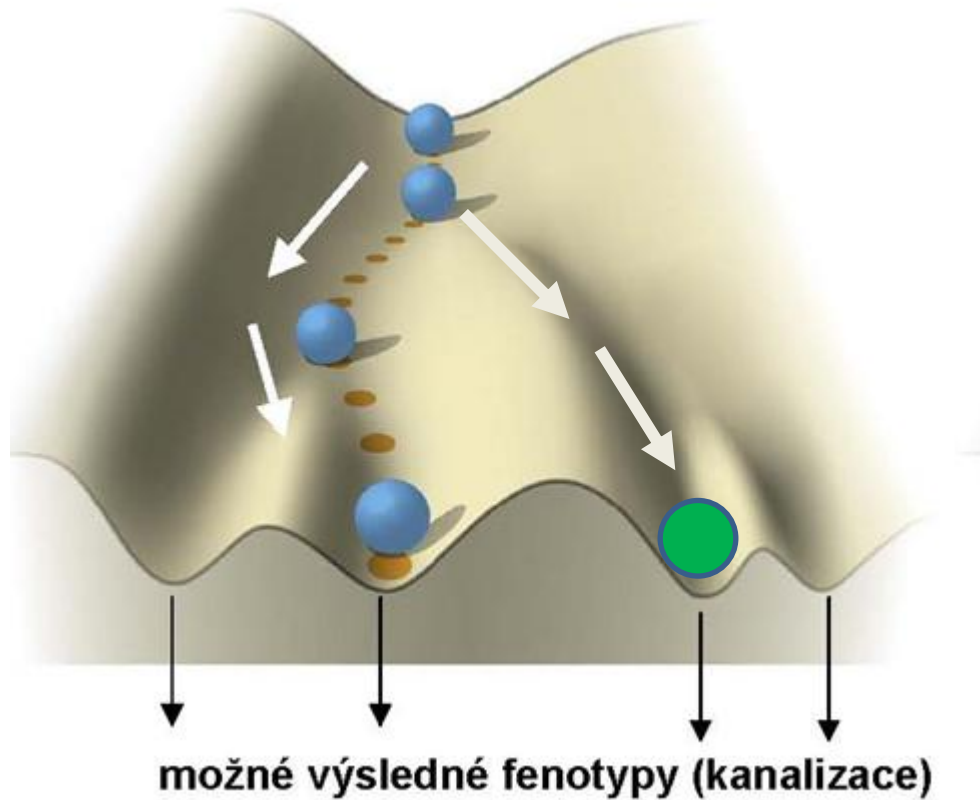
# Epigenetika je aktuální téma



Waddington: Diferenciaci chápe jako epigenetický proces  
ovlivňovaný prostředím



**Conrad Waddington**  
**(1905-75)**  
embryolog



... adaptivní změny genové exprese mohou být za určitých  
podmínek v ontogenezi stabilizovány (asimilovány)

... evoluce je fixace ontogenetických změn

# Mnohočetné funkce epigenetických procesů

řízení ontogeneze

regulace genové exprese

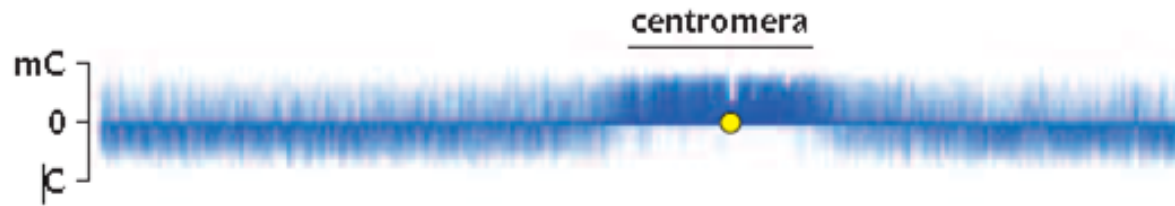
organizace buněčného jádra

Funkce se realizují epigenetickými kódy:

- DNA methylation code
- Histone modification code
- Small RNA code

# Molekulární nástroje epigenetických změn....

3. Rozložení hustoty metylace DNA na chromozomu 3 huseníčku. Mapa byla sestrojena z dat získaných imunoprecipitací chromatinu s protilátkou proti metylcytosinu (mC). Na ose Y jsou relativní hustoty mC (+ hodnoty) a C (- hodnoty) vztažené na jednotku délky sekvence.



Vesmír 94, únor 2015 | <http://www.vesmir.cz>

**Methylace DNA není v genomu rozmístěna náhodně:**

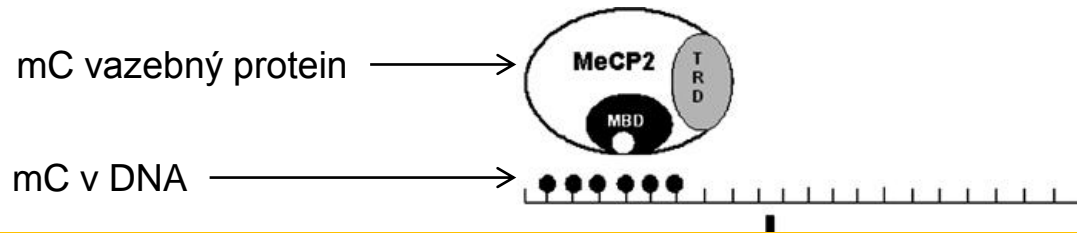
- Bývá lokalizována v symetrických motivech CG, u rostlin pak i CHG, CHH,
- V genomu existují klastry mC převážně v nekódujících částech centromer, inaktivních promotorů, transposonů...

**Objev methylace cytosinu v CG motivech savčích buňkám patří českým vědcům z AVČR**

**Doskočil a Šorm: Biochim Biophys Acta. 1962 Jun 11;55:953-9.**



Metylační kód se realizuje chromatinovými bílkovinami....



Characterization of **MeCP2**, a vertebrate DNA binding protein with affinity for methylated DNA. Meehan RR, Lewis JD, Bird AP. Nucleic Acids Res. 1992 Oct 11;20(19):5085-92.

## Multiple function of DNA methylation:

- Regulation of tissue specific expression /gene knock outs are lethal/
- Inhibition of transposon activity and other parasitic genomic elements
- Inhibition of genetic recombination?

Martin-Bell

X-chromosom vázané  
mentální retardace

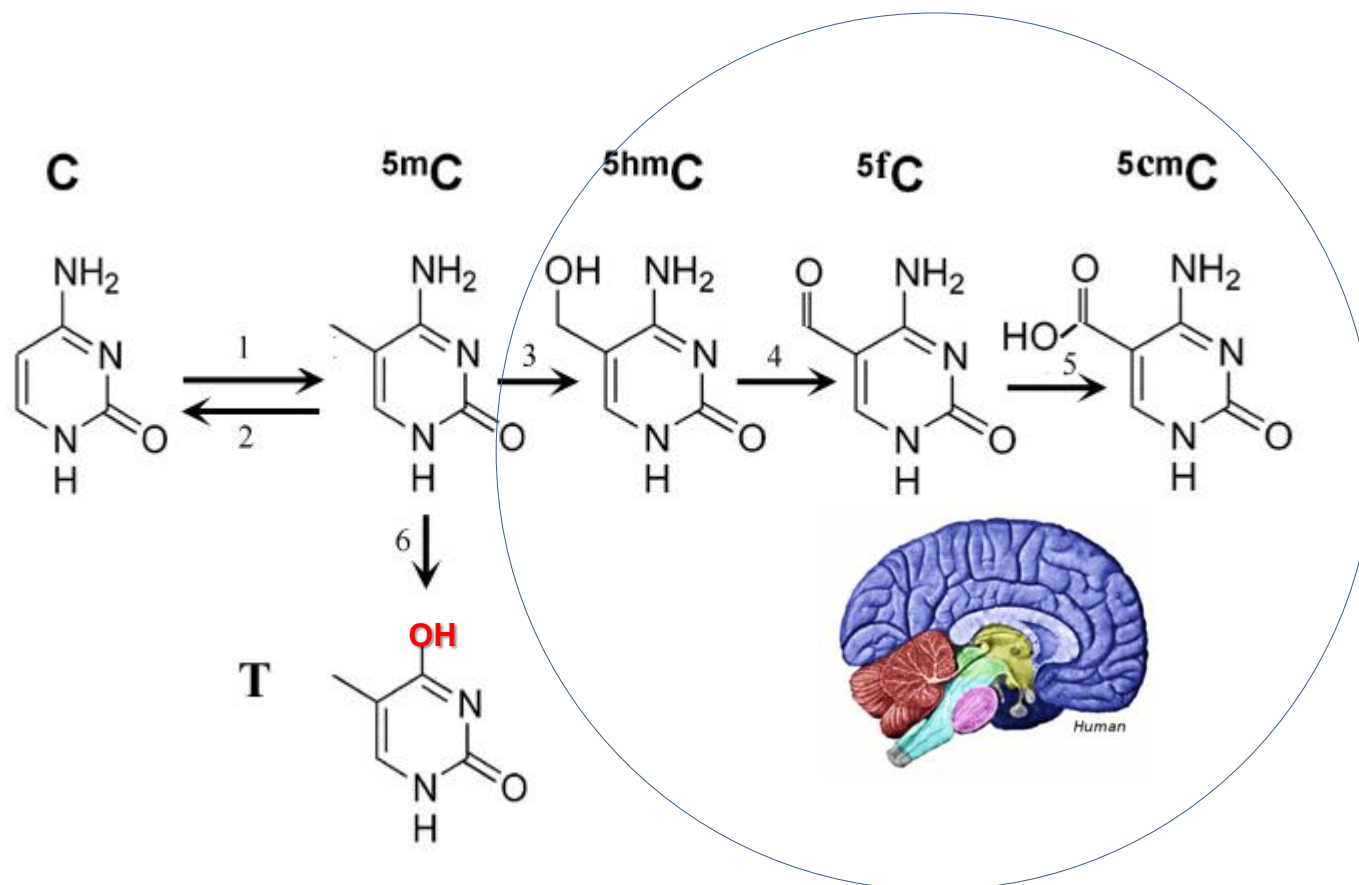
metylace CGG



Rett

Mutace v MeCP2 lokusu  
mC-vazebný protein

Vznik a metabolismus metylcytosinu. Reakce 1,2 a 6 mají obecnou platnost, reakce 3-5 byly prokázány v mozkové tkáni savců.



Chemicky je mC nejméně stabilní bází, podléhá spontánní deaminaci na tymin (reakce 6)

Daň za přepych...

Metylcytosin v DNA je mutagenní bází in vivo



*Cycas revoluta*

High methylation

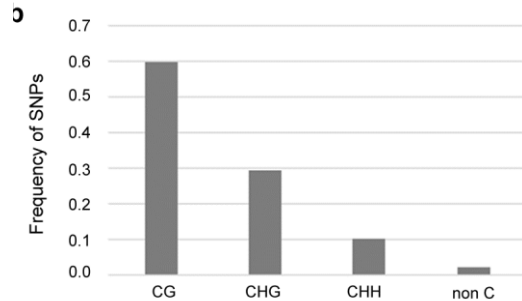
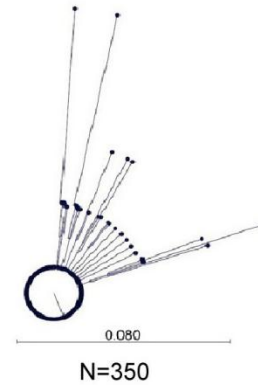
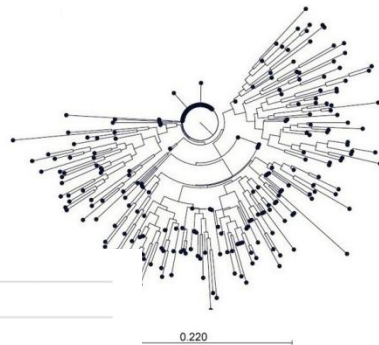


*Drosophila melanogaster*

No methylation

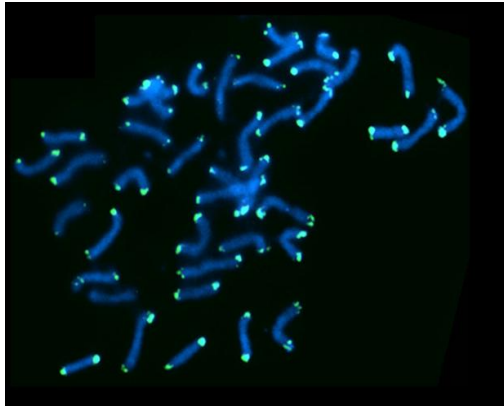


rRNA genes divergence:



Mutations in *C. revoluta* rDNA are distributed exclusively in methylation motifs

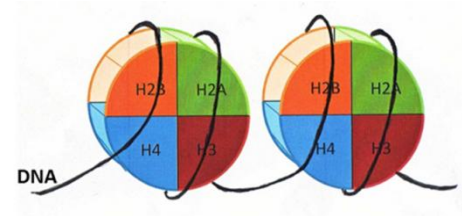
Metylace DNA není ve svém snažení sama.....



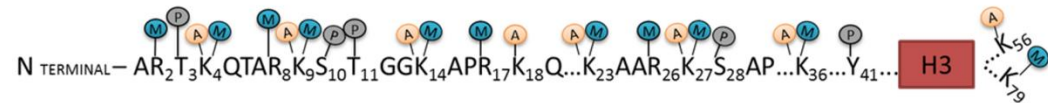
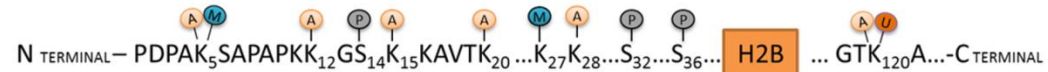
Chromosomy *Nicotiana repanda*  
Koukalova a spol 2010



1000  $\mu\text{m}$



10  $\mu\text{m}$



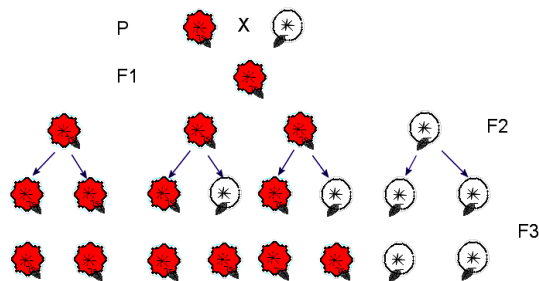
Kovalentní modifikace  
tvoří histonových kód, existuje  
téměř nekonečné množství  
kombinací nukleosomových variant

Biochemistry, Genetics and Molecular Biology. Chromatin remodelling, book edited by Danuta Radzioch, ISBN 978-953-51-1087-3



# Několik zásadních objevů v genetice předznamenal výzkum na rostlinách

- Zákony dědičnosti – Gregor Johann Mendel



- RNA interference, siRNA, miRNA

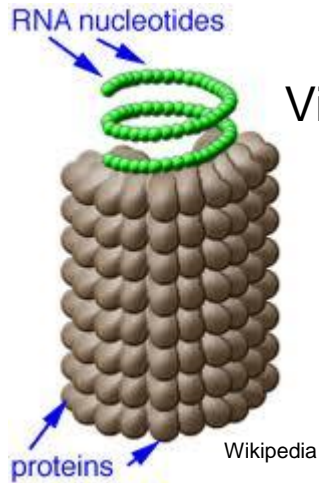


Wikipedia

- Napoli C., Lemieux C., and Jorgensen R. (1990) „Introduction of a chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes *in trans*“. *Plant Cell* **2**: 279-289.

