

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Diplomová práce**

**Olomouc 2012**

**Martina Bednářová**

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



## Změny v epigenetickém a expresním profilu v průběhu embryogeneze rostlin

Diplomová práce

**Martina Bednářová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: prezenční

Olomouc 2012

Vedoucí práce: **doc. RNDr. Vladan Ondřej, Ph.D**

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. Vladana Ondřeje, a že jsem použila pouze literární zdroje uvedené v přehledu použité literatury.

V Olomouci dne 27. července 2012

.....

Podpis

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat doc. Vladanovi Ondřejovi za odborné vedení a příležitost získat praxi v biologickém výzkumu a ostatním členům z katedry botaniky a katedry buněčné biologie a genetiky za rady a připomínky k mé práci.

# Shrnutí

Tato diplomová práce je zaměřena na studium změn v genové expresi a epigenetického stavu chromatinu během rostlinné embryogeneze. Embryogeneze začíná splynutím haploidních gamet a vznikem jednobuněčné zygoty. Zygota se následně dělí, vzniká základní stavební plán embrya a zakládají se meristémy, ze kterých se později budou vyvíjet orgány dospělé rostliny. Tyto procesy jsou ovlivněny souhrou skupin genů, které se zapojují v průběhu vývoje embrya, ale mohou mít úlohu také v odlišných procesech. Důležitou roli během embryogeneze hraje také epigenetická regulace. V této práci byla zkoumána globální hladina metylace a hydroxymethylace genomu *Arabidopsis thaliana* a *Cucumis sativus* během různých stádií vývoje embrya ve srovnání s listy a květy. Dále byla kvantifikována exprese genů *SINI*, *KANI*, *PCNA1*, *BE1* a *LEA4-5* u *Arabidopsis* a *XTH1*, *XTH2* a *XTH3* u *Cucumis* během embryogeneze a byl zjišťován jejich metylační stav. Vyšší globální hladina metylace DNA byla pozorována v pozdějších fázích vývoje embrya oproti hladině ve stádiu globulárním jak u *Arabidopsis*, tak u *Cucumis*. Hladina hydroxymethylace DNA během vývoje embrya byla u obou pokusných rostlin zvýšena oproti květu a listu. Byly zaznamenány expresní profily jednotlivých genů a analýzou jejich metylačního stavu byla zjištěna možnost, že transkripční aktivita *LEA4-5* a *XTH2* je regulována prostřednictvím metylace DNA.

# Summary

This thesis is focused on the study of changes in gene expression and epigenetic state of the chromatin during plant embryogenesis. Embryogenesis starts with fusion of haploid gametes and origin of one-cell zygote. Zygote divides and basic structural plan is established. Meristems, originating during embryogenesis, will later give rise adult plant organs. These processes are influenced by groups of genes having a role in embryo development, but can participate in other different processes. Also epigenetic regulation plays an important role in embryogenesis. In this thesis, the level of global DNA methylation and DNA hydroxymethylation in fertilized eggs with developing embryos was explored in comparison to flowers and leaves. *Arabidopsis thaliana* and *Cucumis sativus* were used as an experimental plants. Expression of *Arabidopsis* genes *SINI*, *KAN1*, *PCNA1*, *BE1* a *LEA4-5* and *Cucumis XTH1*, *XTH2* a *XTH3* was quantified and their methylation state was explored. Higher level of global DNA methylation was observed in later phases of *Arabidopsis* and also *Cucumis* embryo development compared with DNA methylation level in egg with globular embryo. DNA hydroxymethylation level was higher during embryogenesis than in flowers or leaves. Expression profiles of chosen genes were determined and analysis of their methylation state revealed a possibility of epigenetic regulation of *LEA4-5* and *XTH2* transcription activity by DNA methylation.

# Obsah

<b>1 Cíle práce.....</b>	<b>9</b>
<b>2 Úvod.....</b>	<b>10</b>
<b>3 Současný stav řešené problematiky.....</b>	<b>11</b>
3.1 Rostlinná embryogeneze.....	11
3.1.1 Uspořádání vajíčka a fertilizace.....	11
3.1.2 Vývoj embrya – vznik základního stavebního plánu.....	12
3.2 Genetická regulace.....	13
3.2.1 SHORT INTEGUMENT (SIN).....	14
3.2.2 KANADI (KAN).....	15
3.2.3 PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN (PCNA).....	16
3.2.4 BRANCHING ENZYME (BE).....	17
3.2.5 XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLUKOSYLASE/HYDROLASE (XTH).....	18
3.2.6 LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT PROTEIN (LEA).....	19
3.3 Epigenetická regulace.....	20
3.3.1 Mechanismy epigenetických procesů.....	21
3.3.1.1 Metylace DNA.....	21
3.3.1.1.1 Metylace DNA a embryogeneze.....	22
3.3.1.2 Hydroxymethylace DNA.....	23
3.3.1.2.1 Hydroxymethylace DNA a embryogeneze.....	24
3.3.1.3 Modifikace N-terminálních konců histonů.....	24
<b>4 Materiál a metody.....</b>	<b>26</b>
4.1 Použité chemikálie.....	26
4.2 Přístroje a experimentální vybavení.....	26
4.3 Rostlinný materiál.....	27
4.4 Příprava mikroskopických preparátů.....	27
4.5 Izolace DNA.....	27
4.6 Izolace RNA.....	28
4.7 Ošetření RNA DNázou.....	29
4.8 Reverzní transkripce.....	29
4.9 Modifikace DNA (bisulfidická konverze).....	29
4.10 Použité primery a jejich navržení.....	30
4.11 PCR.....	32
4.12 Gelová elektroforéza.....	32
4.13 Real-time PCR (qPCR).....	32
4.14 Kvantifikace hydroxymetylované DNA specifickým stanovením 5-hydroxymetylcytosinu.....	33
4.15 Kvantifikace metylované DNA specifickým stanovením 5-metylcytosinu.....	34
<b>5 Výsledky.....</b>	<b>36</b>
5.1 Pozorování mikroskopických preparátů.....	36
5.1.1 Preparáty <i>Arabidopsis</i> .....	36
5.1.2 Preparáty <i>Cucumis</i> .....	37
5.2 Globální hladiny metylace a hydroxymethylace DNA.....	38
5.2.1 Analýza <i>Arabidopsis</i> .....	38
5.2.2 Analýza <i>Cucumis</i> .....	39
5.3 Analýza genové exprese.....	40

5.3.1 Analýza exprese <i>Arabidopsis</i> .....	40
5.3.1.1 Exprese genu <i>SINI</i> .....	40
5.3.1.2 Exprese genu <i>KANI</i> .....	41
5.3.1.3 Exprese genu <i>PCNA1</i> .....	42
5.3.1.4 Exprese genu <i>BE1</i> .....	43
5.3.1.5 Exprese genu <i>LEA4-5</i> .....	44
5.3.2 Analýza exprese <i>Cucumis</i> .....	45
5.3.2.1 Exprese genu <i>XTH1</i> .....	45
5.3.2.2 Exprese genu <i>XTH2</i> .....	46
5.3.2.3 Exprese genu <i>XTH3</i> .....	47
<b>6 Diskuze.....</b>	<b>49</b>
<b>7 Závěr.....</b>	<b>53</b>
<b>8 Seznam použité literatury.....</b>	<b>54</b>
<b>9 Seznam použitých zkratk.....</b>	<b>59</b>



# 1 Cíle práce

Cílem této diplomové práce je studovat změny během rostlinné embryogeneze na úrovni genetické a epigenetické. K tomuto studiu bylo vybráno několik genů *Arabidopsis thaliana* a *Cucumis sativus*, z nichž každý má v průběhu embryogeneze specifickou funkci. Exprese těchto genů bude kvantifikována během různých stádií vývoje embrya a zároveň bude analyzován jejich metylační stav. Dalším cílem práce je určit globální hladinu metylace a hydroxymethylace genomické DNA a sledovat, zda se hladina těchto modifikací v průběhu embryogeneze mění a jakým způsobem.

## 2 Úvod

Embryogeneze je proces, kterým začíná vegetativní fáze rostlinného vývoje. Na rozdíl od živočichů je vývoj u rostlin kontinuální – nové rostlinné orgány jsou formovány během života ze shluků embryonálních buněk nazývaných meristémy. Vzniku embrya předchází formace haploidních gamet uvnitř samčích a samičích pohlavních orgánů a jejich fúze, kterou vzniká jednobuněčná zygota. Ta podléhá programovanému vzorci buněčných dělení vedoucích k vývoji embrya a struktur pro výživu a ochranu. Vývoj embrya u vyšších rostlin zahrnuje komplexní sekvenci událostí, které lze rozdělit do třech překrývajících se fází. Jako první dochází k intenzivnímu mitotickému dělení jednobuněčné zygoty. Vzniklé buňky poté dále diferencují a dají vzniknout základnímu stavebnímu plánu embrya. Později dochází ke zrání embrya, kdy už neprobíhají další buněčná dělení. Tato fáze je charakterizována expanzí buněk a ukládáním zásobních látek. Zrání je ukončeno dehydratací, což vede k utlumení metabolismu a dočasnému dormantnímu stavu. Embryo je obdařené unikátní schopností přestát extrémní dehydrataci a další stresy prostředí bez snížení životaschopnosti a v příznivých podmínkách vyrůstá v novou rostlinu. Buněčné dělení a diferenciace během embryogeneze probíhají podle vysoce regulovaných schémat, která jsou ovlivňována genetickými a epigenetickými mechanismy. Epigenetická regulace je do jisté míry prozkoumána u savců, u rostlin je však dosud známo jen málo. Savčí genom podléhá během embryogeneze genomickému reprogramování, což zahrnuje globální změny v metylaci DNA důležité pro regulaci genové exprese během jednotlivých stádií vývoje. Metylace DNA je často asociována s transkripčně inaktivním heterochromatinem. Během časné embryogeneze podléhají rozsáhlé části genomu demetylaci a posléze remetylaci, což je spojeno s dekondukcí chromatinu a transkripční aktivací genů esenciálních pro vývoj embrya. Hydroxymetylace DNA byla v genomu živočichů objevena jako jedna z dalších epigenetických modifikací. Zvýšené hladiny hydroxymetylované DNA byly zjištěny u embryonálních kmenových buněk a u pluripotentních buněk. Význam této modifikace zatím nebyl zcela objasněn, ale nedávné studie naznačují zapojení při demetylaci DNA. U rostlin byla prokázána přítomnost nízké hladiny hydroxymetylace DNA, nic však není známo o její funkci v rostlinném genomu. Prohloubení našich poznatků o řízení vývoje rostlin na genetické a epigenetické úrovni je dalším článkem doplňujícím znalosti v oblasti anatomické a fyziologické a zároveň důležitým krokem vedoucím k možnosti využití těchto znalostí v biotechnologickém výzkumu a ve šlechtitelství.

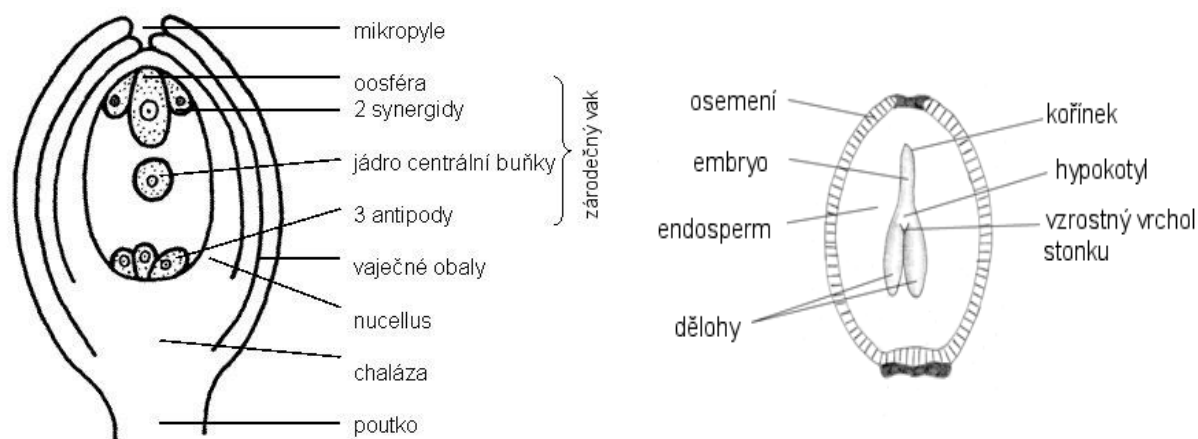
## 3 Současný stav řešené problematiky

### 3.1 Rostlinná embryogeneze

Vývoj rostliny začíná embryogenezí. Embryogeneze ustavuje základní stavební plán rostlinného těla - vede k vytvoření apikálně bazální osy a radiálního uspořádání stonku a kořene. Zároveň generuje meristémy, ze kterých se v dospělosti vyvíjejí orgány. V meristémech probíhá dělení buněk, růst a diferenciace. Buňky odvozené z meristémů později tvoří pletiva a orgány, což determinuje celkovou velikost, tvar a strukturu rostliny. Na rozdíl od živočišné embryogeneze je vývoj rostlin pokračující proces (Zhang a Laux, 2011). Samotná embryogeneze začíná splynutím spermatické buňky s vaječnou a vytvořením jednobuněčné zygoty. Oplození zahajuje také tři další procesy: vývoj endospermu, plodu a semene. Embryogeneze transformuje jednobuněčnou zygotu v mnohobuněčnou mikroskopickou embryonickou rostlinku. Embryogenezi ve vyšších rostlinách lze rozdělit do třech překrývajících se fází. V první fázi vzniká apikálně bazální uspořádání – kořenový a stonkový vrchol a zakládají se embryonická pletiva. Ve druhé fázi dochází ke zrání embrya, embryo akumuluje a ukládá zásobní látky. V poslední fázi dojde k vysušení embrya a dočasnému zastavení vývoje (Zeiger a Taiz, 2006).

#### 3.1.1 Uspořádání vajíčka a fertilizace

Uvnitř vajíčka je umístěn mnohobuněčný zárodečný vak. Má polární uspořádání, takzvanou mikropylárně chalazální osu. Vaječná buňka a synergidy jsou umístěny při mikropylárním pólu vajíčka, zatímco antipody jsou na opačném pólu (Reiser a Fischer, 1993). U krytosemenných rostlin (*Angiospermae*) se vyskytuje unikátní jev – dvojí oplození. Během opylení proniká do vajíčka pylová láčka skrze mikropyle a dopravuje sem dvě spermatidy, jedna splývá s vaječnou buňkou za vzniku jednobuněčné zygoty, druhá splývá s centrální buňkou za vzniku triploidního pletiva endospermu, které slouží k výživě embrya (Higashiyama, 2002). Endosperm buď přetrvává ve zralém semeni jako zásobní pletivo a nebo je postupně absorbován během vývoje semene (Olsen, 2004). Schéma uspořádání vajíčka a semene je zobrazeno na obr. 1.



**Obr. 1:** Uspořádání vajíčka (vlevo) a semene (vpravo). Po oplození vytváří vaječná buňka embryo, jádro zárodečného vaku se mění v živné pletivo endosperm. Vaječné obaly se přeměňují v osemení.

Převzato a upraveno dle:

[http://web2.mendelu.cz/af\\_211\\_multitext/obecna\\_botanika/obrazky/organologie/velke\\_prime\\_vajicko.jpg](http://web2.mendelu.cz/af_211_multitext/obecna_botanika/obrazky/organologie/velke_prime_vajicko.jpg)

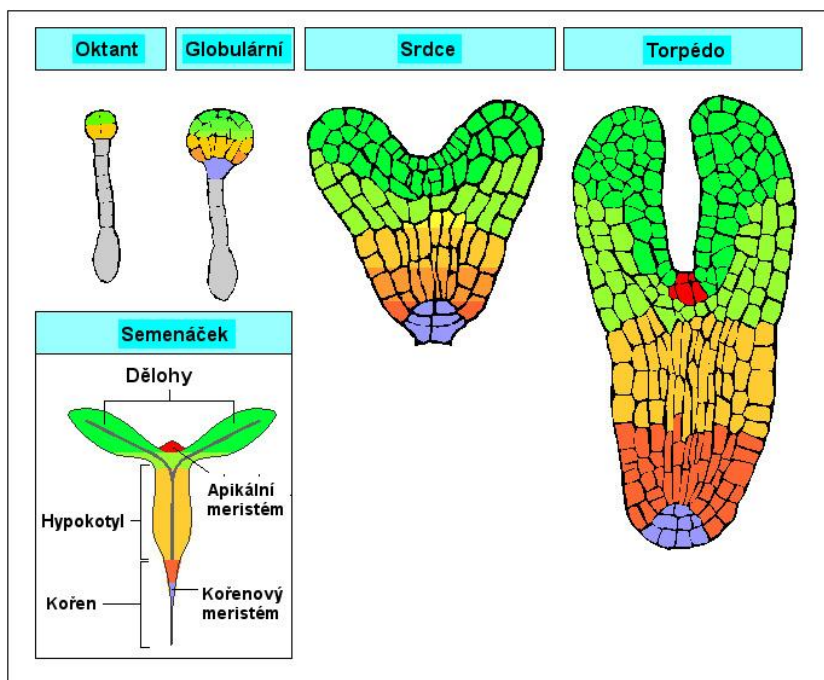
<http://www.biomach.cz/biologie-rostlin/system-a-evoluce-rostlin/krytosemenne-rostliny#TOC-PL0D>

### 3.1.2 Vývoj embrya – vznik základního stavebního plánu

Vaječná buňka a zygota jsou polárně uspořádány, mají velkou vakuolu v bazální části a jádro a většinu cytoplazmy v apikální části. Po fertilizaci se zygota začne prodlužovat zhruba do trojnásobku původní velikosti, poté asymetricky dělit, aby pak vytvořila dceřinné buňky rozdílné velikosti a hustoty cytoplazmy (Mansfield a Briarty, 1991). Apikální buňka je menší, obsahuje více cytoplazmy, plastidů, mitochondrií a vyšší koncentrace RNA, zatímco větší bazální buňka získá vakuolu. Apikální dceřinná buňka po dvou horizontálních a jednom vertikálním dělení dává vzniknout vlastnímu osmibuněčnému embryu (oktant). Dalším dělením je separováno první histologicky detekovatelné pletivo protoderm. Odlišení protodermu určuje globulární fázi vývoje. Současně se horizontálně dělí bazální dceřinná buňka a vzniká šest až devět buněk vytvářejících suspensor, který zajišťuje spojení s mateřským pletivem, a hypofýza (Berleth a Chatfield, 2002). Jak embryo dále roste a dostává se do stádia srdce, lze rozlišit tři regiony s odlišnými vývojovými osudy. Za prvé je to apikální doména, tvořená čtyřmi apikálními buňkami vlastního embrya, ze které vzniká stonkový meristéma a dělohy, za druhé centrální doména, tvořená čtyřmi nižšími buňkami embrya, která dává vznik hypokotylu a kořeni a přispívá k vytvoření děloh a kořenového meristému, za třetí je to bazální doména – hypofýza, která dává vzniknout kořenovému meristému, klidovému centru a kmenovým buňkám kořenové čepičky (Laux *et al.*, 2004). Dochází ke změně symetrie z radiální na bilaterální a vznikají dva základní orgánové systémy. Je to osa, která je tvořena stonkovým a kořenovým meristémem, z níž po klíčení vzniká dospělá rostlina. Druhý systém, dělohy, budou sloužit jako zásobní orgán během klíčení a poté zaniknou (West a Harada, 1993). Současně dochází k dělení triploidního

endospermu, který vznikl spojením druhé spermatické buňky s buňkou centrální, a který vytváří coenocytické stadium. Celularizace endospermu se objevuje v době, kdy jsou vytvořena primordia děloh. U *Arabidopsis* dochází ke spotřebování endospermu během zrání embrya (Olsen, 2004). Další fáze připravují embryo na stadium dormance a pozdější klíčení, dochází k akumulaci zásobních proteinů, lipidů a škrobu. Prodlužováním buněk embrya a dalším vývojem děloh nastává stádium torpéda. Nakonec začne embryo a semeno ztrácet vodu, přestane být metabolicky aktivní a vstupuje do fáze dormance - zralé embrya. V dělohách uložené proteiny, škrob a lipidy slouží jako výživa po dobu heterotrofní fáze (West a Harada, 1993). Jednotlivá stádia vývoje jsou zobrazeny na obr. 2.

Radiální uspořádání pletiv je poprvé pozorováno ve fázi oktantu. S pokračujícím dělením globulárního embrya dochází k tomu, že transverzální dělení rozdělí nižší vrstvu buněk do tří regionů. Tyto regiony se budou vyvíjet v radiálně uspořádaná pletiva stonku a kořene. Na vnější straně se vytváří jednovrstevný protoderm, ze kterého se vyvine epidermis. Buňky pod protodermem vytváří bazální meristémy, který dá později vzniknout kortexu a endodermis v hypokotylu a kořeni. Nejvnitřnější vrstva vytváří prokambium, ze kterého se vyvinou vodivá pletiva a pericykl kořene (Jürgens, 1996).



