

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra experimentální biologie rostlin



**Umlčování exprese transgenů v rostlinách bramboru
a v buněčné linii tabáku BY-2.**

Transgene silencing in potato plants and tobacco cell line BY-2.

Dimitrij Tyč

Diplomová práce

Praha 2011

Vedoucí práce:

RNDr. Lukáš Fischer, Ph.D.

Konzultanti:

RNDr. Lenka Dvořáková, Ph.D.

RNDr. Miroslav Srba

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně s použitím všech uvedených literárních zdrojů, a to pod vedením školitele RNDr. Lukáše Fischera, Ph.D. a za konzultace RNDr. Lenky Dvořákové, Ph.D. a RNDr. Miroslava Srby. Souhlasím se zveřejněním jejího obsahu.

V Praze dne 26.8. 2011

Bc. Dimitrij Tyč

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat zejména svému školiteli RNDr. Lukáši Fischerovi, Ph.D. za jeho velkou trpělivost, přátelský přístup, cenné rady, spoustu času a také za korektury předkládaného textu. Dále bych chtěl poděkovat i mým konzultantům RNDr. Lence Dvořákové, Ph.D. a RNDr. Mirkovi Srbovi. Obzvláště Lence Dvořákové za zaškolení v metodách, pasážování biologického materiálu v době mé nepřítomnosti, cenné připomínky a rady k mé práci a za poskytnutí nejrůznějších protokolů.

Můj dík patří také všem ostatním kolegům z laboratoře č. 210, v čele s laborantkou Halkou Hrabákovou, DiS., za nejrůznější pomoc a celkové kamarádské prostředí, do kterého se člověk těší. *In memoriam* bych chtěl poděkovat tragicky zesnulému RNDr. Lubomíru Daňkovi za pomoc a rady při pěstování rostlin ve skleníku a kamarádský přístup.

V poděkování nesmím opomenout i další kolegy z Katedry experimentální biologie rostlin, kteří mi byli jakkoliv nápomocni – Mgr. Eva Husáková, RNDr. Lenka Havelková, Ph.D., Mgr. Ivan Kulich, Mgr. Radek Bezvoda, Mgr. Stanislav Vosolsobě a mnozí další.

Můj velký obdiv, úctu a dík si zaslouží také mí rodiče a prarodiče za finanční i psychickou podporu, sestra za odborné konzultace a kamarádi za podporu morální.

Diplomová práce byla vypracována v rámci Výzkumného centra MŠMT LC06004 – Integrovaný výzkum rostlinného genomu.

Obsah

Obsah	6
Seznam použitých zkratek	8
Abstrakt a klíčová slova	10
Abstract and key words	11
1. Úvod	12
1.1. Cíle.....	14
2. Literární přehled	15
2.1. RNAi u rostlin	15
2.1.1. Umlčování transgenů u rostlin.....	15
2.1.2. Chromatin a jeho modulace.....	17
2.1.2.1. Epigenetické modifikace histonů.....	17
2.1.2.2. Epigenetické modifikace DNA.....	19
2.1.3. Základní mechanismus RNAi	20
2.1.3.1. Hlavní komponenty RNAi.....	21
2.1.3.1.1. dsRNA a její vznik	21
2.1.3.1.2. Malé RNA.....	22
2.1.3.1.3. Proteiny rodiny Argonaut	25
2.1.3.1.4. Proteiny rodiny Dicer	26
2.1.3.1.5. DNA dependentní RNA polymerázy IV a V.....	27
2.1.3.2. Typy RNAi	28
2.1.3.2.1. PTGS – štěpení RNA či blokování translace.....	28
2.1.3.2.2. TGS – Metylace DNA řízená malými RNA (RdDM).....	29
3. Materiál a metody	31
3.1. Biologický materiál a jeho kultivace	31
3.1.1. <i>Escherichia coli</i> kmen DH5α	31
3.1.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> kmen C58C1Rif ^R	31
3.1.3. Tabáková linie BY-2 (<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. 'Bright Yellow')	32
3.1.4. Lilek brambor (<i>Solanum tuberosum</i> L. cv. 'Désirée').....	32
3.2. Plazmidy	33
3.3. Média	36
3.4. Metody.....	40

3.4.1. Transformace biologického materiálu.....	40
3.4.1.1. Příprava elektrokompetentních buněk <i>Escherichia coli</i>	40
3.4.1.2. Příprava elektrokompetentních buněk <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ...	41
3.4.1.3. Transformace bakterií	41
3.4.1.4. Transformace tabákové buněčné linie BY-2.....	42
3.4.1.5. Transformace rostlin bramboru (<i>Solanum tuberosum</i>) infiltrací	43
3.4.2. Práce s DNA.....	44
3.4.2.1. Izolace plazmidové DNA.....	44
3.4.2.2. Restrikční štěpení	45
3.4.2.3. Agarózová gelová elektroforéza	46
3.4.2.4. Izolace DNA fragmentu z agarózového gelu	47
3.4.2.5. Měření koncentrace DNA	48
3.4.2.6. Ligace.....	49
3.4.2.7. Odsolení ligační směsi	49
3.4.2.8. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	50
3.4.2.9. TA-klonování	51
3.4.2.10. Sekvence.....	51
3.4.3. <i>De novo</i> regenerace rostlin bramboru po ošetření 5-azacytidinem	52
3.4.4. Test kanamycinové rezistence.....	53
3.4.5. Reaktivace exprese po ošetření 5-azacytidinem.....	53
3.4.6. Tvorba obrazových dat.....	53
4. Výsledky	54
4.1. Příprava genových konstruktů.....	54
4.2. Hodnocení míry umlčování transgenů.....	59
4.3. Příprava transgenní linie s jednou kopií T-DNA náchylnou k umlčení.....	64
4.4. Vliv kultivačních podmínek a ošetření na indukci umlčování.....	68
5. Diskuze.....	78
5.1. Závislost míry umlčování transgenů	78
5.2. Příprava transgenní linie náchylné k umlčování, s jednou kopií T-DNA.....	80
5.3. Posouzení vlivu kultivačních podmínek a ošetření na indukci umlčování	82
5.4. Budoucnost RNAi	85
6. Závěry	87
7. Použitá literatura	89

Seznam použitých zkratk

AGO	Argonaut
AT	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
AzaC	5-azacytidin
CDGS	umlčování genů závislé na chromatinu
CMT3	chromometyltransferáza 3
CWS	roztok na promývání kolonek
dH ₂ O	destilovaná voda
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP's	deoxyribonukleotidy
DRM1 a 2	varianty <i>de novo</i> metyltransferáz s přeskupenými doménami
dsRNA	dvouvláknová ribonukleová kyselina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E-GFP	varianta zeleného fluorescenčního proteinu se zesílenou fluorescencí
EtOH	etanol
GLU	glukóza
HP1	protein 1 asociovaný s heterochromatinem
Kyp	histonová metyltransferáza KRYPTONITE
MCS	mnohočetné klonovací místo
MET1	metyltransferáza 1
miRNA	mikro RNA
mRNA	mediátorová RNA
nt	nukleotid
NPTII	neomycin fosfotransferáza
OD	optická denzita
PCR	polymerázová řetězová reakce
piRNA	PIWI interagující RNA
PTGS	posttranskripční umlčení exprese genu
RdDM	metylace DNA řízená malými RNA
RdRP	RNA dependentní RNA polymeráza
RISC	umlčovací komplex indukovaný malými RNA

RITS	transkripční umlčovací komplex indukovaný malými RNA
RNA	ribonukleová kyselina
RNAi	RNA interference
RPM	otáčky za minutu
RS-GFP	zelený fluorescenční protein s posunutým excitačním maximem do červené oblasti
SAM	S-adenozyl-L-metionin
sRNA	malá ribonukleová kyselina
siRNA	malé interferující ribonukleové kyseliny o délce 20-25 nukleotidů
T-DNA	transferová DNA odvozená od plazmidu <i>Agrobacterium tumefaciens</i> indukujícího nádory
TGS	transkripční umlčení exprese genu
Tris	tris-hydroxymetyl-aminometan
TRSV	virus kroužkovitosti tabáku
UV	ultrafialové záření

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 transgenů, 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 transgenů u linií, které jsou k umlčení náchylné. To by umožnilo ihned po transformaci selektovat linie stabilní v expresi transgenů, resp. linie se sníženým rizikem pozdějšího umlčení transgenů, 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 transgenů, tak i vystavení stresovým podmínkám na míru umlčování vnesených genů. Přechod rostlin brambor přes stádium hlízy nevyvolal žádné změny v expresi transgenů. 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

Abstract

Accidental discovery of RNA interference in plants a few decades ago and its description by Fire et al. (1998) brought a real revolution in molecular biology and in many other branches of biology. Researchers have uncovered a large and unexpected mechanism of regulation of gene expression at many levels in almost all studied eukaryotes. The first studies have revealed silencing of both exogenous and endogenous genes in plants. So, it soon became clear that this process serves to organisms not only in the defense against viruses, but also against mobile genetic elements as well as in modulation of expression own genes. The key role in all RNAi mechanisms is played by dsRNA that is processed into small RNAs. In association with a number of other proteins, small RNAs can direct either cleavage of complementary or nearly complementary mRNAs or block their translation in the process of posttranscriptional gene silencing (PTGS). Additionally, sRNAs can affect gene expression at transcriptional level *via* modifying DNA in a process called RNA dependent DNA methylation (RdDM).

In plant transformation, RNAi cause variability amongst transgene lines and instability in the expression of introduced genes, which complicates the use of transgenic lines, because many biotechnological approaches require a defined stable transgene expression.

The main aim of the thesis was to evaluate the impact of selected factors on the degree of silencing of transgene expression and to find such conditions or treatments, which would cause rapid silencing of the transgene expression in lines that are prone to silence. This would select immediately after transformation the lines with stable transgene expression, which is very desirable for both basic and applied research. The materials for this research were transgenic potato lines with silenced, restored *GFP* and long-term stable *GFP* expression and tobacco cell line BY-2, which was transformed with newly prepared constructs.

In the frame of the master thesis, the impact of the transgene coding sequence on silencing was proven by comparing the *GFP* fluorescence in BY-2 lines transformed with prepared constructs. The rate of transgene silencing was also affected by exposure to stress conditions during potato *de novo* regeneration. The transition of potato plants through the dormant tuber stage did not reveal any changes in the expression of the transgene. Reactivation of expression from silenced transgenic single-copy line of potato was successful only for the *NPTII* gene. Only temporary restoration of expression was seen in the case of *GFP*.

Keywords: RNA interference, PTGS (posttranscriptional gene silencing), TGS (transcriptional gene silencing), tobacco BY-2 cell line, *Solanum tuberosum*, RdDM (RNA-directed DNA methylation), GFP, transgene silencing

1. Úvod

Lidstvo je odedávna životně závislé na rostlinách. Když pomíneme jedny z nejvýznamnějších přínosů rostlin pro lidstvo a vůbec celou planetu – primární produkci organických látek a tvorbu kyslíku, jsou rostliny účastny v koloběžích řady prvků, důležitým zdrojem stavebních materiálů, tkanin, léků, paliv, barviv, papíru, vonných olejů, pryskyřic, zdrojem koření, potravy, slouží jako krmivo. Vzdávající lidská populace vyžaduje i rostoucí produkci plodin. Ta je ovšem v současnosti limitována nedostatkem orné půdy, vody, řadou biotických a abiotických faktorů, změnami klimatu a i výnosností současných odrůd. Jednou z možností jak zvýšit výnos, odolnost a kvalitu plodin je šlechtění nových odrůd.

Klasické metody šlechtění jsou zdoluhavé a pracné, nepřinášejí často kýžený efekt a mají svá omezení (fyziologická a genetická). Další možností je šlechtění s využitím metod genového inženýrství. Tyto precizní techniky rekombinantní DNA umožňují překonat řadu úskalí klasického šlechtění – dovolují nám např. cíleně vnášet do rostlin znaky z jiných druhů, rodů, nebo i dokonce říší. Rostliny tak najednou mohou získat úplně nové zajímavé vlastnosti.

Transgenní rostliny nejsou ovšem využívány pouze v zemědělství, ale slouží také jako velice dobrý nástroj pro základní výzkum – při studiu interakcí proteinů, dynamiky struktur, funkce genů atd.

Po transformaci rostlin určitým konstruktem lze v odvozených liniích sledovat značnou variabilitu v expresi vloženého genu. U řady linií je exprese záhy umlčena či snížena, u jiných k ní dochází v průběhu času a některé linie exprimují gen dlouhodobě stabilně. Tento proces je do značné míry ovlivněn náhodným začleňováním T-DNA do genomu rostliny, počtem začleňovaných kopií, ale i charakterem vnášené T-DNA (De Bolle *et al.*, 2003; shrnuto v Butaye *et al.*, 2005).

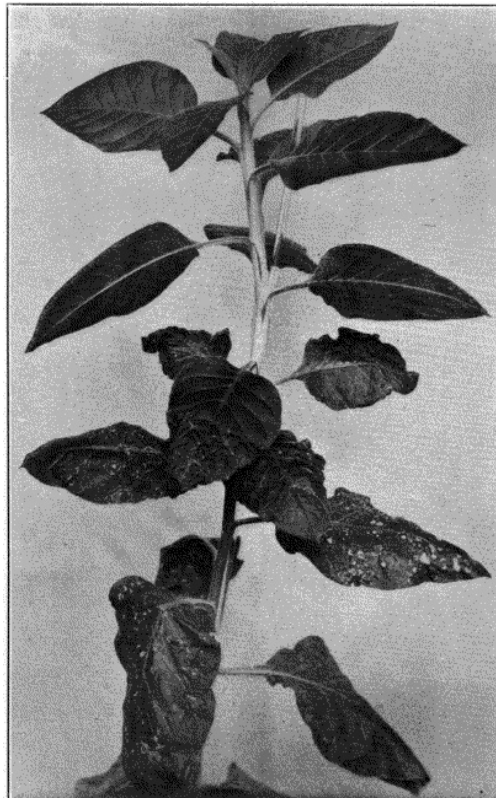
Míra exprese genů je ovlivněna procesem tzv. RNA interference (RNAi). Při RNAi dochází k modulaci aktivity genů (vlastních i cizorodých) prostřednictvím malých RNA (sRNA) o délce ~20-31 nukleotidů (Moazed, 2009; shrnuto v Jagtap *et al.*, 2011).