- Dehio C. and Schell J. (1994). „Identification of plant genetic loci involved in a post transcriptional mechanism for meiotically reversible transgene silencing“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91** (12): 5538-5542.

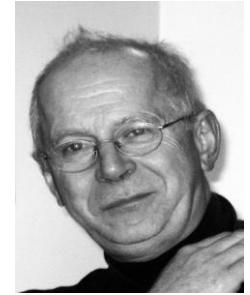
# Imunitní systém rostlin je zacílen na virovou RNA



Virus PV-X



*Nicotiana benthamiana*



Sir David Charles Baulcombe

+ virus

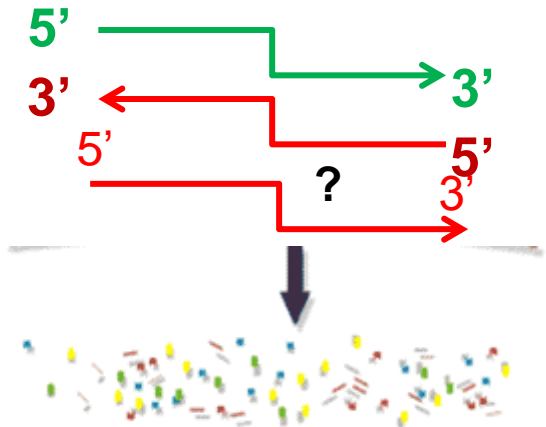
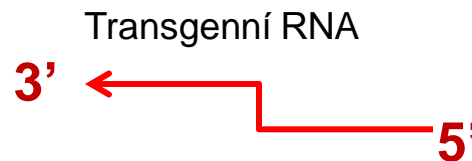
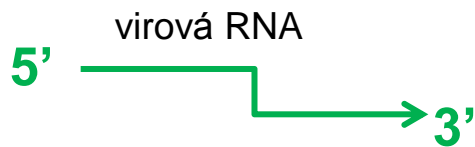


< symptomu

- virus



+ virus



- rozpad virových i transgenních RNA
- RNA interference, post transkripční umlčování (PTGS)
- klíčový enzym RNAdependentníRNA polymeráza (RdRP)



## The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006 Andrew Z. Fire, Craig C. Mello

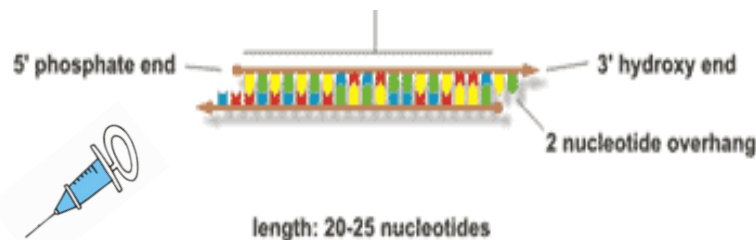


Andrew Fire

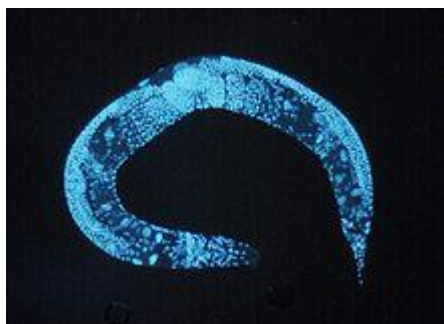


Craig Mello

### Klíčová úloha dvouvláknové RNA



*Caenorhabditis elegans*  
(hlistice, Nematodeae)

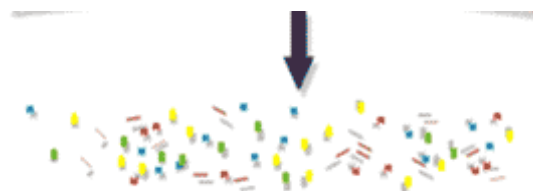


Wikipedia



?

Sir David Charles Baulcombe



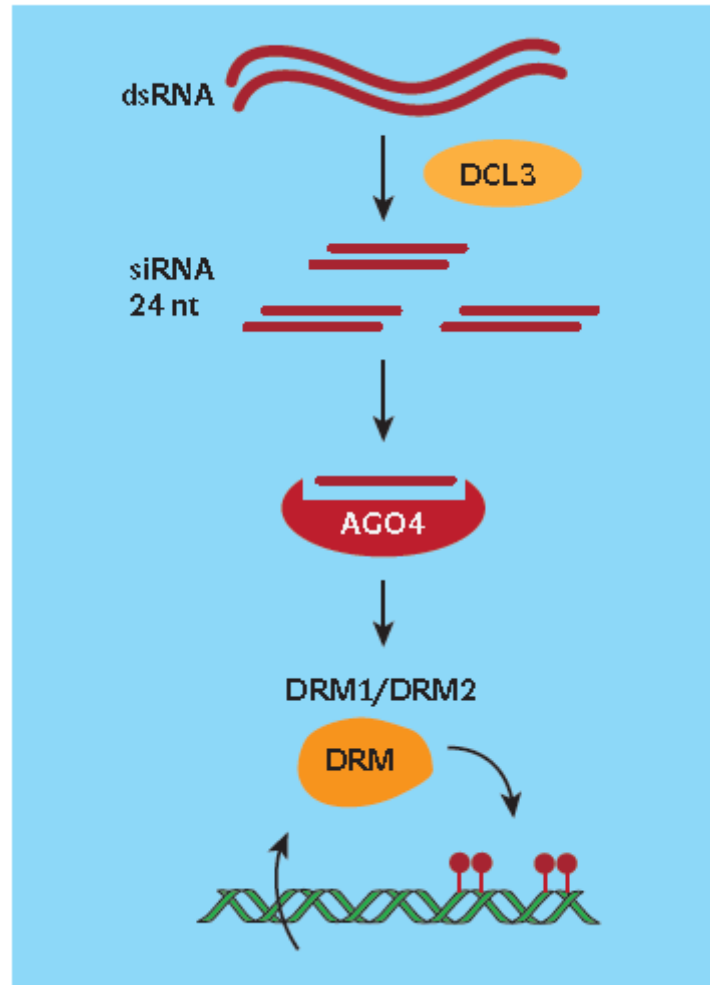
Rozpad buněčných mRNA

Fire, A; Xu, S; Montgomery, MK; Kostas, SA; Driver, SE; Mello, CC (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*". *Nature* **391** (6669): 806–11

- RNA interference je prastarým mechanismem ochrany genomu před cizorodou nukleovou kyselinou
- Expresi endogenních genů lze modulovat siRNA (RNAi) technologií (široké uplatnění v praxi včetně humánní medicíny)

## Dvojláknová RNA může u rostlin vyvolat metylaci DNA

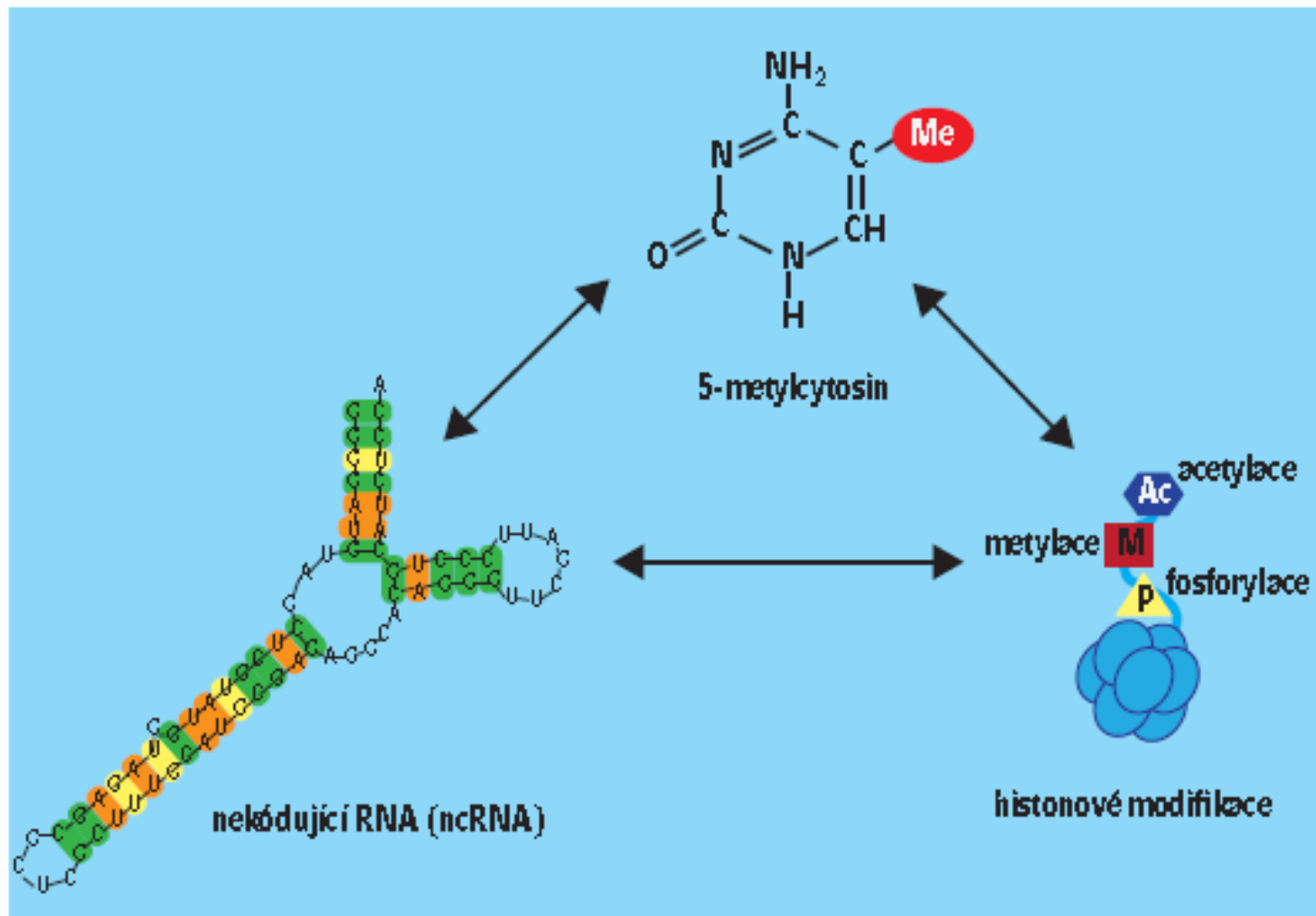
RNA  
↓  
Obrácený tok informace  
↓  
DNA



4. Methylace DNA *de novo* katalyzovaná specifickými molekulami RNA nabourává centrální dogma molekulární biologie. Dlouhé dvouvláknové molekuly RNA (dsRNA) jsou štěpeny endonukleázou DCL3 na fragmenty délky 24 nukleotidů. Ty vstupují do komplexu s proteinem Argonaut AGO4, který pak aktivuje DNA metyltransferázy DRM1-2 na příslušném úseku DNA. Proces připomíná dva stavy baterie – vybitá (AGO4 minus RNA), nebo nabitá (AGO4 plus RNA). Upraveno podle Matzke M. A., Kanno T., Matzke A.: Annu. Rev. Plant Biol. 66, 9.1–9.25, 2015.



## Provázanost epigenetických procesů



# Epigenetické markery genové exprese

Modifikátor	Activační (euchromatin)	Represivní (heterochromatin)
➤ DNA methylation		CG, (CHG, CHH)
➤ Histone acetylation	H4, H3 (lysine)	-
➤ Histone methylation	H3K4m2, H3K4m3, H3K36m3	H3K9m2, H3K27m3, H4K20m1
➤ Small RNA	lncRNA miRNA	21 nt 24 nt lncRNA miRNA

# Heterochromatinizace a inaktivace jednoho X chromosomů u savců

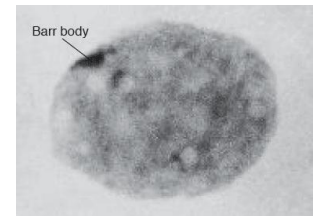
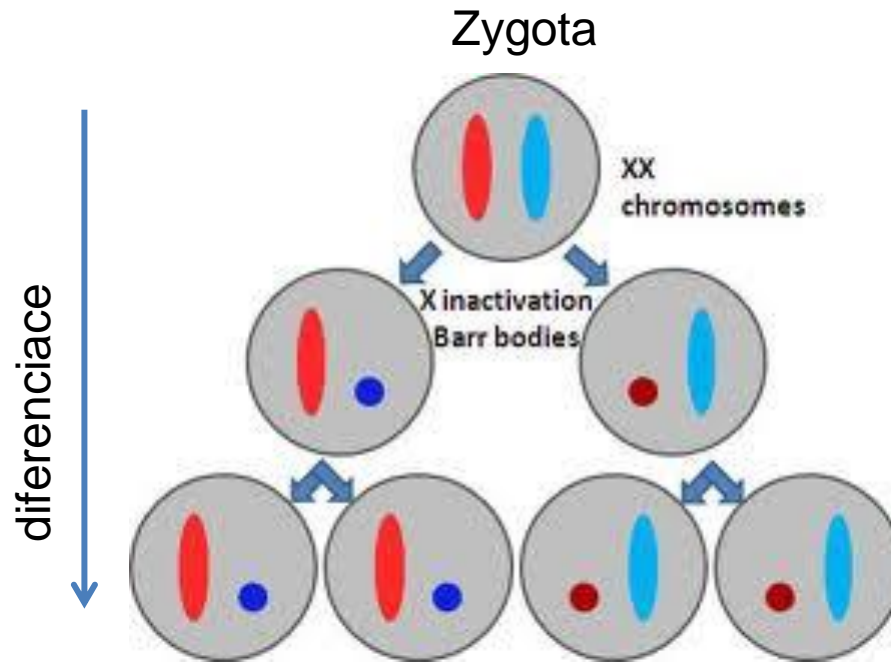
- primární funkce je kompenzace genové dávky,
- Nastává u samic XX
- Nenastává u samců XY a samic X-



Murray Barr  
(1949)



Mary Lyon  
(1961)



XX genotyp

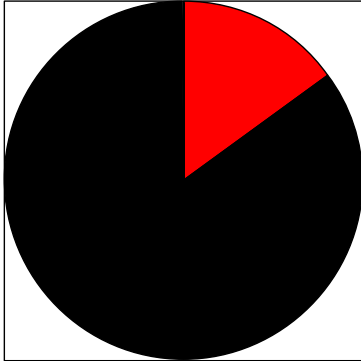
Lyonizace je složitý proces zahrnující téměř všechny známé epigenetické mechanismy

- Metylace DNA
- Deacetylace a metylace histonů
- Transkripce dlouhých nc RNA

# Temná hmota genomu

Jen malá frakce DNA kóduje bílkoviny nebo strukturní RNA

Transkripce dříve

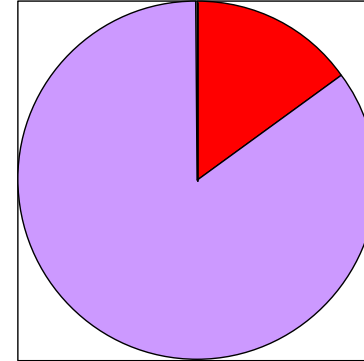


Z čeho je temná hmota genomu složena?