**Obr. 2:** Stádia vývoje embrya *Arabidopsis*.

Převzato a upraveno dle:

[http://santanusana.org/pakelly/AP%20Bio/embryonic\\_cell\\_development.htm](http://santanusana.org/pakelly/AP%20Bio/embryonic_cell_development.htm)

### 3.2 Genetická regulace

V průběhu megasporogeneze, embryogeneze a dalších souvisejících událostí je nezbytná vzájemná souhra skupin genů, které tyto procesy řídí a ovlivňují. V následující

kapitole jsou popsány geny vybrané k analýze v této diplomové práci v souvislosti s výše uvedenými procesy, jejich působení a defekty vznikající mutacemi těchto genů.

### **3.2.1 SHORT INTEGUMENT (SIN)**

Gen *SIN1* je potřebný pro normální vývoj integumentů, pro megasporogenezi a pravděpodobně je zapojen také v řízení načasování kvetení, což potvrzují doposud provedené studie mutantů. Ve vajíčku mutantu *sin1* jsou iniciovány dva integumenty, ale jejich další vývoj je narušen díky tomu, že při pokračujícím dělení buněk dochází k potlačení jejich elongace. Byla pozorována aberantní megasporogeneze, kdy je mutant schopen vytvořit archesporiální buňku, ale nikdy nevytvoří normální zárodečný vak. To naznačuje možnost, že formování zárodečného vaku a vývoj integumentů je provázaný, a nebo že jsou řízeny částečně společnou drahou (Robinson-Beers *et al.*, 1992). *SIN1* představuje genetické propojení mezi vývojem vajíčka a kontrolou kvetení. Mutace *sin1* způsobuje female-specifickou sterilitu a defekt v kontrole načasování kvetení u *Arabidopsis*. Dalším projevem mutace je zvýšený počet vegetativních listů a primordií, ze kterých později vzniká květní meristém, a také zpožděný nástup kvetení (Ray *et al.*, 1996).

*Sin2* je jedolokusová recesivní mutace, která u homozygotů způsobuje kompletní female-sterilitu. Vajíčka mutantů se vyvíjejí stejně jako vajíčka wild-type rostliny (WT) až do bodu, kdy je iniciována tvorba integumentů. Dělení buněk je zastaveno krátce po iniciaci a tím i růst obou integumentů. Mutant má potom vajíčko se dvěma krátkými integumenty tvořenými menším počtem buněk než WT (Broadhvest *et al.*, 2000). Bylo pozorováno také narušení megasporogeneze, respektive její zastavení ještě před vznikem mateřské buňky megaspory. U pestíků a kališních plátků *sin2* květů byly pozorovány morfologické změny. *SIN2* je tedy nezbytný pro progresivní růst obou integumentů, je primárním promotérem jejich růstu a sekundárním promotérem růstu dalších struktur reprodukční morfogeneze. Pozorováním genetických interakcí mezi *sin2* a dalšími mutacemi zasahující vývoj vajíčka autoři došli k závěru, že přímá regulace, dělení a expanze buněk jsou částečně nezávislé procesy řídící vývoj integumentu. *SIN2* sdílí funkční redundanci s minimálně dvěma geny regulujícími kvetení a růst vajíčka. Pleiotropní efekt *sin2* a dalších mutantů vedly k předpokladu, že existuje spojení mezi některými geny regulujícími vývoj vajíčka a vývoj květních orgánů (Broadhvest *et al.*, 2000).

*SIN2* kóduje domnělou GTPázu z relativně dosud necharakterizované podtřídy DAR GTPáz, které obsahují konzervovaný motiv aspartát-alanin-arginin (DAR) a další konzervované domény. Některé DAR GTPázy byly shledány důležitými pro buněčné dělení

bakterií, hub a linií lidských kmenových buněk, kde jsou asociovány s aparátem pro transport ribozomálních podjednotek v buňce. Protein SIN2 byl lokalizován v mitochondriích a mohl by se účastnit sestavování mitochondriálních ribozomů u *Arabidopsis*. *SIN2* mRNA byla nalezena ve všech rostlinných pletivech, tak jak se předpokládá pro mitochondriální protein (Hill *et al.*, 2006).

### 3.2.2 KANADI (KAN)

Listy a květní orgány jsou polarizovány podél jejich adaxiální – abaxiální osy. U *Arabidopsis* je tento rozdíl částečně zřetelný na prvních dvou růžicových lístcích, které nesou trichomy na adaxiální straně, nikoli však na abaxiální. Mutantní alely genu *KAN* byly identifikovány při screenech mutantů, kteří produkují trichomy na abaxiální straně těchto dvou prvních lístků. Mutace *kan* byly původně identifikovány jako zesilovače mutantního květního fenotypu *crabs claw*, genu, který určuje abaxiální identitu pestíků (Eshed *et al.*, 1999). Exprese *KAN* ve vyvíjejícím se floému a v abaxiálních regionech laterálních orgánů probíhá během časného vývoje. Zatímco se zdá, že geny *KAN* nejsou požadovány pro vlastní funkci meristému, je jejich exprese potřebná pro uspořádání orgánů vznikajících ze stonkového vrcholového meristému a z vaskulárního meristému. Mutanti *kan1-2*, *kan2-1* a *kan3-1* mají radializovanou vaskulaturu ve stonku a jejich laterální orgány jsou adaxializovány. Overexprese *KAN* ve stonkovém a kořenovém apikálním meristému způsobuje kompletní ztrátu meristematické aktivity a uniformní exprese ve vyvíjejících se laterálních orgánech způsobuje kompletní abaxializaci těchto orgánů (Emery *et al.*, 2003).

*KAN* je požadován pro určení abaxiální identity u listů i pestíků a kóduje jaderný protein náležící do rodiny GARP, rodiny domnělých transkripčních faktorů. Ektopická exprese *KAN* pod kontrolou 35S promotoru z viru mozaiky tabáku naznačuje též úlohu při určení periferální identity ve vyvíjejícím se embryu. RNA *in situ* hybridizace odhalila slabou expresi během globulární fáze vývoje embrya. Brzy poté byla exprese omezena na periferální buňky v bazální části nad hypofýzou. Ve stadiu srdce byla exprese pozorována na periférii budoucího hypokotylu a na abaxiální straně děložních primordií (Kerstetter *et al.*, 2001). Single mutanti *kan1* nebo *kan2* vykazovali pouze malý nebo žádný efekt na morfologii rostliny, zatímco u *kan1kan2* double mutanta došlo k nahrazení abaxiálních buněk buňkami adaxiálními ve většině laterálních orgánů. Změny v ustavení polarity souvisejí s expanzí exprese *PHB* (*PHABULOSA*)-like genů a s redukcí exprese genů *YABBY*, které určují abaxiální identitu. Ektopická exprese genů *KAN* v listových primordiích vedla ke dramatické

transformaci adaxiálních buněk na abaxiální. Fenotypy mutantů *KAN* naznačují, že jádrem ustavení polarity je právě jemná regulace těchto genů (Eshed *et al.*, 2001).

Exprese *KANADI4* v chaláze může vést k zastavení vývoje vnějšího integumentu, a to negativní regulací genu *INNER NO OUTER (INO)*. Antagonismus mezi geny *KAN* a geny náležejícími do HD-ZIPIII (homeodomény s leucinovým zipem třídy III) se objevuje během vývoje listu při vytváření adaxiálně-abaxiální osy. V gain-of-function mutantech HD-ZIPIII genů jako *phb-1d* a *phv-1d* došlo k adaxalizaci listového pletiva skrze represi abaxiálních faktorů, exprese *KAN4* byla potlačena. Ve vajíčku WT je exprese *KAN4* nejprve pozorována ve spojovacích buňkách mezi vnějším a vnitřním integumentem a později je omezena na vnitřní integument. *KAN4* a HD-ZIPIII jsou potřebné pro udržování vývoje integumentu a negativně regulují expresi *INO* ve vajíčku. Vajíčko mutantu *kan4 phb phv rev/+* vykazovalo ektopickou expresi *INO* na gynoapikální straně, zatímco normálně je exprese *INO* lokalizována v gynobazální oblasti (Kelley *et al.*, 2009).

### **3.2.3 PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN (PCNA)**

Gen *PCNA* kóduje evolučně konzervovaný protein nalezený u všech druhů eukaryot a také archeí. Funkcí proteinu PCNA je více. Nejdříve byla objevena funkce PCNA jako funkčního faktoru polymerázy  $\delta$ , která je potřebná pro syntézu DNA během replikace. Avšak funkce PCNA je asociována také s dalšími vitálními procesy jako remodelace chromatinu, oprava DNA, koheze sesterských chromatid a kontrola buněčného cyklu. Protein PCNA je konzervován jak v sekvenci, tak ve struktuře a funkci. PCNA kvasinek a *Drosophily* byl schopen nahradit PCNA savců při replikaci DNA. Rostlinný PCNA stimuloval aktivitu lidské DNA polymerázy  $\delta$  a savčí PCNA stimuloval aktivitu dvou  $\delta$ -like polymeráz izolovaných z embrya pšenice (Paunesku *et al.*, 2001). PCNA patří do rodiny DNA klouzavých svorek, která zahrnuje také podjednotku  $\beta$  DNA polymerázy III z *E. coli*. PCNA a DNA polymeráza  $\delta$  jsou exprimovány v dělících se buňkách. PCNA funguje jako platforma pro DNA polymerázu  $\delta/\epsilon$  a další repikační proteiny, které interagují s PCNA. Přítomnost PCNA v replikační vidličce umožňuje výměnu DNA polymerázy  $\alpha$  za další polymerázy. Vazba PCNA na 3' konec primeru zabraňuje předčasné vazbě polymerázy  $\alpha$  a funguje jako signál pro rekrutování DNA polymerázy  $\delta$  a  $\epsilon$ . Po rekrutaci polymerázy se komplex polymeráza-PCNA pohybuje podél templátového vlákna a dochází k syntéze vlákna nového (Strzalka a Ziemienowicz, 2011).

Vedle role PCNA při replikaci vykonává tento protein také důležité funkce při opravách DNA. Role rostlinného PCNA proteinu při opravě je zatím málo charakterizována a



data poukazující na důležitost PCNA v tomto procesu jsou zatím nepřímá. Role rostlinného proteinu PCNA při opravách je předpokládána na základě identifikace a analýzy rostlinných proteinů, u jejichž homologů v kvasinkách a živočišných buňkách zapojených do reparačního systému byly prokázány interakce s PCNA. Tyto studie homologů naznačují, že klíčová role PCNA při opravách DNA spočívá v interakcích nejen s DNA polymerázou, ale také s dalšími reparačními proteiny (Maga a Hubscher, 2003).

PCNA je také zapojen v kontrole buněčného cyklu. Biochemické analýzy živočišného PCNA prokázaly interakce tohoto proteinu s komplexem cyklin A - cyklin dependentní kináza 2 (Cdk2). Toto naznačuje, že PCNA funguje jako spojení mezi Cdk2 a jejími substráty. V komplexu formovaném PCNA, cykliny a cyklin dependentními kinázami byl také identifikován protein p21, který brání přechodu z G1 fáze do S fáze inhibicí aktivity cyklin dependentní kinázy při poškození DNA. Homolog p21 v rostlinách nebyl dosud identifikován, avšak je zajímavé, že rostlinný protein PCNA je schopen interagovat s lidským p21 (Strzalka a Ziemienowicz, 2011).

Expresce *PCNA* ve všech organismech koreluje s buněčnou proliferací a tak i se syntézou DNA při replikaci v S fázi buněčného cyklu. Korelace mezi expresí *PCNA* a proliferací byla pozorována u mnoha rostlinných druhů. U fazolu šarlatového byla hladina transkriptu na nízké úrovni na začátku klíčení semene, avšak v průběhu došlo k nárůstu. V konečné fázi klíčení hladina transkriptu opět poklesla. V kořenech, stonku a listech byla hladina transkriptu nízká. Pozorovaný pokles hladiny transkriptu v pozdějších fázích klíčení byl způsoben s největší pravděpodobností změnou v poměru dělicích a nedělicích se buněk (Strzalka *et al.*, 2010).

### **3.2.4 BRANCHING ENZYME (BE)**

Aktivita tohoto proteinu je nezbytná jak pro embryogenezi, tak pro postembryonální vývoj. Analýza mnohonásobných mutantů odhalila, že nulová mutace *bel* vede k zastavení vývoje embrya v pozdní fázi srdce, popřípadě vede k letalitě. Mutant *bel-3* měl oproti WT kratší primární kořeny, zelenání děloh a iniciace listů byla zpožděna. Listy měly nažloutlou barvu a byly menší, rostlinky byly celkově menšího vzrůstu než WT. Květní orgány byly vyvinuty normálně, fertilita ovlivněna nebyla. Šešule WT rostlin obsahovaly zeleně zbarvená embrya, která se během maturace barvila do hněda. Šešule odvozené z rostlin *BE1/bel-4* obsahovaly asi 25% bíle zbarvených embryí, která byla v pozdější fázi abortována. Embryonální letalita byla taktéž pozorována pro alelu *bel-2* a *bel-1*. Mutace *bel-4* pravděpodobně narušuje normální průběh dělení a diferenciaci během embryogeneze.

Expres *BE1* byla detekována v celém embryu, v embryonálním kořínku pouze ve vaskulárních pletivech. Ve fázi po klíčení byla exprese detekována v aktivně se dělících buňkách – ve stonkovém apikálním meristému a mladých listech. Nízká aktivita byla pozorována v kořenech, hypokotylu a petiolech (Wang *et al.*, 2010). Na základě sekvenční homologie se předpokládá, že *BE1* kóduje glykosidhydrolázu lokalizovanou v chloroplastech, což nasvědčuje úloze v metabolismu sacharidů. *BE1* obsahuje čtyři konzervované domény – dvě E-set domény a dvě  $\alpha$ -amylázové domény, což tento protein řadí ke glykosidhydrolázám rodiny 13. U *Arabidopsis* bylo doposud objeveno deset genů náležejících ke glykosidhydrolázám rodiny 13. Mezi těmito geny byly charakterizovány některé jako geny kódující škrob větvicí enzymy (*BE2* a *BE3*). Tyto sdílejí s *BE1* nejvyšší stupeň homologie, avšak u proteinu *BE1* větvicí aktivita pozorována nebyla (Dumez *et al.*, 2006).

### **3.2.5 XYLOGLUCAN ENDOTRANGLUKOSYLASE/HYDROLASE (XTH)**

Xyloglukan endotransglukosylázy/hydrolázy zajišťují enzymatickou aktivitu zodpovědnou za plasticitu buněčné stěny a produkci oligosacharidů odvozených od xyloglucanu, což představuje regulační aktivitu při specifických fyziologických podmínkách. *XTH* jsou apoplastické enzymy vykazující jak endotransglukosylázovou, tak xyloglukan endohydrolázovou aktivitu. *XTH* geny patří ke glykosidhydrolázám rodiny 16. Na základě jejich struktury jsou tyto geny děleny do tří podrodin. Rodina *XTH* genů má evoluční původ v genové duplikaci. Hlavní rozrůznění v rodině *XTH* genů spočívá v orgánově specifické expresi a v různé citlivosti k hormonálním signálům. Také *XTH* geny s identickým schématem orgánově specifické exprese odpovídají na hormonální stimuly odlišně (Yokohama a Nishitani, 2001).

Expres genů *XTH1* a *XTH3* u *Cucumis sativus* byla pozorována po indukci somatické embryogeneze, kdy se v průběhu embryogeneze míra exprese zvyšovala. Gen *XTH1* byl lokalizován na druhém chromozomu blízko oblasti centromery, zatímco *XTH3* byl nalezen uprostřed dlouhého raménka pátého chromozomu. Bylo pozorováno, že oba geny byly přednostně exprimovány v kořenech. Akumulace obou transkriptů byla vyšší v somatických embryích než v proembryogenní masě. Transkripty *XTH1* byly akumulovány v místě děložních primordií (Malinowski *et al.*, 2004).

U *Arabidopsis* bylo nalezeno 33 *XTH* genů. Tyto geny mají odlišné orgánově a pletivově specifické expresní profily a odpovídají odlišně na hormonální a environmentální stimuly. Například *XTH17*, *-18*, *-19* a *-20* jsou exprimovány především v kořenech, *XTH22* v šesulích a *XTH24* ve stoncích. Jejich funkce mají malou nebo žádnou redundanci.

Předpokládá se, že jednotlivé XTH enzymy mají různé kinetické vlastnosti i různé transferázové a hydrolázové aktivity. Proto je kombinovaná exprese mnoha *XTH* genů klíčová pro široké spektrum rostlinných vývojových procesů. *XTH21* u *Arabidopsis* byl vysoce exprimován v květech, kořenech a je up-regulován přidáním kyseliny gibberelové a chladovým šokem. Mutant *xth21* má ve srovnání s WT trpasličí vzrůst, kratší kořenové vlášení, anomální epidermální kořenové buňky a slabší kořenový systém. Na základě změněného fenotypu mutanta *xth21* a fenotypu při overexpresi *XTH21* bylo prokázáno, že *XTH21* je zapojen do procesů modifikace buněčné stěny během růstu a vývoje kořenů. Ztráta funkce *XTH21* porušuje rovnováhu mezi syntézou, reorganizací a rozkládáním buněčné stěny, což omezuje růst primárních kořenů. *XTH21* je zapojen v růstu primárních kořenů prostřednictvím ovlivňování poměru obsahu xylokglukanu a ukládání celulózy (Liu *et al.*, 2007).

Studie z roku 2010 se zabývala imunolokalizací XTH v průběhu imbibice a klíčení semen *Cicer arietinum*. Přítomnost proteinu XTH1 v buněčné stěně embryonální osy už tři hodiny po imbibici, ještě před objevením se kořínku, naznačuje zapojení proteinu při samotném procesu klíčení. Hladina proteinu vzrůstala během dalších dvaceti čtyř hodin, což naznačuje účast při elongaci embryonální osy. Lokalizace XTH1 indikuje také zapojení proteinu do vývoje vaskulárního pletiva v embryonální ose. Stálá přítomnost proteinu v meristemických pletivech, lokalizace v rychle se dělících a rostoucích pletivech naznačuje funkci ve vývoji a morfogenezi pletiv blízkých meristémům (Hernández-Nistal *et al.*, 2010).

### **3.2.6 LATE ABUNDANT PROTEIN (LEA)**

Tyto proteiny nejsou charakteristické jen pro rostliny. Byly nalezeny také u bakterií jako například *Deinococcus radiodurans* a *Bacillus subtilis*, u pakomárů, žábřonožek a dalších živočichů. Přítomnost LEA proteinů je asociována s tolerancí buněk k dehydrataci, která může být způsobena mrazem, salinitou nebo vysušením. Společným rysem LEA proteinů je jistá kompozice aminokyselin, která vede k vysoké hydrofilitě a tepelné stabilitě v roztoku. To je pro LEA proteiny společné s nedávno vyvinutým konceptem hydrofilinů - mnoho LEA proteinů bylo skutečně klasifikováno jako hydrofiliny (Hundertmark a Hinch, 2008).

Rostlinné geny *LEA* jsou exprimovány ve fázi zrání embrya a na konci vývoje semene během jeho vysychání. Proteiny *LEA* hrají důležitou úlohu při procesu zrání. Studie na ječmeni prokázaly akumulaci *LEA* proteinů v embryu, což korelovalo se získáním tolerance k vysychání. Tato korelace naznačuje, že *LEA* proteiny rostlin jsou základní součástí mechanismu tolerance k vysychání (Bartels *et al.*, 1988). Mnoho *LEA* genů může být

indukováno aplikací kyseliny abscisové a různými druhy vodního stresu jak v reprodukčních, tak ve vegetativních pletivech. Geny *LEA* byly nalezeny u vyšších rostlin, a to u jednoděložných, dvouděložných i nahosemenných. *LEA* geny jsou rozděleny do několika skupin na základě časového schématu exprese a na základě sekvenčních podobností (Wise, 2003).

*LEA* geny skupiny 1 (nazývány také *Em* geny nebo skupina D-19) byly identifikovány u mnoha rostlinných druhů a mají nejvyšší stupeň sekvenční homologie na úrovni nukleotidové i aminokyselinové (Dure *et al.*, 1989). Indukce těchto genů se objevuje se zvýšením hladiny kyseliny abscisové v embryu a exprese pokračuje až do pozdní fáze vývoje embrya. Všechny proteiny *LEA* ze skupiny 1 obsahují vysoce konzervovaný úsek dvaceti aminokyselin, který může být tandemově opakován až čtyřikrát. Na rozdíl od dalších *LEA* genů jsou geny skupiny 1 exprimovány výhradně v embryonálních pletivech a nejsou inducibilní v pletivech dospělé rostliny. *ATEM1* a *ATEM6* jsou geny *Arabidopsis* náležející do této skupiny. Oba jsou během zrání embrya časově i místně odlišně exprimovány. *ATEM1* mRNA je exprimována především v provaskulárních pletivech a nejsilnější exprese se objevuje v kořenové špičce, exprese *ATEM1* začíná asi o dva dny dříve než exprese *ATEM6*. *ATEM6* mRNA je exprimována ve všech oblastech embrya, nejsilněji však ve stonkovém apikálním meristému a v provaskulárním pletivu. Během imbibice je mRNA proteinů rychle odbourávána, zatímco samotné proteiny jsou během prvních hodin klíčení relativně stabilní (Bies *et al.*, 1998). Oba geny kódují podobný protein, který se liší především v počtu opakování konzervovaného motivu dvaceti aminokyselin. Semena homozygotního mutantu *atem6-1* neobsahují žádný detekovatelný protein ATEM6-1. Mutant vykazuje předčasnou dehydrataci semene, což naznačuje funkci při kontrole ztráty vody v semeni. Vnesení WT alely do mutantních rostlin *atem6-1* vedlo k obnovení WT fenotypu (Manfre *et al.*, 2006).