Napoli *et al.* objevili fenomén RNAi v roce 1990 při studiích overexprese chalkonsyntázy (jeden z klíčových enzymů syntézy antokyanů) v rostlinách petunie. Květy transgenních rostlin vykazovaly bílou či chimerickou barvu namísto

očekávaného tmavě fialového zbarvení květů, právě díky blokování exprese endogenního homologního genu tzv. kosupresí. Za skutečně první pozorování RNAi u rostlin však můžeme považovat již studii Wingarda (1928) dokumentující vliv infekce viru kroužkovitosti tabáku (TRSV) na rostliny. Rostliny tabáku infikované TRSV vykazovaly na diferencovaných listech těžké příznaky napadení, naproti tomu nově narostlé listy z nemocných rostlin byly zcela bez příznaků, odolné vůči sekundární infekci TRSV (viz obr. č. 1.1.). Wingard tento jev popsal jako získání imunity vůči viru. V té době nebyly známy ani nukleové kyseliny jako zdroj genetické informace. Nyní víme, že šlo o RNA umlčování cílené specificky na virovou RNA.

Procesy založené na RNAi byly popsány v roce 1992 Romanem *et* Macinem i u hub a v roce 1998 Firem *et al.* u živočichů – konkrétně u háďátka *Caenorhabditis elegans*. A. Fire v roce 1998 současně poprvé použil termín RNA interference a za své objevy, především klíčovou roli dsRNA v indukci umlčování genové exprese, získal spolu s C. Melem v roce 2006 Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu.

Předkládaná diplomová práce navazuje na experimentální práci RNDr. Evy Nocarové, Ph.D., bývalé členky našeho týmu Buněčné biologie a biotechnologie rostlin Katedry experimentální biologie rostlin PřF UK. Pohnutkou pro hlubší studium RNA interference bylo pozorované umlčování exprese genů pro *GFP* a *NPTII* v některých transgenních liniích lilku bramboru a buněčné linie BY-2.



Obr. 1.1.: Rostlina tabáku 23 dní po inokulaci TRSV. Převzato z: Wingard, 1928.

1.1. Cíle

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 transgenů u linií, které jsou k umlčení náchylné. To by umožnilo ihned po transformaci selektovat linie stabilní v expresi transgenů, resp. linie se sníženým rizikem pozdějšího umlčení transgenů, což je velmi žádoucí jak pro základní tak i aplikovaný výzkum. Dílčími cíli práce bylo:

- 1) Vysledovat závislost a míru umlčování transgenů na uspořádání T-DNA a charakteru transgenů
 - připravit několik variant expresních konstruktů
 - transformovat připravenými konstrukty tabákovou linií BY-2 a vzájemně porovnat míru umlčování
- 2) Získat transgenní linii lilku bramboru s jednou kopií T-DNA, která bude náchylná k umlčování vnesených genů
 - regenerací *de novo* (po ošetření 5-azacytidinem) získat linie s obnovenou expresí umlčených transgenů od jednokopiové linie R28
 - prozkoumat aktuální stav exprese transgenů u jednokopiové linie R25
- 3) Posoudit vliv kultivačních podmínek a ošetření na indukci umlčování exprese transgenů u linie náchylné k umlčení
 - aplikovat stresové podmínky během regenerace *de novo* a posoudit míru umlčování u regenerovaných rostlin
 - sledovat vliv přechodu rostlina – hlíza – rostlina na indukci umlčování
 - připravit konstrukt pro cílenou indukci umlčování exprese RS-GFP a zavést metodu infiltrace *in vitro*

2. Literární přehled

2.1. RNAi u rostlin

RNAi je prastarým regulačním mechanismem rozšířeným s menšími výjimkami napříč všemi eukaryotickými organizmy. U rostlin hraje velmi významnou roli v obraně proti invazním nukleovým kyselinám, jako jsou viry, transpozony či transgeny, podílí se na regulaci exprese rostlinných genů (v průběhu ontogeneze, odpovědi na stres...) a udržuje heterochromatinové oblasti (Vance *et Vaucheret* 2001; Baulcombe, 2004; Borsani *et al.*, 2005; Vrbsky *et al.*, 2010).

U rostlin se podle Baulcombea (2004) vyskytuje umlčování genů na základě RNAi nejméně na třech různých úrovních: (i) cytoplazmatické umlčování prostřednictvím dsRNA, vyúsťující ve štěpení komplementární mRNA, známé jako posttranskripční umlčování (dále jen PTGS); (ii) umlčování endogenních mRNA komplementárními miRNA (negativně regulující genovou expresi) štěpením této mRNA či blokováním translace; (iii) umlčování genů asociované se sekvenčně specifickou metylací DNA vedoucí v potlačení transkripce – transkripční umlčování (TGS).

RNA interference znesnadňuje práci genových inženýrů umlčováním vnášených transgenů (Hobbs *et al.*, 1990; Neuhaus *et al.*, 1991; Eamens *et al.*, 2008 a mnozí další). Její detailní pochopení – jednotlivých drah, interaktorů a spouštěcích signálů by mohlo umožnit vědcům umlčování předcházet.

Na druhou stranu může být tento mechanismus využit v základním výzkumu pro studium funkce genů jejich vyřazením (reverzní genetika) na základě znalostí fungování RNAi či jako zajímavý nástroj v rostlinných biotechnologiích (např. ke kosupresím).

2.1.1. Umlčování transgenů u rostlin

Prvními zmínkami o umlčování exprese transgenů u rostlin jsou studie popisující kosupresi – tedy umlčení endogenního genu navozené vnesením téhož genu pod kontrolou silného promotoru, jako v již zmiňované práci Napoli *et al.* (1990). Neuhausa s kolegy (1991) prováděli cisgenní transformaci¹ rostlin tabáku genem, jenž

¹**Cisgenní transformace** – transformace rostliny pomocí DNA z téhož druhu či druhu blízké příbuzného, se kterým se daný druh dá křížit klasickými metodami šlechtění.

je za normálních okolností v rostlinách exprimován s nízkou hladinou. Transformací rostlin konstruktem s tímto genem pod kontrolou silného CaMV 35S promotoru byly získány cisgenní linie nejen s mnohem vyšší hladinou exprese sledovaného genu než divoká forma, ale i rostliny s nulovou hladinou exprese genu. Autoři spekulovali nad inhibicí exprese endogenu transgenem. Spektrum transgenických linií s vysokou hladinou exprese transgenu až po linie s expresí nulovou jsou získávány i při použití cizorodých genů.

U rostlin dochází k umlčování transgenů na úrovni transkripční (TGS – nevzniká mRNA transkript) a posttranskripční (PTGS – vzniká mRNA transkript, ale nevzniká protein). Při PTGS je ovlivňována míra exprese transgenu štěpením mRNA či blokováním translace mRNA. TGS brání vzniku transkriptu modifikací chromatinu, která bývá doprovázena metylací DNA v promotorové oblasti cílového genu. Nejprve se zdálo, že jsou oba jevy odděleny – umlčování na transkripční úrovni se odehrává v jádře, posttranskripční v cytoplazmě (Vaucheret *et Fagard*, 2001; více v kapitolách 2.1.2. a 2.1.3.). Záhy se však prokázalo, že i) jsou oba děje vzájemně propojeny, ii) umlčování na posttranskripční úrovni může časem přejít na úroveň transkripční (Vance *et Vaucheret*, 2001; Fojtová *et al.*, 2003; Nocarová *et al.*, 2010), iii) některé složky PTGS jsou lokalizovány v jádře (Mello *et Conte*, 2004).

Řada studií ukazuje, že umlčování transgenů je nejčastěji závislé na míře exprese transgenu (Que *et al.*, 1997; De Bolle *et al.*, 2003;), místě jeho začlenění (van Blokland *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2007), počtu vnesených kopií (Hobbs *et al.*, 1990; Nocarová *et al.*, 2010) či uspořádání T-DNA (např. Tavernarakis *et al.*, 2000).

PTGS je mnohem efektivněji spouštěno, je-li transgen pod kontrolou silného promotoru. Míra exprese totiž souvisí s náhodnou tvorbou aberantních transkriptů (bez 7mGpppN čepičky a především bez poly-A konce), jež jsou rozpoznávány RNA dependentní RNA polymerázou (RdRP – u huseníčku izoformou RDR6), která vytváří komplementární vlákno k aberantním RNA za vzniku dsRNA (Luo *et Chen*, 2007). Štěpením dsRNA enzymem DCL vznikají malé RNA účastníci se všech procesů RNAi (detaily viz kap. 2.1.3.).

Začlenění transgenu do genomu je v případě přenosu T-DNA agrobaktériem zcela náhodné (jak co do místa inserce, tak i počtu vnesených kopií), což vede k možnosti vložení transgenu do kompaktních oblastí chromatinu s nízkou či nulovou expresí (Kim *et al.*, 2007; více viz následující kap. 2.1.2.). Vliv počtu začleněných kopií

na míru umlčování souvisí jednak s možností tvorby invertovaných repetic v případě začlenění více kopií na genom (Muskens *et al.*, 2000) a jednak s celkovou hladinou exprese. V případě invertovaných repetic vzniká transkripční rovnou vláseňková RNA schopná spuštění umlčování (viz kap. 2.1.3.).

2.1.2. Chromatin a jeho modulace

Genetická informace je v buňkách uložena ve formě DNA zabudovaná do struktury chromatinu. Základní kondenzační jednotkou chromatinu všech eukaryot je nukleozom, skládající se z DNA o délce 146 bp a oktameru vždy dvou histonových proteinů H2A, H2B, H3 a H4. Jednotlivé nukleozomy jsou pak dále sbaleny pomocí internukleozomálního histonu H1. Existuje i řada dalších specifických variant histonových proteinů charakteristická pro různé druhy a různé oblasti chromatinu. Význam nukleozomů pro genom není pouze strukturní (kompaktace DNA, rozmístění chromatinu v rámci jádra, replikace...), ale i funkční (modulace genové exprese, parentální imprinting...). Charakter histonových proteinů a uspořádání DNA v rámci chromatinu umožňuje měnit strukturu chromatinu modifikacemi jak histonových proteinů, tak i DNA, a tím i modulovat přístupnost DNA pro další interakční proteiny (transkripční faktory apod.). Modifikace DNA totiž často vede k odpovídající modifikaci histonových proteinů a naopak (Cedar *et Bergman*, 2009). Tyto tzv. epigenetické modifikace jsou součástí širokého souboru mechanismů, které dědičně ovlivňují genovou expresi, ovšem beze změny primární sekvence DNA. Jsou tak dalším zdrojem informací, mimo vlastní sekvenci DNA (Law *et Jacobsen*, 2010).

Obecně jsou rozeznávány dvě formy chromatinu – euchromatin (rozvolněný, transkripčně velmi aktivní) a heterochromatin (kondenzovaný, transkripčně méně aktivní, DNA je často metylována; Zaratiegui *et al.*, 2007).

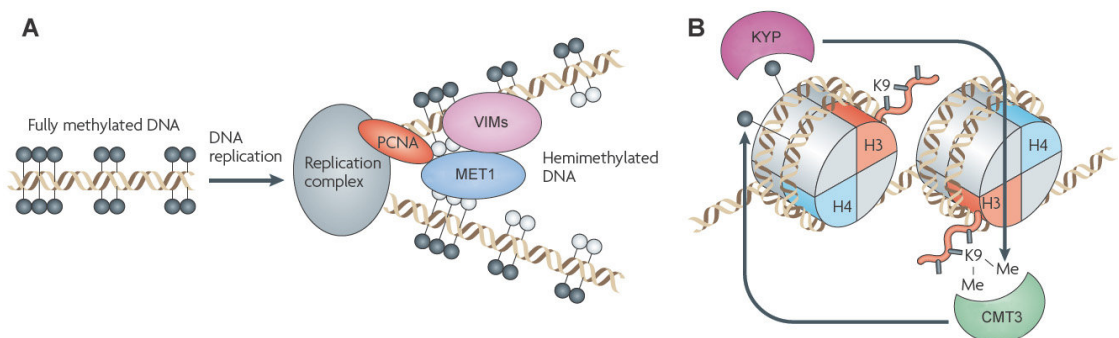
2.1.2.1. Epigenetické modifikace histonů

Histony hrají zásadní roli v modulaci DNA. Z evolučního hlediska jsou velice konzervované. Bazická povaha velké části jejich aminokyselin (bohatý výskyt Arg, Lys) umožňuje neutralizovat kyselý charakter DNA a vinout tak vlákna DNA na nukleozomu blízko u sebe. Modifikace histonů, způsobující jejich zásadní konformační změny, je umožněna díky aminoterminálním koncům čnicím

z nukleozomů. Ty jsou pomocí řady enzymů epigeneticky modifikovány acetylací, ADP-ribozylací, fosforylací, metylací, sumoylací či ubiquitinací.

Z řady studií na modelových organizmech vyplývá, že všechny tyto histonové modifikace ovlivňují expresi příslušných genových oblastí (Rea *et al.*, 2000; Lachner *et al.*, 2001; Jackson *et al.*, 2002). Např. acetylace, fosforylace či ubiquitinace většinou genovou expresi aktivuje, naproti tomu di(/tri)metylace lyzinu 9 či 27 na histonu 3 (tzv. H3K9 či H3K27) či deacetylace vede k represi chromatinu (Cedar *et Bergman*, 2009; Chinnusamy *et Zhu*, 2009). Metylace H3K9 provádí specifická metyltransferáza huseníčku – KRYPTONITE (dále jen Kyp), pro níž je metylačním signálem metylovaná DNA v CpHpG (H = nukleosidy A/T/C; p=fosfát) sekvencích (viz také obr. 2.1.; Malagnac *et al.*, 2002; Jackson *et al.*, 2004; Mathieu *et Bender*, 2004). Deacetylaci zprostředkovává histon deacetyláza 6 (HDA6; Aufsatz *et al.*, 2002). Jak Kyp, tak i HDA6 se účastní RdDM (více v kap. 2.1.3.2.2.; Chinnusamy *et Zhu*, 2009).

Je známo, že v průběhu replikace DNA jsou histonové proteiny rovnoměrně rozděleny mezi obě dceřiná vlákna (Sogo *et al.*, 1986). Tento proces umožňuje zachovat informaci o modifikaci histonů a hovoříme zde o tzv. epigenetické dědičnosti chromatinového stavu. Kupříkladu již několikrát zmiňovaná metylace H3K9 vytvářející vazebná místa pro řadu proteinů je tak v průběhu replikace zachována na obou vláknech DNA a posléze může sloužit jako značka pro znovuoobnovení modifikačního vzoru prostřednictvím proteinů modulujících chromatin i DNA (viz obr. 2.1.; Moazed, 2009).