Heterochromatin:

- Retroelementy
- Endogenní viry
- Satelitní DNA
- Jednoduché repetice

Situace dnes



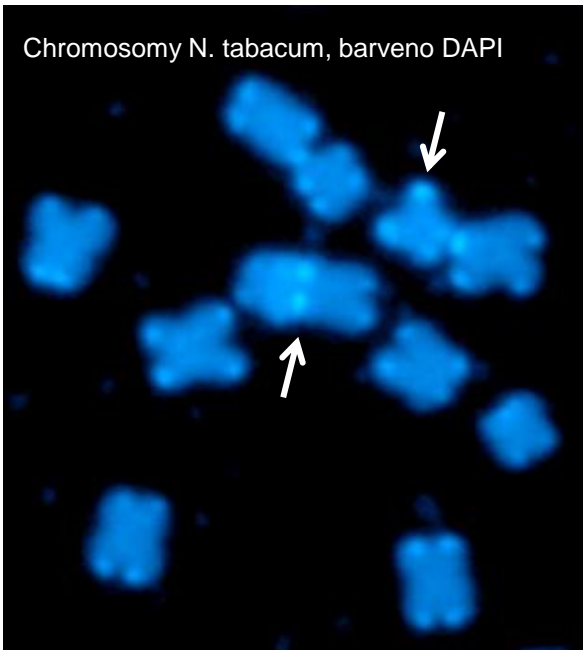
• mRNA

• miRNA

• siRNA

• long ncRNA

Chromosomy *N. tabacum*, barveno DAPI



Koukalova a spol, 2010

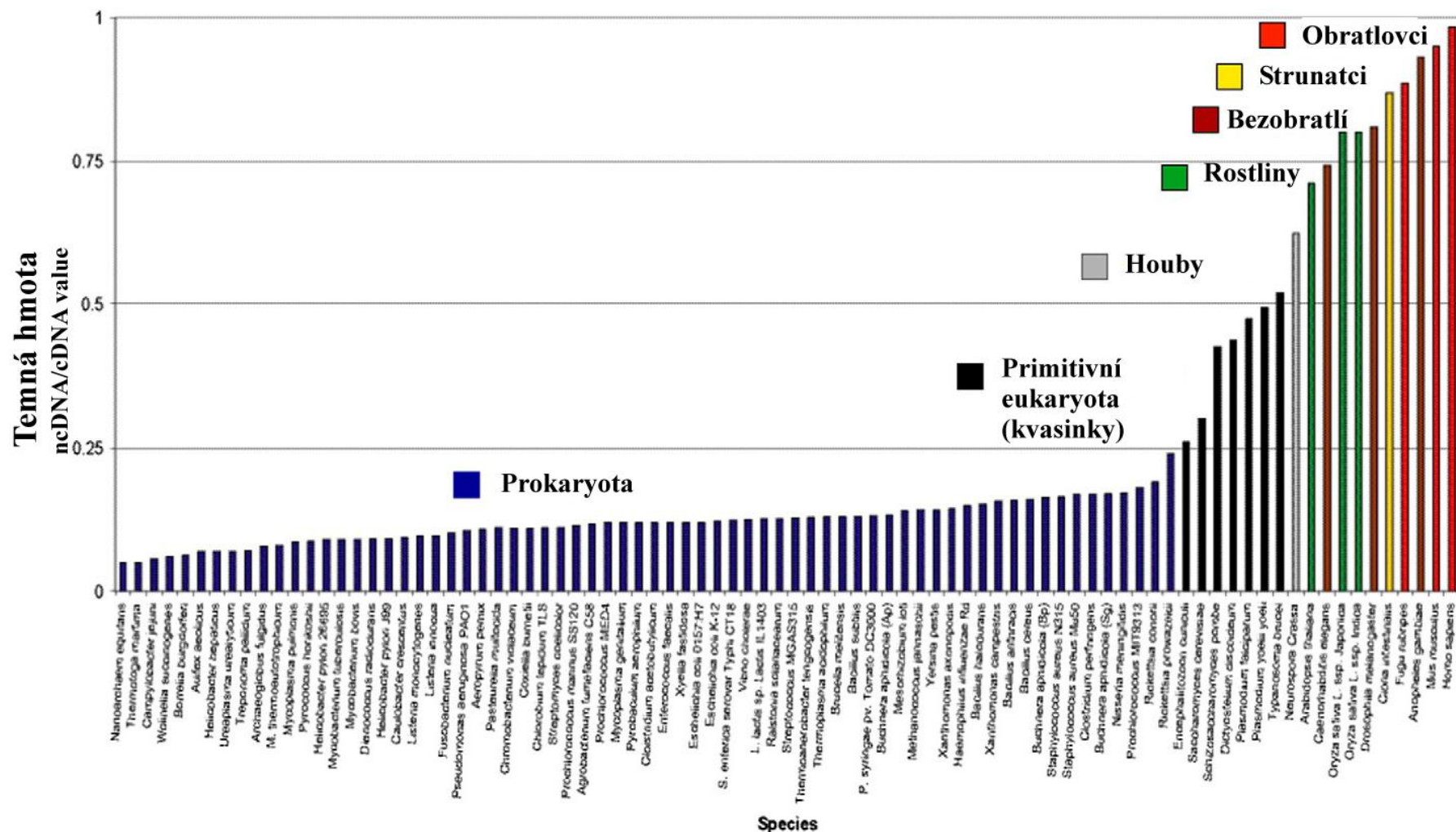
*Funkce:*



Wikipedia



# Obsah “Temné hmoty“ koreluje se složitostí organismu



## Základní fakta o mikroRNA

miRNA poprvé popsal Ambros a kol. (1993) u *C. elegans* (lin-4)

Přibližně 3% predikovaných lidských genů jsou geny pro miRNA (přibližně 1000 miRNA)

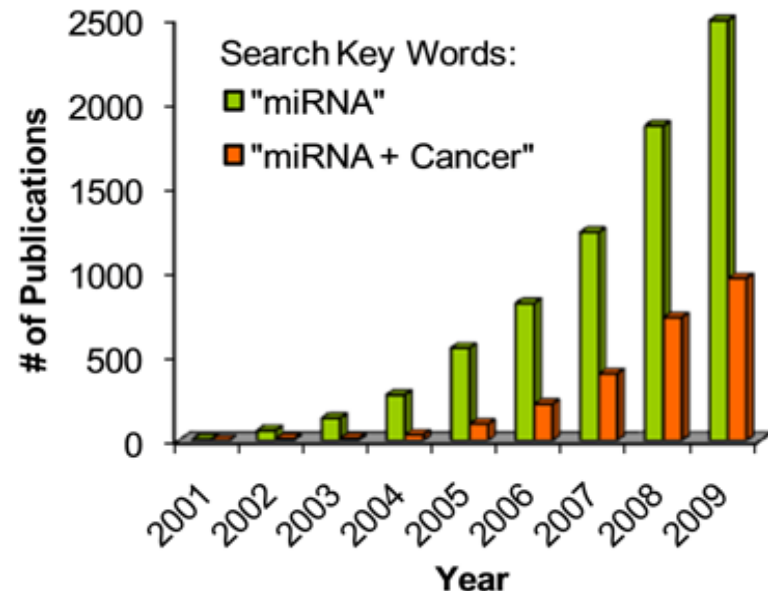
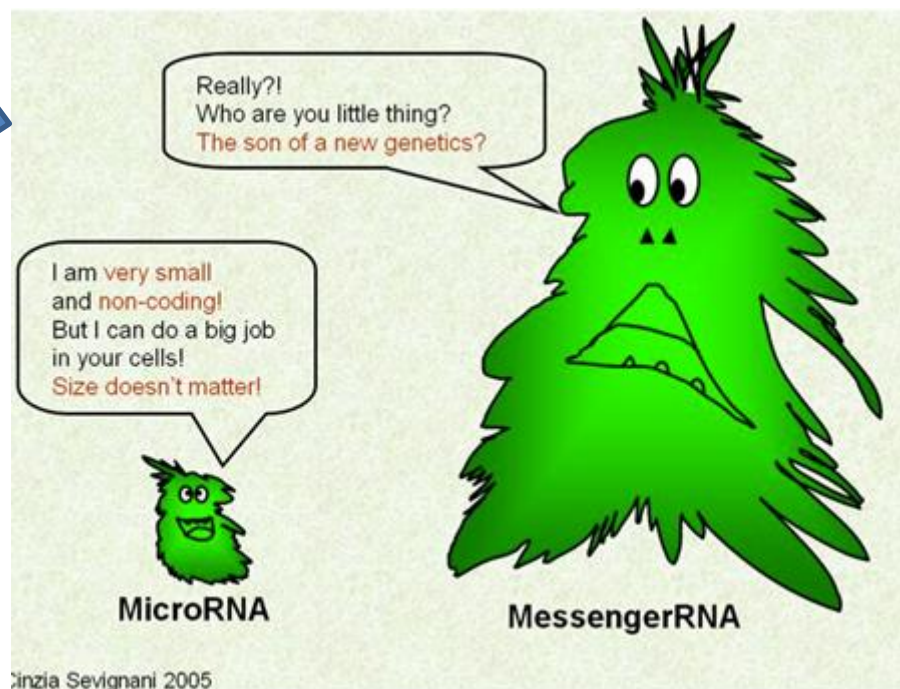
miRNA mají potenciál regulovat asi 1/3 kódujících genů

Některé miRNA jsou kódovány více než jedním genem

Geny kódující miRNA jsou často klastrovány (klastr miR-17)

Geny miRNA jsou lokalizovány v mezigenových oblastech

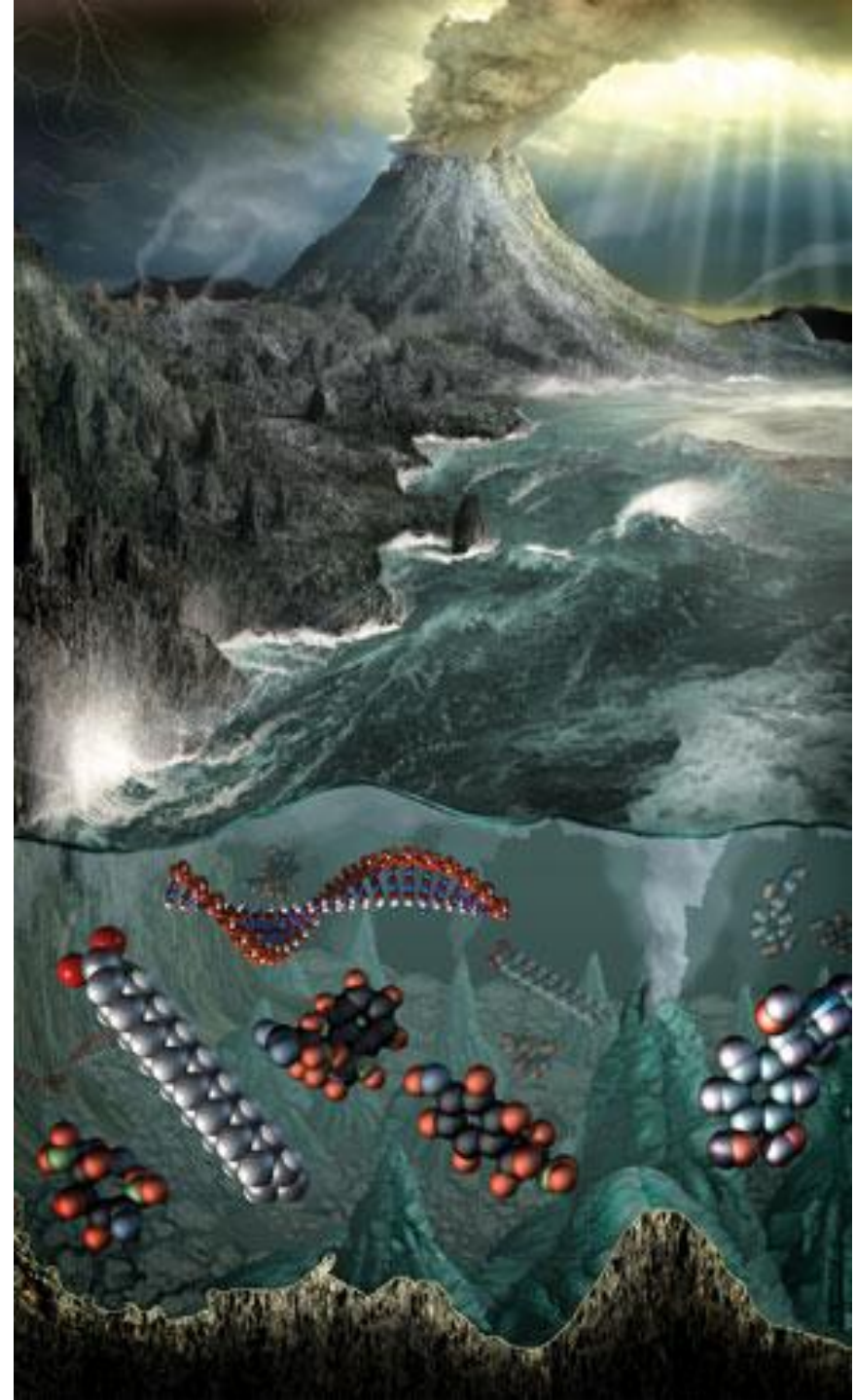
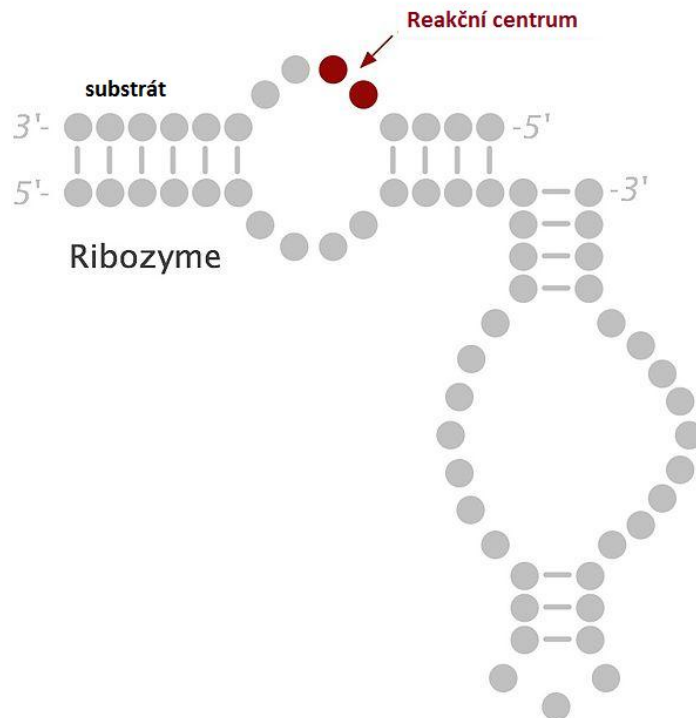
v intronových oblastech nebo antisense řetězcích známých genů