### **3.3 Epigenetická regulace**

Epigenetika je věda zabývající se studiem širokého souboru mechanismů, které dědičně ovlivňují genovou expresi beze změny nukleotidové sekvence DNA. Typickým rysem epigenetiky je kolísavá či neúplná exprese a nepravidelná penetrance projevu genů v potomstvu. Epigenetika se také zabývá nemendelistickou dědičností znaků, které souvisejí s modifikací příslušných genů. Epigenetické modifikace jsou procesy reverzibilní, tedy vratné v řádově vyšších frekvencích, než je tomu u genetických mutací. Zpočátku se zdálo, že je epigenetika omezena jen na náhodné projevy, tzv. epimutace, a její význam je jen okrajový.

Dnes se však ukazuje, že epigenetické řízení genové exprese je v říši eukaryotických organismů univerzální (Vyskot, 2010).

### **3.3.1 Mechanismy epigenetických procesů**

#### **3.3.1.1 Metylace DNA**

Metylace DNA probíhá na pátém atomu uhlíku pyrimidinového kruhu cytozinu a je nejčastější modifikací DNA u eukaryot. Jde o enzymatický proces, kdy je metylová skupina přenášena DNA metyltransferázou z S-adenozylmethioninu na cytozin. Výsledkem reakce je drobná hydrofobní modifikace DNA, 5-metylcytozin (5-mC), která je signálem pro vazbu metyl-DNA vazebných proteinů a pro histon-modifikující enzymatické systémy v nukleozomech. Metylace DNA hraje roli v diferenciaci, inaktivaci chromozomu X, imprintingu, podílí se na udržení struktury chromatinu a slouží k supresi parazitické DNA. Obecně má metylace DNA represivní charakter (Vyskot, 2010). Modifikace cytozinu jsou zobrazeny na obr. 3.

U rostlin se metylace DNA objevuje v oblastech obsahujících CpG dinukleotidy, zde je udržována metyltransferázou1 (MET1). Navíc se metylace může vyskytovat také na místech CpNpG a CpNpN, kde je metylační stav udržován chromometylázou3 (CMT3). U živočichů je metylace omezena na regiony CpG, přestože u embryonálních kmenových buněk metylace převládá mimo oblasti CpG. Ve velké míře jsou metylovány centromerické a pericentromerické oblasti a různé repetitivní elementy. To platí jak pro živočichy, tak pro rostliny. Vysoký stupeň metylace se také objevuje u mnoha regionů obsahujících transkripčně neaktivní geny (He *et al.*, 2011).

Dlouho byl diskutován mechanismus odstranění metylovaných bází z DNA. Pasivní odstranění metylované báze při replikaci DNA za nepřítomnosti faktorů udržujících metylaci byl dlouho považován za jediný způsob selektivní demethylace vedoucí k aktivaci umlčených genů. Avšak později došlo k objevu aktivního mechanismu demethylace. *DEMETER (DME)* byl objeven jako gen exprimovaný v centrální buňce zárodečného vaku, jehož exprese je nezbytná pro aktivaci mateřské alely imprintovaného genu *MEDEA (MEA)* ze skupiny Polycomb. *DME* kóduje protein s DNA glykosyláza-lyázovou aktivitou a aktivuje *MEA* excizí metylovaných cytozinových reziduí. *MEA* podporuje rozvoj endospermu a brzdí vývoj samotného embrya (Vanyushin a Ashapkin, 2011).

### 3.3.1.1.1 Metylace DNA a embryogeneze

Viejo *et al.* (2010) se zabývali epigenetickou regulací v průběhu sexuální embryogeneze u kaštanovníku jedlého. Hladina 5-mC byla kvantifikována v průběhu vývoje vajíčka, fertilizace a během vývoje embrya. Během vývoje vajíčka nebyly pozorovány signifikantní změny v metylaci. V pozdější fázi, po oplození vajíčka, se dané oplozené vajíčko stává dominantním a podléhá demetylaci, dostává se tedy do stavu hypometylace oproti ostatním neoplozeným vajíčkům, která si zachovávají původní hladinu 5-mC. To souvisí s nastartováním programu sexuální embryogeneze. V průběhu další diferenciacce embrya se hladina 5-mC opět zvyšuje. Neoplozená vajíčka jsou následně hypermetylována a degenerují.

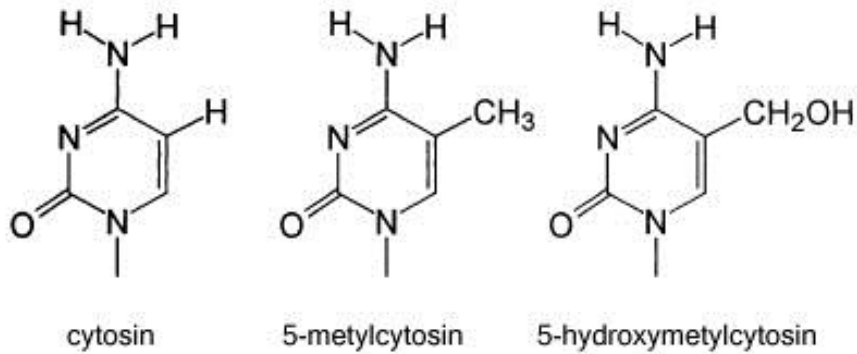
Embrya *Arabidopsis thaliana* s mutacemi, které způsobují ztrátu funkčnosti *MET1* a *CMT3*, se vyvíjejí defektně, vykazují pozměněná schémata buněčného dělení a mají sníženou životnost. U mutantů *met1* jsou defektně exprimovány geny specifikující identitu buněk embrya a také nedochází k vytvoření správného gradientu auxinu. Proto je metylace DNA kritická pro životaschopnost semen a regulaci rostlinné embryogeneze. Autoři studie izolovali čtyři mutantní alely *met1*. Šešule homozygotních *met1-6* rostlin obsahovaly abortovaná semena se 40x vyšší frekvencí než šešule WT. Další defekty byly pozorovány již po prvním zygotickém dělení, kdy byly identifikovány zygoty *met1*, u kterých dělení probíhalo více symetricky než u kontrolních embryí WT. Při vývoji suspensoru i samotného embrya docházelo u mutantů k chybně orientovaným buněčným dělením, což vedlo k defektům ve vývoji apikálně-bazálně osy embrya, děloh i meristémů. U double mutantů *met1cmt3* byl efekt na embryogenezi, životaschopnost a vývoj mnohem větší ve srovnání s jednotlivými mutacemi. Rostlinný genom je tak epigeneticky modifikován prostřednictvím *MET1* a *CMT3*, vykazujících částečnou redundanci (Xiao *et al.*, 2006).

Chakrabarty *et al.* (2003) sledovali obsah metylovaného cytosinu v embryogenním a neembryogenním kalusu. Výsledky ukázaly, že proces somatické embryogeneze může být zodpovědný za změnu schématu metylace DNA. DNA neembryogenního kalusu byla ve srovnání s kalusem embryogenním hypermetylována, což poukazuje na významný mechanismus, který přispívá k regulaci genové exprese během vývoje. Oba typy kalusu byly odvozeny ze stejného genotypu a vznikly za stejných kultivačních podmínek, proto odlišnosti v metylaci zřejmě odrážejí zapojení rozdílných vývojových procesů. Takovéto schéma metylace DNA odpovídá současnému poznání role metylace při vývoji embrya, kdy po fertilizaci se objevuje vlna demetylace a dochází ke konverzi 5-mC na cytozin.

### 3.3.1.2 Hydroxymetylace DNA

5-hydroxymetylcytozin (5-hmC) byl poprvé objeven v myších Purkyňových buňkách a granulárních neuronech a předpokládá se, že by mohl být potenciálním mezičlánkem při demethylaci DNA. 5-hmC vzniká oxidací 5-mC za účasti enzymů z rodiny TET. Doposud byly identifikováni tři členové – TET1, TET2 a TET3. TET1 je vysoce exprimován v embryonálních kmenových buňkách a je esenciální pro obnovování těchto buněk, pro udržování nediferenciovaného stavu. Primární sekvence *TET1* a *TET2* jsou velmi podobné a mutace *TET2* narušující katalytickou aktivitu enzymu byly asociovány s myeloidními malignitami. *TET2* také reguluje produkci 5-hmC a specifikaci buněčných linií v myších embryonálních kmenových buňkách. *TET3* je specificky exprimován v oocytech a zygotě a je pravděpodobně zapojen v procesu redukce 5-mC v paternálním pronukleu (Ito *et al.*, 2010).

5-hmC je široce distribuován v oblastech bohatých na geny a obvykle se nevyskytuje v repetitivních sekvencích. Často byl nalezen v oblastech promotorů bohatých na CpG a ve vazebných místech pro pluripotentní transkripční faktory. TET1 hraje zásadní roli při podpoře transkripčně aktivního stavu udržováním nemetylovaného stavu promotorů a tím umožňuje rekrutaci transkripčních faktorů a základních transkripci zajišťujících komponent. 5-hmC nebyl detekován v embryonálních kmenových buňkách s knockoutovaným genem *DNMT* (*DNA methyltransferase*) na rozdíl od WT s funkčním *DNMT*, což potvrzuje, že 5-hmC je odvozený z již existujícího 5-mC (Wu a Zhang, 2011). Obohacení TET1 a 5-hmC v oblasti genových promotorů naznačuje úlohu při TET-zprostředkované hydroxymetylaci při regulaci transkripce. Úbytek Tet1/2 vede ke snížení exprese skupiny genů zahrnujících také pluripotentní faktory jako *Nanog* a *Tcl1*. Úbytek TET1 v myších embryonálních kmenových buňkách vede ke zvýšení hladiny 5-mC, což je doprovázeno poklesem exprese některých pluripotentních genů. To potvrzuje, že TET1 pravděpodobně ještě v součinnosti s TET2 jsou požadovány pro zachování transkripce skupiny pluripotentních genů udržováním hypometylovaného stavu na jejich promotorech (Wu *et al.*, 2011). U rostlin byl prokázán výskyt 5-hmC teprve nedávno, jeho funkce zatím známa není. Nízké hladiny 5-hmC byly naměřeny v listech a květech *Arabidopsis*, 5-hmC tvořil asi 0,068 až 0,075% z celkového počtu cytosinů v genomu (Yao *et al.*, 2012).



**Obr. 3:** Schémata cytosinu a jeho modifikací 5-metylcytosinu a 5-hydroxymetylcytosinu. Převzato a upraveno dle Tardy-Planechaud *et al.*, (1997).

### 3.3.1.2.1 Hydroxymetylace DNA a embryogeneze

Zhang *et al.* (2012) analyzovali stav metylace a hydroxymetylace DNA v myších oocytech ve stadiu metafáze II a embryích ve stadiu jedné buňky a ve stadiu rýhování. V zygotách byl 5-hmC detekován především v paternálním pronukleu a jeho hladina postupně stoupala, což naznačuje zapojení 5-hmC v demethylaci paternální genomické DNA. Byla též prokázána rozsáhlá redukce 5-mC a 5-hmC LINE1 elementů genomické DNA embrya ve stadiu čtyř až osmi buněk, což indikuje, že se proces demethylace potenciálně objevuje po dosažení čtyřbuněčného stadia. Dále byl do myších zygot vnesen *in vitro* metylovaný plazmid a byl analyzován hydroxymetylační stav plazmidového promotoru. Rychlý nástup exprese do dvanácti hodin byl pozorován u nemetylovaného plazmidu, zatímco exprese u plazmidu metylovaného byla zpožděna. Expresa metylovaného plazmidu byla pozorována až v osmibuněčném stadiu asi po padesáti hodinách. Byla prokázána přítomnost 5-hmC v oblasti promotoru plazmidu, v době, kdy se objevila aktivní demethylace, což podporuje domněnku zapojení 5-hmC v procesu aktivní demethylace.

### 3.3.1.3. Modifikace N-terminálních konců histonů

Eukaryotický genom je tvořen nukleoproteinovým komplexem – chromatinem. Základní jednotka chromatinu je nukleozom, který sestává ze 147 párů bází dlouhé DNA obtáčeující se dvakrát kolem oktameru histonů. Oktamer histonů obsahuje vždy dvojici histonů H2A, H2B, H3 a H4. Každý nukleozom je separován 10 – 16 páry bází dlouhou spojníkovou DNA. Tyto „kuličky na niti“ tvoří chromatinové vlákno o průměru 10 nm. Každý z těchto histonů obsahuje globulární doménu, která zprostředkovává vzájemné interkace mezi histony a nese vysoce dynamický aminoterminální konec tvořený 20 – 35 aminokyselinovými zbytky, bohatý na bazické aminokyseliny. Tento konec vyčnívá ven z nukleozomu. Všechny



histonové proteiny jsou modifikovány v jádře buňky. Jsou cílem mnoha typů posttranslačních modifikací zahrnujících acetylaci a metylaci lyzinu a argininu, fosforylaci serinu a threoninu, ubiquitylaci, sumoylaci a biotinylaci lyzinu a také ADP ribozylaci. Mnohé studie již odhalily, že místně specifické kombinace modifikovaných histonů korelují s různými biologickými funkcemi jako je například transkripce, umlčování, heterochromatinizace, oprava DNA a replikace. Tato pozorování vedla k zavedení koncepce „histonového kódu“ (Munshi *et al.*, 2009).

Acetylace histonů se odehrává prostřednictvím histonacetyltransferázy, zatímco deacetylaci zajišťuje histondeacetyláza. Acetylované histony jsou asociovány výhradně s transkripčně aktivním chromatinem. Methylace histonů v závislosti na metylaci specifických lyzinů může signifikovat jak aktivní, tak represivní stav. Je zajišťována histonmetyltransferázou. Fosforylace je známa pouze na serinu 10 histonu H3 a vede k aktivaci transkripce. Sumoylace na různých lyzinech histonů H2A, H2B a H4 vede vždy k represi, zatímco ubiquitylace je asociována s repesí i aktivací (Vyskot, 2010). Ubiquitylace byla zjištěna jako zásadní pro mitotický a meiotický růst kvasinek (Robzyk *et al.*, 2000). Biotinylace lyzinových reziduí histonů je prováděna biotinidázou a holokarboxylázasyntetázou. Jako biotinylační místa byl identifikován lyzin 4, 9 a 18 histonu H3 a lyzin 8 a 12 histonu H4 (Kobza *et al.*, 2005).

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Použité chemikálie

ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA, Sigma Aldrich, USA), tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS, Sigma Aldrich, USA), hexadecyltrimethylamoniumbromid (CTAB, Sigma Aldrich, USA), chlorid sodný (NaCl, Lachema, Česká republika), kyselina chlorovodíková (HCl), NaOH, destilovaná voda, ethanol 100%, ethanol 96%, 2-merkaptóetanol (Fluka, Švýcarsko), chloroform (Lach-Ner, Česká republika), kyselina octová, izoamylalkohol, glycerol (Lachema, Česká republika), chloralhydrát (Lachema, Česká republika), octan sodný (Lachema, Česká republika), izopropanol, agaróza (Duchefa, Nizozemsko), GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium, USA), RQ1 Rnase-free DNase (Promega, USA) + RQ1 DNase 10x Reaction Buffer + Stop Solution (Promega, USA), primery (Generi Biotech, Česká republika), GeneRuler 100bp DNA ladder (Fermentas, USA), 6x loading dye solution (Fermentas, USA)

**Komerční kity:** LightCycler FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR I (Roche, Německo) MethylFlash Hydroxymethylated DNA Quantification Kit Colorimetric (Epigentek, USA), MethylFlash Methylated DNA Quantification Kit Colorimetric (Epigentek, USA), Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich, USA), Imprint® DNA Modification Kit (Sigma-Aldrich, USA), Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, Švýcarsko), FastStart PCR Master (Roche, Německo), GoTaq DNA Polymerase (Promega, USA)

### 4.2 Přístroje a experimentální vybavení

Analytické váhy (Sartorius, Německo), automatické pipety (Eppendorf, Německo), centrifuga 5414 D (Eppendorf, Německo), centrifuga 5804 R (Eppendorf, Německo), digitální předvážky (KERN, Německo), digitální pH metr MV-87 (Practictronic, Německo), elektromagnetická míchačka (IKA, Německo), flowbox Holten Lamin Air HH 1.2 Plus (Heto-Holten, Dánsko), minicentrifuga MCF 2360 (Vitrum, Česká republika), multifunkční modulární reader Infinite M200 (Tecan, Švýcarsko), nanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologist, USA), termoblok CHB-202 (BIOER technology, Čína), termocykler XP (BIOER technology, Čína), vortex mixer SA8 (Stuart, UK), stereomikroskop SZ51 (Olympus Optical, Japonsko), LightCycler 2.0 (Roche, Německo), aparatura pro elektroforézu (Termo Scientific, USA), mikrovlnná trouba, počítač s UV transiluminátorem

UVT-20M (Herolab) a digitálním fotoaparátem (Kodak Edas 290), světelný mikroskop Olympus CK40 (Olympus Optical, Japonsko), fotoaparát, digestoř, autokláv

### **4.3 Rostlinný materiál**

K experimentům byly použity ve skleníku pěstované rostliny *Arabidopsis thaliana*, L., wild-type (semena poskytnuta Laboratoří růstových regulátorů na Univerzitě Palackého v Olomouci) a *Cucumis sativus* L., cv. Marketer (semena poskytnuta Výzkumným ústavem rostlinné výroby Praha - Ruzyně). Po odebrání plodů *Arabidopsis* a *Cucumis* byla preparována vajíčka s embryi na základě vývojového stádia. Preparace byla provedena pod osvětlenou lupou za pomoci jehly a skalpelu. Vajíčka s embryi byla poté rozdělena do 3 vzorků dle stádia vývoje (vzorek I, II a III), které byly společně se vzorkem listu (L) a květu (K) použity k izolaci DNA a RNA a následujícím analýzám.

### **4.4 Příprava mikroskopických preparátů**

Pro pozorování vajíček s embryi pod světelným mikroskopem byla použita chloralhydrátová metoda. Nejprve proběhla fixace celých šesulí *Arabidopsis* resp. vypreparovaných vajíček *Cucumis* v roztoku etanolu a kyseliny octové v poměru 9:1. Materiál byl v tomto roztoku ponechán 2 hodiny při pokojové teplotě. Poté byl materiál dvakrát promyt 90% etanolem po 30 minutách. K přípravě roztoku chloralhydrátu byly použity 2,5 g chloralhydrátu na 1 ml 30% glycerolu. Materiál byl umístěn na podložní sklíčko nebo Petriho misku, zakápnut roztokem chloralhydrátu a po zprůsvitnění pozorován pod světelným mikroskopem nebo lupou. Byly pořízeny fotografie vajíček s embryi v různých fázích vývoje.

### **4.5 Izolace DNA**

Výchozím materiálem byly vzorky *Cucumis* a *Arabidopsis*. Cca 100 mg rostlinného materiálu bylo zalito tekutým dusíkem a rozetřeno v třecí misce. K rozetřenému materiálu byla přidána směs 1 ml pufru pro extrakci DNA (tab. 1) s 4 µl 2-merkptoethanolu předem zahřátá na 65 °C. Proběhla inkubace materiálu společně s přidanou směsí pufru a 2-merkptoethanolu po dobu 60 minut při teplotě 65°C. Poté bylo k materiálu přidáno 600 µl roztoku chloroformu s isoamylalkoholem v poměru 24:1. Směs byla protřepána, ponechala se ustát a poté centrifugována při 13 000 rpm a 4 °C po dobu 15 minut. Do čisté mikroskopavky byla odebrána horní vodní fáze, ke které bylo přidáno 60 µl octanu sodného o koncentraci 3 mol/l. Směs byla protřepávána 1 minutu. Poté bylo připipetováno 500 µl chlazeného isopropanolu. Směs byla po dobu 30 minut uložena v -20 °C v mrazáku a poté 30 minut

centrifugována při 13 000 rpm a 4 °C. Supernatant byl odstraněn a do mikrokumavky bylo přidáno 200 µl 70% chlazeného ethanolu. Směs byla centrifugována 15 minut při 13 000 rpm při 4 °C. Ethanol byl odstraněn a vzorek se nechal mírně vyschnout volně na vzduchu. K peletu DNA bylo přidáno 50 nebo 100 µl sterilní vody. Po změření koncentrace byla DNA v mikrokumavce uchována v -20 °C.