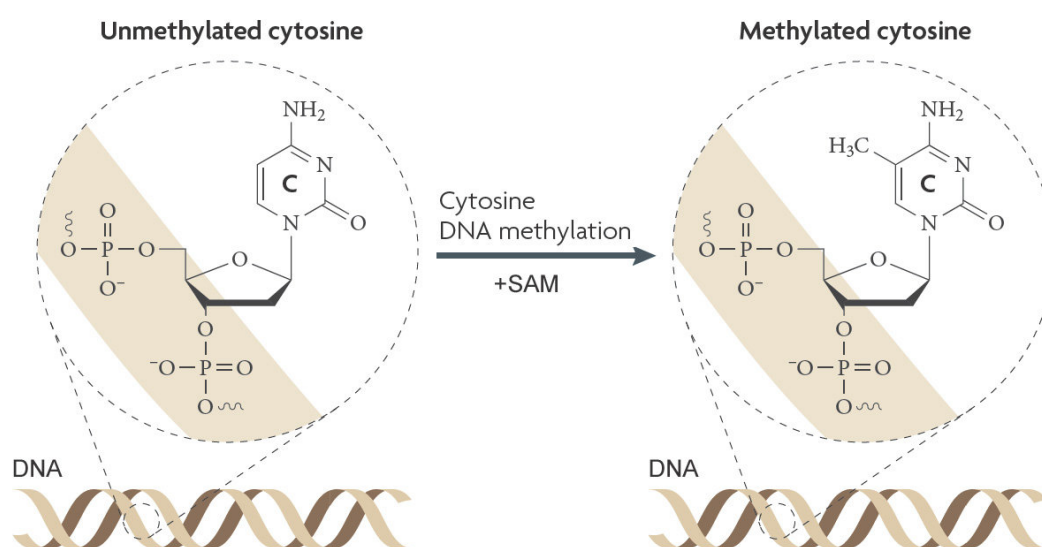


Obr. 2.1.: **Udržovací metylace DNA po její replikaci.** (A) Metylace palindromatických CpG sekvencí u rostlin. (B) Metylace CpHpG sekvencí u rostlin. Převzato z: Law *et Jacobsen*, 2010, upraveno.

2.1.2.2. Epigenetické modifikace DNA

Jednou z epigenetických, evolučně velmi prastarých modifikací chromatinu u eukaryot je metylace DNA (cytozinů; obr. 2.2.), jíž zpravidla doprovází i umlčováním genové exprese (Law *et Jacobsen*, 2010). Je zprostředkována malou skupinou konzervovaných proteinů zvaných DNA cytozin-5-metyltransferázy, jež přenášejí metylovou skupinu z S-adenozyl-L-metioninu (SAM) na C5 uhlík pyrimidinového kruhu cytozinu. Cílovými oblastmi metyltransferáz mohou být jak symetrické (CpG či CpHpG), tak i nesymetrické (CpHpH) sekvence. Tato drobná hydrofobní úprava DNA značně ovlivňuje charakter chromatinu. Je signálem pro vazbu metyl-DNA vazebných proteinů, které zprostředkovávají vazbu proteinů modifikujících histony. Jako příklad může sloužit umlčení genů na základě kompaktace DNA do heterochromatinu – rostlinám specifická chromometyltransferáza 3 (CMT3) interaguje s HP1, jehož chromodoména se váže na di/trimetylovaný lyzin 9 na histonu 3 (H3K9) a současně asociuje s Kyp (viz kap. 2.1.2.1., obr. 2.1.B). Tzn. že metylace DNA pomocí CMT3 může vést k metylaci H3K9 (Kyp) a naopak (Johnson *et al.*, 2002; Malagnac *et al.*, 2002).

Metylace DNA slouží k regulaci mobilních genetických elementů, cizorodých DNA (viry, transgeny), inaktivaci jednoho z chromozomů X u savců a v neposlední řadě ovlivňuje expresi vlastních genů v průběhu ontogeneze (Holliday *et Pugh*, 1975; Ratcliff *et al.*, 1997; Colot *et Rossignol*, 1999).



Obr. 2.2.: Metylace cytozinů v DNA. Převzato z: Law *et Jacobsen*, 2010, upraveno.

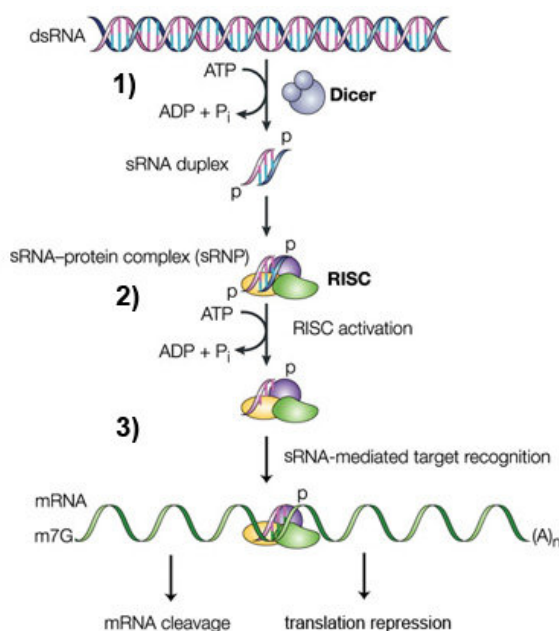
U huseníčku je udržovací metylace palindromatických CpG sekvencí při replikaci zajišťována metyltransferázou 1 (MET1), za spoluúčasti komplexu modulujícího nukleozomy. Metyltransferázy DRM1 a 2 zprostředkovávají *de novo* metylaci všech sekvencí a současně udržovací metylaci CpHpH sekvencí. Již dříve zmíněná CMT3 udržuje navíc spolu s DRM2 metylace CpHpG sekvencí (Cao *et Jacobsen*, 2002; Chan *et al.*, 2005). Celkově je podle studie Cokus *et al.* (2008) u huseníčku metylováno 24 % všech CpG sekvencí, 6,7 % všech CpHpG sekvencí a pouze 1,7 % CpHpH. Co se týče metylace oblastí kódujících geny (včetně pseudogenů a neexprimovaných genů) prokázal výzkum Zhanga *et al.* (2006) na huseníčku, že 61,5 % všech genů je nemetylováno, 5,2 % genů má metylováno pouze promotor a 33 % genů má metylovány kódující oblasti, nikoliv však promotorové. Methylace DNA v kódující oblasti zpravidla nevede k umlčení transkripce a její význam zatím není zcela jasný, naproti tomu metylace promotorových oblastí znamená okamžitou transkripční inaktivaci (Fojtova *et al.*, 2003).

Primární metylace kódující sekvence ale může být rozšířena mechanismem RdDM (methylace DNA řízená malými RNA) i na oblast promotorovou a pak dochází k umlčení exprese příslušného genu (Daxinger *et al.*, 2009; více v kap. 2.1.3.2.2.).

2.1.3. Základní mechanismus RNAi

Základní mechanismus RNAi může být rozdělen přibližně do tří vzájemně navazujících kroků (viz. obr. 2.3.). Prvním krokem je štěpení dvouvláknové RNA extracelulárního či intracelulárního původu pomocí enzymů s RNázovou aktivitou – Diceru (u rostlin Dicer-like, DCL). Činností tohoto proteinu vznikají krátké nekódující dvouvláknové sRNA o přibližné délce 20-31 nt. Ve druhém kroku procesu RNAi jsou tyto sRNA rozvinuty a jedno z vláken je preferenčně vázáno do komplexu s proteinem Argonaut. Následně, ve třetím kroku, tento efektorový komplex hledá mezi molekulami RNA přítomnými v buňce potenciální cíle svého účinku – molekuly komplementární k jednovláknové malé RNA – tzv. vodící RNA nesené Argonautem. Po interakci může komplex cílovou RNA rozštěpit (endonukleázovou aktivitou proteinu Argonaut), blokovat transkripci či indukovat metylaci templátové DNA. Tímto způsobem řídí vodící RNA sekvenční specifitu všech procesů RNAi (Meister *et Tuschl*, 2004; Moazed *et al.*, 2009; Siomi *et Siomi*, 2009).

V různých organizmech jsou do procesu RNAi zapojeny víceméně různé proteiny, které ovšem překvapivě často fungují na dost podobných principech. Ve všech dosud studovaných organizmech slouží k RNAi dva hlavní komponenty – malé RNA, které zodpovídají za specifitu odpovědi a proteiny rodiny Argonaut (AGO), které provádí vlastní represi (Siomi *et* Siomi, 2009). Spojení RISC komplexu s cílovou mRNA může, v závislosti na povaze AGO či míře komplementarity mezi malou RNA a cílovou mRNA, kontrolovat syntézu proteinů či stabilitu mRNA, podporovat integritu genomu nebo produkovat specifickou sadu sekundárních malých RNA (Meister *et* Tuschl, 2004; Hutvagner *et* Simard, 2008).



Obr. 2.3.: **Základní mechanismus RNAi.**

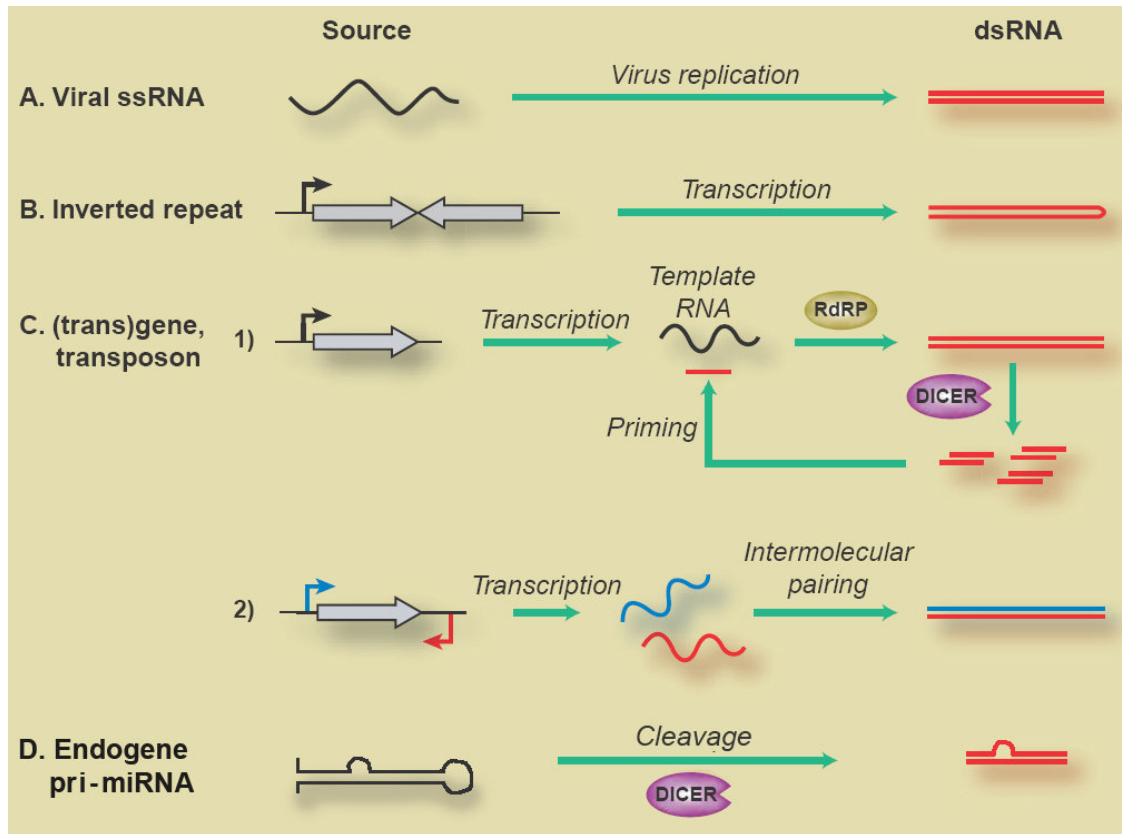
Převzato z: Dykxhoorn *et al.*, 2003, upraveno.

2.1.3.1. Hlavní komponenty RNAi

2.1.3.1.1. dsRNA a její vznik

Klíčovým rysem spojujícím všechny úrovně RNAi u různých organismů je dsRNA, sloužící jako spouštěcí impuls či prostředník. Dlouhá dsRNA může vznikat několika různými cestami (viz obr. 2.4.): i) z jednovláknových RNA sense a antisense orientace, které asociují za vzniku dsRNA (např. v případě virových RNA asociací plus a minus vláken); ii) přepisem DNA obsahující invertované repetice za vzniku vlásková RNA; iii) z dsRNA může být tvořena i pomocí RdRP (chybí u savců či octomilky) při virové replikaci či endogenními enzymy z nejrůznějších poškozených transkriptů (Dalmay *et al.*, 2000; Moazed, 2009). Tento mechanismus je také uváděn jako stěžejní pro tvorbu dsRNA z transgenů, kdy vinou silného promotoru

mohou vznikat neterminované (aberantní) transkripty (Luo *et* Chen, 2007). Dvouvláknová RNA může být ale i exogenního původu, jako tomu bylo např. ve sčěžjší studii Fireho *et al.*, 1998.



Obr. 2.4.: Vznik dsRNA. Převzato z: Mathieu *et* Bender, 2004, upraveno.

2.1.3.1.2. Malé RNA

Jednou z hlavních komponent procesu RNA interference jsou malé RNA. Jsou to právě ony, které zodpovídají za specifitu RNAi na základě komplementarity s cílovou RNA. Jejich členění se liší podle různých autorů, nejčastěji se dělí podle původu jejich prekurzoru. Moazed ve své studii z roku 2009 rozděluje malé RNA do 3 různých tříd – na malé interferující (siRNA), microRNA (miRNA) a živočichům specifické PIWI interagující RNA (piRNA) – viz tab. 2.1. Štěpením dlouhé dsRNA virového či jiného původu vznikají siRNA, zatímco zpracováním endogenní, genomem kódované vlásenkové struktury (pre-miRNA) vznikají miRNA. piRNA vyskytující se u živočichů (Carmell *et al.*, 2002) byly více prozkoumány teprve nedávno pomocí moderních vysoce paralelních sekvenačních metod Girardem *et al.* (2006). Jejich vznik dosud není plně pochopen (Gan *et al.*, 2011). Dále se malé RNA vzájemně liší

i svou délkou – siRNA jsou nejčastěji 21-25 nt dlouhé, miRNA 20-24 nt a délka piRNA se pohybuje v rozmezí 21-31 nt (Bernstein *et al.*, 2001; Girard *et al.*, 2006; Voinnet, 2009).