RNA byla klíčovou molekulou při vzniku  
života na Zemi,  
...je to proto, že může plnit současně katalytickou  
i informační funkci

V dnešních organismech se RNA účastní všech  
důležitých buněčných procesů

1. proteosyntéza.
2. diferenciaci,
3. regulace genové exprese
4. kognitivní funkce při interakcích makromolekul

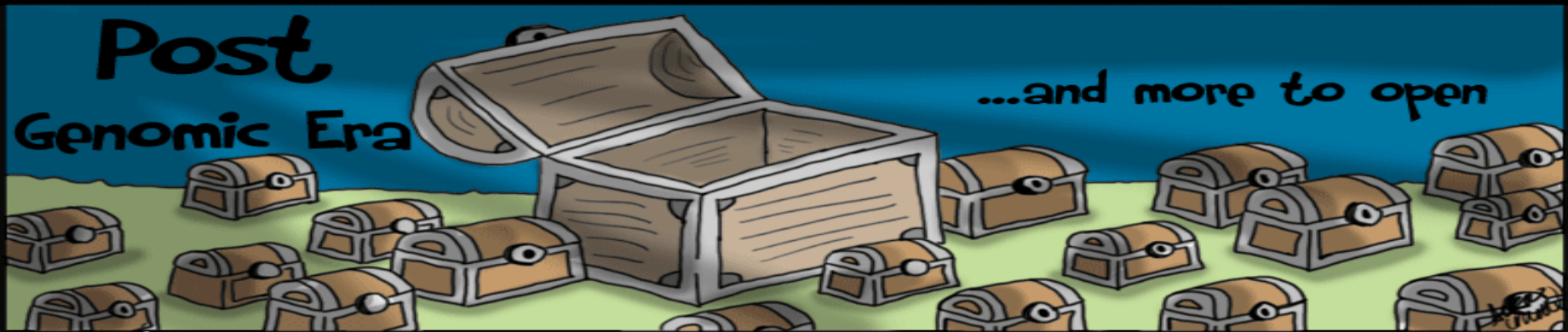
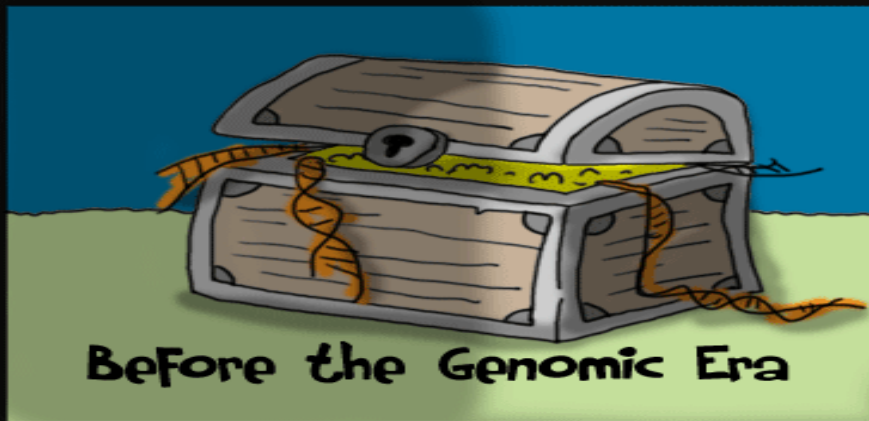




**Umíme sekvenovat genomy, známe mutace v genech způsobující různá onemocnění, ale neumíme mutace opravovat**

**Příklad: jedinci s mutací v genu APC mají 50% pravděpodobnost vzniku nádoru tlustého střeva (Familiární adenomatózní polypóza).**

**Ale můžeme s tím něco dělat?**



[www.biocomicals.com](http://www.biocomicals.com)



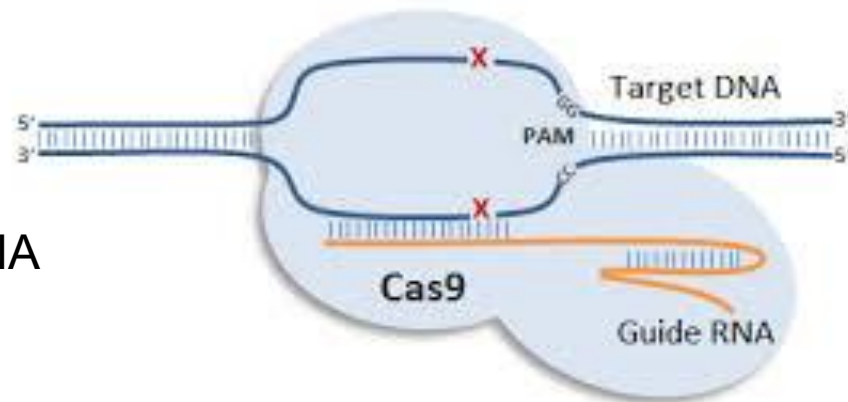
*K čemu jsou poznatky o RNA dobré....*

## CRISPR - **C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats

Nová technologie CRISPR umožňuje jako poprvé v historii editaci genomu in vivo

- Princip spočívá v součinnosti gRNA a nukleázy

- oprava mutací v genech
- náhrada poškozených úseků DNA
- introdukce nových variant



[Nat Biotechnol.](#) 2014 Jun;32(6):551-3. doi: 10.1038/nbt.2884. Epub 2014 Mar 30.

**Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype.**

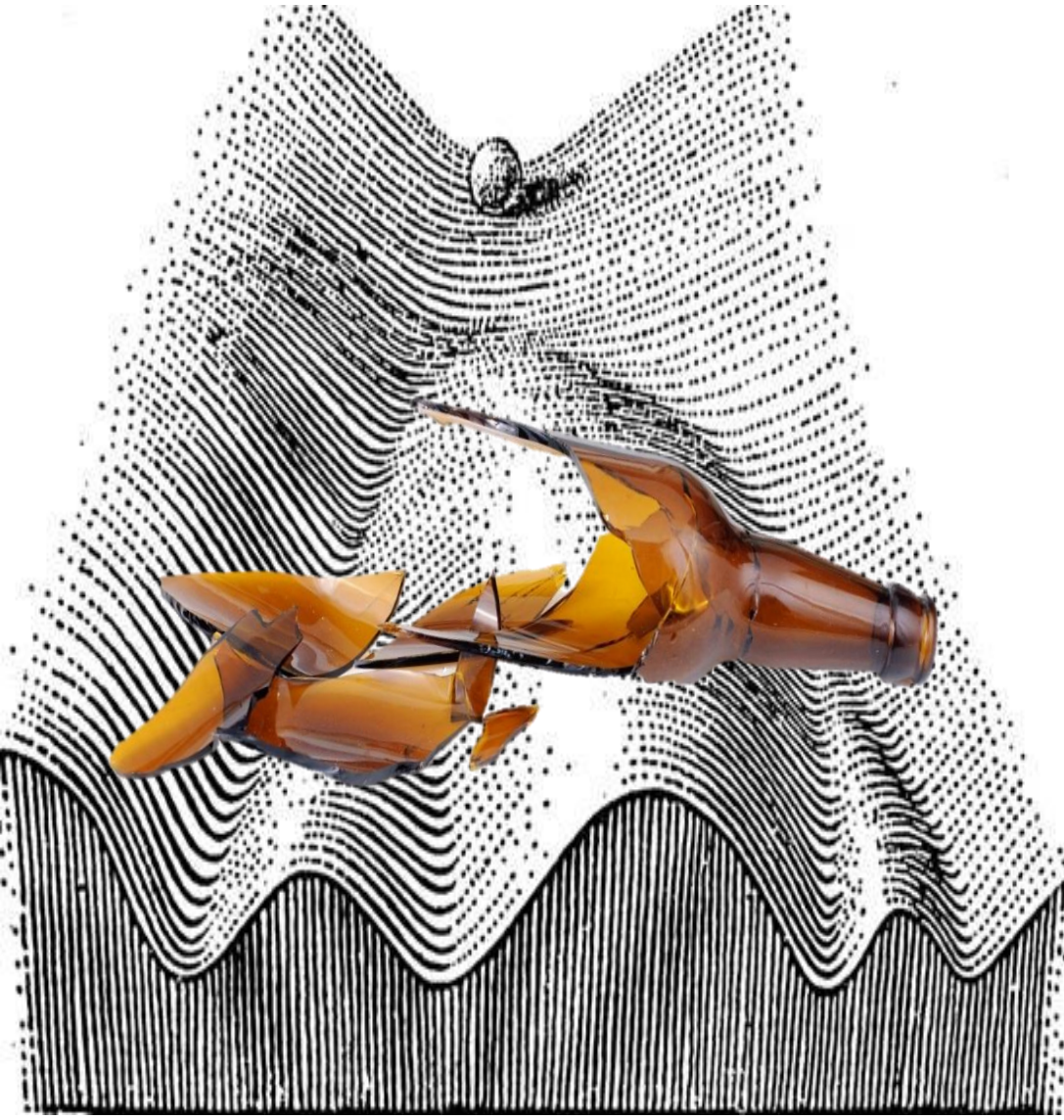
[Yin H](#)<sup>1</sup>, [Xue W](#)<sup>1</sup>, [Chen S](#)<sup>2</sup>, [Bogorad RL](#)<sup>2</sup>, [Benedetti E](#)<sup>3</sup>, [Grompe M](#)<sup>3</sup>, [Koteliensky V](#)<sup>4</sup>, [Sharp PA](#)<sup>5</sup>, [Jacks T](#)<sup>6</sup>, [Anderson DG](#)<sup>7</sup>.  
sachusetts, USA. [4] Institute of Medical Engineering and Science, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts, USA.

### **Abstract**

We demonstrate CRISPR-Cas9-mediated correction of a *Fah* mutation in hepatocytes in a mouse model of the human **disease hereditary tyrosinemia**. Delivery of components of the CRISPR-Cas9 system by hydrodynamic injection resulted in initial **expression of the wild-type *Fah* protein in ~1/250 liver cells**. Expansion of *Fah*-positive hepatocytes rescued the body weight loss phenotype. Our study indicates that CRISPR-Cas9-mediated genome editing is possible in adult animals and has potential for correction of human genetic diseases

# Waddingtonova epigenetická krajina

Waddington, Conrad H. 1953. The Epigenetics of birds. Cambridge University Press



- Co se stane, když se v krajině objeví překážka?
- Může prostředí ovlivňovat vývojový program?
- Může prostředí ovlivňovat epigenetické modifikace?