**Tab. 1:** Složení extračního pufru pro izolaci DNA

<b>Položka</b>	<b>Množství na 1l</b>
CTAB	20 g
NaCl (5M)	280 ml
EDTA (0,5M) pH 8.0	40 ml
TRIS (1M) pH 8.0	100 ml
doplnit ddH <sub>2</sub> O do objemu 1l.	
sterilizováno filtrací (velikost pórů filtru 0,22 µm)	

#### **Příprava 1 M Tris (pH 8.0)**

121,1 g Tris báze bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody. pH bylo upraveno na 8.0 přidáním koncentrované HCl. Poté byl objem doplněn na 1l destilovanou vodou. Sterilizace proběhla autoklávováním.

#### **Příprava 0,5 M EDTA (pH 8.0)**

186,1 g EDTA bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody. pH bylo upraveno na 8.0 přidáním NaOH. Poté byl objem doplněn na 1l destilovanou vodou. Sterilizace proběhla autoklávováním.

### **4.6 Izolace RNA**

K izolaci RNA byl použit Spectrum™ Plant Total RNA Kit. Postup byl proveden dle návodu přiloženého výrobcem. Výchozím materiálem byly vzorky *Cucumis* a *Arabidopsis*. Cca 100 mg materiálu bylo zalito tekutým dusíkem a rozetřeno ve třecí misce. Ke vzniklému prášku bylo napipetováno 500 µl lyzačního roztoku, do kterého byl předem přidán 2-merkptoethanol (10 µl na 1 ml lyzačního roztoku). Vzorek s přidáním roztokem byl vortexován 30 sekund a poté inkubován při 56°C po dobu 3-5 minut. Dále byl vzorek centrifugován 3 minuty při 13 000 rpm. Supernatant byl přepipetován do filtrační kolonky umístěné v 2ml mikrokumavce. Znovu proběhla centrifugace 1 minutu při 13 000 rpm. K přečištěnému lyzátu bylo připipetováno 500 µl RNA-vázacího roztoku a vzorek byl lehce

zvortexován. Do kolonky umístěné do nové 2ml mikrozkušavky bylo napipetováno 700  $\mu$ l této směsi a proběhla centrifugace 1 minutu při 13 000 rpm. Kapalina, která protekla, byla zlikvidována a krok byl zopakován ještě jednou se zbytkem směsi. Následně bylo na kolonku napipetováno 500  $\mu$ l promývacího roztoku 1 a proběhla centrifugace 1 minutu při 13 000 rpm. Tekutina, která protekla, byla zlikvidována. Na kolonku bylo napipetováno 500  $\mu$ l promývacího roztoku 2, proběhla centrifugace 30 sekund při 13 000 rpm, proteklá kapalina byla zlikvidována. Tento krok s promývacím roztokem 2 byl ještě jednou zopakován. Následovala centrifugace 1 minutu při 13 000 rpm pro vysušení kolonky. Kolonka byla přenesena do nové 2ml mikrozkušavky a bylo přidáno 50  $\mu$ l elučňího roztoku. Kolonka byla ponechána 1 minutu stát a poté byla centrifugována 1 minutu při 13 000 rpm. Koncentrace přečištěné RNA byla změřena spektrofotometrem a RNA byla uložena do  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.7 Ošetření RNA DNázou**

Vyizolovaná RNA byla pro odstranění DNA ošetřena kitem Rnase-free DNase (Promega). K 1-8  $\mu$ l RNA rozpuštěné v elučňím roztoku bylo napipetováno 0,2  $\mu$ l RQ1 RNase-free DNázy (1U/1  $\mu$ g RNA) a 1  $\mu$ l RQ1 Rnase-free DNase reakčního pufru (10x). Objem byl doplněn nuclease-free vodou do 10  $\mu$ l. Vzorek byl inkubován po dobu 5 minut při  $37^{\circ}\text{C}$ . Dále byl přidán 1  $\mu$ l RQ1 DNase Stop roztoku k ukončení reakce a vzorek byl inkubován 10 minut při  $65^{\circ}\text{C}$ . Kvalita DNA byla poté ověřena elektroforézou.

#### **4.8 Reverzní transkripce**

K přepisu genetické informace z mRNA do cDNA byl použit Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit. Postup byl proveden dle návodu přiloženého výrobcem. Výchozím materiálem byla RNA izolovaná z *Cucumis* a *Arabidopsis* ošetřená DNázou. Vkládané množství RNA bylo 1000 ng. Reakce probíhala s využitím anchored-oligo(dT)<sub>18</sub> primerů. Před přidáním reverzní transkriptázy byla směs templátu a primerů inkubována 10 minut při  $65^{\circ}\text{C}$  za účelem denaturace. Celkový objem reakce činil 20  $\mu$ l, inkubace kompletní reakční směsi byla provedena při  $55^{\circ}\text{C}$  po dobu 30 minut, pro inaktivaci reverzní transkriptázy proběhla inkubace 5 minut při  $85^{\circ}\text{C}$ . Poté byla reakční směs přenesena na led, byla stanovena koncentrace cDNA spektrofotometrem a vzorky byly uloženy do  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.9 Modifikace DNA (bisulfidická konverze)**

Analýza metylace genů byla provedena bisulfidickou konverzí cytozinu na uracil hydrogensířičitanem sodným. To vedlo v následné PCR reakci k tranzici cytosinu za thymin.

Metylované cytosiny jsou před touto konverzí chráněny, proto při reakci PCR vznikly produkty pouze pokud byla tato DNA v místě nasednutí primerů metylována. Pro bisulfidickou konverzi byl použit Imprint DNA Modification Kit. Výchozím materiálem byla genomická DNA *Arabidopsis* a *Cucumis*. Postup byl proveden dle návodu přiloženého výrobcem. 1,1 ml DNA Modification Solution bylo přidáno do lahvičky s modifikačním práškem. Roztok byl vortexován tak dlouho, dokud nebyl čirý. Dále bylo přidáno 40 µl Balance Solution a lehce zvortexováno. Do 1,5 ml mikroskopické mikrozkušavky bylo přidáno 10 µl DNA o koncentraci 10 ng/ µl, tedy 100 ng do jedné reakce. Dále bylo do mikroskopické mikrozkušavky přidáno 110 µl směsi Modification a Balance Solution. Po lehkém zvortexování proběhla inkubace při 99°C po dobu 6 minut. Po uplynutí 6 minut byla mikroskopická mikrozkušavka okamžitě přenesena a inkubována 90 minut při 65°C. V tomto kroku proběhla bisulfidická konverze nemetylovaných cytosinů na uracily. Následovalo přečištění DNA. Filtrační kolonka byla umístěna do 2ml mikroskopické mikrozkušavky. Na kolonku bylo nanášeno 300 µl Capture Solution a bylo ponecháno 1 minutu stát. Poté byla přidána modifikovaná DNA a proběhla centrifugace 20 sekund při 12 000 x g. Tekutina, která protékla, byla zlikvidována. Na kolonku bylo přidáno 200 µl ethanolem ředěného Cleaning Solution a proběhla centrifugace 20 sekund při 12 000 x g. Bylo přidáno 50 µl Balance/Ethanol Wash Solution přímo doprostřed kolonky. Proběhla inkubace při pokojové teplotě po dobu 8 minut. Proběhla centrifugace 20 sekund při 12 000 x g. Tekutina, která protékla, byla zlikvidována. Bylo přidáno 200 µl 90% ethanolu a centrifugováno 40 sekund při 12 000 x g. 2ml mikroskopická mikrozkušavka byla zlikvidována i s obsahem a kolonka byla přenesena do čisté 1,5ml mikroskopické mikrozkušavky. Bylo přidáno 20 µl Elution Solution přímo doprostřed kolonky, bylo ponecháno 1 minutu stát a poté centrifugováno 20 sekund při 12 000 x g. Kolonka byla vyjmuta a zlikvidována. Koncentrace vyeluované DNA byla změřena spektrofotometrem a DNA byla uložena do -20°C.

#### **4.10 Použité primery a jejich navržení**

Primery jsou uvedeny v tab. 2. K jejich navržení byl použit program Primer3, sekvence byly zjištěny z databáze GenBank. Jako referenční gen pro *Cucumis* byl použit gen *GAPDH* kódující enzym glycerinaldehyd 3-fosfátdehydrogenasu. Pro *Arabidopsis* byl použit gen *YLS8* kódující sestřihový faktor pro mRNA. Primery byly syntetizovány a dodány firmou Generi-Biotech.

**Tab. 2:** Primery amplifikující oblasti sledovaných genů

<b>Sledovaný gen</b>	<b>Primer</b>	<b>Sekvence</b>	<b>Velikost produktu (bp)</b>
<b>GenBank acc. no.</b>			
<i>GAPDH</i>	F	5'-ACATCATTCCTAGCAGCACT-3'	221
HE650148	R	5'-TTCAGTGTACCCCAAATTC-3'	
<i>XTH1</i>	F	5'-CAACAAGAGGAGGGCTGG-3'	681
AJ555154	R	5'-AGAGATTCTTTCATGCACTAT-3'	
<i>XTH2</i>	F	5'-AGCCCCATTTGTAGCTTCCT-3'	279
AJ555543	R	5'-GAGACATTCAGGCGGTAAGC-3'	
<i>XTH3</i>	F	5'-GGCAACAAGAGGTGGATTAA-3'	476
AJ555126	R	5'-CAAACCTCAACGTAAATTATTCAA-3'	
<i>YLS8</i>	F	5'-CACTGAATCATGTTCTGAAGCAAGT-3'	136
NM_120912	R	5'-TTACTGTTTCGGTTGTTCTCCATTT-3'	
<i>SINI</i>	F	5'- TCTAGGCTCATCCTCCATTA -3'	231
AF292940	R	5'- CTGCAAACAACAACCTCAAAA-3'	
<i>KANI</i>	F	5'- TTAAAGGTGTTTCCTTTGCAT-3'	180
AY048688	R	5'-GAGACATTTTCAGGCGGTAAGC-3'	
<i>PCNA1</i>	F	5'-AGTGCTGGAGCAGTCGAAAT-3'	159
NM_100611	R	5'-TTTCCAAAATAGCCGCAAAC-3'	
<i>LEA 4-5</i>	F	5'-AGGCGGAGAAGATGAAGACA-3'	218
NM_120759	R	5'-CATCTGATGTGTCCCAGTGC-3'	
<i>BE1</i>	F	5'-CAGACTCGGAATTGCTGACA-3'	650
NM_001203011	R	5'-TTTTCTGTAGGCGACCATCC-3'	

## 4.11 PCR

Jako templátová DNA byla použita genomická DNA, cDNA a DNA modifikovaná bisulfidickou konverzí. PCR reakce byly provedeny s kity FastStart PCR Master a GoTaq DNA Polymerase podle návodu uvedeného výrobcem, ale v polovičním reakčním objemu. PCR reakce probíhaly dle programu uvedeného v tab. 3.

Tab. 3: PCR program

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95°C	2 min	1
Denaturace	95°C	30 s	30
Nasednutí primerů	55°C	30 s	
Elongace	72°C	60 s	
Finální extenze	72°C	5 min	1
Konec	4°C	-	1

## 4.12 Gelová elektroforéza

Produkty získané PCR reakcí byly vyhodnoceny gelovou elektroforézou na 1,5 % agarózovém gelu v 0,5x TBE pufru. Elektroforéza probíhala při napětí 100 V po dobu 30 minut. Jako marker molekulové hmotnosti byl použit GeneRuler 100 bp DNA Ladder s rozsahem 100 – 1000 bp.

### Příprava 5x TBE

27,5 g HBO<sub>2</sub>, 54 g Tris-HCl a 20 ml 0,5M EDTA (pH 8) bylo rozpuštěno v ddH<sub>2</sub>O a doplněno do objemu 1l a sterilizováno filtrací.

## 4.13 Real-time PCR (qPCR)

Real-time PCR byla provedena s pomocí kitu LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I dle návodu uvedeného výrobcem. Celkový objem reakce činil 20 µl, vkládané množství cDNA do reakce bylo 250 ng. Jako negativní kontrola sloužila PCR - grade voda. Reakce probíhala dle programu uvedeného v tab. 4.



**Tab. 4:** Program real-time PCR

Krok	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	10 min	1
Denaturace	95	10 s	40
Annealing	48	30 s	
Elongace	72	20 s	
Finální extenze	72	7 min	1
Analýza teploty tání	65→95 (0,1°C/s)	1 min	1
Chlazení	40	30 s	1

Získaná data byla zpracována softwarem LightCycler 4.1. K ověření vzorků a detekci nespecifických produktů byla použita analýza křivek tání PCR produktů. Po proběhnutí real-time PCR software provedl kvantitativní analýzu vzorků a automaticky určil  $C_t$  hodnoty pro jednotlivé vzorky. Dále byly hodnoty  $C_t$  zpracovány pomocí metody  $\Delta\Delta C_T$ . K relativní kvantifikaci sloužil jako standard exprese *YLS8* u *Arabidopsis* a *GAPDH* u *Cucumis*, jako kontrola byly použity hladiny exprese jednotlivých genů v listu *Arabidopsis* a *Cucumis*.

Výpočet relativní exprese metodou  $\Delta\Delta C_T$ :

$$\text{Relativní exprese} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ vzorek} - \Delta C_T \text{ kontrola}$$

$$\Delta C_T = C_T \text{ studovaný gen} - C_T \text{ referenční gen}$$

#### **4.14 Kvantifikace hydroxymethylované DNA specifickým stanovením 5-hydroxymethylcytosinu**

Ke kvantifikaci byl použit MethylFlash Hydroxymethylated DNA Quantification Kit (Colorimetric). Postup byl proveden dle návodu přiloženého výrobcem. Výchozím materiálem byla genomická DNA vyizolovaná z *Arabidopsis* a *Cucumis*. Nejdříve byl připraven Wash buffer (HC1 1x) naředěním 1:10 destilovanou vodou. Poté byla připravena pozitivní kontrola naředěním HC5 (10 ng/μl) destilovanou vodou na koncentraci 3 ng/μl. Jako negativní kontrola byla použita destilovaná voda. Po označení jednotlivých stripů bylo nanášeno do každé jamky 80 μl HC2 (vazebný roztok). Bylo nanášeno 1-8 μl vzorku (tak, aby vložené množství DNA bylo 200 ng), 1 μl pozitivní a negativní kontroly, po jemném promíchání byly jamky překryty parafilmem a inkubovány 90 minut při 37°C. Byl odstraněn HC2 a každá jamka vymyta 150 μl ředěného HC1 (1x). Vymytí se opakovalo 3x. HC6 (vazebná protilátka

o koncentraci 1000 ng/ µl) byla naředěna 1:1000 ředěným HC1 (1x). Do každé jamky bylo přidáno 50 µl zředěné HC6, jamky byly překryty parafilmem a inkubovány 60 minut při pokojové teplotě. HC6 byla z jamek odstraněna. 3x proběhlo promytí 150 µl HC1 (1x). HC7 (detekční protilátka o koncentraci 400 ng/µl ) byla naředěna 1:1000 ředěným HC1 (1x). Do každé jamky bylo přidáno 50 µl zředěné HC7, jamky po překrytí parafilmem byly inkubovány 30 minut při pokojové teplotě. HC7 byla odstraněna, proběhlo 4x vymytí 150 µl HC1 (1x). HC8 (zesilující roztok) byl naředěn 1:5000 ředěným HC1 (1x). Do každé jamky bylo přidáno 50 µl ředěného HC8, po překrytí parafilmem byly jamky inkubovány 30 minut při pokojové teplotě. HC8 byl odstraněn, proběhlo 5x vymytí jamek 150 µl HC1 (1x). Do každé jamky bylo přidáno 100 µl HC9 (roztok vyvíjející zbarvení), proběhla inkubace ve tmě při pokojové teplotě po dobu 1-10 minut. Po změně zbarvení (zmodrání) pozitivní kontroly bylo přidáno 50 µl HC10 (stop roztok) do každé jamky k ukončení reakce. Barva se tímto změnila na žlutou, obsah jamek byl přenesen na mikrotitrační destičku a od 2 do 15 minut uplynulých od přidání HC10 byla měřena absorbance při vlnové délce 450 nm.

Výpočet % zastoupení 5-hmC:

$$\% \text{ 5-hmC} = \frac{(\text{OD vzorku} - \text{OD neg. kontroly}) / S}{(\text{OD poz. kontroly} - \text{OD neg. kontroly}) \times 5 / P} \times 100$$

S....množství vkládané DNA v ng

P....množství vkládané pozitivní kontroly (HC5) v ng

OD....hodnota absorbance měřená při 450 nm

5....faktor, který normalizuje hodnotu 5-hmC v pozitivní kontrole na 100%, pozitivní kontrola obsahuje pouze 20% 5-hmC

#### **4.15 Kvantifikace methylované DNA specifickým stanovením**

##### **5 -methylcytosinu**

Ke kvantifikaci byl použit MethylFlash Methylated DNA Quantification Kit (Colorimetric). Postup byl proveden dle návodu přiloženého výrobcem. Výchozím materiálem byla genomická DNA vyizolovaná z *Arabidopsis* a *Cucumis*. Nejdříve byl připraven Wash buffer 1x naředěním (ME1 1x) 1:10 destilovanou vodou. Poté byla připravena pozitivní kontrola naředěním ME4 (10 ng/µl) destilovanou vodou na koncentraci 2 ng/µl. Jako

negativní kontrola byla použita destilovaná voda. Po označení jednotlivých stripů bylo nanášeno do každé jamky 80 µl ME2 (vazebný roztok). Bylo nanášeno 1-8 µl vzorku (tak, aby vložené množství DNA bylo 100 ng), 1 µl pozitivní a negativní kontroly, po jemném promíchání byly jamky překryty parafilmem a inkubovány 90 minut při 37°C. Byl odstraněn ME2 a každá jamka vmyta 150 µl ředěného ME1 (1x). Vymytí se opakovalo 3x. ME5 (vazebná protilátka o koncentraci 1000 ng/ µl) byla naředěna 1:1000 ředěným ME1 (1x). Do každé jamky bylo přidáno 50 µl zředěné ME5, jamky byly překryty parafilmem a inkubovány 60 minut při pokojové teplotě. ME5 byla z jamek odstraněna. 3x proběhlo promytí 150 µl ME1 (1x). ME6 (detekční protilátka o koncentraci 400 ng/µl ) byla naředěna 1:2000 ředěným ME1 (1x). Do každé jamky bylo přidáno 50 µl zředěné ME6, jamky po překrytí parafilmem byly inkubovány 30 minut při pokojové teplotě. ME6 byla odstraněna, proběhlo 4x vymytí 150 µl ME1 (1x). ME7 (zesilující roztok) byl naředěn 1:5000 ředěným ME1 (1x). Do každé jamky bylo přidáno 50 µl ředěného ME7, po překrytí parafilmem byly jamky inkubovány 30 minut při pokojové teplotě. ME7 byl odstraněn, proběhlo 5x vymytí jamek 150 µl ME1 (1x). Do každé jamky bylo přidáno 100 µl ME8 (roztok vyvíjející zbarvení), proběhla inkubace ve tmě při pokojové teplotě po dobu 1-10 minut. Po změně zbarvení (zmodráání) pozitivní kontroly bylo přidáno 50 µl ME9 (stop roztok) do každé jamky k ukončení reakce. Barva se tímto změnila na žlutou, obsah jamek byl přenesen na mikrotitrační destičku a od 2 do 15 minut uplynulých od přidání ME9 byla měřena absorbance při vlnové délce 450 nm.