Obecnou vlastností všech malých RNA je, že interagují s proteiny rodiny Argonaut, jež jsou zřejmě základem všech výkonných komplexů RNAi – komplexu RISC, respektive jeho jaderné formy RITS, objevené Verdelem *et al.* (2004) u *Saccharomyces pombe*, miRNP a dalších (Meister *et Tuschl*, 2004; Siomi *et Siomi*, 2009).

Tab. 2.1.: Rozdělení malých RNA a jejich účast na RNAi. Převzato z: Moazed, 2009.

malá RNA	přibližná velikost (nukleotidy)	mechanismus účinku	výskyt v eukaryotech
siRNA	21-24	PTGS (degradace RNA či blokování translace) CDGS	rostliny, nálevníci, živočichové, houby
miRNA	20-24	PTGS (degradace RNA či blokování translace) CDGS	rostliny, živočichové
piRNA	21-31	PTGS (degradace RNA) CDGS (velmi málo)	živočichové

❖ Biogeneze siRNA (viz obr. 2.5.)

Tyto ~21-24 nt dlouhé nekódující RNA s fosfáty na obou 5' koncích a hydroxylovými skupinami spolu s 2nt přesahy na 3' koncích vznikají, jak již bylo zmíněno výše, štěpením dvouvláknové RNA (Siomi *et Siomi*, 2009). Enzym Dicer (u rostlin Dicer-like) obsahuje mimo jiné PAZ doménu, jíž rozpoznává 3' a 5' konce dsRNA, kterou následně štěpí v charakteristické vzdálenosti od konců. Posléze se podílí na navázání jednoho vlákna vznikuvší siRNA do proteinového komplexu RISC (shrnuto v MacRae *et al.*, 2007).

Zdroje dsRNA pro siRNA jsou velice variabilní – vznikají replikací virů, transkripcí invertovaných repetit, konvergentní transkripcí transpozonů či transgenů (viz obr. 2.4. – var. A, B, C), popř. pomocí RdRP syntézou komplementárního vlákna k ssRNA. Templátem pro RdRP může být aberantní transkript či produkt rostlinám specifické DNA dependentní RNA polymerázy IV (Pol IV; viz kap. 2.1.3.1.5.). Vzhledem ke svému původu a účasti na určitém typu RNAi se někdy endogenní siRNA dále člení na i) heterochromatinové siRNA (hc-siRNA) spouštějící TGS;

ii) *in trans* působící siRNA (ta-siRNA) indukující hlavně PTGS; iii) siRNA odvozené od přirozených antisense transkriptů (nat-siRNA) spouštějící také hlavně PTGS.

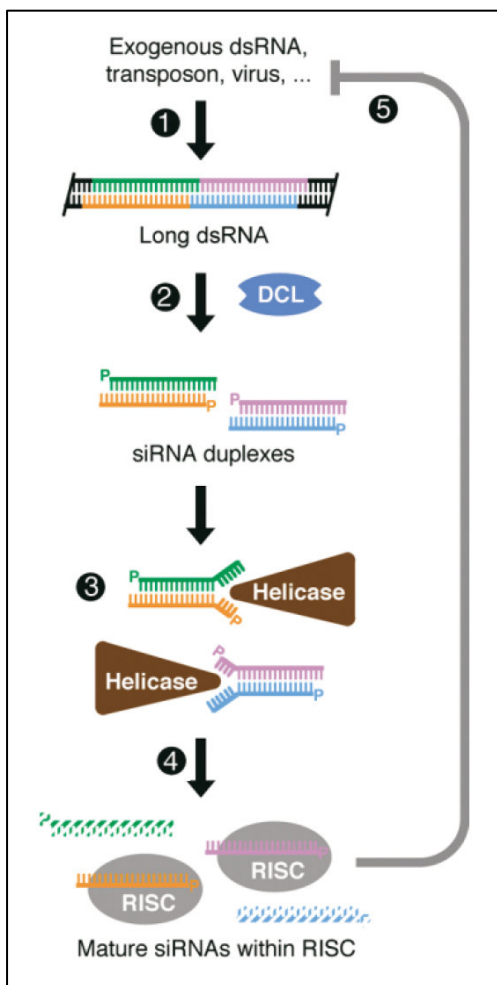
Malé interferující RNA zpravidla regulují genovou expresi *in cis*, tzn., že ovlivňují lokus, ze kterého vznikají, ale mohou ovlivňovat i lokusy homologní, a to jak na úrovni transkripční (methylace DNA) tak i posttranskripční (štěpení transkriptu či blokování syntézy proteinu; Moazed, 2009).

❖ **Biogeneze miRNA** (viz obr. 2.6.)

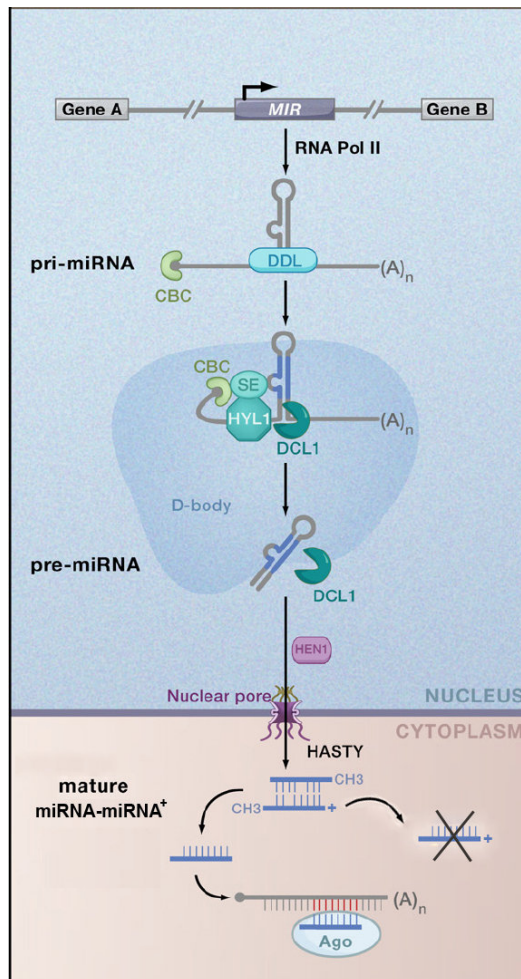
Délka miRNA se pohybuje přibližně v rozmezí 20-24 nt (Voinnet, 2009). Jejich biogeneze se od biogeneze siRNA značně liší. Primární prekurzory pro miRNA (pri-miRNA) jsou kódovány tzv. MIR geny v genomu rostlin i živočichů a vznikají většinou jejich transkripcí DNA dependentní RNA polymerázou II (Lee *et al.*, 2004). MIR geny, jež jsou evolučně značně konzervované, leží u rostlin zpravidla v nekódujících oblastech, u živočichů naopak často v oblastech genových (intronech i exonech; Voinnet, 2009).

Prekurzor pri-miRNA má strukturu dvouvláknové vlásenkové dsRNA s místy nedokonalým párováním. U rostlin je v jádře štěpen enzymem Dicer-like 1 (DCL1) za účasti řady dalších proteinů na vlásenkovou strukturu pre-miRNA (Park *et al.*, 2002). Z tohoto prekurzoru je pak opět pomocí DCL1 vyštěpen duplex miRNA-miRNA⁺, metylován na svých koncích pro zvýšení stability a transportován do cytoplazmy. Posléze miRNA asociuje s proteinem Argonaut, kdežto miRNA⁺ je degradována (Siomi *et Siomi*, 2009; Voinnet, 2009). U živočichů se na štěpení pri-miRNA prekurzorů navíc podílí enzym Drosha (Lee *et al.*, 2003).

MicroRNA zpravidla regulují expresi posttranskripčně, *in trans*, tzn., že ovlivňují jiné lokusy, než ze kterých vznikají. U rostlin miRNA dokonale homologní s cílovou mRNA zprostředkovávají jak její štěpení, tak i blokování translace. Téměř dokonale párující miRNA, podobně jako je tomu u živočichů nejčastěji blokují translaci cílové mRNA (Siomi *et Siomi*, 2009; Bartel, 2004; Rhoades *et al.*, 2002).



Obr. 2.5.: **Biogeneze siRNA a mechanismus jejich účinku.** Převzato z: Bartel, 2004, upraveno.



Obr. 2.6.: **Biogeneze miRNA.** Převzato z: Voinnet, 2009, upraveno.

2.1.3.1.3. Proteiny rodiny Argonaut

Proteiny Argonaut rostlin, hub i živočichů se podílejí na všech třech drahách RNAi – to z nich dělá klíčové součásti tohoto aparátu. Fylogeneticky se člení na 2 podrodiny – Argonaut a PIWI (viz obr. 2.7.). Piwi rodina se podílí na biogenezi piRNA u živočichů (Girard *et al.*, 2006). U rostlin dosud nebyla nalezena. Argonaut (AGO) a jím nesené vlákno malé RNA jsou minimální variantou RISC komplexu (Baulcombe, 2004). AGO se skládá z vysoce konzervovaných domén PAZ a PIWI, dále pak N-terminální a MID domény. Cílová homologní RNA je štěpena PIWI doménou, která však není v mnoha izoformách AGO funkční (Song *et al.*, 2004).

Proteiny rodiny Argonaut byly vůbec poprvé popsány právě u rostlin při studiích mutantů huseníčku defektních v jednotlivých typech RNAi. Postupně bylo

u huseníčku odhaleno nejméně 10 různých AGO proteinů. Slouží jako efektory – tedy štěpí (PIWI doménou) cílovou molekulu RNA, komplementární k jimi nesené RNA, nebo blokují její translaci. Neovlivňují však hladinu transkriptu pouze na posttranskripční úrovni, ale podílejí se i na metylaci DNA a potažmo příslušné modifikaci histonů (Baulcombe, 2004; Xie *et al.*, 2004). Podle některých studií se mohou také účastnit umlčování genů ve specializovaných buňkách či určitém stádiu vývoje. Například studie Huntera *et al.* (2003) odhalila roli AGO7 při přechodu rostliny ze stádia juvenilního do stádia dospělé.

2.1.3.1.4. Proteiny rodiny Dicer

Proteiny Dicer patřící do skupiny ribonukleáz typu III mají u huseníčku 4 zástupce – tzv. Dicer-like proteiny (DCL1-4 – viz obr. 2.7.). Jednotlivé DCL se liší svojí účastí na biogenezi malých RNA, jejichž délku současně ovlivňují (Kasschau *et al.*, 2007).

Nejlépe popsány zástupci jsou DCL1 podílející se na biogenezi miRNA o délce nejčastěji 21 nt (Park *et al.*, 2002; viz také kap. 2.1.3.1.2.) a DCL3 tvořící 24nt siRNA (resp. tzv. rasiRNA), jež řídí tvorbu a udržování heterochromatinu. DCL1 navíc ke své činnosti vyžaduje proteiny HEN1 a HYL1. Substráty dsRNA pro DCL3 jsou tvořeny činností Pol IV a RDR2. Při obraně proti virům zprostředkované DCL2 se mohou na tvorbě prekurzorů pro siRNA také podílet RdRP – RDR1 či RDR6 (Xie *et al.*, 2004). Dále může DCL2 zprostředkovávat umlčování sense transgenů na posttranskripční úrovni. DCL4 generuje 21nt siRNA (tzv. trans-acting siRNA), které hrají roli v posttranskripčním umlčování některých endogenů, transgenů a virových RNA (shrnutí v Deleris *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2005).

Studie Delerise z roku 2006 také poodhalila význam většího počtu DCL proteinů u rostlin – ty se účastní „závodů ve zbrojení“ s rostlinnými viry. Viry si totiž velice často kódují supresory umlčování cílené právě na DCL či RISC (shrnutí v Burgyán *et Havelda*, 2011). K primární obraně proti virům slouží DCL4. Je-li však vyřazen z funkce virovým supresorem slouží k obraně proti virům DCL2 a za určitých podmínek i další DCL proteiny (Xie *et al.*, 2004; Deleris *et al.*, 2006).

Protein	Yeast (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>)	Plant (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	Nematode (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	Fruitfly (<i>Drosophila melanogaster</i>)	Mammal Human
RNasell	Dcr1	DCL1 DCL2 DCL3 DCL4	DCR-1 DRSH-1	DCR-1 DCR-2 DROSHA	DICER1 DROSHA
Argonaute: AGO subfamily	Ago1	AGO1 AGO2 AGO4 AGO5 AGO6 AGO7 (ZIPPY) AGO10 (ZLL, PNH) 3 others	ALG-1 ALG-2 3 others	AGO1 AGO2	AGO1 AGO2 AGO3 AGO4
Argonaute: PIWI subfamily	None	None	ERGO-1 PRG-1 PRG-2	AGO3 PIWI AUB	HILI (PIWIL2) HIWI (PIWIL1) HIWI2 (PIWIL4) PIWIL3 (HIWI3)
Double-stranded-RNA-binding domain (dsRBD)-containing cofactor of RNasell	None	HYL1	PASH-1 RDE-4	PASHA R2D2 LOQS	DGCR8 TRBP (TARBP2) PACT (PRKRA)
RNA-dependent RNA polymerase (RdRP)	Rdp1	RDR1 RDR2 (SMD1) RDR6 (SDE1, SGS2) 3 others	EGO-1 RRF-1 RRF-3 1 other 11 others	None	None

Obr. 2.7.: Klíčové komponenty RNAi u různých organizmů. Převzato z: Siomi *et al.*, 2009, upraveno.

2.1.3.1.5. DNA dependentní RNA polymerázy IV a V

Transkripce vysoce metylovaných heterochromatinových oblastí zůstávala dlouhou dobu nejasná až do objevu dvou rostlinám specifických DNA dependentních RNA polymeráz v huseníčku – Pol IV (starší název Pol IVa) a Pol V (starší název Pol IVb; Onodera *et al.*, 2005).

Tyto polymerázy sestávají z 12 dílčích podjednotek, které jsou paralogy či identické 12 podjednotkám Pol II. Největšími podjednotkami polymeráz jsou NRPD1 (=NRPD1a) v Pol IV a NRPE1 (=NRPDb) v Pol V. Obě polymerázy sdílí druhou největší podjednotku – NRPD2/NRPE2 (Herr *et al.*, 2005; Kanno *et al.*, 2005; Onodera *et al.*, 2005; Pontier *et al.*, 2005; Ream *et al.*, 2009). Funkčně se obě polymerázy liší – Pol IV je vyžadována pro tvorbu hc-siRNA, naproti tomu Pol V se účastní metylace DNA (Wierzbicki *et al.*, 2008). Obě se účastní procesu RdDM (více v kap. 2.1.3.2.2.).

