

## Abstrakt

Náhodný objev RNA interference před pár desítkami let u rostlin a její následné popsání Firem *et al.* v roce 1998 znamenal doslova revoluci v molekulární biologii a řadě dalších oborů. Výzkumníci odkryli rozsáhlý a nečekaný mechanismus regulace genové exprese na mnoha úrovních u téměř všech studovaných eukaryot. Prvotní studie u rostlin odhalily umlčování exprese z vnějšku dodaných genů i příslušných endogenů. Brzy bylo tedy jasné, že tento proces neslouží organismům pouze v obraně před viry, ale i před mobilními genetickými elementy a k regulaci vlastních genů. Společným jmenovatelem všech mechanismů RNAi je dvouvláknová RNA, která je štěpena na malé RNA. Ty pak řídí v součinnosti s řadou dalších proteinů buď štěpení částečně či plně komplementární mRNA či blokují její translaci v procesu posttranskripčního umlčování (PTGS), nebo se v procesu RNA řízené metylace DNA (RdDM) podílejí na umlčování genů na transkripční úrovni doprovázené remodelací chromatinu.

Mechanismy RNAi se uplatňují i při transformaci rostlin, kdy způsobují v odvozených liniích značnou variabilitu a nestabilitu v expresi vnesených genů. Řada biotechnologických postupů ovšem vyžaduje dlouhodobou definovanou a stabilní expresi transgenu, kterou právě RNAi znesnadňuje.

Hlavním cílem diplomové práce bylo posoudit vliv vybraných faktorů na míru umlčování exprese transgenů a nalézt takové podmínky či ošetření, při nichž by docházelo k rychlému umlčení exprese transgenu u linií, které jsou k umlčení náchylné. To by umožnilo ihned po transformaci selektovat linie stabilní v expresi transgenu, resp. linie se sníženým rizikem pozdějšího umlčení transgenu, což je velmi žádoucí jak pro základní tak i aplikovaný výzkum.

Prostředkem k tomuto výzkumu byly transgenní linie brambor s umlčenou či obnovenou expresí *GFP*, linie dlouhodobě stabilně exprimující *GFP* a tabáková buněčná linie BY-2, která byla v rámci práce transformována nově připravenými konstrukty.

V diplomové práci se podařilo pomocí připravených expresních konstruktů prokázat vliv jak kódující sekvence transgenu, tak i vystavení stresovým podmínkám na míru umlčování vnesených genů. Přejít rostlin brambor přes stádium hlízy nevyvolal žádné změny v expresi transgenu. Reaktivace exprese z umlčené jednokopiové transgenní linie bramboru se podařila jen v případě *NPTII* genu, v případě *GFP* bylo prokázáno pouze dočasné obnovení exprese.

**Klíčová slova:** RNA interference, PTGS (posttranskripční umlčování), TGS (transkripční umlčování), tabáková buněčná linie BY-2, lilek brambor, RdDM (metylace DNA řízená malými RNA), GFP, umlčování transgenů