Výpočet % zastoupení 5-mC:

$$\% \text{ 5-mC} = \frac{(\text{OD vzorku} - \text{OD neg. kontroly}) / S}{(\text{OD poz. kontroly} - \text{OD neg. kontroly}) \times 2 / P} \times 100$$

S...množství vkládané DNA v ng

P...množství vkládané pozitivní kontroly (ME4) v ng

OD...hodnota absorbance měřená při 450 nm

2...faktor, který normalizuje hodnotu 5-mC v pozitivní kontrole na 100%, pozitivní kontrola obsahuje pouze 50% 5-mC

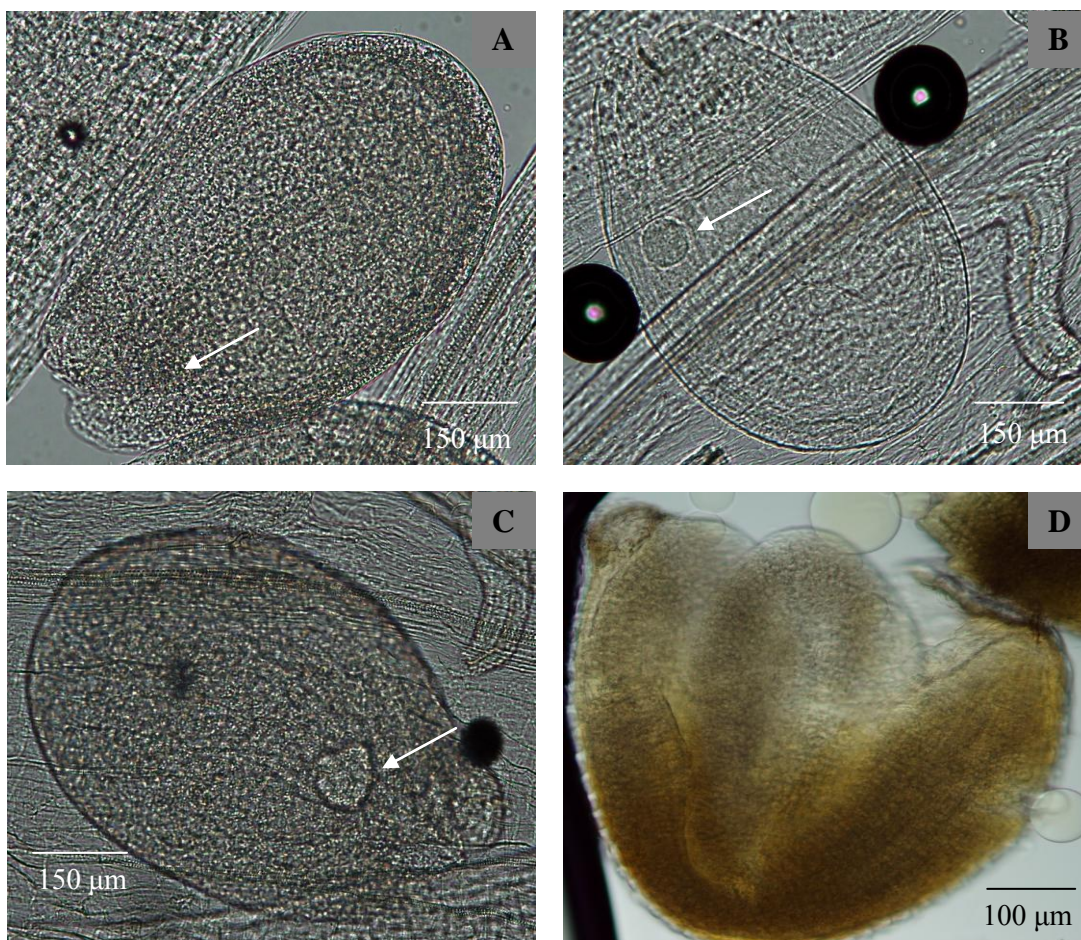
# 5 Výsledky

## 5.1 Pozorování mikroskopických preparátů

Preparáty byly vytvořeny za pomoci prosvětlení pletiv chloralhydrátem (kapitola 4.4). Cílem bylo pozorovat jednotlivá stádia embryogeneze pod světelným mikroskopem, případně lupou, a zároveň určit, v jakých fázích vývoje se nacházelo vajíčko s embryem odebírané pro další analýzy.

### 5.1.1 Preparáty *Arabidopsis*

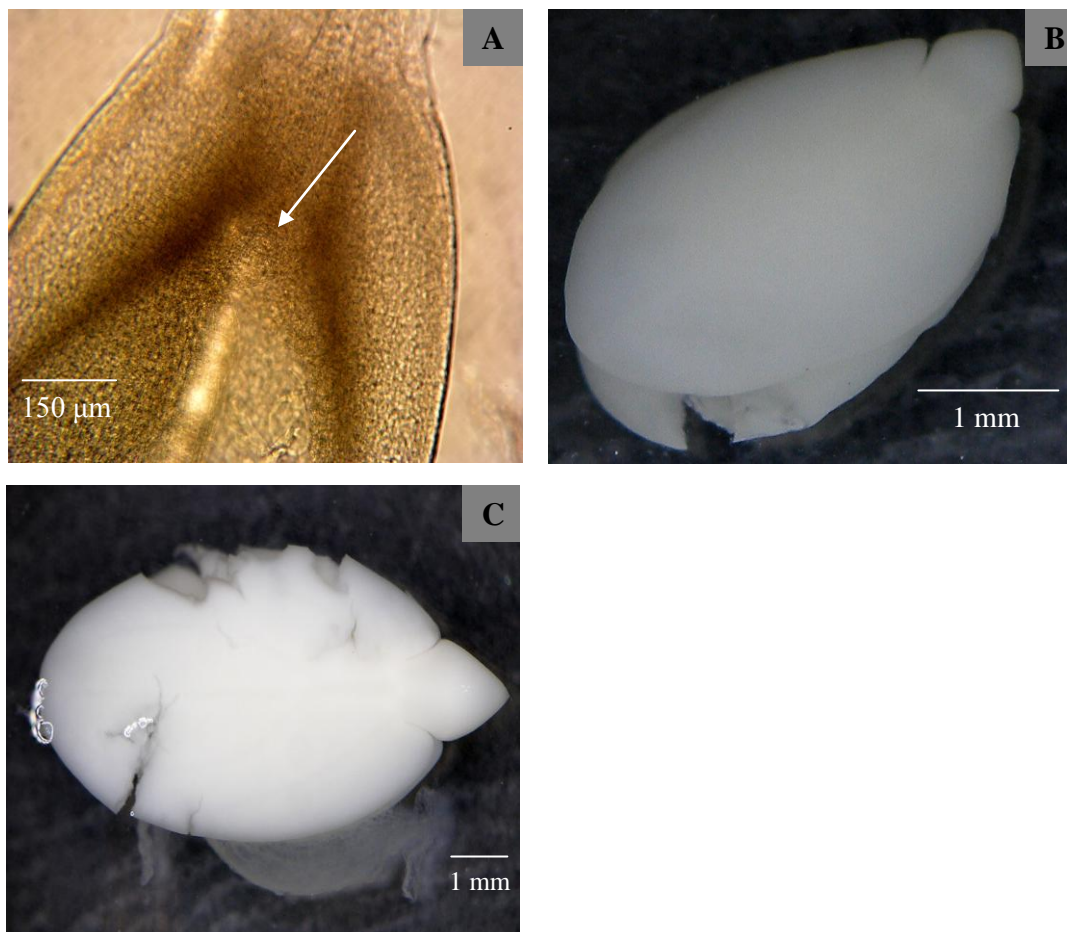
Stádium I odpovídalo vajíčko s proembryem, stádium II bylo charakterizováno embryem ve fázi globulární a srdčité, stádium III odpovídalo již zralé embryo. Fotografie pozorovaných stádií vývoje jsou na obr. 4.



**Obr. 4:** Pozorování průběhu embryogeneze *Arabidopsis*. Na fotografii A je vajíčko po opylení s proembryem. Na fotografii B již lze rozlišit embryo v globulárním stádiu. Fotografie C ukazuje vajíčko s embryem ve stádiu srdce a na fotografii D je vidět zralé embryo s vytvořenými dělohami a kořínkem. Proembryo a embryo ve stádiu globule a srdce jsou označeny šipkami.

### 5.1.2 Preparáty *Cucumis*

Stadiu I odpovídalo vajíčko s embryem v globulární fázi, stádium II bylo charakterizováno jako nezralé embryo v pozdní fázi vývoje a stadiu III odpovídalo zralé embryo. Fotografie pozorovaných stádií vývoje jsou na obr. 5.



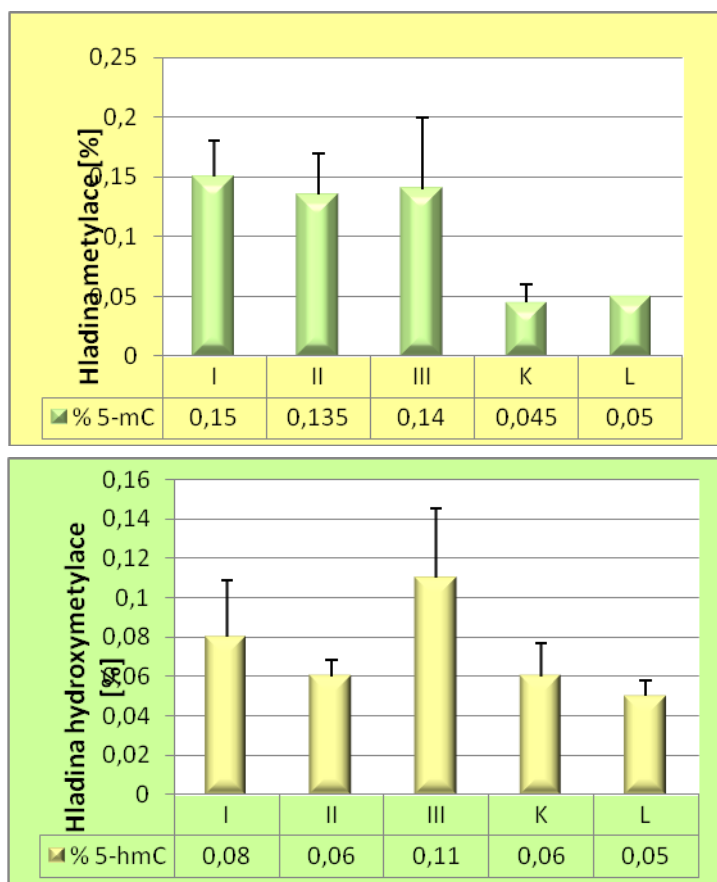
**Obr. 5:** Pozorování průběhu embryogeneze *Cucumis*. Na fotografii A je vajíčko s embryem v globulární fázi. Na fotografii B je nezralé embryo v pozdní fázi vývoje. Fotografie C ukazuje zralé embryo. Globulární embryo na fotografii A je označeno šipkou.

## 5.2 Globální hladiny metylace a hydroxymethylace DNA

Kvantifikace metylace a hydroxymethylace byla provedena specifickým stanovením 5-mC a 5-hmC pomocí protilátek (kapitola 4.14 a 4.15).

### 5.2.1 Analýza *Arabidopsis*

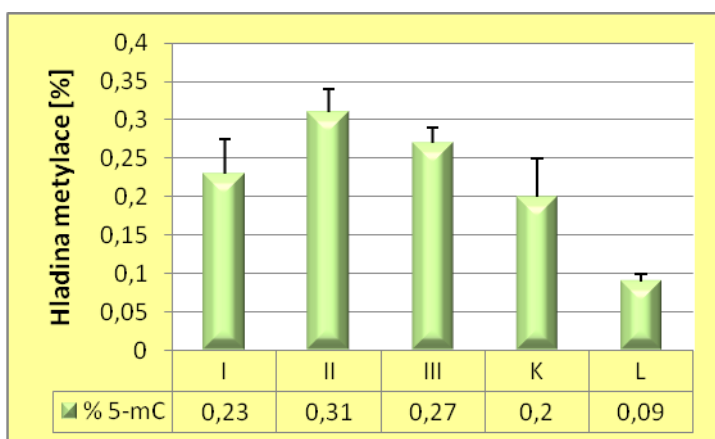
Hodnoty metylace se pohybovaly v řádu desetin procenta, zatímco hodnoty hydroxymethylace dosahovaly pouze setin procenta. Během stádia I se hladina 5-mC pohybovala na 0,15 %, ve fázi II klesla na 0,135% a ve fázi III vzrostla na 0,14%. V listu byla hladina 5-mC 0,05%. Během embryogeneze *Arabidopsis* byla tedy hladina 5-mC asi 3x vyšší než v listu. Množství 5-mC v květu bylo taktéž na nízké úrovni podobně jako v listu, hladina 5-mC dosahovala 0,045%. Úroveň hydroxymethylace ve fázi I dosahovala 0,08%, ve fázi II poklesla na 0,06% a ve fázi III opět stoupla na 0,11%. Hladina 5-hmC v listu dosahovala 0,05% a v květu 0,06%. Nejvyšší hladina 5-hmC byla naměřena ve fázi III, kdy hodnota 5-hmC byla 2,2x vyšší než v listu. Grafy znázorňující hladiny metylace a hydroxymethylace v jednotlivých stádiích embryogeneze, v listu a v květu *Arabidopsis* jsou zobrazeny na obr. 6.



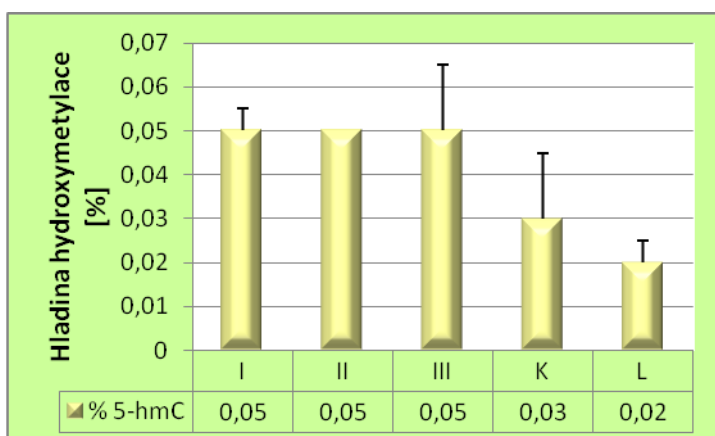
**Obr. 6:** Hladiny metylace a hydroxymethylace u *Arabidopsis*. Grafy znázorňují průběh metylace a hydroxymethylace během jednotlivých stádií embryogeneze (I, II a III), v květu (K) a listu (L). Zobrazená data jsou průměrem ze třech měření.

### 5.2.2 Analýza *Cucumis*

Hodnoty metylace se pohybovaly v řádu desetin procenta, zatímco hodnoty hydroxymethylace dosahovaly pouze setin procenta. Během stádia I se hladina 5-mC pohybovala na 0,23 %, ve fázi II stoupla na 0,31% a ve fázi III klesla na 0,27%. V listu byla hladina 5-mC 0,09%. Během embryogeneze *Cucumis* byla tedy hladina 5-mC asi 3,4x vyšší než v listu. Množství 5-mC v květu dosahovalo 0,2%. Hodnota hydroxymethylace byla ve všech třech stádiích embryogeneze na stejné úrovni 0,05%. Hladina 5-hmC v listu dosahovala 0,02% a v květu 0,03%. Hladina 5-hmC byla 2,5x vyšší než v listu. Grafy znázorňující hladiny metylace a hydroxymethylace v jednotlivých stádiích embryogeneze, v listu a v květu *Cucumis* jsou zobrazeny na obr. 7.



**Obr. 7:** Hladiny metylace a hydroxymethylace u *Cucumis*. Grafy znázorňují průběh metylace a hydroxymethylace během jednotlivých stádií embryogeneze (I, II a III), v květu (K) a listu (L). Zobrazená data jsou průměrem ze třech měření.



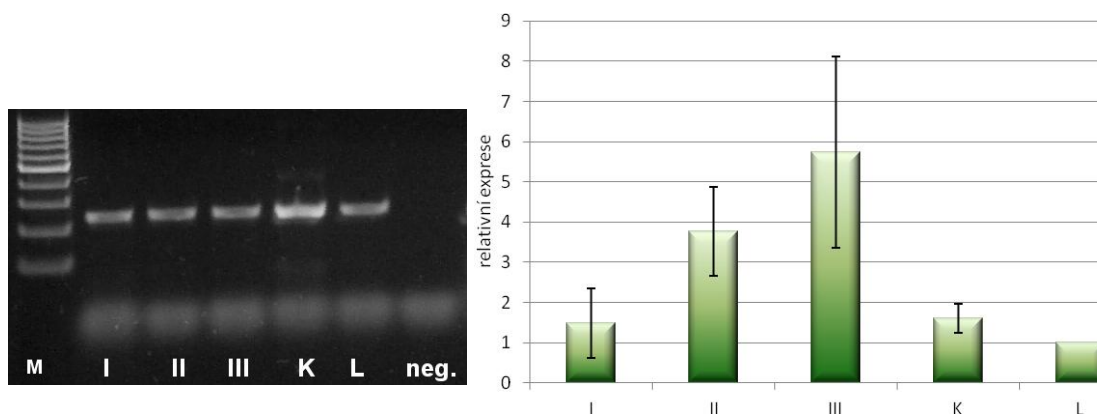
## 5.3 Analýza genové exprese

Relativní exprese všech genů byla stanovena metodou real-time PCR (kapitola 4.13). Metylace genů byla analyzována PCR reakcí po bisulfidické konverzi genomické DNA (kapitola 4.9).

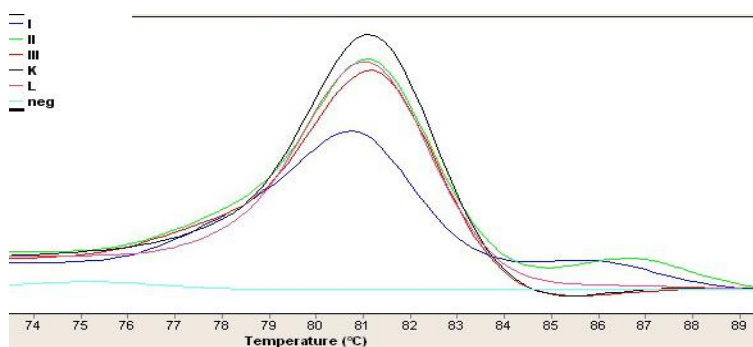
### 5.3.1 Analýza exprese *Arabidopsis*

#### 5.3.1.1 Eprese genu *SIN1*

Expres *SIN1* měla v jednotlivých stádiích vývoje embrya vzestupnou tendenci. Ve fázi I byla 1,5x vyšší, ve fázi II 3,8x a ve fázi III až 5,7x vyšší než exprese v listu. V květu dosahuje exprese *SIN1* 1,6 násobku exprese v listu, což je hladina srovnatelná s fází I (obr. 8). Křivka tání potvrzující specifitu produktů je zobrazena na obr. 9. Nepřítomnost produktů délky 231 bp u modifikované DNA značí demetylovaný stav v místě nasedání primerů (obr. 10).

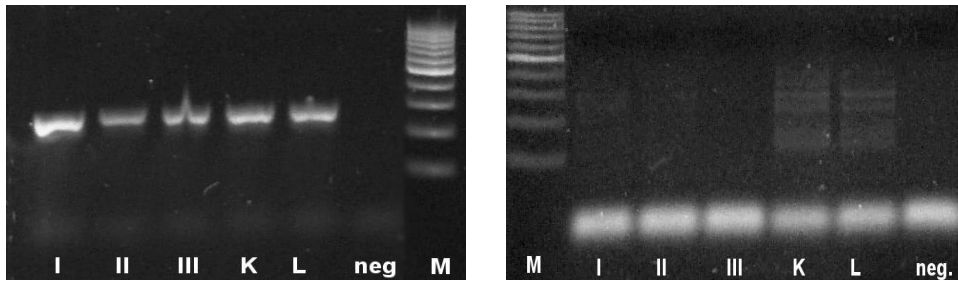


**Obr. 8: Expres *SIN1*.** V levé části obrázku jsou elektroforetické separace produktů PCR reakcí s cDNA. Velikost produktu u cDNA je 231 bp. Negativní kontrolou (neg.) je reakce s PCR-grade vodou namísto templátové DNA. Byl použit marker molekulové hmotnosti (M) odstupňovaný po 100 bp s nejjasnějším proužkem o délce 500 bp. V pravé části je na grafu zobrazeno porovnání relativní exprese v jednotlivých stádiích embryogeneze (I, II, III) a v květu (K) s expresí v listu (L), hodnota exprese v listu je vždy rovna 1.



**Obr. 9: Analýza křivek teploty tání u qPCR produktů genu *SIN1*** s průměrnou teplotou tání 81,2 °C. Odchyly teplot tání produktů se pohybovaly v řádu setin stupňů Celsia.