2.1.3.2. Typy RNAi

Různé druhy umlčování pomocí RNA mohou být klasifikovány do rozdílných skupin na základě mechanismu jejich účinku, lokalizace v rámci buňky, původu malých RNA, či organismu ve kterém působí. Nicméně mnohé z těchto mechanismů se více či méně prolínají a využívají často společných komponentů.

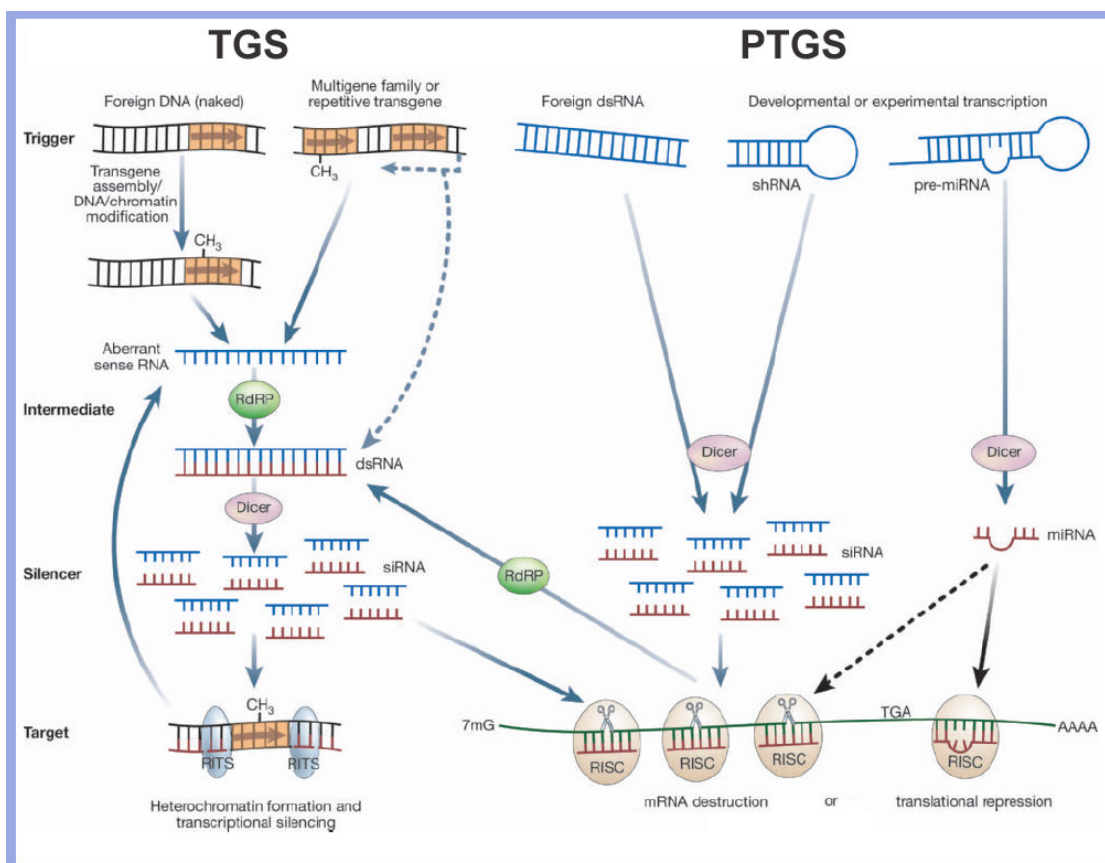
Buhler et Moazed (2007) člení RNAi mechanismy podle místa jejich účinku – na posttranskripční umlčování genů (PTGS) účinkující v cytoplazmě a na chromatinu závislé umlčování genů (CDGS), účinkující v jádře. CDGS dále dělí na transkripční umlčování genů (TGS) a kotranskripční umlčování genů (CTGS), které dosud nebylo u rostlin prokázáno. Toto členění není v rozporu se členěním dle Baulcombe, 2004 z kapitoly 2.1., kde pod PTGS spadá cytoplazmatické umlčování prostřednictvím dsRNA stejně jako posttranskripční umlčování endogenních genů pomocí miRNA. Dále v textu bude RNAi členěna standardně na TGS a PTGS.

2.1.3.2.1. PTGS – štěpení RNA či blokování translace

Umlčování genů na posttranskripční úrovni může probíhat dvěma rovnocennými cestami – štěpením cílové mRNA, nebo blokováním její translace. Základní mechanismus viz kap. 2.1.3. Rozhodnutí, zda-li bude cílová molekula štěpena či bude blokována její translace, závisí na komponentech účastnících se PTGS. Zejména proteiny rodiny AGO, jež nesou malou RNA (siRNA/miRNA) a vytváří RISC komplex, určují výsledný způsob regulace mRNA. Například AGO4 štěpí mRNA, naopak AGO1 se může podílet jak na štěpení, tak i na blokování translace (Baumberger *et Baulcombe*, 2005; Qi *et al.*, 2006).

U živočichů je navíc určujícím signálem pro blokování translace mRNA miRNA, která s cílovou mRNA páruje nedokonale (Brodersen *et al.*, 2008). Rostlinné miRNA jsou homologní či téměř homologní s cílovou mRNA a podílejí se jak na štěpení mRNA, tak i na blokování translace (Rhoades *et al.*, 2002).

K blokování translace mRNA je narozdíl od jejího štěpení zapotřebí řada dalších proteinů mimo RISC komplex (Brodersen *et al.*, 2008). Tento proces je také vratný a umožňuje reagovat pružněji na změny podmínek – např. stres (Sunkar *et al.*, 2007.).



Obrázek č. 2.8.: PTGS a jeho propojení s TGS. Převzato z: Mello *et* Conte, 2004, upraveno.

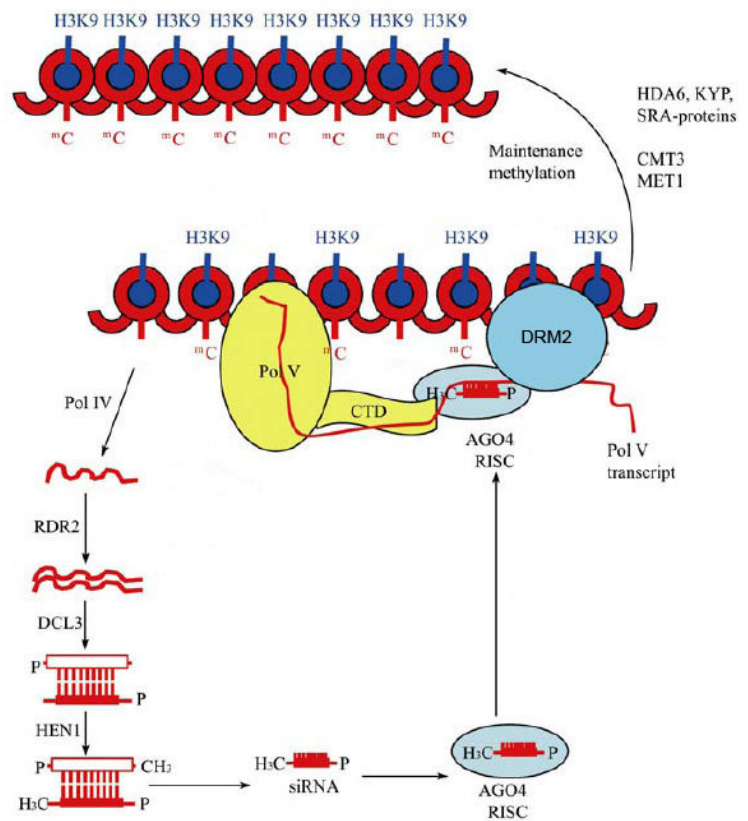
2.1.3.2.2. TGS – Metylace DNA řízená malými RNA (RdDM)

RdDM byla objevena Wasseneggerem *et al.* (1994) při pokusech s transformacemi tabáků viroidy. V transgenních rostlinách došlo po přirozené replikaci viroidů k metylaci viroidové DNA začleněné do genomu. Zpočátku se spekulovalo o indukci metylace sekvencí promotoru transgenu (Park *et al.*, 1996), později byla prokázána dědičná metylace promotorové sekvence řízená dvouvláknovou RNA, jež je štěpena na malé RNA (Mette *et al.*, 2000). Následně byly pomocí klasických i reverzních genetických analýz identifikovány součásti procesů biogeneze siRNA, metylace DNA a modifikace histonů (shrnuto v Chinnusamy *et* Zhu, 2009).

RdDM je jaderný proces, ve kterém siRNA dirigují metylaci cytozinů v sekvencích DNA komplementárních k siRNA. Tento děj má v rostlinách (nejen) řadu funkcí – umlčuje transpozibilní elementy, udržuje genomovou stabilitu, je důležitý také pro imprinting, regulaci exprese genů důležitých pro růst a vývoj rostlin (Ratcliff *et al.*, 1997; Colot *et* Rossignol, 1999; shrnuto v Chinnusamy *et* Zhu, 2009).

U rostlin je při procesu RdDM, jak bylo uvedeno v kap. 2.1.3.1.1., dvouvláknová DNA generována činností RNA dependentní RNA polymerázy RDR2 a následně zpracována na 24nt siRNA enzymem DCL3 (Mette *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2004; Pontes *et al.*, 2006). Předpokládá se, že substrátem pro RDR2 jsou transkripty vznikající činností rostlinám specifické Pol IV (viz kapitola 2.1.3.1.5.). Rozsáhlá sekvenční studie siRNA huseníčku dokonce prokázala, že více než 90 % všech endogenních siRNA je tvořených právě z transkriptů Pol IV (Zhang *et al.*, 2007).

Vzniknuvší siRNA (viz výše) jsou rozvinuty a vodící vlákno siRNA asociuje s AGO4. Spolu s ním vytváří RISC komplex. Následně interaguje C-terminální doména NRPE1 podjednotky Pol V s tímto RISC komplexem, resp. s AGO4 (skrz specifický WG/GW motiv). Je-li vodící siRNA nesená AGO4 komplementární ke vznikajícímu transkriptu Pol V (nejčastěji ~200 nt dlouhý, bez polyA konce), jsou rekrutovány enzymy modifikující DNA a chromatin (DRM2, CMT3, Kyp, HD6, SWI2/SNF2-like ATPázový protein a mnohé další – jejich role viz kap. 2.1.2.). Výsledkem je metylace DNA doprovázená vznikem represivních struktur v příslušné oblasti chromatinu (Jeddeloh *et al.*, 1999; Wierzbicki *et al.*, 2008; Chinusamy *et al.*, 2009; schéma RdDM viz obr. 2.9.).



Obr. 2.9.: RdDM.
Převzato z: Chinnusamy *et al.*
Zhu, 2009, upraveno.

3. Materiál a metody

3.1. Biologický materiál a jeho kultivace

3.1.1. *Escherichia coli* kmen DH5 α

Jedná se o kmen gramnegativní bakterie, jenž byl použit při klonování plazmidů (více viz Sambrook *et al.*, 1989).

Kultivace probíhala v aerobním prostředí na LB médiu (viz kap. 3.3.1.) při 37 °C, nejčastěji přes noc. Charakter média a kultivační nádoba se lišily podle následného účelu použití bakteriální kultury. Např. po transformaci *E. coli*, kdy je nutno získat jednotlivé oddělené kolonie, byly pro kultivaci používány sterilní jednorázové plastické Petriho misky o průměru 9 cm s pevným LB médiem (viz kap. 3.3.1.). Na každou plotnu bylo rozlito přibližně 30 ml rozehrátého LB média s příslušným antibiotikem, vyžadovala-li to metoda (koncentrace antibiotik viz tab. 3.5.). Tyto plotny byly krátkodobě skladovány v lednici při přibližné teplotě 5 °C. Pro účely izolace plazmidů byly bakterie kultivovány za stálého třepání (přibližně 160 RPM) ve sterilních skleněných zkumavkách se 3 ml tekutého LB média s příslušným antibiotikem. Dlouhodobě byly odvozené klony skladovány v mrazáku při teplotě –70 °C jako glycerolové konzervy (800 μ l bakteriální kultury + 200 μ l 50% sterilního glycerolu do 1,5 ml mikrozkuhavky a ihned do tekutého dusíku).

3.1.2. *Agrobacterium tumefaciens* kmen C58C1Rif^R

Tento kmen gramnegativní bakterie nesoucí pomocný plazmid pGV2260 (více v Deblaere *et al.*, 1985) byl využit k transformaci rostlin bramboru a buněčných linií tabáku připravenými konstrukty.

Agrobaktérium bylo kultivováno při teplotě přibližně 28 °C a to za použití dvou různých médií v závislosti na dalším využití. Za účelem získání jednotlivých kolonií (po transformaci či při přípravě kompetentních buněk) bylo použito pro kultivaci pevné LB médium (kap. 3.3.1.) rozlité na sterilní Petriho misky o průměru 9 cm. Nárůst kolonií trval 3 dny. Pro přípravu suspenzí na transformaci rostlinného materiálu bylo agrobaktérium kultivováno v tekutém YEB médiu (viz kap. 3.3.1.). Součástí obou médií bylo vždy antibiotikum rifampicin – 100 mg na 1 litr média (více viz tab. 3.5.).

3.1.3. Tabáková buněčná linie BY-2 (*Nicotiana tabacum* L. cv. 'Bright Yellow')

Zpočátku bylo využití této linie pouze průmyslové. Ovšem po jejím důkladném charakterizování Nagatou *et al.* (1992) se velice rychle prosadila v experimentální biologii rostlin díky řadě předností.

Tabáková buněčná linie BY-2 byla kultivována ve tmě při teplotě 26 °C na modifikovaném MS médiu (Murashige *et* Skoog, 1962, podrobnosti v kap. 3.3.2.).

Alternativně byla buněčná linie kultivována ve formě kalusů na pevném médiu ve sterilních plastických Petriho miskách o průměru 6 cm. Na misce se nacházelo vždy 5 individuálních kalusů, které byly pasážovány v intervalu přibližně 4. týdnů. Po transformacích BY-2 agrobaktériem (kap. 3.4.1.4.) a následném přenesení mladých kalusů na misky byly tyto kultivovány v počtu 9, resp. 12 kusů na 1 misku. Pro odstranění agrobaktéria po úspěšné transformaci bylo do média přidáno antibiotikum – taxcef (=claforan; koncentrace 100 mg na 1 litr média). K selekci transformovaných klonů BY-2 bylo použito antibiotikum kanamycin (koncentrace 50 mg na litr média). Detaily k antibiotikům viz tab. 3.5.