- Konzumace alkoholu během gravidity je nejčastější příčinou indukovaných mentálních deficiencí a vrozených poruch ve vyspělých zemích

Chudley *et al.* CMAJ 2005

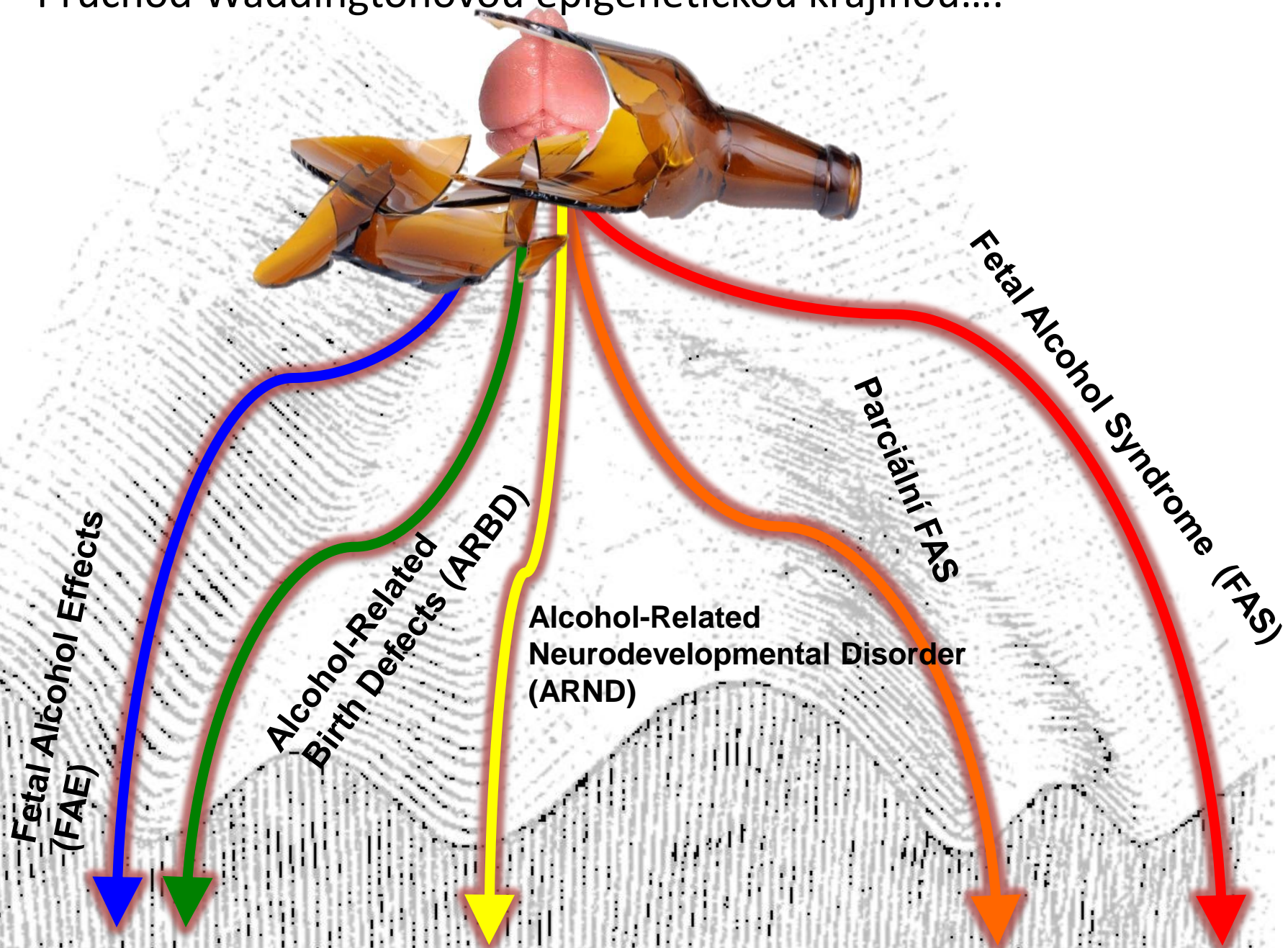
- FASD - Spektrum vrozených alkoholových poruch
  - 2-5% gravidit!
  - Obecný termín zahrnující psychické abnormality, poruchy chování a intelektuální zaostalost
  - Z nich pak nejvážnější diagnóza - Fetal Alcohol Syndrome (FAS)





# Mnohočetné důsledky expozice embrya alkoholu - FASD

## Průchod Waddingtonovou epigenetickou krajinou....



# Myší experimentální model konzumace alkoholu v graviditě

- Kontrolní skupina: H<sub>2</sub>O
- Pokusná skupina: 10% EtOH

volný výběr denní tekutiny

- 70% preference pro 10% EtOH
- Měření konc. alkoholu v krvi
  - Odpovídá mírné závislosti na alkoholu.
  - Ekvivalent gravidní ženy konzumující 2-4 dcl vína denně.





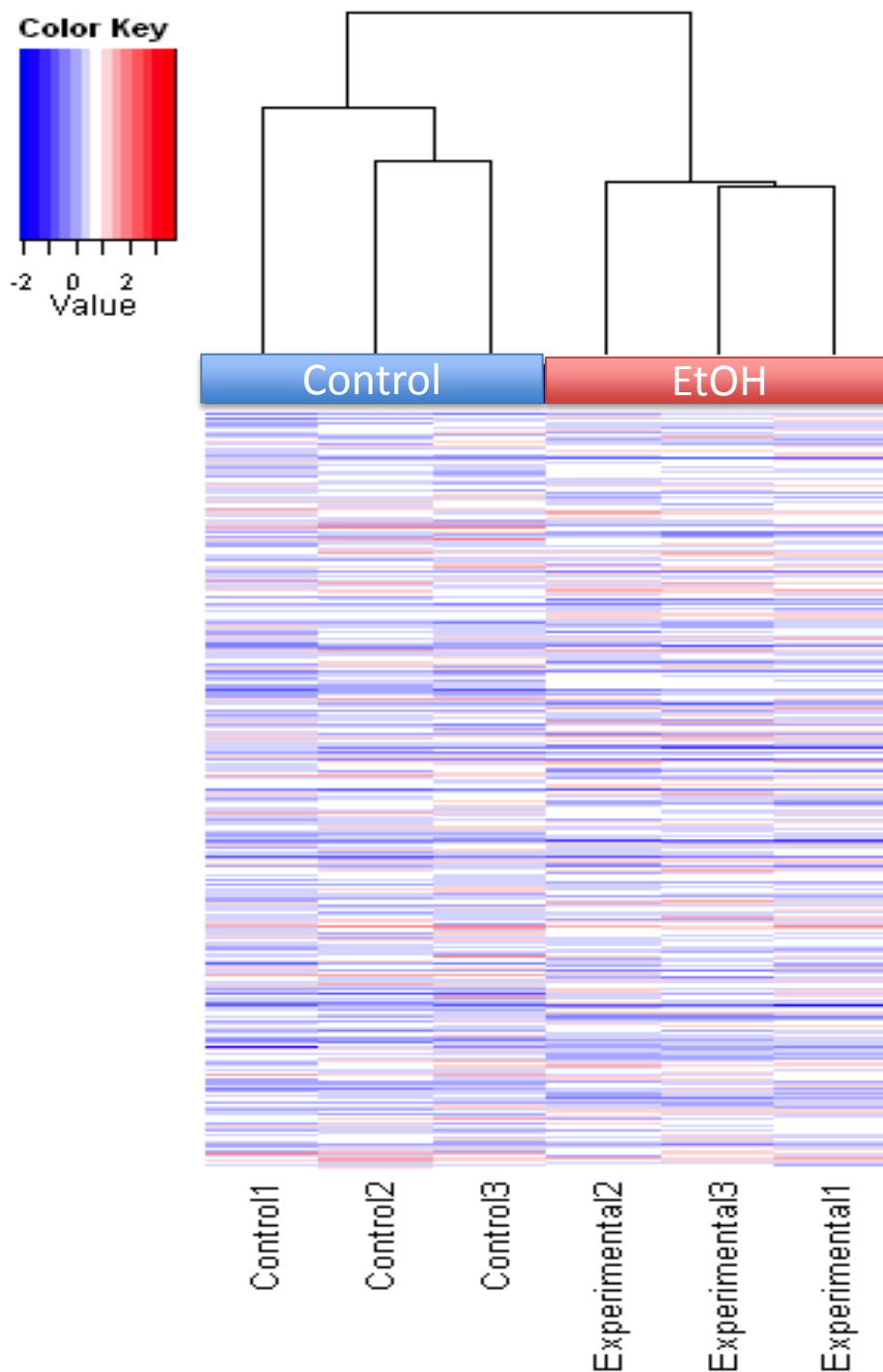
# Mikročipová analýza metylace DNA v potomstvu



PND 70

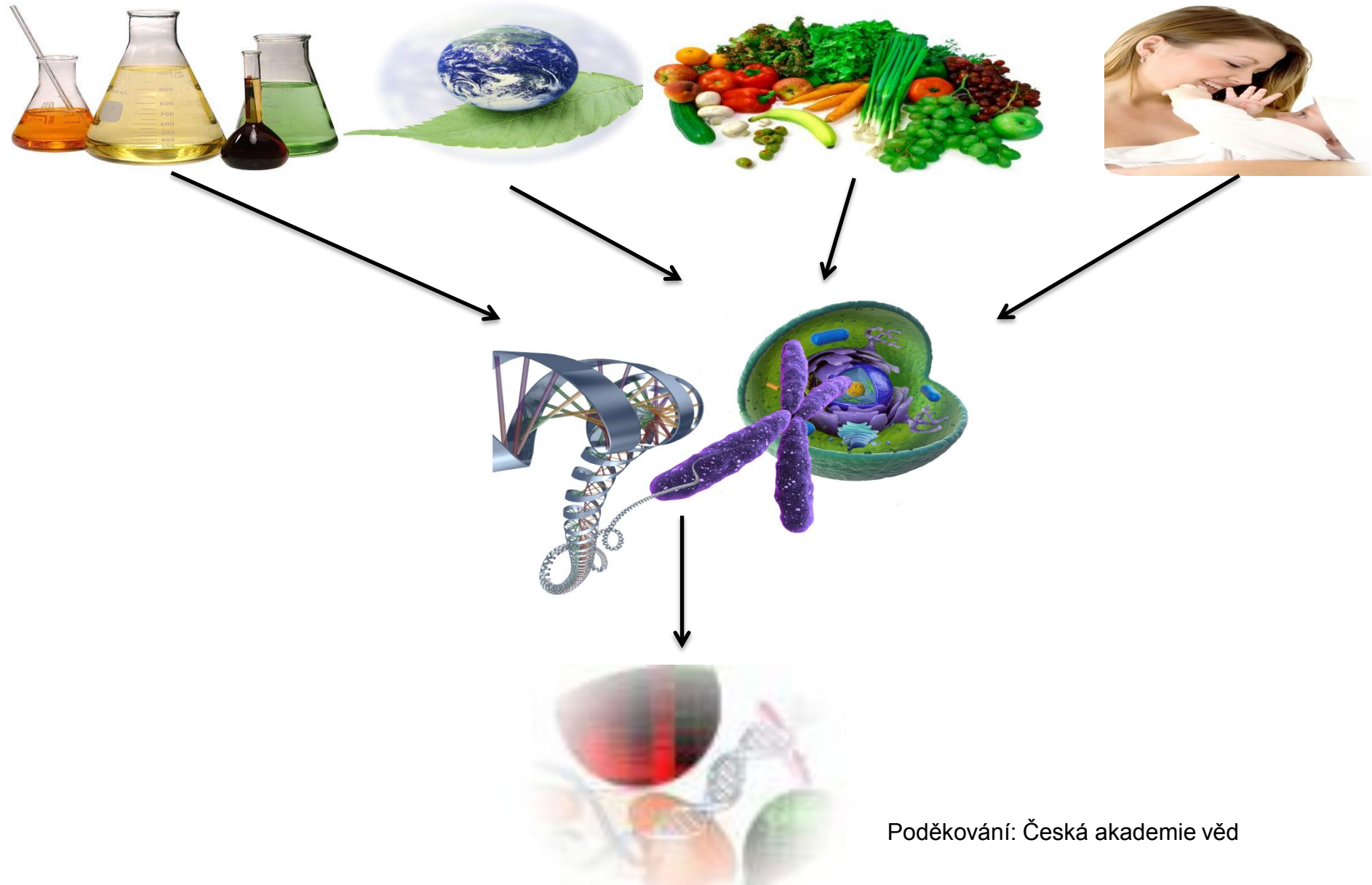


DNA Methylation



- Metylační změny u více než 6000 genů
- Promotorové oblasti
- *Statisticky významná korelace*  
 $p < 0.01$

# Environmentální epigenetika



Poděkování: Česká akademie věd

# Osmotický stres indukuje hypermetylaci DNA u rostlin

Theor Appl Genet (1997) 95 : 301—306

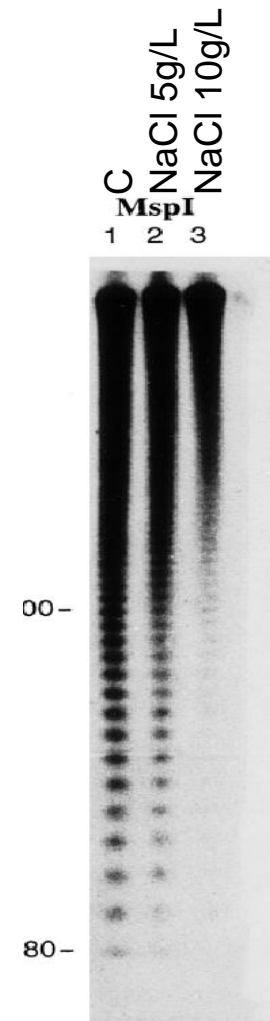
(Springer-Verlag 1997)