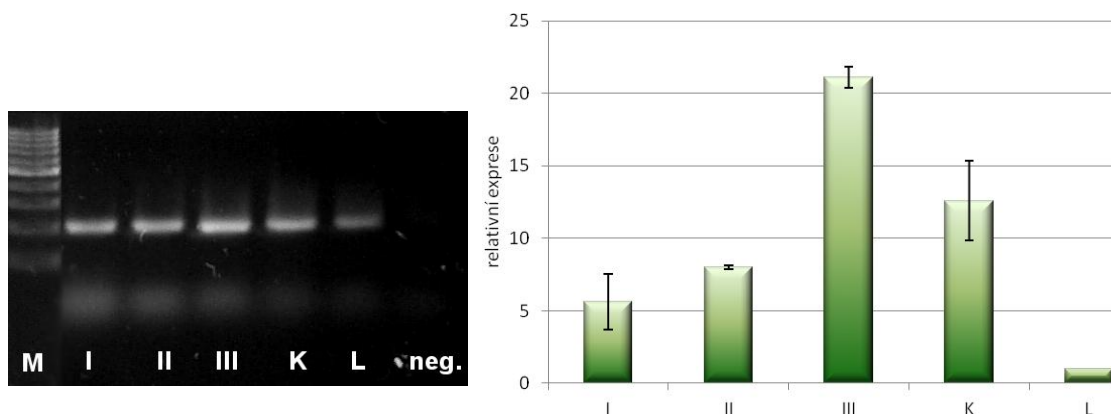




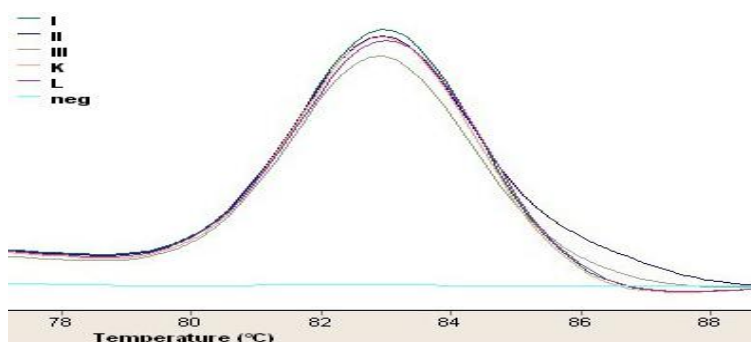
**Obr. 10:** Separace PCR produktů *SIN1* s genomickou DNA (vlevo) a modifikovanou DNA (vpravo). Vzorky I, II, III, K a L představují 3 vývojová stádia embryogeneze, květ a list. Negativní kontrolou (neg.) je reakce s PCR-grade vodou namísto templátové DNA. Byl použit marker molekulové hmotnosti (M) odstupňovaný po 100 bp s nejjasnějším proužkem o délce 500 bp. Nepřítomnost produktů v oblasti o délce 231 bp u modifikované DNA značí demetylaci v místech nasedání primerů.

### 5.3.1.2 Eprese genu *KAN1*

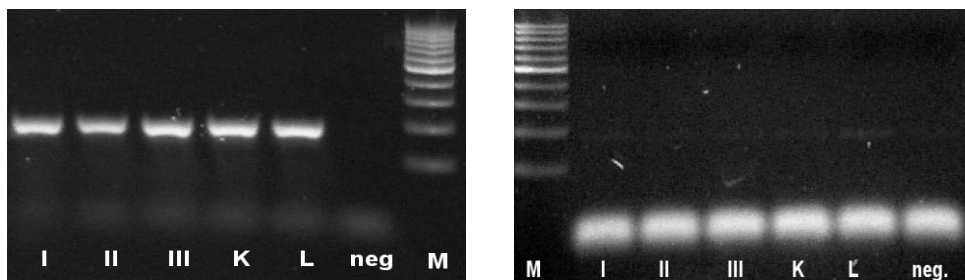
Expresse genu *KAN1* vykazuje vzestupnou tendenci během stádia I, II a III. Ve stádiu III dosahuje hodnot až 21x vyšších než exprese v listu. Hladina exprese v květu se pohybovala taktéž na vysokých úrovních asi 12x vyšších než exprese v listu (obr. 11). Křivka tání je zobrazena na obr. 12. Nepřítomnost produktu o délce 180 bp poukazuje na demetylovaný stav v oblasti nasedání promoterů u všech vzorků (obr. 13).



**Obr. 11: Expresse *KAN1*.** V levé části obrázku jsou elektroforetické separace produktů PCR reakcí s cDNA. Velikost produktu u cDNA je 180 bp. Negativní kontrolou (neg.) je reakce s PCR-grade vodou namísto templátové DNA. Byl použit marker molekulové hmotnosti (M) odstupňovaný po 100 bp s nejjasnějším proužkem o délce 500 bp. V pravé části je na grafu zobrazeno porovnání relativní exprese v jednotlivých stádiích embryogeneze (I, II, III) a v květu (K) s expresí v listu (L), hodnota exprese v listu je vždy rovna 1.



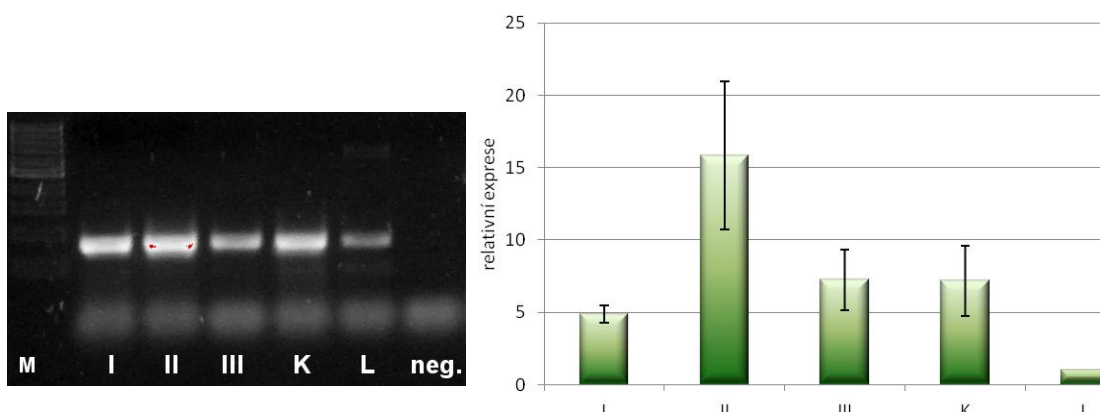
**Obr. 12:** Analýza křivek teploty tání u qPCR produktů genu *KAN1* s průměrnou teplotou tání 83,1 °C. Odchytky u teplot tání produktů se pohybovaly v řádu setin stupňů Celsia.



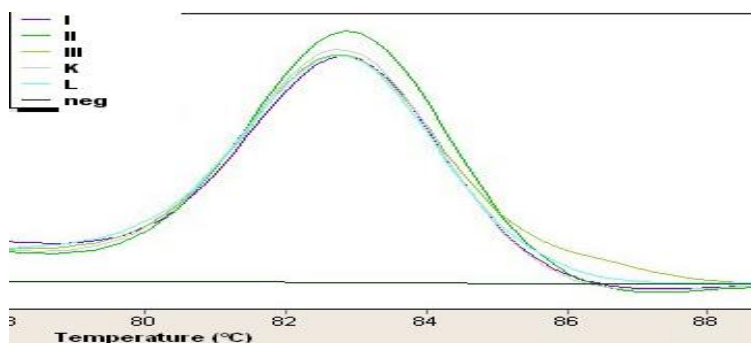
**Obr. 13:** Separace PCR produktů *KAN1* s genomickou DNA (vlevo) a modifikovanou DNA (vpravo). Vzorky I, II, III, K a L představují 3 vývojová stádia embryogeneze, květ a list. Negativní kontrolou (neg.) je reakce s PCR-grade vodou namísto templátové DNA. Byl použit marker molekulové hmotnosti (M) odstupňovaný po 100 bp s nejjasnějším proužkem o délce 500 bp. Nepřítomnost produktu o délce 180 bp u modifikované DNA značí demethylaci cytozinu v místech nasedání primerů.

### 5.3.1.3 Eprese genu *PCNA1*

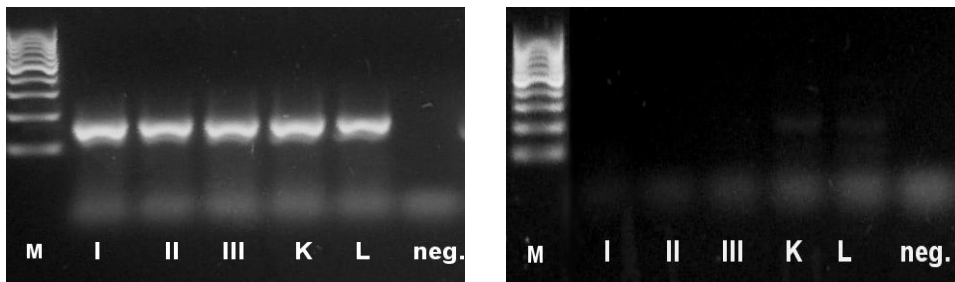
Expresa *PCNA1* byla ve fázi I asi 5x vyšší než v listu, během fáze II vzrostla na téměř 16 násobek exprese v listu a ve fázi III opět poklesla na úroveň 7x vyšší než v listu. Expresa v květu se pohybovala na podobně vysoké úrovni jako ve fázi III (obr. 14). Křivka tání potvrzující specifitu produktů je zobrazena na obr. 15. Nepřítomnost produktů délky 159 bp při PCR modifikované DNA značí demetylovaný stav v místě nasedání primerů (obr. 16).



**Obr. 14: Expresa *PCNA1*.** V levé části obrázku jsou elektroforetické separace produktů PCR reakcí s cDNA. Velikost produktu u cDNA je 159 bp. Negativní kontrolou (neg.) je reakce s PCR - grade vodou namísto templátové DNA. Byl použit marker molekulové hmotnosti (M) odstupňovaný po 100 bp s nejjasnějším proužkem o délce 500 bp. V pravé části je na grafu zobrazeno porovnání relativní exprese v jednotlivých stádiích embryogeneze (I, II, III) a v květu (K) s expresí v listu (L), hodnota exprese v listu je vždy rovna 1.



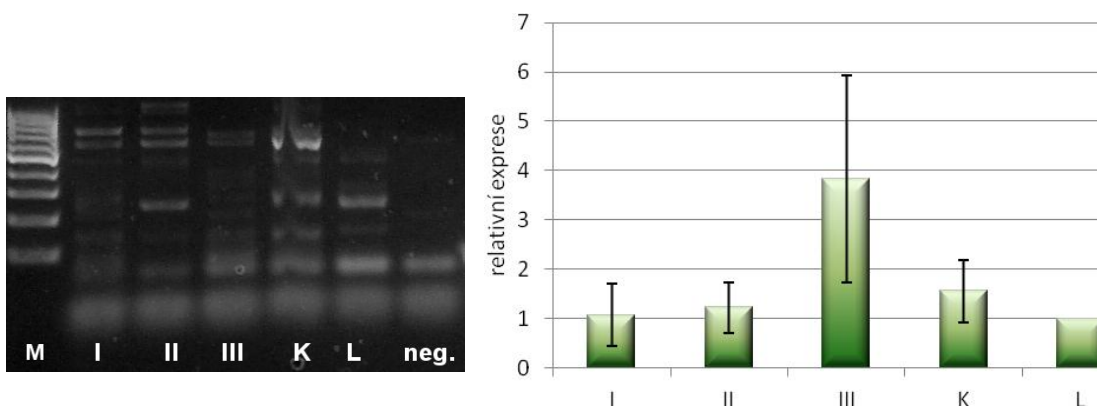
**Obr. 15:** Analýza křivek teploty tání u qPCR produktů genu *PCNA1* s průměrnou teplotou tání 82,9 °C. Odchytky u teplot tání byly v řádu setin stupňů Celsia.



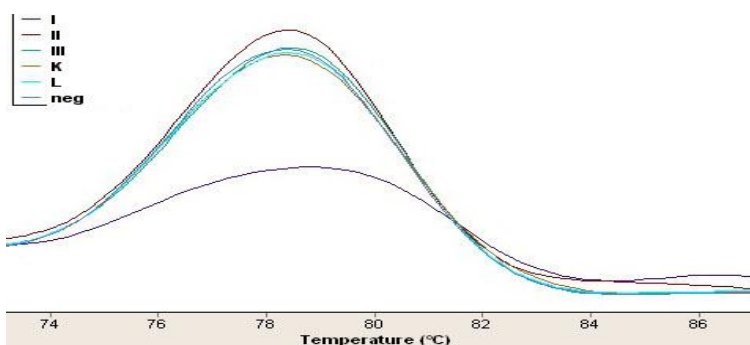
**Obr. 16:** Separace PCR produktů *PCNA1* s genomickou DNA (vlevo) a modifikovanou DNA (vpravo). Vzorky I, II, III, K a L představují 3 vývojová stádia embryogeneze, květ a list. Negativní kontrolou (neg.) je reakce s PCR-grade vodou namísto templátové DNA. Byl použit marker molekulové hmotnosti (M) odstupňovaný po 100 bp s nejjasnějším proužkem o délce 500 bp. Nepřítomnost produktů v oblasti o délce 159 bp u modifikované DNA značí demetylaci v místech nasedání primerů.

### 5.3.1.4 Eprese genu *BE1*

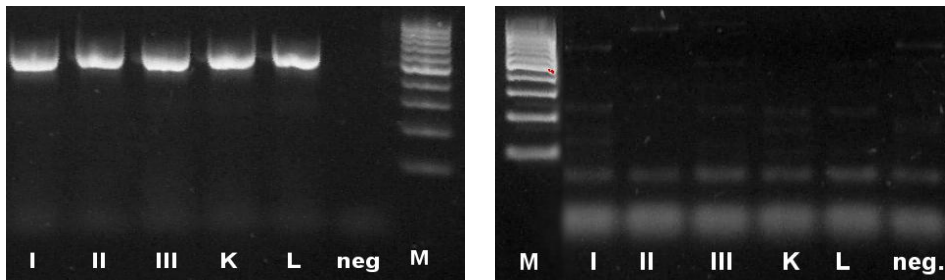
Expres *BE1* ve fázi I a II se pohybovala na podobné úrovni jako expres v listu, ve fázi III se objevuje nárůst, kdy je hladina expres 3,8x vyšší než v listu. Expres *BE1* v květech je taktéž na nízké úrovni podobně jako expres v listu (obr. 17). Důvodem přítomnosti více produktů po elektroforéze na obrázku 17 na rozdíl od jediného produktu při qPCR (obr. 18) je pravděpodobně použití jiné polymerázy. Křivka tání potvrzující specifitu produktů je zobrazena na obrázku 18. Nepřítomnost produktů délky 650 bp při PCR modifikované DNA naznačuje demetylaci v místě nasedání primerů (obr. 19).



**Obr. 17: Expres *BE1*.** V levé části obrázku jsou elektroforetické separace produktů PCR reakcí s cDNA. Velikost produktu u cDNA je 650 bp. Negativní kontrolou (neg.) je reakce s PCR-grade vodou namísto templátové DNA. Byl použit marker molekulové hmotnosti (M) odstupňovaný po 100 bp s nejjasnějším proužkem o délce 500 bp. V pravé části je na grafu zobrazeno porovnání relativní expres v jednotlivých stádiích embryogeneze (I, II, III) a v květu (K) s expresí v listu (L), hodnota expres v listu je vždy rovna 1.



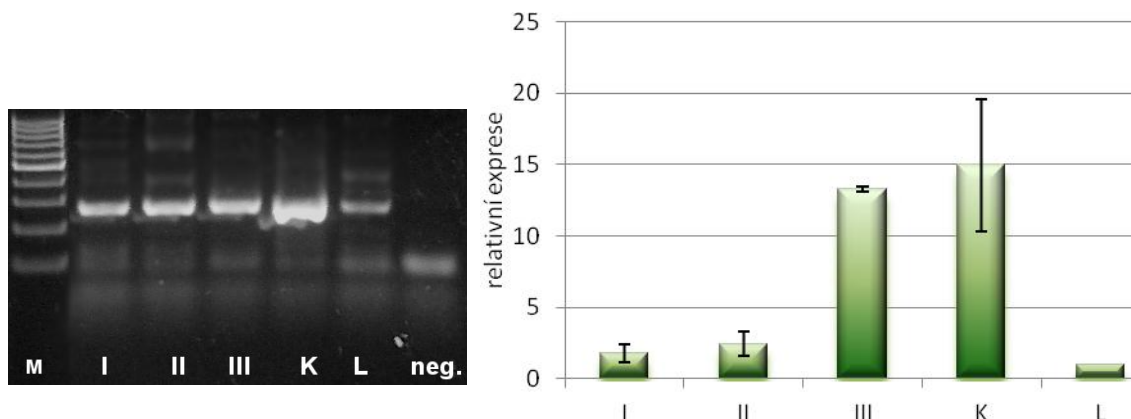
**Obr. 18:** Analýza křivek teploty tání u qPCR produktů genu *BE1* s průměrnou teplotou tání 78,4 °C. Odchyly u teplot tání byly v řádu setin stupňů Celsia.



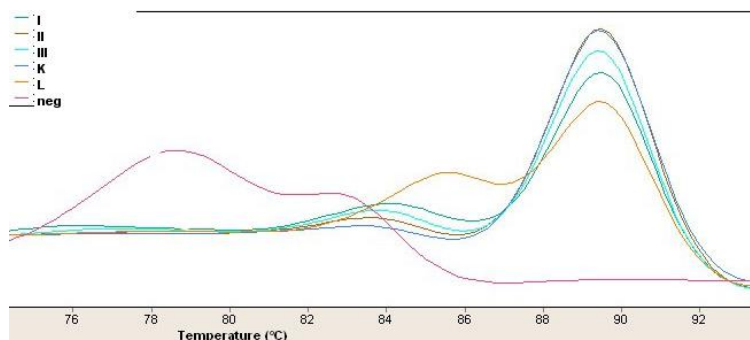
**Obr. 19:** Separace PCR produktů *BE1* s genomickou DNA (vlevo) a modifikovanou DNA (vpravo). Vzorky I, II, III, K a L představují 3 vývojová stádia embryogeneze, květ a list. Negativní kontrolou (neg.) je reakce s PCR - grade vodou namísto templátové DNA. Byl použit marker molekulové hmotnosti (M) odstupňovaný po 100 bp s nejjasnějším proužkem o délce 500 bp. Nepřítomnost produktů v oblasti o délce 650 bp u modifikované DNA naznačuje demetylaci v místech nasedání primerů.

### 5.3.1.5 Eprese genu *LEA4-5*

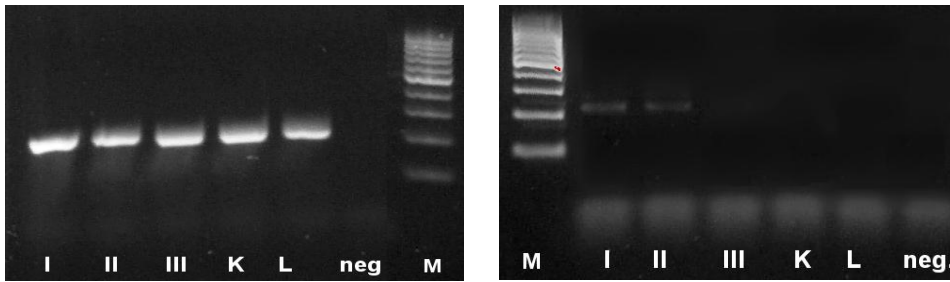
Expresa *LEA4-5* ve fázi I a II byla nízká, ve fázi III významně vzrostla, dosahovala hodnot asi 13x vyšších než hladina exprese v listu. Na podobně vysoké úrovni se pohybovala hladina exprese *LEA4-5* v květech (obr. 20). Křivka tání potvrzující specifitu produktů je zobrazena na obr. 21. Analýza metylace genu (obr. 22) naznačuje přítomnost metylcytozinu v místech nasedání primerů u vzorku I a II.



**Obr. 20: Expresa *LEA4-5*.** V levé části obrázku jsou elektroforetické separace produktů PCR reakcí s cDNA. Velikost produktu u cDNA je 218 bp. Negativní kontrolou (neg.) je reakce s PCR - grade vodou namísto templátové DNA. Byl použit marker molekulové hmotnosti (M) odstupňovaný po 100 bp s nejjasnějším proužkem o délce 500 bp. V pravé části je na grafu zobrazeno porovnání relativní exprese v jednotlivých stádiích embryogeneze (I, II, III) a v květu (K) s expresí v listu (L), hodnota exprese v listu je vždy rovna 1.



**Obr. 21:** Analýza křivek teploty tání u qPCR produktů genu *LEA4-5* s průměrnou teplotou tání 89,7 °C. Odchylky u teplot tání byly v řádu setin stupňů Celsia. Sekundární pík s teplotou tání o několik stupňů nižší přítomný u vzorku s negativní kontrolou a listem představuje pravděpodobně zřetěžené primery.

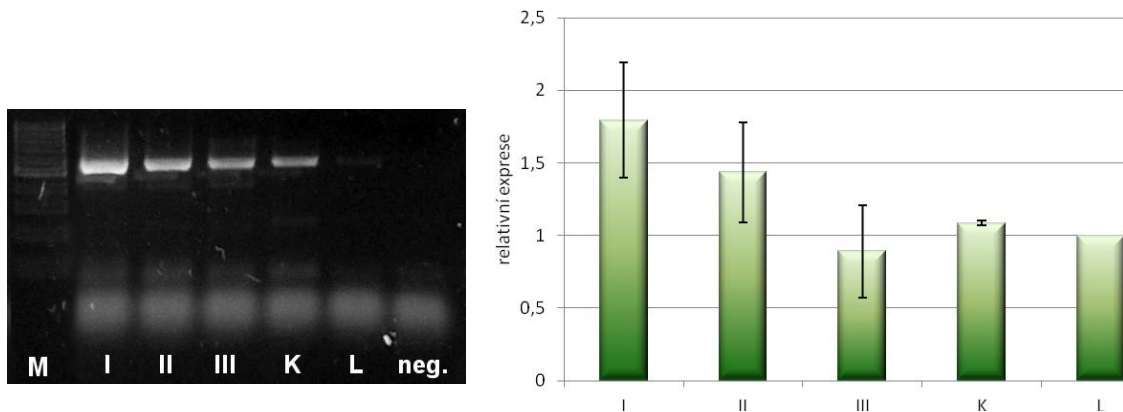


**Obr. 22:** Separace PCR produktů *LEA4-5* s genomickou DNA (vlevo) a modifikovanou DNA (vpravo). Vzorky I, II, III, K a L představují 3 vývojová stádia embryogeneze, květ a list. Negativní kontrolou (neg.) je reakce s PCR-grade vodou namísto templátové DNA. Byl použit marker molekulové hmotnosti (M) odstupňovaný po 100 bp s nejjasnějším proužkem o délce 500 bp. Přítomnost produktů v oblasti o délce 218 bp u modifikované DNA naznačuje přítomnost metylcytozinu v místech nasedání primerů u vzorku I a II.