Kultivace buněčných suspenzí probíhala ve 100ml Erlenmeyerových baňkách naplněných 30 ml tekutého média na orbitální třepače IKA KS501 (111 RPM). K vytvoření buněčné suspenze byl použit přibližně 1 g mladých rostoucích kalusů jejich roztřepáním ve 30 ml MS média. Subkultivace probíhala každých 7 dní odběrem 2 ml narostlé kultury do baňky s novým sterilním médiem.

3.1.4. Lilek brambor (*Solanum tuberosum* L. cv. 'Désirée')

Tento kultivar lilku bramboru byl vyšlechtěn v Holandsku v 60. letech 20. století. Jedná se o odrůdu s červenými hlízkami pro běžné kuchyňské využití (zdroj British Potato Council, <http://www.lovepotatoes.co.uk>). V laboratorních podmínkách je využívána přibližně od 70. let.

Lilek brambor, včetně odvozených transgenních linií byl pěstován v různých podmínkách, v závislosti na použité metodě či plánovaném pokusu (více v kap. 3.4.). Při pěstování ve sterilních podmínkách bylo používáno několikero kultivačních nádob vždy s použitím pevného LS média (Linsmaier *et* Skoog, 1965, kap. 3.3.2.). Pro dlouhodobé udržování jednotlivých linií (pasážování každých 6-8 týdnů) sloužily skleněné zkumavky, naplněné do 1/3 médiem a uzavřené špunty z gázy, umožňující

difúzi plynů. Při běžné práci s liniemi byly použity 100ml Erlenmeyerovy baňky s přibližně 40 ml média. Pro transformaci rostlin *in vitro* probíhala kultivace z apikálních řízků v plastových kelímcích Sigma se 150 ml média. K regeneracím rostlin *in vitro* byly používány plastové Petriho misky o průměru 6 cm s přibližně 17 ml média. Vyjma Petriho misek byly všechny kultivační nádoby umístěny volně do polic kultivační místnosti s 16 hod světelnou periodou a teplotou 23 °C. Petriho misky byly nejčastěji rozloženy po 7 kusech do větší skleněné Petriho misky (Ø 19 cm), která zajišťovala pomalejší vysychání média a výrazně snižovala frekvenci kontaminací.

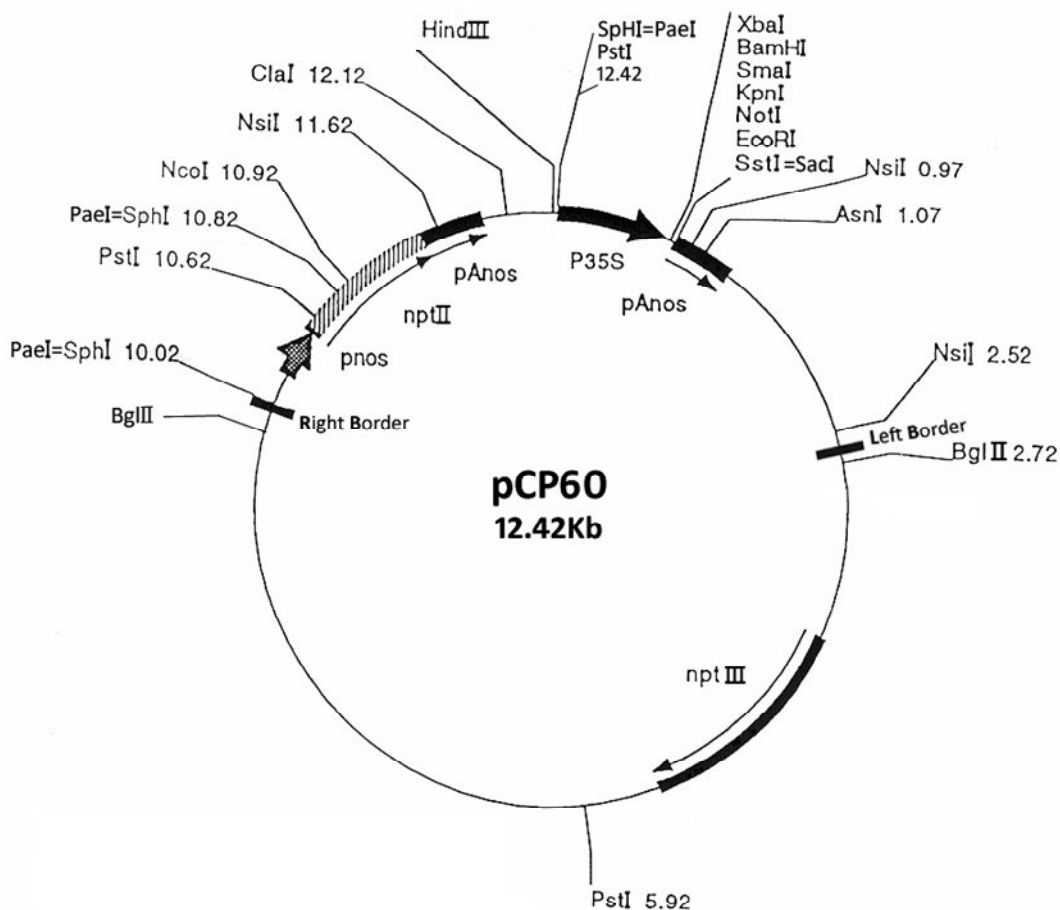
Do podmínek *ex vitro* byly rostliny převedeny z *in vitro* kultur, většinou ze zkumavek. A to prostým vyjmutím rostlin, odstraněním média z oblasti kořenů pod tekoucí vodou z vodovodního řádu a následně jejich vsazením do párou vysterilizované zeminy. Pěstovány byly ve skleníku při 16 hod fotoperiodě, v běžném pěstebním substrátu v plastových čtyřhranných květnících o objemu 1 litr. Po skončení vegetační doby a odumření nadzemní části rostlin byly hlízy sklizeny a před další výsadbou skladovány v lednici po dobu minimálně 6 týdnů. Případná opětovná výsadba probíhala zasazením hlíz prošlých chladovým obdobím do rozměrově stejných květníků s obdobným pěstebním substrátem přibližně 5 cm pod povrch substrátu. K zálivce byla používána destilovaná voda (dále jen dH₂O).

3.2. Plazmidy

K vnesení cizorodé DNA do biologického materiálu může být použita řada technik a strategií. Při zpracování této diplomové práce bylo využíváno malých kruhových molekul DNA – plazmidů, které umožňují amplifikaci a autonomní replikaci v bakteriálních. K selekci transformovaných klonů slouží s výhodou geny pro rezistenci vůči určitému antibiotiku. Na médiu s antibiotikem vyrostou pouze klon obsahující požadovaný plazmid.

3.2.1. *pCP60*

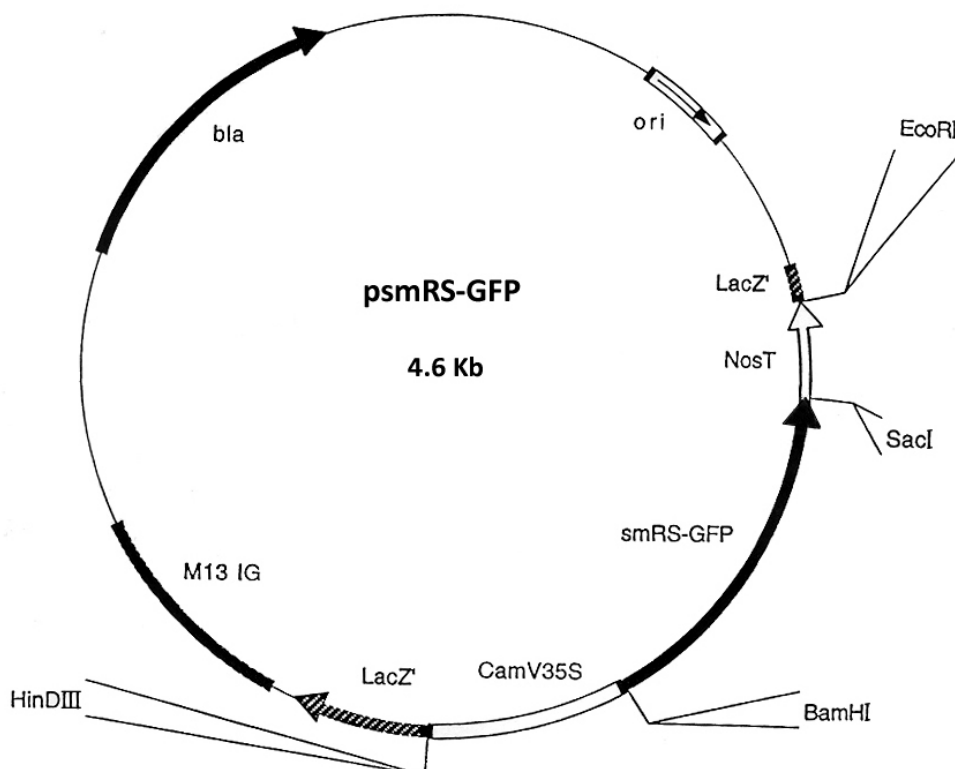
Binární vektor *pCP60* odvozený z *pBin19* byl poskytnut pro potřeby laboratoře Dr. Ratetem. Při klonování byl výchozím konstruktem pro všechny následné konstrukty. Součástí T-DNA, již obklopuje levá a pravá hraniční oblast vymezující úsek DNA přenášený agrobaktériem do rostlin, je gen *NPTII* (neomycin fosfotransferáza) pro rezistenci rostlin ke kanamycinu. Dále se v této oblasti nachází CaMV 35S promotor pocházející z viru kvěťákové mozaiky a terminátor pro nopalín syntázu z agrobaktéria. Mezi těmito úseky se nachází 42 bp dlouhá mnohočetná klonovací oblast (MCS) vhodná pro vkládání genů zájmu. Schéma je patrné z obrázku 3.1.



Obr. 3.1.: Schéma binárního vektoru *pCP60*.

3.2.2. *psmRS-GFP*

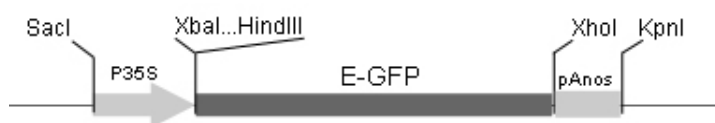
Tento malý 4,6Kbp vektor sloužil jako zdroj genu pro *RS-GFP*. Gen pro *RS-GFP* je zde ohraničen vhodnými restrikčními místy pro jeho vyštěpení pomocí restrikčních endonukleáz. Současně se na plazmidu nachází i gen pro β -laktamázu, navozující rezistenci transformovaných bakteriálních klonů vůči ampicilinu. Rozložení genů a restrikčních míst viz obr. 3.2.



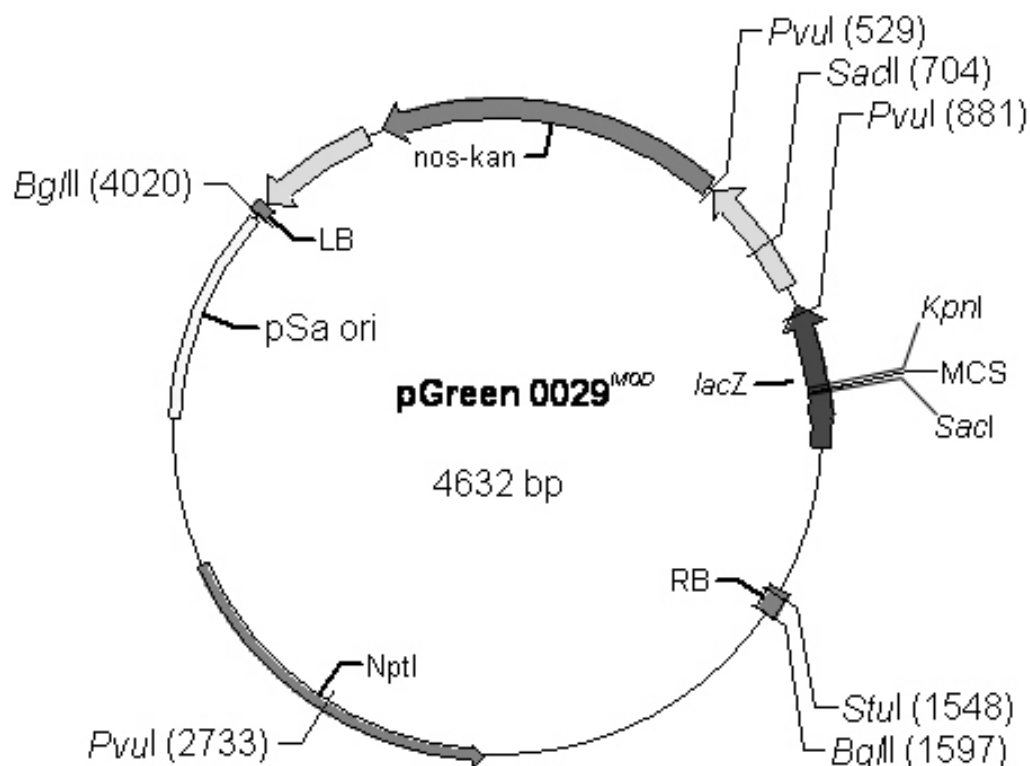
Obr. 3.2.: Schéma plazmidu *psmRS-GFP*.

3.2.3. *pGreen 0029^{MOD}*

Gen pro *E-GFP* byl získán z upraveného komerčního plazmidu *pGreen 0029^{MOD}*, do něhož byl vložen přes restrikční místa *SacI* a *KpnI* v MCS. Oblast MCS viz obrázek 3.3., vlastní plazmid viz obr. 3.4.



Obr. 3.3.: Schéma oblasti plazmidu *pGreen 0029^{MOD}* mezi *SacI* a *KpnI*.



Obr. 3.4.: Schéma plazmidu *pGreen 0029^{MOD}*.

3.3. Média

Všechna média byla připravována dle individuálních návodů viz níže. Hodnota pH byla upravována pomocí 1 M roztoku KOH, respektive 1 M roztoku HCl. Média byla sterilizována v automatických autoklávech (není-li uvedeno jinak) OmegaTM (Media PrestigeTM) a Harvey (SterileMaxTM) při teplotě 120 °C po dobu 20 minut. Skladována byla za laboratorní teploty, vyjma SOC (lednice, teplota blízká 5 °C) a infiltračního roztoku (mrazák, přibližně – 70 °C).