A. Kovarik · B. Koukalova · M. Bezdek · Z. Opatrný

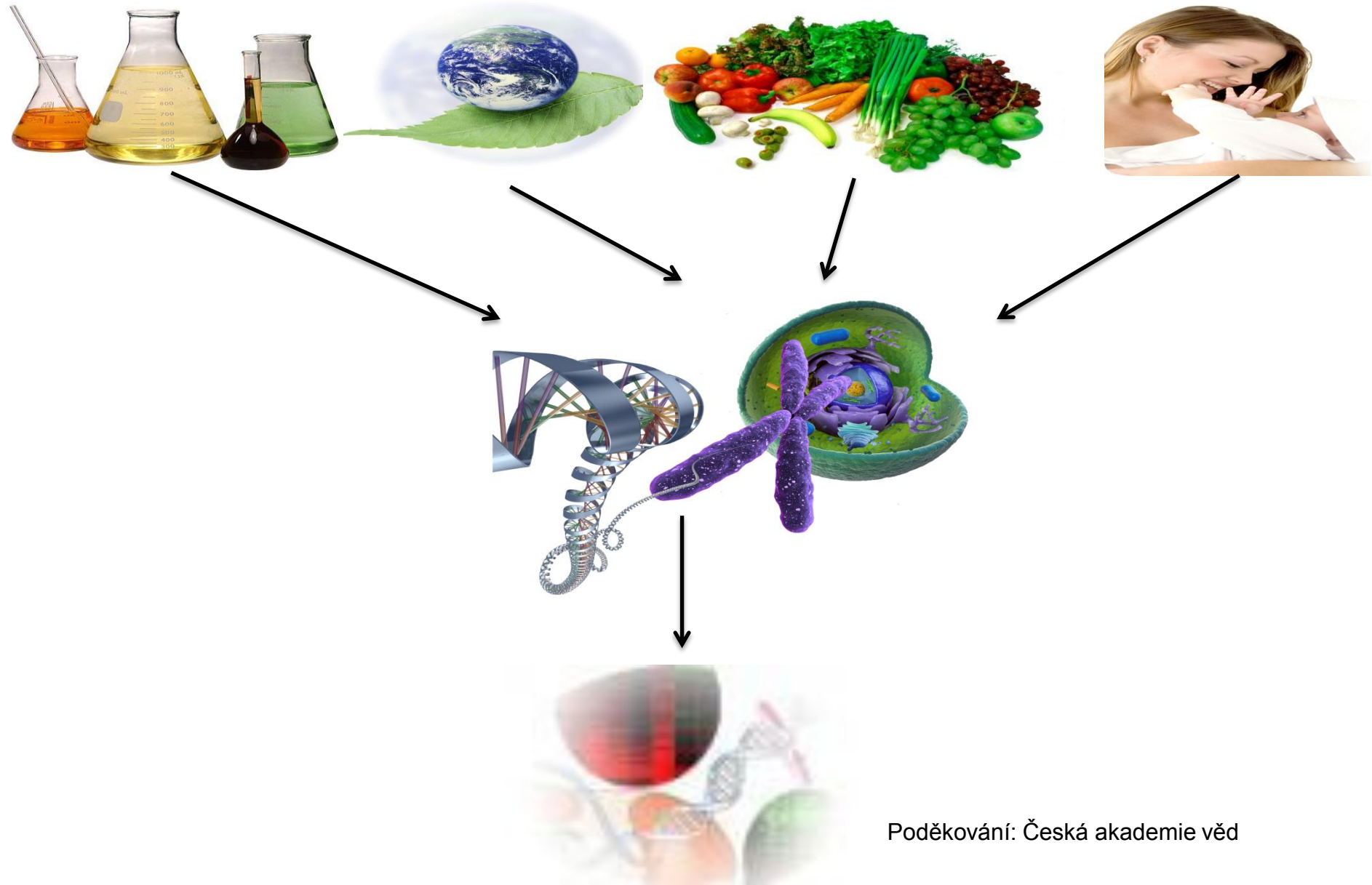
## Hypermethylation of tobacco heterochromatic loci in response to osmotic stress

Received: 26 November 1996 / Accepted: 20 December 1996

**Abstract** Plants have to cope with a number of environmental stresses which may potentially induce genetic and epigenetic changes and thus contribute to genome variability. In the present study we inspected the DNA methylation status of two heterochromatic loci (defined with repetitive DNA sequences HRS60 and GRS) in a tobacco cell culture exposed to osmotic stress. Investigations were performed on a TBY-2 cell suspension culture, and the stress was elicited with NaCl or mannitol. Using the restriction enzymes *MspI/HpaII* and *MboI/Sau3AI* in combination with Southern hybridization we observed a reversible hypermethylation of the external cytosine at the CpCpG trinucleotides in cells grown under mild osmotic stress equal to a NaCl concentration of 10 g/l. There were no changes in the methylation of the internal cytosine as the CpG dinucleotides within the CCGG motifs (*HpaII* sites) appeared to be fully methylated in tobacco DNA repetitive sequences under normal physiological conditions. The data suggest epigenetic changes in the plant genome based on *de novo* methylation of DNA in response to environmental stress.



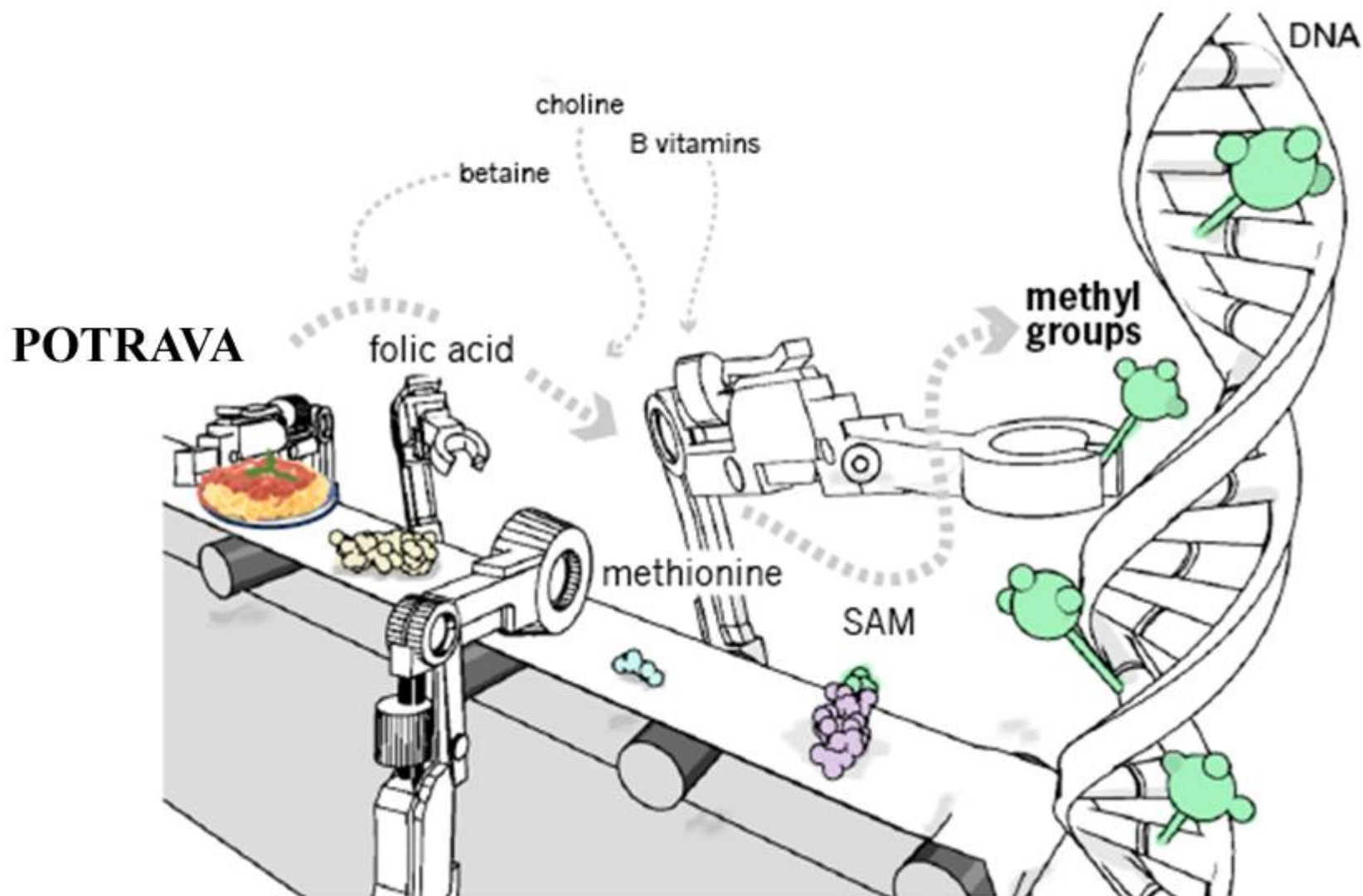
# Environmentální epigenetika



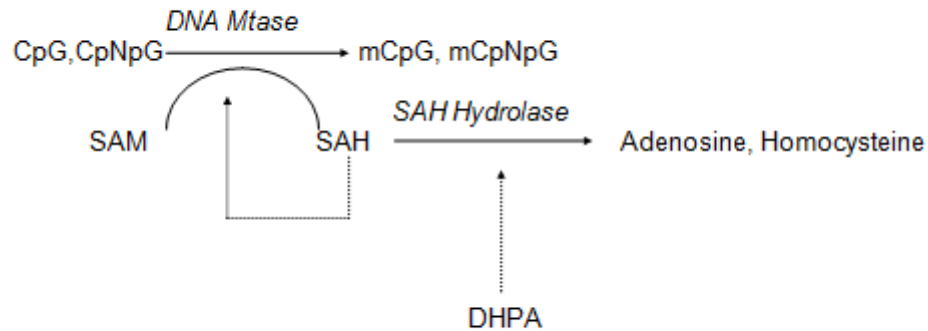
Poděkování: Česká akademie věd



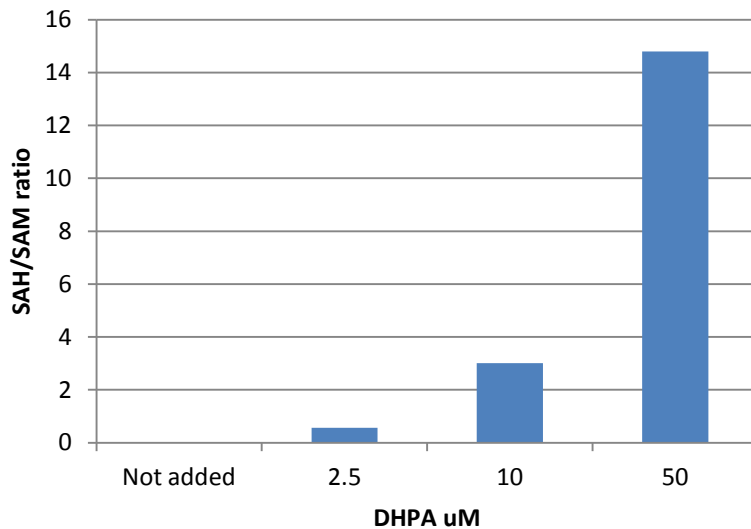
# Epigenetická modulace DNA potravou



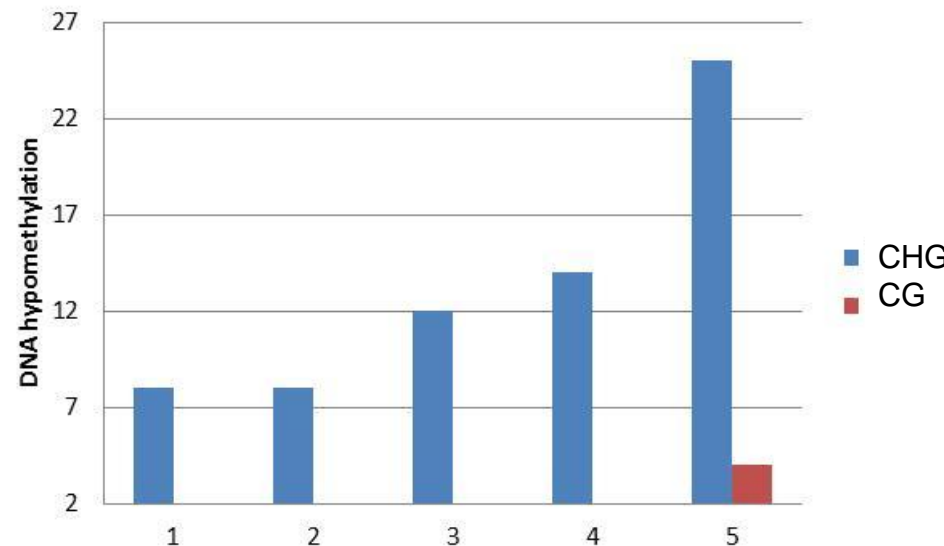
# Dihydroxypropyladenine je účinným metylačním inhibitorem metylace typu CHG, CHH u rostlin



HPLC analýza ukázala, že DHPA zvyšuje poměr SAH/SAM v buňkách *Nicotiana tabacum*



Metylační analýza ukázala, že DHPA indukuje v buňkách *Nicotiana tabacum* hypometylací DNA



# Porušení rovnováhy metylačních kofaktorů v průběhu diferenciacce indukuje homeotické změny později ve vývoji

**Fig. 3** The flower phenotypes resulting from SAH-hydrolase inhibition. The aberrant flowers are from plants whose seeds were treated with 100  $\mu\text{M}$  DHPA (a–e) and 500  $\mu\text{M}$  DHPA (f–j). Flowers were observed after 110 days of development



**Table 1** Morphological characteristics of *N. tabacum* SR1 plants grown from seeds treated with DHPA

DHPA ( $\mu\text{M}$ )	0			10			100					500				
Plant	1	2	3	1	2	3	2	4	5	1	3	2	3	4	5	8
Affected leaves	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.8 <sup>a</sup>	0.3	0.2	0.9 <sup>a</sup>	0.6 <sup>a</sup>	0.8 <sup>a</sup>	0.9 <sup>a</sup>	0.9 <sup>a</sup>	0.8 <sup>a</sup>	0.6
Days to flowering	125	122	125	129	129	128	134	125	125	143	125	178	160	160	139	161
Height (cm)	83	84	77	70	56	69	48	58	56	35	55	20	24	14	44	41
Flowers affect./tot.	0/21	0/18	0/18	0/4	0/7	0/11	0/8	0/10	0/24	4/4 <sup>b,c</sup>	15/15 <sup>c,d</sup>	A	A	A	9/9 <sup>c,d</sup>	3/3 <sup>b,c</sup>

A Flower buds aborted before flower opening

<sup>a</sup> Leaves were etiolized

Genetici říkají, že za většinu našich vlastností mohou geny, zatímco psychologové tvrdí, že rozhodující vliv má prostředí.  
Kde je pravda?