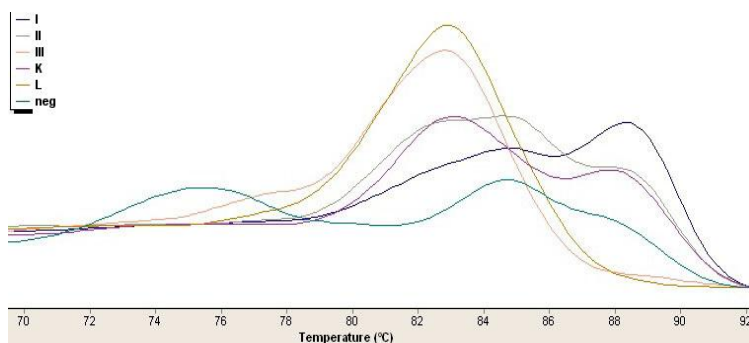
### 5.3.2 Analýza exprese *Cucumis*

#### 5.3.2.1 Eprese genu *XTH1*

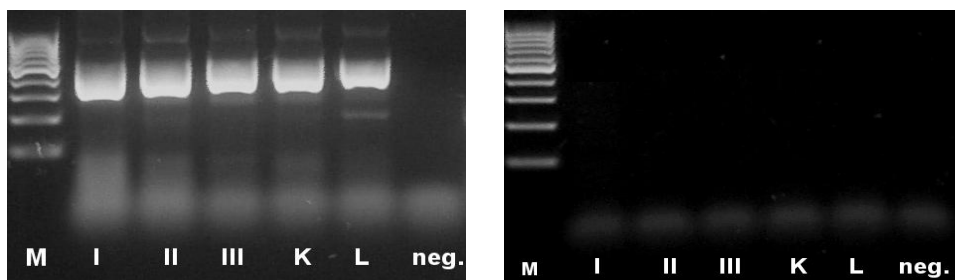
Expres *XTH1* vykazovala sestupnou tendenci. Od fáze I klesala z 1,8 násobku na zhruba 0,9 násobek exprese v listu ve fázi III. Expres *XTH1* v květu se pohybovala na téměř stejné úrovni jako exprese v listu (obr. 23). Křivka tání potvrzující specifitu produktů je zobrazena na obr. 24. Nepřítomnost produktů o délce 681 bp u modifikované DNA vypovídá o demethylaci *XTH1* v místě nasedání primerů (obr. 25).



**Obr. 23: Expres *XTH1*.** V levé části obrázku jsou elektroforetické separace produktů PCR reakcí s cDNA. Velikost produktu u cDNA je 681 bp. Negativní kontrolou (neg.) je reakce s PCR-grade vodou namísto templátové DNA. Byl použit marker molekulové hmotnosti (M) odstupňovaný po 100 bp s nejjasnějším proužkem o délce 500 bp. V pravé části je na grafu zobrazeno porovnání relativní exprese v jednotlivých stádiích embryogeneze (I, II, III) a v květu (K) s expresí v listu (L), hodnota exprese v listu je vždy rovna 1.



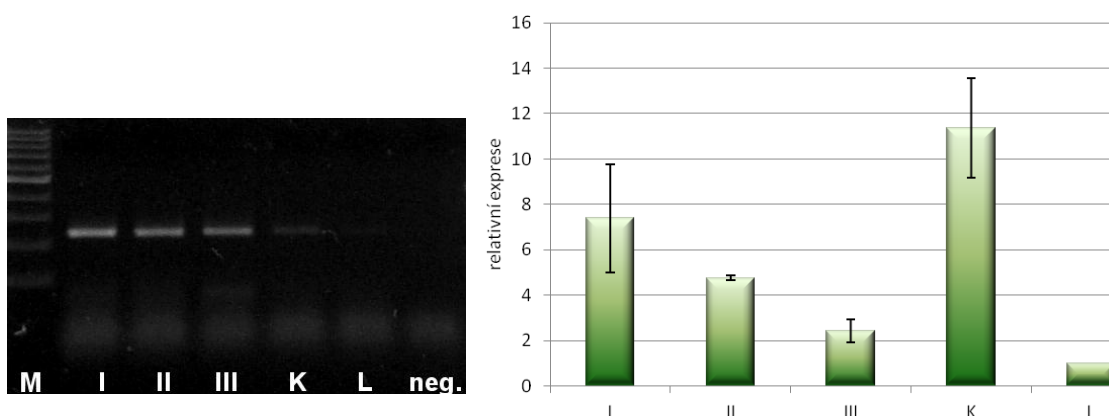
**Obr. 24:** Analýza křivek teploty tání u qPCR produktů genu *XTH1* s průměrnou teplotou tání 83,8 °C. Odchyly teplot tání se pohybovaly v řádu desetín a u produktů I, II a K se objevoval druhý pík při teplotě 88,7 °C.



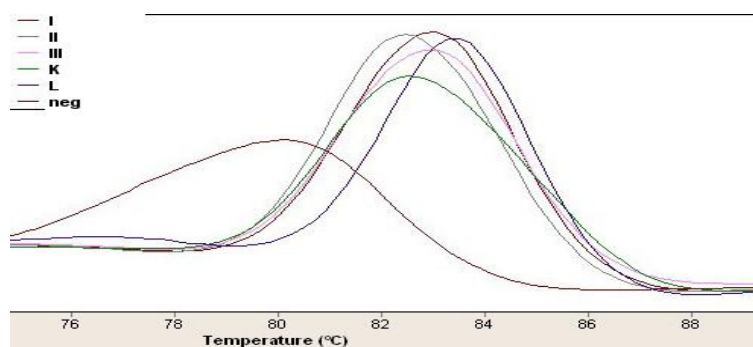
**Obr. 25:** Separace PCR produktů *XTH1* s genomickou DNA (vlevo) a modifikovanou DNA (vpravo). Vzorky I, II, III, K a L představují 3 vývojová stádia embryogeneze, květ a list. Negativní kontrolou (neg.) je reakce s PCR-grade vodou namísto templátové DNA. Byl použit marker molekulové hmotnosti (M) odstupňovaný po 100 bp s nejjasnějším proužkem o délce 500 bp. Nepřítomnost produktů o délce 681 bp u modifikované DNA značí demetylovaný stav.

### 5.3.2.2 Eprese genu *XTH2*

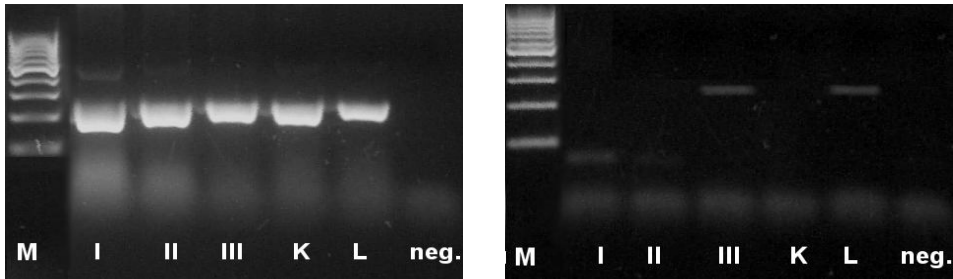
Expres *XTH2* vykazovala sestupnou tendenci. Ve fázi I byla exprese 7,3x vyšší než v listu, postupně se snižovala až na 2,4 násobek ve fázi III. Byla zaznamenána vysoká exprese *XTH2* v květu, a to 11,3x vyšší než v listu (obr. 26). Křivka tání potvrzující specifitu produktů je zobrazena na obr. 27. Přítomnost produktů délky 279 bp u modifikované DNA ve fázi III a u listu naznačuje přítomnost metylcytozinu v místě nasedání primerů (obr. 28).



**Obr. 26: Expres *XTH2*.** V levé části obrázku jsou elektroforetické separace produktů PCR reakcí s cDNA. Velikost produktu u cDNA je 279 bp. Negativní kontrolou (neg.) je reakce s PCR-grade vodou namísto templátové DNA. Byl použit marker molekulové hmotnosti (M) odstupňovaný po 100 bp s nejjasnějším proužkem o délce 500 bp. V pravé části je na grafu zobrazeno porovnání relativní exprese v jednotlivých stádiích embryogeneze (I, II, III) a v květu (K) s expresí v listu (L), hodnota exprese v listu je vždy rovna 1.



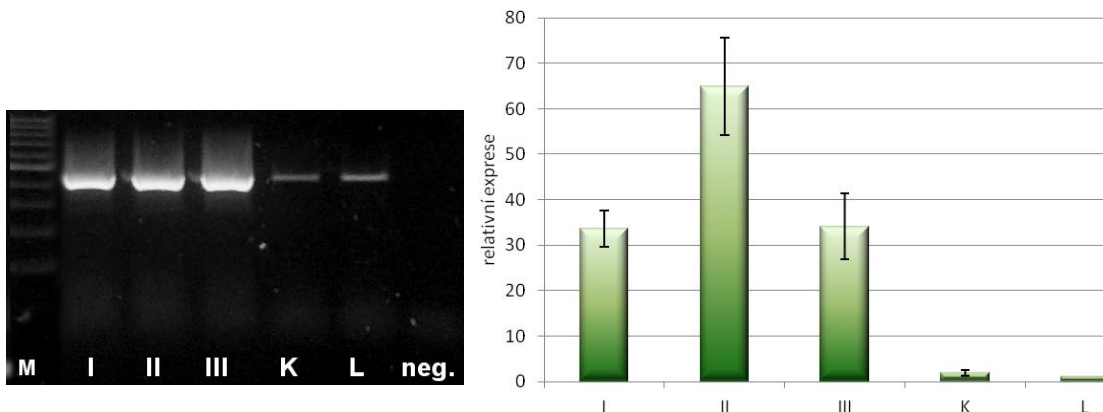
**Obr. 27:** Analýza křivek teploty tání u qPCR produktů genu *XTH2* s průměrnou teplotou tání 82,5 °C. Odchytky teplot tání byly v řádu desetín stupňů Celsia.



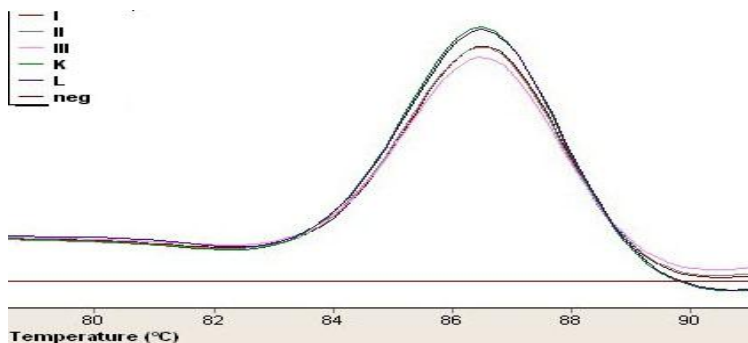
**Obr. 28:** Separace PCR produktů *XTH2* s genomickou DNA (vlevo) a modifikovanou DNA (vpravo). Vzorky I, II, III, K a L představují 3 vývojová stádia embryogeneze, květ a list. Negativní kontrolou (neg.) je reakce s PCR-grade vodou namísto templátové DNA. Byl použit marker molekulové hmotnosti (M) odstupňovaný po 100 bp s nejjasnějším proužkem o délce 500 bp. Přítomnost produktů o délce 279 u modifikované DNA fáze III a listu značí metylovaný stav.

### 5.3.2.3 Exprese genu *XTH3*

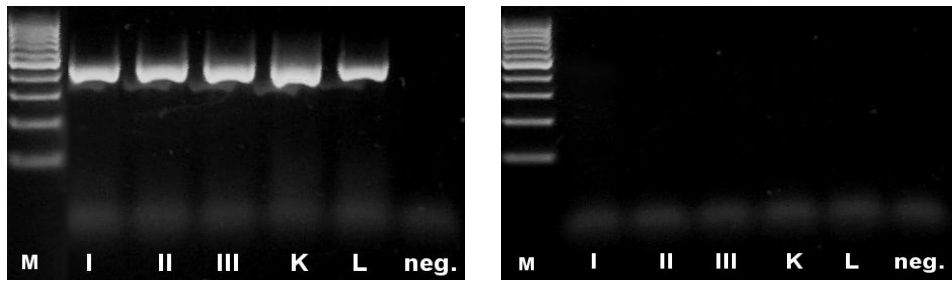
Expresa *XTH3* ve fázi I dosahovala hodnot 33,6x vyšších než exprese v listu. Během fáze II vzrostla na téměř 65 násobek a ve fázi III opět klesla na úroveň fáze I. Expresa *XTH3* v květu byla jen asi 1,9x vyšší než v listu (obr. 29). Křivka tání je zobrazena na obr. 30. Na obr. 31 je zobrazen metylační stav *XTH3*. Nepřítomnost produktů délky 476 bp vypovídá o demetylacii.



**Obr. 29: Expresa *XTH3*.** V levé části obrázku jsou elektroforetické separace produktů PCR reakcí s cDNA. Velikost produktu u cDNA je 476 bp. Negativní kontrolou (neg.) je reakce s PCR-grade vodou namísto templátové DNA. Byl použit marker molekulové hmotnosti (M) odstupňovaný po 100 bp s nejjasnějším proužkem o délce 500 bp. V pravé části je na grafu zobrazeno porovnání relativní exprese v jednotlivých stádiích embryogeneze (I, II, III) a v květu (K) s expresí v listu (L), hodnota exprese v listu je vždy rovna 1.



**Obr. 30:** Analýza křivek teploty tání u qPCR produktů genu *XTH3* s průměrnou teplotou tání 86,6 °C. Odchylky u teplot tání byly v řádu setin stupňů Celsia.



**Obr. 31:** Separace PCR produktů *XTH3* s genomickou DNA (vlevo) a modifikovanou DNA (vpravo). Vzorky I, II, III, K a L představují 3 vývojová stádia embryogeneze, květ a list. Negativní kontrolou (neg.) je reakce s PCR-grade vodou namísto templátové DNA. Byl použit marker molekulové hmotnosti (M) odstupňovaný po 100 bp s nejjasnějším proužkem o délce 500 bp. Nepřítomnost produktů o délce 476 bp u modifikované DNA značí demetylovaný stav.



## 6 Diskuze

V první části práce byla určena vývojová stádia embryí odebíraných pro další experimenty. Vzorky pro *Arabidopsis* byly rozděleny tak, že stádiu I odpovídalo vajíčko s proembryem, stádiu II vajíčko s embryem ve fázi globule a srdce a fázi III vajíčko se zralým embryem. Do experimentů byl také zahrnut vzorek květu a jako kontrolní vzorek sloužil list. Podobně byly rozděleny vzorky pro *Cucumis*, kdy stádiu I odpovídalo vajíčko s embryem v globulární fázi, stádiu II nezralé embryo v pozdní fázi vývoje a stádiu III zralé embryo. Rovněž byly použity vzorky květu a listu.

V další fázi byl zkoumán epigenetický stav během embryogeneze, a to hladiny 5-mC a 5-hmC. Metylace DNA je hlavní epigenetická modifikace a hraje důležitou roli při regulaci genové exprese během embryogeneze eukaryot (Eckardt, 2006). Metylace DNA je také známa jako esenciální složka v mechanismu parentálního imprintingu u savců i rostlin (Tilghman, 1999). Dle doposud zjištěných poznatků by se dalo očekávat, že úroveň 5-mC ve vajíčku s vyvíjejícím se embryem bude nižší než v listech a květech. Viejo *et al.* (2010) prokázali, že vajíčka kaštanovníku jedlého po oplození podléhají demetylaci a v pozdějších fázích vývoje se hladina 5-mC opět zvyšuje. Při studiu metylace DNA v endospermu *Arabidopsis* bylo zjištěno, že globální hladina 5-mC v endospermu je ještě nižší než v samotném embryu (Hsieh *et al.*, 2009). Zemach *et al.*, (2010) srovnávali metylační schémata mezi embryi, stonky, kořeny a listy rýže. Došli k závěru, že úroveň metylace CpG je mezi těmito pletivy téměř stejná. Avšak metylace CpNpG rostla s rostoucím stářím pletiva – nejnižší byla naměřena v embryu, následovaly mladé stonky a kořeny a nejvyšší úroveň byla naměřena v dospělých listech. Podobně vyšší hladina metylace CpNpN byla charakteristická pro listy, zatímco u mladých pletiv semenáčku byla nižší.

Výsledky této práce jsou v rozporu s doposud publikovanými poznatky. Hladina 5-mC ve stádiu I, tedy ve fázi proembrya, se u *Arabidopsis* pohybovala na 0,15%, poté se objevil pokles ve fázi globulární a srdčité. Zralé embryo vykazovalo opět mírný nárůst metylace, nikoli však na původní hladinu, která byla zaznamenána u proembrya. Hladina 5-mC v listu i květu byla asi 3x nižší. Hodnoty metylace v řádu desetin procent byly naměřeny také u *Cucumis*. Ve fázi globulární hladina 5-mC tvořila 0,23%, v další fázi byl zaznamenán nárůst a poté pokles na 0,27% u zralého embrya. Rovněž zde byla pozorována nižší úroveň metylace v listu než v průběhu embryogeneze, a to asi 3,4x. U *Cucumis* i *Arabidopsis* lze pozorovat sníženou hladinu metylace ve fázi globulární ve srovnání s pozdějšími fázemi, kdy se v úrovni

metylace objevuje vzestupná tendence, což může souviset s postupně klesající transkripční aktivitou v průběhu dozrávání embrya.

Úloha hydroxymetylace byla doposud zkoumána u živočišných buněk, o roli 5-hmC v rostlinné buňce nebylo doposud nic publikováno. 5-hmC je široce distribuován v oblastech bohatých na geny a často byl nalezen v oblastech promotorů bohatých na CpG a ve vazebných místech pro pluripotentní transkripční faktory. TET1 hraje zásadní roli při podpoře transkripčně aktivního stavu udržováním nemetylovaného stavu promotorů a tím umožňuje rekrutaci transkripčních faktorů a základních transkripci zajišťujících komponent (Wu a Zhang, 2011).

V této práci bylo zjištěno, že hladina hydroxymetylace *Arabidopsis* se v první fázi pohybovala na 0,08%, poté klesla na 0,06% a ve zralém embryu dosahovala hodnot 0,11%. Hydroxymetylace v listu a květu dosahovala hodnot 0,05% a 0,06%, v listu byla hydroxymetylace 2,2x nižší než během embryogeneze. U *Cucumis* byla zaznamenána během všech tří stádií hladina 0,05%, zatímco v listu a květu byly hodnoty 1,7 až 2,5x nižší. 5-hmC vzniká oxidací 5-mC za účasti enzymů z rodiny TET a předpokládá se, že je mezičlánkem při demetylaci DNA. TET1 hraje zásadní roli při podpoře transkripčně aktivního stavu udržováním demetylovaného stavu promotorů (Wu a Zhang, 2011). Vyšší hladiny 5-hmC během všech fází embryogeneze oproti sníženým hladinám v listu a květu by mohly poukazovat na zvýšenou demetylaci spojenou se zvýšenou transkripční aktivitou. Hladiny 5-hmC zaznamenané v řádu setin procent odpovídají pozorováním, která učinili Yao *et al.* (2012), kteří zkoumali hladinu hydroxymetylace v listech a květech *Arabidopsis*. Dle jejich výsledků tvořil 5-hmC asi 0,068 až 0,075% z celkového počtu cytosinů v genomu.

V poslední části při analýze genové exprese byla porovnávána hladina exprese v jednotlivých fázích embryogeneze a v květu s úrovní exprese v listu. Pro *Arabidopsis* byly vybrány geny *SINI*, *KANI*, *PCNA1*, *BE1* a *LEA4-5*. U *Cucumis* byla sledována exprese genů *XTH1*, *XTH2* a *XTH3*.

*SINI* se účastní megasporogeneze a je zapojen v řízení načasování kvetení. Je nezbytný pro správný vývoj integumentů (Robinson-Beers *et al.*, 1992). Z výsledků této práce vyplývá, že exprese *SINI* měla během vývoje embrya vzestupný charakter, kdy postupně stoupala od 1,5 násobku ve stádiu I až téměř k 6 násobku ve stádiu III ve srovnání s hladinou exprese v listu. To by mohlo naznačovat význam *SINI* nejen pro vývoj integumentů vajíčka, ale také roli při přeměně integumentů v osemeni při vývoji semene. Analýza metylace nezjistila přítomnost 5-mC, transkripční aktivita je tak pravděpodobně regulována na jiné než epigenetické úrovni.