3.3.1. Bakteriální média – tab. 3.1.

Médium, objem [ml]	Název komponentů	Množství v médiu [g]	Objem v médiu [ml]
YEB 450	pepton	5	-
	yeast extract	0,5	
	sacharóza	2,5	
	dH ₂ O	-	doplnit do 450
MgSO₄ (0,5%) 200	MgSO ₄	1	-
	dH ₂ O	-	doplnit do 200
YEB – kompletní 500	YEB	-	450
	MgSO ₄ (0,5%)	-	50
Soli recovery ¹ 100	NaCl	0,58	-
	KCl	0,19	-
	MgCl ₂	0,95	-
	dH ₂ O	-	doplnit do 100
YEB recovery 1	YEB kompletní	-	0,9
	soli recovery	-	0,1
LB (pevné) 1000	pepton	10	-
	yeast extract	5	-
	NaCl	10	-
	(agar)	17,5	-
	dH ₂ O	-	doplnit do 1000
SOC ¹ 20	pepton	0,4	-
	yeast extract	0,1	-
	glukóza	0,0721	-
	NaCl	0,0117	-
	KCl	0,0037	-
	MgCl ₂	0,019	-
	MgSO ₄	0,0241	-
	dH ₂ O	-	doplnit do 20
GYT ¹ 10	glycerol (100%)	-	1
	yeast extract	0,0125	-
	pepton	0,025	-
Infiltrační roztok ³ 50	(acetosyringon ²)	1,96 · 10 ⁻³	-
	MES sodná sůl	0,109	-
	MgCl ₂	0,048	-
	dH ₂ O	-	doplnit do 50

¹Média sterilizována filtrací přes jednorázové sterilní předfiltry Nalgene s velikostí pórů 0,22 μm.

²Acetosyringon přidán až těsně před použitím viz kap. 3.4.1.5. Zásobní roztok 20mM v 96% čistém EtOH, skladován v malých alikvotech na jedno použití při teplotě blízké – 70 °C.

³Nejprve byl připraven 10mM roztok MES s pH 6,5, následně byl přidán MgCl₂.

3.3.2. Rostlinná média – tab. 3.2.

Název komponentů	Název média koncentrace [g/l]				Poznámky
	MS ¹	LS ¹	SIM ¹	CIM ¹	
MSMO soli (M 5524-10L)	4,33	4,33	4,33	4,33	fy Sigma-Aldrich
sacharóza	30	30	-	-	-
glukóza	-	-	16	16	
<i>myo</i> -inositol	0,1	0,1	0,1	0,1	
kasein	-	1	-	-	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	-	-	0,002	0,002	
KH ₂ PO ₄	0,2	-	-	-	
vitamín B1	0,001	0,0001	0,0001	0,0001	
vitamín B6	-	0,0001	0,0005	0,0005	
kyselina nikotinová	-	0,0005	0,0005	0,0005	
glycin	-	0,003	0,002	0,002	
NAA	-	-	2 · 10 ⁻⁵	0,005	viz příprava a skladování růstových regulátorů kapitola 3.3.3.
BAP	-	-	-	0,0001	
GA3	-	-	2 · 10 ⁻⁵	-	
<i>trans</i> -zeatin ribosid	-	-	0,002	-	
2,4 D	0,0002	-	-	-	
agar	(8) ²	8	6	6	

¹U všech médií byla hodnota pH upravena před klávkováním na 5,8.

²Agar přidán při přípravě pevného MS média.

3.3.3. Vitamíny, růstové regulátory, antibiotika

Tab. 3.3.: Vitamíny.

Objem připravené směsi s dH ₂ O [ml]	Vitamín	pro CIM/SIM [mg]	pro LS [mg]
50	B1	5	5
	B6	25	5
	glycin	100	150
	kys. nikotinová	25	25

Směs vitamínů byla rozpuštěna v 50 ml dH₂O. Výsledný roztok byl rozdělen po 1 ml do mikrozkuavek a skladován v mrazáku při přibližné teplotě – 20 °C. Do 1 litru média (CIM/SIM/LS) bylo přidáváno vždy po 1 ml z příslušné směsi.

Tab. 3.4.: Růstové regulátory.

Růstový regulátor	Koncentrace zásobního roztoku [mg/ml]	skladovací médium	sterilizace
BAP	1	10mM KOH	filtrací přes sterilní předfiltry Nalgene 0,22 µm
GA ₃	1	35% EtOH	
NAA	2,5	35% EtOH	
<i>trans</i> -zeatin ribosid	1	70% EtOH	

Růstové regulátory byly skladovány v malých objemech (nejčastěji 10 ml, v případě GA₃ 1 ml) v mrazáku za přibližné teploty – 20 °C.

Tab. 3.5.: Antibiotika.

Antibiotikum	Koncentrace v médiu [mg/l]	koncentrace v zásobním roztoku [mg/ml]	skladovací médium	sterilizace
ampicilin	100	100	dH ₂ O	filtrací přes předfiltry Nalgene 0,22 µm
kanamycin	50	50	dH ₂ O	
taxcef (claforan)	100	100	dH ₂ O	
rifampicin	100	10	metanol	není nutná

Antibiotika byla skladována v menších objemech (nejčastěji 15 ml) v mrazáku za přibližné teploty – 20 °C. Výjimkou byl kanamycin, jenž byl skladován v lednici.

3.4. Metody

3.4.1. Transformace biologického materiálu

3.4.1.1. Příprava elektrokompetentních buněk *Escherichia coli*

Na pevném LB médiu bez antibiotik byl „rozčárkovan“ kmen *Escherichia coli* DH5 α a kultivován 24 hodin. Příští den byly 2x2 narostlé samostatné kolonie „zaočkovány“ do 2 x 250ml sterilních Erlenmeyerových baněk s 2 x 50 ml tekutého LB média bez antibiotik. Kultivovány byly za stálého třepání přes noc při přibližně 37 °C. Následně byly narostlé kultury ráno „zaočkovány“ do 2 x 1000ml Erlenmeyerových baněk s 200 ml LB média (vyhřátým předem na 37 °C) a kultivovány na třepačce. Centrifuga byla předem vychlazená na 4 °C. Bakterie byly kultivovány do optické denzity (OD) 0,4 při 600 nm (OD kultury měřena v 1cm skleněné kyvetě na spektrofotometru Thermo Spectronics – BioMate 5 pomocí intuitivního integrovaného programu). Po dosažení OD 0,35 – 0,4 byly baňky ihned vyjmuty z inkubátoru a byly přeneseny do ledové lázně, kde byly za občasného míchání (přibližně každých 5 minut) chlazeny 20 minut. K sedimentaci kultury bylo použito 8 plastových sterilních kyvet (Falcon) o objemu 50 ml, taktéž předchlazených. Do každé kyvety bylo nalito 25 ml vychlazené bakteriální kultury. Následně byly kyvety centrifugovány při 4 °C, 4000 RPM po dobu 10 minut. Po vyjmutí byl odstraněn supernatant a sediment opatrně resuspendován špičkami s ustřiženým koncem v 6 ml sterilní vychlazené dH₂O. Kyvety byly odloženy na led. Opět byla stočena bakteriální kultura i z druhé 1000 ml baňky stejným způsobem v 8 nových kyvetách. Sedimenty byly resuspendovány ve 4 ml dH₂O. Suspenze z obou sedimentací byly slity do osmi kyvet (vždy jedna z první a jedna z druhé sedimentace) a doplněny dH₂O do objemu 40 ml. Obsahy byly znovu odstředěny (4 °C, 4000 RPM, 10 min), sedimenty resuspendovány ve 25 ml vychlazeného sterilního 10% glycerolu (dále jen glycerol), suspenze slity do 4 kyvet à 50 ml a opět sedimentovány za stejných podmínek. Sedimenty byly resuspendovány tentokrát ve 2 ml glycerolu a převedeny do jediné kyvety. Obsah byl naposledy stočen a supernatant velmi důkladně odstraněn. Konečný sediment byl resuspendován v 800 μ l sterilního vychlazeného GYT média. Z husté suspenze byl odebrán vzorek 5 μ l, zředěn 100x a byla změřena jeho optická denzita při 600 nm proti čistému GYT médiu. Dle naměřeného údaje byla suspenze naředěna GYT médiem na $2 \times 10^{10} - 3 \times 10^{10}$ buněk na 1 ml a rozpipetována po 40 μ l

do sterilních 1,5ml mikrozkušavek a ihned mražena v tekutém dusíku. Konzervy kompetentních buněk byly dlouhodobě skladovány při teplotě blízké – 70 °C.

3.4.1.2. Příprava elektrokompetentních buněk *Agrobacterium tumefaciens*

Jednotlivé kolonie *Agrobacterium tumefaciens* kmen C58C1Rif^R byly získány třídní kultivací „rozčárkované“ agrobakteriální kultury na Petriho misce s LB médiem a rifampicinem (100 mg/l) při teplotě přibližně 28 °C. Byly „zaočkovány“ do 10 ml tekutého LB média s rifampicinem ve 100ml Erlenmeyerově baňce a kultivovány přes noc (16-20 hod) při 28 °C za stálého třepání (160 RPM). Po uplynutí kultivační doby byly 4 ml bakteriální suspenze „zaočkovány“ 200 ml YEB média s rifampicinem v 1000ml Erlenmeyerově baňce a kultura kultivována do OD 0,6 při 600 nm (viz měření OD v kap. 3.4.1.1.). Při naměření optické denzity 0,6 byla baňka s kulturou přenesena na led, kde byla za občasného míchání (přibližně každých 4-5 minut) v průběhu 20 minut zchlazena. Zchlazená kultura byla rozdělena po 25 ml do 8 kyvet (Falcon, objem 50 ml) a odstředěna během 10 minut při 4 °C, 4000 RPM (stejně podmínky byly použity i v dalších krocích). Supernatant byl odstraněn a sediment resuspendován ve 25 ml sterilní vychlazené dH₂O v každé kyvetě. Obsah byl sedimentován, supernatant odstraněn a sediment resuspendován tentokrát v 10 ml dH₂O. Počet kyvet byl jejich slitím zredukován na 4, objem byl doplněn dH₂O do 25 ml a sedimentován. Vzniklý sediment byl resuspendován v každé kyvetě se 2 ml sterilního vychlazeného 10% glycerolu (dále jen glycerol) a suspenze slita do jediné, nové kyvety. Po posledním odstředění a odstranění supernatantu byl sediment resuspendován v 1 ml glycerolu. Vzniknuvší suspenze byla rozpipetována do sterilních 1,5ml mikrozkušavek po 100 µl a ihned zamražena v tekutém dusíku. Konzervy kompetentních buněk byly skladovány při přibližné teplotě – 70 °C.

3.4.1.3. Transformace bakterií (*text platí pro Escherichia coli, odlišnosti pro AT – Agrobacterium tumefaciens uvedeny v závorkách*)

Konzerva elektrokompetentních buněk připravená dle kap. 3.4.1.1. (3.4.1.2. pro AT) byla z mrazáku přenesena na led a zde ponechána do rozmražení. Elektroporátor Bio Rad Gene PulserTM byl zapnut a nastaven na 2,5 kV (pro AT 2 kV), 200 Ω. Do konzervy byly přidány 3 µl liganční směsi po odsolení nebo 10 ng (1 µg pro

AT) přečištěné plazmidové DNA a inkubována 1 min. Posléze byla suspenze rychle přenesena na dno vychlazené elektroporační kyvety a vložena do přístroje. Byl aplikován elektrický puls zmáčknutím příslušného tlačítka na přístroji (ideální doba trvání 4,2 – 4,5 ms) a k suspenzi byl v co nejkratším čase přidán 1 ml SOC média (pro AT 1 ml YEB recovery). Poté byla kultura přenesena do sterilní skleněné zkumavky a kultivována 1 hod při 37 °C (3 hod při 28 °C pro AT). Nakonec byla vyseta v objemech 50 µl a 500 µl na plotny s LB médiem a selekčními antibiotiky pro příslušný plazmid a kultivována za podmínek charakteristických pro daný typ bakterií (kap. 3.1.).

3.4.1.4. Transformace tabákové buněčné linie BY-2

Čerstvě narostlá (2-3 denní), příslušným binárním vektorem transformovaná, kolonie agrobaktéria byla „zaočkována“ do 10 ml tekutého kompletního YEB média s příslušnými antibiotiky (rifampicin + selekční antibiotikum pro příslušný plazmid) a kultivována přes noc (přibližně 20 hod) při 28 °C do podoby „mléčně zakalené“ suspenze.

Pro transformaci byla použita 3 – 4denní exponenciální kultura BY-2 o objemu 30 ml. Buněčná suspenze byla přefiltrována filtračním aparátem Nalgene a resuspendována v čerstvém MS médiu o původním objemu. K suspenzi bylo přidáno 15 µl acetosyringonu (20mM zásobní roztok) a vše bylo důkladně přibližně 20 x protaženo neustříženou špičkou pomocí 10ml pipety. Z celkového objemu 30 ml byly odebrány 2 ml suspenze a vysety jako kontrola na malou Petriho misku (Ø 6 cm) s pevným MS médiem. Do zbylé buněčné suspenze byly přidány 3 ml suspenze agrobaktéria (viz výše) a celý objem byl protažen několikrát přes neustříženou špičku. Ze směsi BY-2 a agrobaktéria byly odebrány vždy 2 ml suspenze a vysety na malé Petriho misky (Ø 6 cm) s pevným MS médiem. Kokultivace probíhala 3 dny ve tmě při teplotě 27 °C ve velké skleněné Petriho misce (Ø 19 cm) s kouskem mokré gázy (použita sterilní dH₂O).

Po třech dnech byly narostlé buňky v Petriho miskách resuspendovány vždy 10 ml sterilní 3% sacharózy a přeneseny pomocí pipety do sterilního filtračního aparátu Nalgene. Buňky byly promyty 300 ml 3% sacharózy za současného resuspendování špičkou pipety. Dále byla kultura promyta 100 ml MS média s přídatkem antibiotika

taxcef (claforan, 100 mg/l) za opětovného resuspendování špičkou pipety. Nakonec byly promyté buňky resuspendovány v nové 100 ml baňce se 2 ml MS média s claforanem a po 600 μ l rozpipetovány na malé Petriho misky s pevným MS médiem, claforanem a selekčním antibiotikem na příslušný konstrukt, jímž byly transformovány (v mém případě kanamycin – 50 mg/l média). Krouživým pohybem byly buňky rozprostřeny po celé ploše misky.

Negativní kontrola nebyla promývána sacharózou či MS médiem (neobsahovala agrobaktérium), byla pouze resuspendována v malém objemu MS média a rozlita na 3 Petriho misky se stejným médiem a antibiotiky jako transformovaná varianta. Krouživým pohybem byla také rovnoměrně rozprostřena po povrchu.

Všechny vzniknuvší Petriho misky byly po sedmi rozprostřeny na větší skleněné Petriho misky spolu s navlhčenou gázou (sterilní dH₂O) uprostřed.