## Péče o novorozence

Dobrá



Stabilní psychika potomstva

Špatná



Stresová psychika potomstva

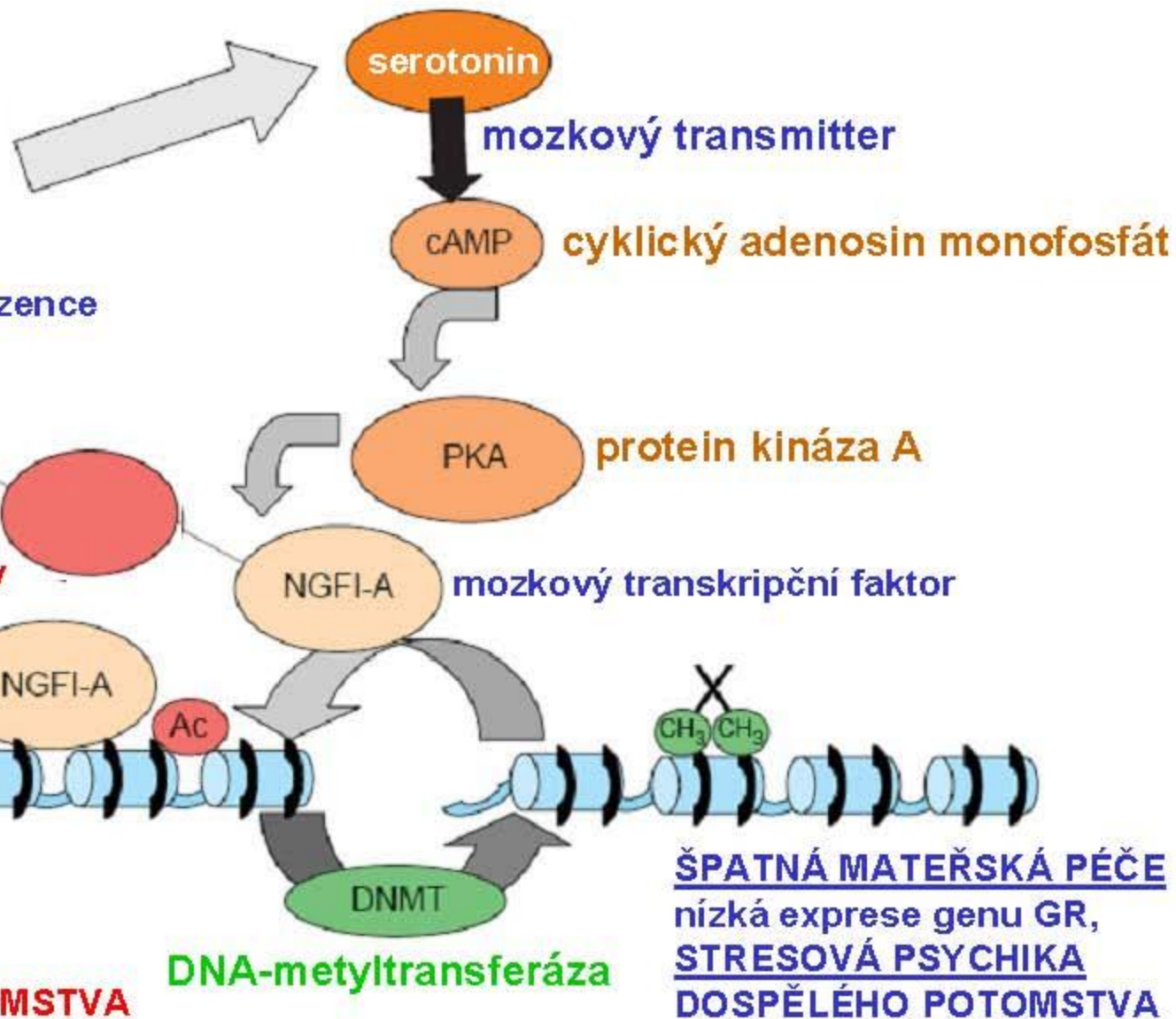
Prostor pro epigenetiku.....

# Maternální programování epigenetických stavů

*Maternální péče jako model „experience-dependent chromatin plasticity“*



mateřská péče o novorozence  
(lízání a mazlení)

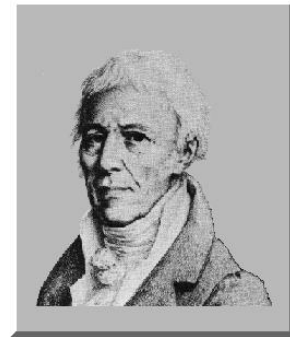




zygota

Jak je to s transgenerační  
dědičností epigenetických stavů ?

Nevíme.....

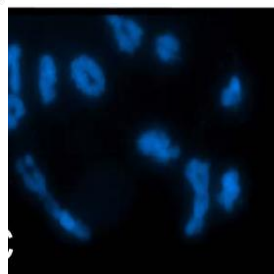


Jean B. Lamarck

Meiosa

zygota

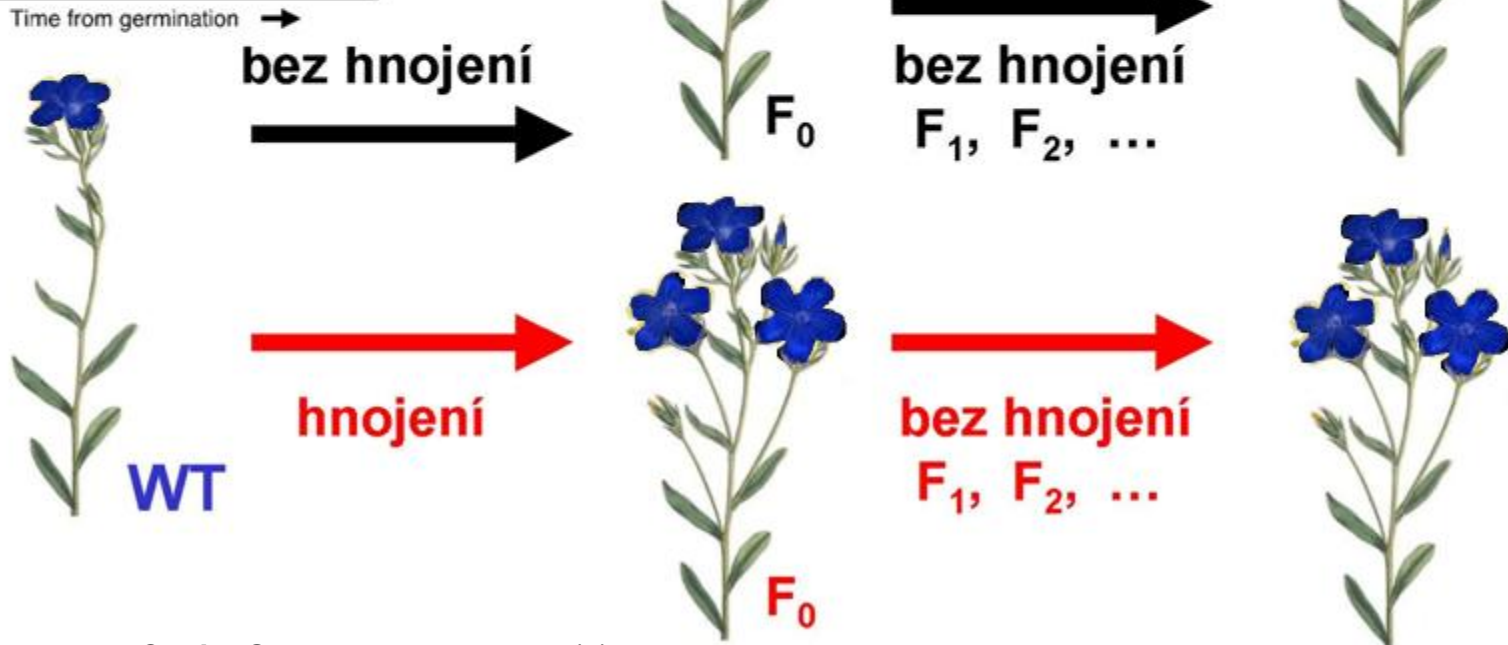
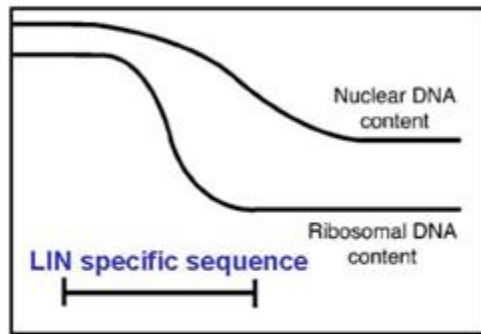
možné výsledné fenotypy (kanalizace)



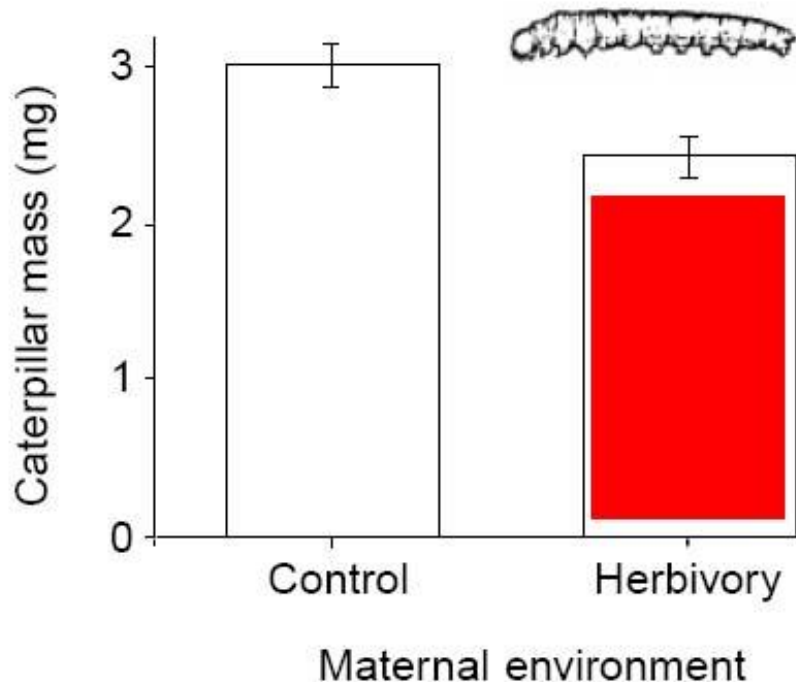
možné výsledné fenotypy (kanalizace)

# Meiotický přenos epigenetického stavu (fenotypu) aneb environmentální indukce dědičných změn

- genotrofy u lnu (vliv podnebí a výživy na větvení)



... rostliny ohnice *Raphanus raphanistrum* v reakci na požer housenkou *Pieris rapae* syntetizují odpudivé hořčičné látky, znak přetrvává minimálně do další generace



*Raphanus raphanistrum* resistance to herbivory as measured by growth of a specialist caterpillar, *Pieris rapae*, on the  $F_1$  generation of seedlings from different maternal environments. Maternal plants were either subject to herbivory by *P. rapae* or left undamaged. This transgenerational induction of defences was not associated with differences in seed mass or seed concentrations of carbon or nitrogen.

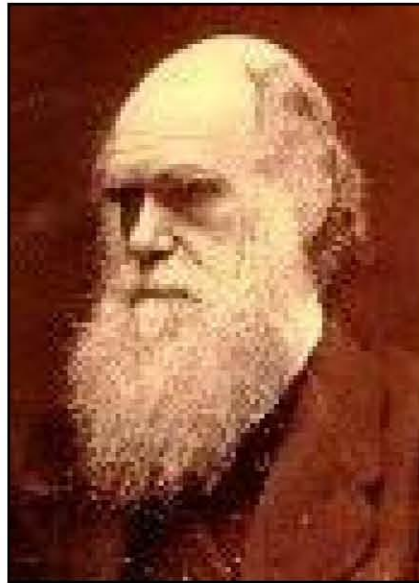
Agrawal:  
 ECOLOGY Volume:  
 83 Issue: 12 Pages: 3408-  
 3415, 2002



# Vznik a dědičnost rostlinných monster (epimutace)



Carl Linnaeus  
(1744)



Charles Darwin  
(1868)

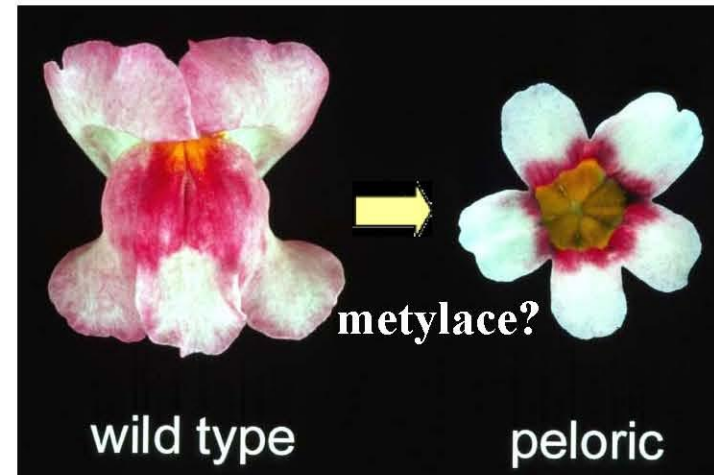


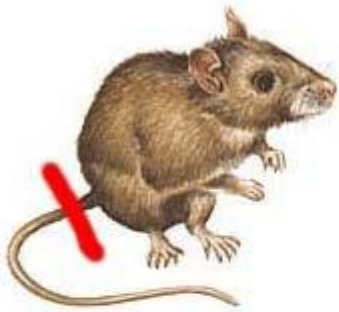
Enrico Coen  
(1999)

**Linnaeus** ... pelorie u Inice, historicky první doložená mutace?

**Darwin** ... křížení normálních a pelorických forem v F2 127:37 (*Variation of Animals and Plants under Domestication*)

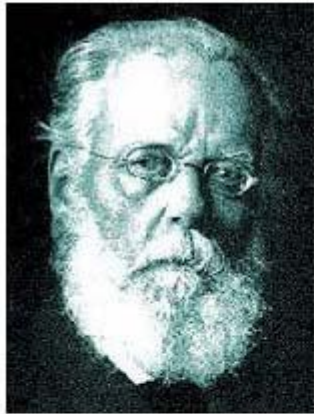
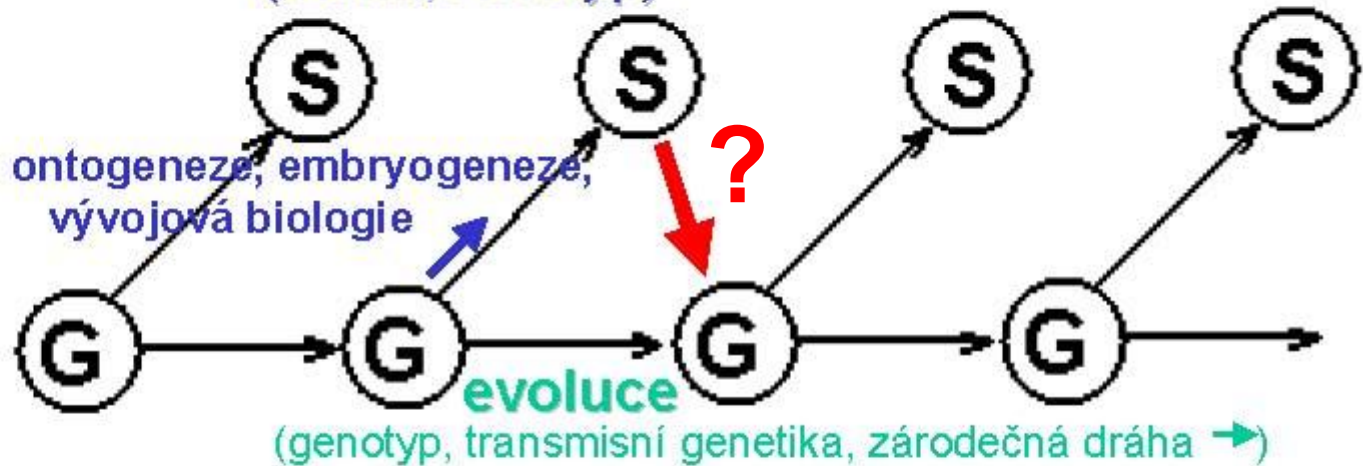
**Coen** ... hypermetylace homologu genu *Cycloidea*





Po selekci se dědí (přenáší) genotyp,  
selekce se však realizuje na bázi fenotypu ...