Kerstetter *et al.* (2001) potvrdili roli *KAN* při určení periferální identity ve vyvíjejícím se embryu. Pozorovali slabou expresi během globulární fáze vývoje embrya, brzy poté byla exprese omezena na periferální buňky v bazální části nad hypofýzou. Ve stadiu srdce byla exprese pozorována na periférii budoucího hypokotylu a na abaxiální straně děložních primordií. V této práci byla v expresi *KANI* zaznamenána vzestupná tendence. Hladina exprese vzrůstala z 5 násobku ve stádiu I (proembryo) až na 21 násobek ve stádiu III (zralé embryo). Zvýšená hladina exprese *KANI* v květu (asi 12x vyšší než v listu) odpovídá úloze *KAN* zjištěné autory Kerstetter *et al.* (2001). Ti odhalili jeho roli při určení abaxiální identity pestíků a také listů. Dle výsledků této práce není exprese *KANI* regulována metylací.

Protein PCNA funguje jako funkční faktor polymerázy  $\delta$ , která je potřebná pro syntézu DNA během replikace (Strzalka a Ziemienowicz, 2011). V této práci byla nejvyšší hladina exprese *PCNA* pozorována ve fázi II, tedy ve stádiu globulárním a srdčitém, kdy se embryo intenzivně dělí, což odpovídá funkci PCNA při replikaci DNA. Nebyla pozorována přítomnost 5-mC, tudíž zde pravděpodobně nedochází k regulaci metylací.

*BE1* kóduje glykosidhydrolázu lokalizovanou v chloroplastech, což nasvědčuje úloze v metabolismu sacharidů. Sdílí nejvyšší sekvenční homologii s geny kódujícími škrob větvicími enzymy jako je *BE2* a *BE3*, ale tato aktivita u něj pozorována nebyla a předpokládá se pro něj existence jiných substrátů než škrobu (Dumez *et al.*, 2006). Wang *et al.*, (2010) sledovali vliv mutace *be1* na průběh embryogeneze a zjistili, že vývoj mutantů *be1* se zastavil v pozdní srdčité fázi a dál už nepokračoval. Exprese *BE1* byla detekována v celém embryu. Závěrem bylo, že *BE1* je nezbytný pro normální průběh dělení a diferenciaci během vývoje embrya. Z výsledků této práce vyplývá, že nejvyšší exprese *BE1* probíhala ve stádiu zralého embrya, zatímco v ostatních fázích byla exprese na nízké úrovni podobné jako v listu, což by mohlo naznačovat souvislost mezi expresí *BE1* a ukládáním škrobu při zrání embrya.

Vysoká exprese *LEA4-5* byla pozorována ve stádiu III (zralé embryo), a to 13x vyšší než v listu. Hladiny během stádia I a II byly na nízké úrovni. To odpovídá současným poznatkům, že *LEA* geny začínají být exprimovány v pozdních fázích embryogeneze při zrání embrya a zapojují se do mechanismu tolerance k vysychání (Bartels *et al.*, 1988). Výsledky qPCR i klasické PCR s cDNA v této práci odhalily vysokou expresi *LEA4-5* také v květu. O *LEA* genech skupiny 1 jako *ATEM1* a *ATEM6* je doposud známo, že jsou exprimovány výhradně v embryonálních pletivech. Exprese *LEA4-5* by mohla být důkazem, že *LEA* geny skupiny 1 nejsou specifické pouze pro tato pletiva, a že *LEA4-5* může být zapojen i v jiné vývojové dráze. Expresi *LEA* genů v květech pozorovali Gu *et al.* (2012). Jednalo se o *LEA* gen ze skupiny 4 - *CarLEA4*, kdy byla pozorována slabá exprese v květech cizrny. Analýzou

metylace byla zjištěna přítomnost 5-mC ve stadiu I a II. To souhlasí s naměřenou nízkou expresí a dochází zde tedy pravděpodobně k regulaci transkripce pomocí metylace DNA.

Xyloglukan endotransglukosylázy/hydrolázy zajišťují enzymatickou aktivitu zodpovědnou za plasticitu buněčné stěny a produkci oligosacharidů odvozených od xyloglukanu (Yokohama a Nishitani, 2001). Endotransglukosylázy umožňují zvětšování rychle rostoucích buněk prostřednictvím rozvolňování buněčné stěny (Thompson *et al.*, 1997).

V této práci byla pozorována sestupná tendence exprese *XTH1* z 1,8 násobku ve stádiu globulárního embrya klesající až pod úroveň exprese v listu ve stádiu zralého embrya. Exprese *XTH3* měla odlišný průběh. Nejvyšší exprese byla zaznamenána ve fázi embrya před dozráním, zatímco embryo v globulární fázi a zralé embryo vykazovaly stejnou míru exprese tohoto genu. Malinowski *et al.*, (2004) sledovali expresi *XTH1* a *XTH3* u *Cucumis* po indukci somatické embryogeneze. U obou genů zaznamenali postupně se zvyšující expresi. To je v rozporu s výsledky této práce, avšak je možné, že *XTH* geny jsou při somatické a zygotické embryogenezi exprimovány odlišně. Exprese *XTH2* měla sestupný charakter podobně jako *XTH1*. Zesílená exprese *XTH* genů poukazuje na aktivní roli těchto buněčnou stěnu modifikujících enzymů během vývoje embrya. U *XTH2* byla zaznamenána také významná exprese v květu. Harada *et al.*, (2011) pozorovali vysokou expresi *DcXTH2* a *DcXTH3* v korunních lístcích květu karafiátu a předpokládají asociaci těchto genů s růstem a vývojem korunních lístků během rozkvétání. Je tedy možné, že vysoká exprese *XTH2* u *Cucumis* souvisí s funkcí tohoto genu při vývoji květu. *XTH1* ani *XTH3* nebyl v žádném stádiu metylován. Přítomnost 5-mC byla pozorována u *XTH2* ve zralém embryu a listu, což naznačuje možnost regulace exprese metylací DNA.

## 7 Závěr

Rostlinná embryogeneze je řízena expresí specifických genů a epigenetickými mechanismy zahrnujícími např. metylaci DNA. V této práci byla zkoumána globální hladina metylace a hydroxymethylace genomu *Arabidopsis thaliana* a *Cucumis sativus* během různých fází embryogeneze, v květech a listech. Bylo zjištěno, že hladina metylace DNA má tendenci stoupat od okamžiku globulárního stádia, kdy byla naměřena nižší hladina 5-mC ve srovnání s pozdějšími fázemi embryonálního vývoje u obou pokusných rostlin. U hydroxymethylace DNA nebylo pozorováno jasné schéma průběhu, ale její hladina byla v případě *Cucumis* i *Arabidopsis* během embryogeneze zvýšena ve srovnání s hladinou listu. Dále byl zkoumán expresní profil vybraných genů řídících embryogenezi a související procesy jako je megasporogeneze. Byla kvantifikována exprese *SINI*, *KANI*, *PCNA1*, *BE1* a *LEA4-5* u *Arabidopsis* a *XTH1*, *XTH2* a *XTH3* u *Cucumis*. Současně byl analyzován metylační stav těchto genů a bylo sledováno, zda může být transkripční aktivita těchto genů regulována metylací. Nejvyšší exprese *SINI* a *KANI* byla pozorována u zralého embrya, což naznačuje úlohu při přeměně integumentů v osemení. *KANI* byl vysoce exprimován také v květu, kde jeho role při vývoji pestíku byla již prokázána. *PCNA* byl nejsilněji exprimován ve stádiu globulárním a srdčitém, což souvisí s úlohou tohoto genu při vysoké proliferaci v těchto fázích vývoje. Zralé embryo vykazovalo nejsilnější expresi také pro gen *BE1*, což by mohlo být náznakem role *BE1* při ukládání škrobu. *LEA4-5* vykazoval dle očekávání nejvyšší expresi ve zralém embryu potvrzující úlohu *LEA* genů při dehydrataci semene. Překvapující byla však silná exprese *LEA4-5* v květu, která by mohla poukazovat na funkci *LEA4-5* i v jiných procesech než je embryogeneze. Exprese *XTH1* a *XTH2* měla během vývoje embrya sestupnou tendenci s nejvyšší expresí ve fázi globulární. *XTH2* byl významně exprimován v květu. U *XTH3* byla nejvyšší exprese pozorována ve fázi globulární a srdčité. To potvrdilo význam těchto *XTH* genů při modifikaci buněčné stěny během embryogeneze. Významná exprese *XTH2* v květu napovídá o zapojení *XTH2* v průběhu jeho vývoje. U žádného z genů nebyla pozorována metylace cytozinu s výjimkou *LEA4-5* a *XTH2*. Transkripce těchto genů je tedy pravděpodobně regulována na jiné než epigenetické úrovni, zatímco přítomnost 5-mC u *LEA4-5* a *XTH2* naznačuje regulaci transkripce metylací DNA.

## 8 Seznam použité literatury

- Bartels D., Singh M., Salamini F., (1988) Onset of desiccation tolerance during development of the barley embryo. *Planta* 175 (4): 485–492
- Berleth T. a Chatfield S., (2002) Embryogenesis: pattern formation from a single cell. *The Arabidopsis Book*, The American Society of Plant Biologist, USA
- Bies N., Aspart L., Carles C., Gallois P., Delseny M., (1998) Accumulation and degradation of Em proteins in *Arabidopsis thaliana*: evidence for post-transcriptional controls. *Journal of Experimental Botany* 49(329): 1925-1933
- Broadhvest J., Baker S. C., Gasser C. S., (2000) SHORT INTEGUMENTS 2 promotes growth during *Arabidopsis* reproductive development. *Genetics* 155: 899-907
- Chakrabarty D., Yu K. W., Paek K. Y., (2003) Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleuterococcus senticosus*). *Plant Science* 165: 61-68
- Dumez S., Wattedled F., Dauvillee D., Delvalle D., Planchot V., Ball S. G., D’Hulst C., (2006) Mutants of *Arabidopsis* lacking starch branching enzyme II substitute plastidial starch synthesis by cytoplasmic maltose accumulation. *The Plant Cell* 18:2694-2709
- Dure L., Crouch M., Harada J. J., Ho T., Mundy J., Quatrano R. S., Thomas T. L., Sung Z. R., (1989) Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology* 12: 475–486
- Eckardt N. A., (2006) Genetic and epigenetic regulation of embryogenesis. *Plant Cell* 18:781–784
- Emery J. F., Floyd S. K., Alvarez J., Eshed Y., Hawker N. P., Izhaki A., Baum S. F., Bowman J. L., (2003) Radial patterning of *Arabidopsis* shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. *Current Biology* 13: 1768-1774
- Eshed Y., Baum S. F., Bowman J. L., (1999) Distinct mechanisms promote polarity establishment in carpels of *Arabidopsis*. *Cell* 99: 199-209
- Eshed Y., Baum S. F., Perea J. V., Bowman J. L., (2001) Establishment of polarity in lateral organs of plants. *Current Biology* 11(16): 1251-1260
- Gu H., Jia Y., Wang X., Chen Q., Shi S., Ma L., Zhang J., Zhang H., Ma H., (2012) Identification and characterization of a LEA family gene CarLEA4 from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Molecular Biology Reports* 39:3565–3572
- Harada T., Torii Y., Morita S., Onodera R., Hara Y., Yokoyama R., Nishitani K., Satoh S., (2011) Cloning, characterization, and expression of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase and expansin genes associated with petal growth and

development during carnation flower opening. *Journal of Experimental Botany* 62(2): 815-823

- He X., Chen T., Zhu J., (2011) Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. *Cell Research* 21: 442-465
- Hernández-Nistal J., Martín I., Labrador E., Dopico B., (2010) The immunolocation of XTH1 in embryonic axes during chickpea germination and seedling growth confirms its function in cell elongation and vascular differentiation. *Journal of Experimental Botany* 61(15): 4231-4238
- Higashiyama T., (2002) The synergid cell: attractor and acceptor of the pollen tube for double fertilization. *Journal of Plant Research* 115: 149-160
- Hill T. A., Broadhvest J., Kuzoff R. K., Gasser C. S., (2006) *Arabidopsis* SHORT INTEGUMENTS 2 is a mitochondrial DAR GTPase. *Genetics* 174: 707-718
- Hsieh T., Ibarra C. A., Silva P., Zemach A., Eshed-Williams L., Fischer R. L., Zilberman D., (2009) Genome-wide demethylation of *Arabidopsis* endosperm. *Science* 324:1451-1454
- Hundertmark M. a Hinch D. K., (2008) LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* 9(118), doi: 10.1186/1471-2164-9-118
- Ito S., D'Alessio A. C., Taranova O. V., Hong K., Sowers L. C., Zhang Y., (2010) Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* 466: 1129-1133
- Jürgens G., (1996) Cell division and morphogenesis in angiosperm embryogenesis. *Cell and Developmental Biology* 7: 867-872
- Kelley D. R., Skinner D. J., Gasser C. S., (2009) Ovule development: genetic trends and evolutionary considerations. *The Plant Journal* 57: 1054-1064
- Kerstetter R. A., Bollman K., Taylor R. A., Bomblies K., Poethig R. S., (2001) KANADI regulates organ polarity in *Arabidopsis*. *Nature* 411: 706-709
- Kobza K., Camporeale G., Rueckert B., Kueh A., Griffin J. B., Sarath G., Zemleni J., (2005) K4, K9 and K18 in human histone H3 are targets for biotinylation by biotinidase. *FEBS Journal* 272: 4249-4259
- Laux T., Würschum T., Breuninger H., (2004) Genetic regulation of embryonic pattern formation. *The Plant Cell* 16: 190-202
- Liu Y., Lu S., Zhang J., Liu S., Lu Y., (2007) A xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase involves in growth of primary root and alters the deposition of cellulose in *Arabidopsis*. *Planta* 226: 1547-1560
- Maga G. a Hübscher U., (2003). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): A dancer with many partners. *Journal of Cell Science* 116: 3051-3060.

- Malinowski R., Filipecki M., Tagashira N., Wiśniewska A., Gaj P., Plader W., Malepszy S., (2004) Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase genes in cucumber (*Cucumis sativus*) – differential expression during somatic embryogenesis. *Physiologia plantarum* 120: 678-685
- Manfre A. J., Lanni L. M., Marcotte W. R., (2006) The *Arabidopsis* group 1 Late Embryogenesis Abundant Protein ATEM6 is required for normal seed development. *Plant Physiology* 140: 140-149
- Mansfield S. G. a Briarty L. G., (1991) Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*.II. The developing embryo. *Canadian Journal of Botany* 69(3): 461-476
- Munshi A., Shafi G., Aliya N., Jyothy A., (2009) Histone modifications dictate specific biological readouts. *Journal of Genetics and Genomics* 36: 75-88
- Olsen O., (2004) Nuclear endosperm development in cereals and *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 16: 214-227
- Paunesku T., Mittal S., Protić M., Oryhon J., Korolev S. V., Joachimiak A., Woloschak G. E., (2001) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. *International Journal of Radiation Biology* 77(10): 1007-1021
- Ray A., Lang J. D., Golden T., Ray S., (1996) SHORT INTEGUMENT (SIN1), a gene required for ovule development in *Arabidopsis*, also controls flowering time. *Development* 122: 2631-2638
- Reiser L. a Fischer R. L., (1993) The ovule and the embryo sac. *The Plant Cell* 5: 1291-1301
- Robinson-Beers K., Pruitt R. E., Gasser C. S., (1992) Ovule development in wild-type *Arabidopsis* and two female-sterile mutants. *The Plant Cell* 4: 1237-1249
- Robzyk K., Recht J., Osley M. A., (2000) Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science* 287: 501-504
- Strzalka W., Kaczmarek A., Naganowska B., Ziemienowicz A., (2010) Identification and functional analysis of PCNA1 and PCNA-like1 genes of *Phaseolus coccineus*. *Journal of Experimental Botany* 61: 873–888
- Strzalka W. a Ziemienowicz A., (2011) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Annals of Botany* 107: 1127-1140
- Tardy-Planechaud S., Fujimoto S., Lin S. S., Sowers L. C., (1997) Solid phase synthesis and restriction endonuclease cleavage of oligodeoxynucleotides containing 5-(hydroxymethyl)-cytosine. *Nucleic Acids Research* 25: 553 – 558
- Thompson J. E., Smith R. C., Fry S. C., (1997) Xyloglucan undergoes interpolymeric transglycosylation during binding to the plant cell wall in vivo: evidence from <sup>13</sup>C/<sup>3</sup>H dual labelling and isopycnic centrifugation in caesium trifluoroacetate. *Biochemical Journal* 327: 699–708



- Tilghman S. M., (1999) The sins of the father and mothers: genomic imprinting in mammalian development. *Cell* 96:185–193
- Vanyushin B. F. a Ashapkin V. V., (2011) DNA methylation in higher plants: past, present and future. *Biochimica et Biophysica Acta* 1809: 360-368
- Viejo M., Rodríguez R., Valledor L., Pérez M., Cañjal M. J., Hasbún R., (2010) DNA methylation during sexual embryogenesis and implications on the induction of somatic embryogenesis in *Castanea sativa* Miller. *Sex Plant Reproduction* 23: 315-323
- Vyskot, B. (2010) Epigenetika, 1. vydání, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc
- Wang X., Xue L., Sun J., Zuo J., (2010) The *Arabidopsis* BE1 gene, encoding a putative glycoside hydrolase localized in plastids, plays crucial roles during embryogenesis and carbohydrate metabolism. *Journal of Integrative Plant Biology* 52 (3): 273-288
- West M. A. L. a Harada J. J., (1993) Embryogenesis in higher plants: an overview. *The Plant Cell* 5: 1361-1369
- Wise M. J., (2003) LEAPing to conclusions: a computational reanalysis of late embryogenesis abundant proteins and their possible roles. *BMC Bioinformatics* 4(52), doi: 10.1186/1471-2105-4-52
- Wu H., D'Alessio A.C., Ito S., Xia K., Wang Z., Cui K., Zhao K., Sun Y. E., Zhang Y., (2011) Dual functions of Tet1 in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Nature* 473: 389-393
- Wu H. a Zhang Y., (2011) Tet1 and 5-hydroxymethylation: A genome-wide view in mouse embryonic stem cells. *Cell Cycle* 10 (15): 2428-2436
- Xiao W., Custard K. D., Brown R. C., Lemmon B. E., Harada J. J., Goldberg R. B., Fischer R. L., (2006) DNA methylation is critical for *Arabidopsis* embryogenesis and seed viability. *The Plant Cell* 18: 805-814
- Yao Q., Song C., He C., Kumaran D., Dunn J. J., (2012) Heterologous expression and purification of *Arabidopsis thaliana* VIM1 protein: In vitro evidence for its inability to recognize hydroxymethylcytosine, a rare base in *Arabidopsis* DNA. *Protein Expression and Purification* 83: 104-111
- Yokohama R. a Nishitani K., (2001) A comprehensive expression analysis of all members of a gene family encoding cell-wall enzymes allowed us to predict *cis*-regulatory regions involved in cell-wall construction in specific organs of *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology* 42 (10): 1025-1033
- Zeiger E. a Taiz L., (2006) Plant Physiology, 4th Edition, Sinauer Associates, Inc., Publishers, USA
- Zemach A., Kim M. Y., Silva P., Rodrigues J A., Dotson B., Brooks M. D., Zilberman D., (2010) Local DNA hypomethylation activates genes in rice endosperm. *PNAS* 107(43): 18729-18734, doi: 10.1073/pnas.1009695107

- Zhang Z. a Laux T., (2011) The asymmetric division of the *Arabidopsis* zygote: from cell polarity to an embryo axis. *Sexual Plant Reproduction* 24: 161-169
- Zhang P., Su L., Wang Z., Zhang S., Guan J., Chen Y., Yin Y., Gao F., Tang B., Li Z., (2012) The Involvement of 5-hydroxymethylcytosine in active DNA demethylation in mice. *Biology of Reproduction, BOR-Papers in Press*, doi:10.1095/biolreprod.111.096073

## 9 Seznam použitých zkratek

SIN	SHORT INTEGUMENT
KAN	KANADI
PCNA	PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN
BE	BRANCHING ENZYME
LEA	LATE ABUNDANT PROTEIN
XTH	XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLUKOSYLASE/HYDROLASE
WT	Wild-type
PHB	PHABULOSA
PHV	PHAVOLUTA
INO	INNER NO OUTER
Cdk2	Cyklin dependentní kináza 2
MET1	METHYLTRANSFERASE1
CMT3	CHROMOMETHYLASE3
DME	DEMETER
MEA	MEDEA
5-mC	5-metylcytozin
5-hmC	5-hdroxymetylcytozin
DNMT	DNA METHYLTRANSFERASE
EDTA	Etylendiamintetraoctová kyselina
TRIS	Tris(hydroxymetyl)aminometan
CTAB	Cetyl-trimetylamonium bromid