(soma, fenotyp)



“Weismannova bariéra” (1889): somatické změny získané v průběhu života neovlivňují reprodukční buňky či potomstvo

Rostliny zárodečnou dráhu nemají



*Získané reakce na pachy ovlivňují  
nervové struktury a chování zvířat v následujících generacích*

# Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations

Brian G Dias<sup>1,2</sup> & Kerry J Ressler<sup>1–3</sup>

Using olfactory molecular specificity, we examined the inheritance of parental traumatic exposure, a phenomenon that has been frequently observed, but not understood. We subjected F0 mice to odor fear conditioning before conception and found that subsequently conceived F1 and F2 generations had an increased behavioral sensitivity to the F0-conditioned odor, but not to other odors. When an odor (acetophenone) that activates a known odorant receptor (*Olfr151*) was used to condition F0 mice, the behavioral sensitivity of the F1 and F2 generations to acetophenone was complemented by an enhanced neuroanatomical representation of the *Olfr151* pathway. Bisulfite sequencing of sperm DNA from conditioned F0 males and F1 naive offspring revealed CpG hypomethylation in the *Olfr151* gene. In addition, *in vitro* fertilization, F2 inheritance and cross-fostering revealed that these transgenerational effects are inherited via parental gametes. Our findings provide a framework for addressing how environmental information may be inherited transgenerationally at behavioral, neuroanatomical and epigenetic levels.

Responding to environmental stimuli is crucial to the survival of organisms and often manifests as alterations in the structure and function of the nervous system. When and how information from the environment results in experience-dependent alteration of nervous system structure and function are fundamental questions in behavioral neuroscience.

An important, but often ignored, factor that influences adult nervous systems is exposure of parents to salient environmental stimuli before the conception of their offspring. Such information transfer would be an efficient way for parents to ‘inform’ their offspring about the importance of specific environmental features that they are likely to encounter in their future environments. However, this would necessitate the transgenerational inheritance of environmental information via the germ line by offspring not even conceived at the time. Although

differences in methylation that may mark the specific olfactory receptor gene for enhanced transcription in the subsequent generation. Finally, using *in vitro* fertilization (IVF), F2 and cross-fostering studies, we found that the behavior and structural alterations were inherited and were not socially transmitted from the F0 generation.

## RESULTS

### Olfactory fear conditioning to study descendant generations

We examined whether olfactory fear conditioning of the F0 generation leads subsequently conceived adult F1, F2 and IVF-derived generations to exhibit F0-like behavioral sensitivity toward the F0 conditioned odor, and whether there were neuroanatomical changes at the level of the main olfactory epithelium (MOE) and olfactory

Dědičnost indukované fóbie?

Některé

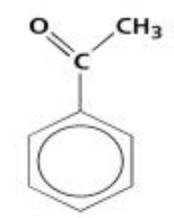
- Epigenetická předpoklady

- Posílání pachů

- Dědičnost min. 2 generací



+



acetofenon

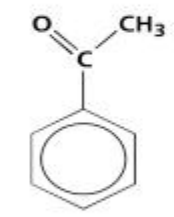
Reakce



1, což je



+



+

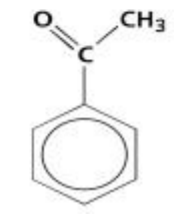


achyzení

Podmíněný reflex Pavlovského typu po dobu



+



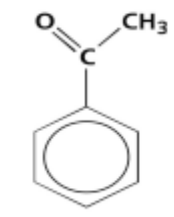
fóbie

meiosis      přirozená reprodukce, in vitro oplození

F1, F2...



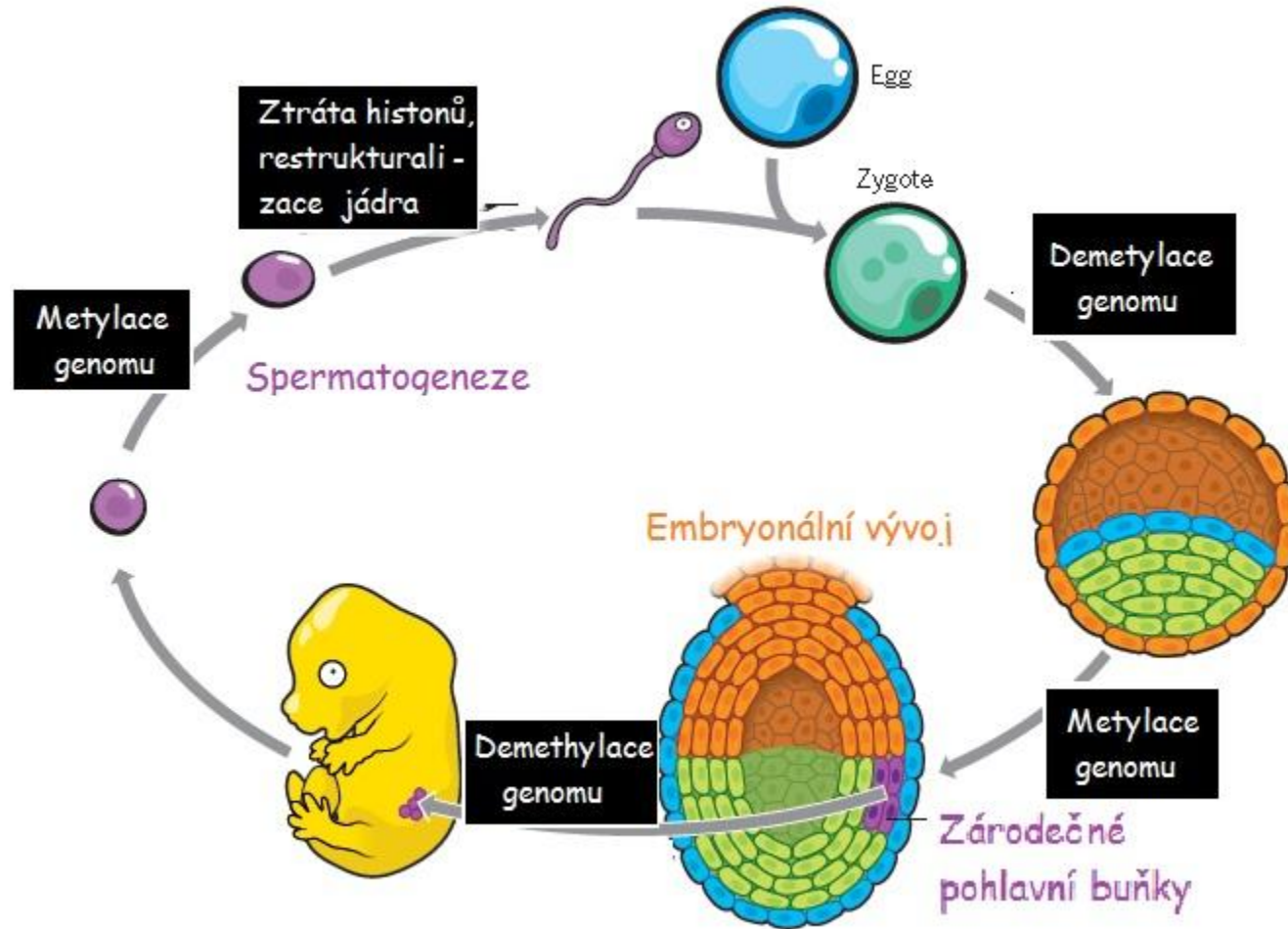
+



fóbie

Epigenetický obraz genomu se sice v embryonálním vývoji vymazává, ale ne úplně!

Prostor pro další výzkum.....



# Plán přednášky

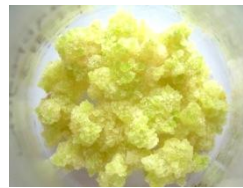
- Epigenetická pojetí ontogeneze
- Kovalentní modifikátory chromatinu a krátké molekuly RNA
- Epigenetická transgenerační paměť
- Epigenetické změny provázející dediferenciaci buněk**







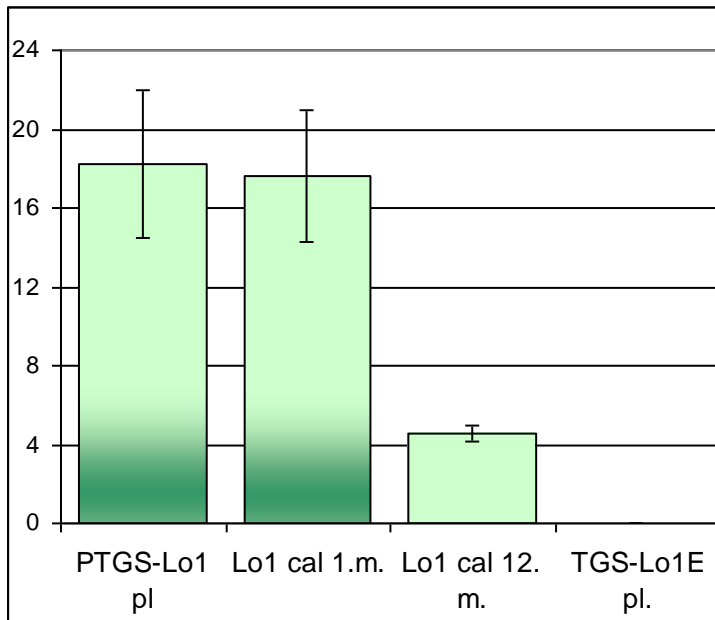
hormony



hormony



qPCR prokázala progresivní pokles transgenní aktivity v kalusech



Parental Helo1 plant  
Callus Helo1 – 1 month  
Callus Helo1 – 12 months  
Regenerated plant



Miloslava Fojtová

Hypotézy:

- Mutace – vyloučena sekvenováním
- Rearrangement – vyloučena S. blot hybridiz.
- Epigenetická změna – metylace DNA?

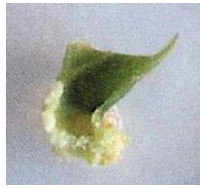


Kateřina Křížová

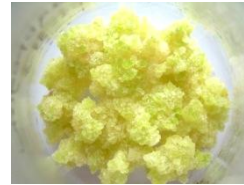
# Změny v metylaci promotoru transgenu v průběhu dediferenciace, kultivace buněk in vitro a regenerace rostliny



PTGS-Lo1 plant



disc of leaf, microcallus (0.p.)

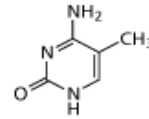


advanced callus (Lo1 11.p.)



regenerated TGS-Lo1E plant

## 35S promoter methylation (%)

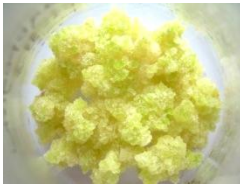


5-methylcytosine



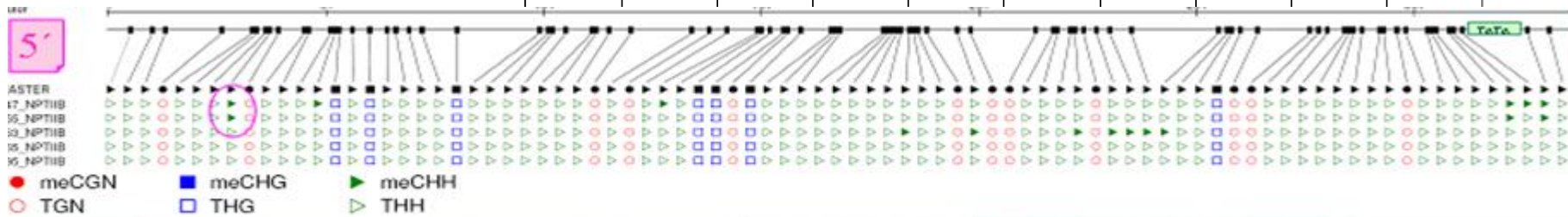
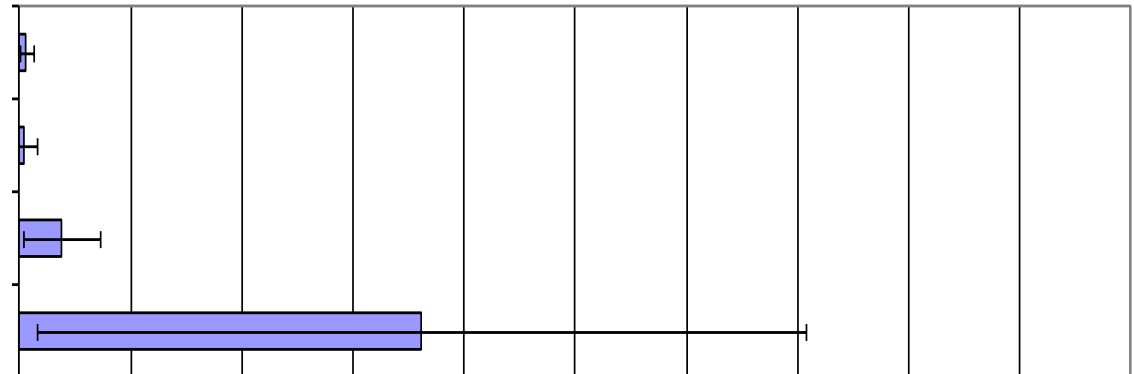
PTGS-Lo1 pl

Lo1 0.p. disc of leaf



Lo1 0.p.

Lo1 11.p.





*Děkuji za pozornost*

**Academy of Sciences:**

**Aleš Kovařík**

**Miloslava Fojtová**

**Jana Lunerová**

**Kateřina Křížová**

**Lucie Khaitová**

**Jaroslav Fulneček**

**University of Ghent, Belgium:**

**Anna Depicker**

**Annick Bleys**

**Helena Van Houdt**



*Nicotiana tabacum* , AVČR, Brno