Narůstající transformované kalusy BY-2 byly při velikosti 2-3 mm (po asi 5 týdnech) přeneseny pomocí sterilní jehly na Petriho misky s čerstvým MS médiem + claforan + kanamycin.

3.4.1.5. Transformace rostlin bramboru (*Solanum tuberosum*) infiltrací

Stejně jako při transformaci BY-2 (kap. 3.4.1.4.) byla přes noc připravena kultura transformovaného agrobaktéria do podoby „mléčně zakalené“ suspenze. Ze suspenze bylo odebráno do mikrozkuřavky 1,5 ml a stočeno během 6 min v centrifuze zn. Eppendorf za laboratorní teploty a 3000 RPM. Supernatant byl odstraněn a sediment 2 x promyt 1 ml infiltračního roztoku a znovu sedimentován za stejných podmínek. Nakonec byl sediment resuspendován opět v 1 ml infiltračního roztoku tentokrát s přídatkem 10 μ l acetosyringonu a inkubován 3 hod při pokojové teplotě (všechny tyto kroky pro variantu infiltrace *in vitro* musely být prováděny sterilně).

Infiltrace agrobaktéria do rostlin lilku bramboru (transformované linie cv. 'Désirée') probíhala za dvou odlišných podmínek – *ex vitro* a *in vitro*. Obě varianty vyžadovaly trochu odlišný přístup a techniku infiltrace. Metoda infiltrace *in vitro* byla na řešitelském pracovišti odvozena a vůbec poprvé použita právě v rámci této diplomové práce.

Při metodě infiltrace *ex vitro*, která sloužila jako metodické zaškolení pro následnou infiltraci *in vitro*, byly rostliny přeneseny do těchto podmínek z *in vitro* kultur viz kap. 3.1.4.. Jakmile rostliny dosáhly výšky přibližně 15 cm, byla 1-2 dny

před vlastní transformací rostlinám omezena zálivka, z důvodů následného lepšího přijetí infiltračního roztoku. Rostliny byly přeneseny z prostor skleníku do laboratoře. Zde byly neinvazivně kousky lepicí pásky označeny oblastí na stoncích od kterých směrem apikálně budou vždy 3 listy infiltrovány. K infiltraci byla použita 5ml plastická injekční stříkačka. Po 3-hodinové inkubaci byla suspenze agrobaktéria nasáta do stříkačky. Na abaxiální straně listů byly pomocí nové sterilní jehly vytvořeny 1-2 malé vpichy, ke kterým byla posléze přitisknuta stříkačka proti prstu s rukavicí. Tlakem na píst byla suspenze agrobaktéria vtlačena do mezenchymu listu. Takto byly infiltrovány všechny označené listy.

Pro infiltraci *in vitro* byly použity mladé, přibližně 6-týdenní rostliny, rostoucí v 1l Sigma kelímcích na LS médiu, v počtu 6-7 kusů. Rostliny pocházely z vrcholových řízků. Před vlastní infiltrací byly rostliny na přibližně 15 minut vystaveny nižší vzdušné vlhkosti otevřením kelímků v laminárním boxu (pro usnadnění infiltrace poklesem turgoru v listech). Celá práce probíhala vysoce sterilně v laminárním boxu. Oblasti infiltrace byly označeny odstřížením poloviny dobře vyvinutého listu ve spodní části rostliny (=referenční list). První list na stonku apikálně od referenčního byl infiltrován. Nejprve však byly zkoušeny různé techniky infiltrace, z různou účinností a mírou poškození listu (tab. 4.5.). Opět byla použita 5ml sterilní injekční stříkačka s nasazenou sterilní jehlou, do které byla nasáta sterilně připravená suspenze agrobaktéria. Z důvodů vysokého rizika kontaminace nebylo možno přitlačit infiltrovaný list proti prstu s rukavicí jako u varianty *ex vitro*. Transformace tak probíhala propíchnutím infiltrovaného listu jehlou injekční stříkačky za současného vypuzování agrobakteriální suspenze.

K transformaci byl u obou variant použit umlčující konstrukt – jednalo se tedy o supertransformace. Transformanti nebyly regenerovány – byla pouze sledována míra exprese genu GFP v čase a místě.

3.4.2. Práce s DNA

3.4.2.1. Izolace plazmidové DNA

K izolaci plazmidové DNA byl použit komerční kit fy Promega – „Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System“.

Z kultury *Escherichia coli* narostlé přes noc bylo odebráno 1,5 ml a stočeno v 1,5 ml mikrozkušavce 30 s na centrifuze zn. Eppendorf při 13000 RPM.

Supernatant byl odstraněn (slit) a sediment doplněn dalším 1,5 ml bakteriální kultury a stočen za stejných podmínek. Veškerý supernatant byl odstraněn na vodní vývěvě. Sediment byl resuspendován ve 250 μ l „Cell Resuspension Solution“ a důkladně promíchán vortexem. Následně bylo přidáno 250 μ l „Cell Lysis Solution“. Mikrozkuhavka byla pouze 5x opatrně převrácena a ponechána za laboratorní teploty 4 min. Po oplynutí doby bylo ihned přidáno 10 μ l „Alkaline Protease Solution“ a obsah znovu opatrně 5x promíchán převrácením a ponechán ve stojánku 4 min. Neutralizace „Cell Lysis Solution“ byla provedena přidáním 350 μ l „Neutralization Solution“ a promícháním mikrozkuhavky opatrným několikanásobným převrácením. Celá směs byla odstředována po dobu 10 min při 13000 RPM. Supernatant byl převeden do centrifugačních kolonek „Spin Column“, ty vloženy do sběrných mikrozkuhavek „2ml Collection Tube“ a sedimentovány 1 min při 13000 RPM. Kolonky byly promyty 750 μ l „Column Wash Solution“ s dodaným 96% čistým EtOH (dále jen CWS), sedimentovány 1 min při 13000 RPM. Opět promyty, tentokrát 250 μ l CWS a sedimentovány 2 min při 13000 RPM. Kolonky byly přeneseny do nových popsaných 1,5ml mikrozkuhavek a DNA byla eluována (uvolněna) 100 μ l sterilní dH₂O.

Mikrozkuhavky s plazmidy byly skladovány v mrazáku při teplotě blízké – 20 °C.

3.4.2.2. Restrikční štěpení

Při přípravě konstruktů byly používány specifické restrikční endonukleázy firmy Fermentas odvozené z bakterií, jež štěpí DNA v určitých sekvenčně specifických místech, tzv. restrikčních místech. Klonovací vektory mají tato místa rozmístěna po celé své délce či zhuštěna do určité vhodné oblasti – MCS (viz kap. 3.2.1.). Usnadňují začleňování či naopak odstraňování nejrůznějších úseků DNA.

Reakční směsi byly namíchány dle přiložených pokynů ke každé restrikční endonukleáze, v závislosti na velikosti štěpeného vektoru a počtu restrikčních míst pro danou restriktazu. Typická reakční směs viz tab. 3.6.

Tab. 3.6.: Typická restriční reakce.

Složka reakční směsi	Množství	Reakční podmínky
Restriktáza <i>SphI</i>	variabilně ¹	1 h při 37 °C, pak inaktivace 10 min při 65 °C
plazmid pCP60	25 – 50 ng	
pufř B	1 µl	
dH ₂ O	do 10 µl	

¹V závislosti na specifické aktivitě udávané výrobcem, počtu štěpených restričních míst a velikosti vektoru.

3.4.2.3. Agarózová gelová elektroforéza

Elektroforetická frakcionace izolované (případně naštěpené) plazmidové DNA poskytuje dobré informace o jejích vlastnostech (délce a počtu fragmentů, množství DNA ve vzorku, konformaci plazmidů apod.) a čistotě (kontaminace a pod.). Metoda je založena na putování negativně nabitých molekul deoxyribonukleových kyselin molekulárním sítím v podobě agarózového gelu v elektrickém poli. K dělení dochází v závislosti na velikosti a konformaci fragmentů a koncentraci agarózy. Malé a vysoce nadšroubovicové molekuly putují gelem snáze a tedy rychleji než molekuly velké či relaxované plazmidy.

Nejčastěji byl používán 1,2% agarózový gel v 0,5x TAE pufřu. Zásobní roztok byl 50x TAE (1 litr obsahoval 242 g Tris, 57,1 ml kyseliny octové, 100 ml 0,5 M EDTA-pH 8,0). Pro vizualizaci DNA byl do rozehrátého gelu (při zchladnutí na přibližně 60 °C) přidán GelRedTM firmy Biotium, v koncentraci 1 µl na 10 ml gelu. K utužení gelu došlo po jeho nalití do formy. Pro tvorbu jamek na nanášení vzorků byly do formy vsazeny hřebeny. Vlastní elektroforéza probíhala ve vaničce s pufřem připojené k elektrické síti s nastavitelnou hodnotou napětí. Nejčastěji bylo používáno napětí 50 V (tj. intenzita elektrického pole asi 4 V/cm). Pro izolaci delších fragmentů z gelu (nad 10 kb) byl používán 0,8 % agarózový gel a napětí 25 V. K vizualizaci vzorků, jejich mobility a ke zvýšení jejich hustoty sloužilo komerční barvivo Loading Buffer (Fermentas), ředěné 6x ve výsledném roztoku nanášené DNA. Na odečet délek fragmentů byl použit 1kb marker GeneRulerTM (Fermentas).

3.4.2.4. Izolace DNA fragmentu z agarózového gelu

K izolaci DNA fragmentů byl použit komerční kit fy QIAGEN – „QIAEX II Gel Extraction Kit (150)“.

Z agarózového gelu byl co nejpřesněji vyříznut segment obsahující požadovaný fragment DNA a byla zvážena jeho hmotnost (nesmí přesáhnout 250 mg). Dle velikosti fragmentu DNA a hmotnosti vyřezaného segmentu bylo přidáno *n*-násobné množství pufru „QX1“, popř. dH₂O – viz tab. 3.7. níže. Dále bylo ke směsi přidáno 10 µl křemičité suspenze „QX II“ a vše důkladně promícháno vortexem. Mikrozkušavka se směsí byla umístěna do bločku vyhřátého na teplotu 65 °C po dobu 10 min. Každé 2 min byla důkladně promíchána. Po ukončení kultivace byl vzorek opět protřepán za pomoci vortexu a pak sedimentován 30 s při 13000 RPM. Supernatant byl odstraněn a sediment resuspendován v 500 µl „QX1“ pufru. Vzorek byl znovu sedimentován za stejných podmínek, supernatant odstraněn a sediment resuspendován 2x v 500 µl „PE“ pufru a vždy stočen na centrifuze. Supernatant byl dokonale odstraněn a peleta dána sušit. Těsně před úplným doschnutím pelety (nepatrná tmavší centrální zóna pelety) byla peleta resuspendována v 10 µl dH₂O a dle velikosti fragmentu (viz tab. 3.8.) ponechána určitou dobu v klidu za účelem uvolnění DNA z křemičité suspenze. Po uplynutí klidové fáze byl vzorek sedimentován a roztok DNA nad peletou přenesen do nové mikrozkušavky. Peleta byla opět resuspendována, tentokrát v 5 µl, a celý proces zopakován. Na konci izolace bylo získáno přibližně 10-13 µl vodného roztoku DNA. Mikrozkušavky s izolovanými fragmenty byly skladovány v mrazáku při teplotě blízké -20 °C.

Tab. 3.7.: Závislost velikosti DNA fragmentu na reakční směsi.

Velikost DNA fragmentu [kbp]	Objem dodávaného pufru QX1 [µl]	Objem dodávané dH ₂ O [µl]
< 0,1	6 x hmotnost segmentu v mg	-
0,1 – 4	3 x hmotnost segmentu v mg	-
> 4	3 x hmotnost segmentu v mg	2 x hm. segmentu v mg

Tab. 3.8.: Doba a podmínky pro eluci DNA fragmentu z pelety.

Velikost DNA fragmentu [kBp]	Doba klidové fáze [min]	Teplota při klidové fázi [°C]
< 4	5	laboratorní
4 – 10	5	50
> 10	10	50

3.4.2.5. Měření koncentrace DNA

Měřena byla koncentrace plazmidové DNA na spektrofotometru Thermo Spectronics – BioMate 5. Následující postup je pro plazmidovou DNA, odlišnosti pro genomovou DNA – v závorkách.

Vzorek DNA byl 150x (pro genomovou 10x) naředěn – př. viz tab. 3.9. Na spektrofotometru byla změřena jeho absorbance při 260 a 280 nm proti dH₂O. Koncentrace DNA byla vypočtena dle vzorců 3.1. níže.

Tab. 3.9.: Příklady ředění DNA pro měření její koncentrace.

Typ DNA	DNA [μl]	dH ₂ O [μl]	Použitá kyveta
plazmidová	2	298	standardní
genomová	10	90	pro 100 μl

Vzorce 3.1.: Výpočet koncentrace plazmidové DNA ve vzorku:

$$c = \frac{\varepsilon \cdot A_{260} \cdot 150}{1000} [\mu\text{g} / \mu\text{l}]$$

respektive genomové DNA:

$$c = \frac{\varepsilon \cdot A_{260} \cdot 10}{1000} [\mu\text{g} / \mu\text{l}] \quad \varepsilon = \text{molární absorpční koeficient}$$

3.4.2.6. Ligace

Vektorový plazmid a fragment, které měly být spojeny ligací, byly nejprve naštěpeny restrikcími enzymy (kapitola 3.4.2.2.) za vzniku kohezivních konců. Poté byly nanášeny na agarózový gel DNA elektroforézou (kap. 3.4.2.3.), vyzolovány (kap. 3.4.2.4.) a zbaveny tak nečistot a jinak dlouhých fragmentů. Aliquoty izolovaných úseků DNA byly opět nanášeny na elektroforetický gel, po 2 μl (spolu s 1Kb DNA markerem) a pomocí fotodokumentačního softwaru GeneSnap (Syngene) byla vztažením k množství nanášeného markeru spolu se vzorky vypočtena jejich koncentrace.

Stechiometrický poměr vektor : inzert byl nejčastěji volen 1 : 7. Do reakční směsi byla přidána dH_2O , dále T4-DNA ligáza a příslušný pufr obsahující ATP (Fermentas). Obecná ligační reakční směs viz tab. 3.10. Reakce probíhala v objemu 15 μl při teplotě 15 °C po dobu 3 hod. Ukončena byla inaktivací ligázy při teplotě 65 °C po dobu 10 min.

Tab. 3.10.: Příklad složení typické ligační reakce.

	vektor [ng]	fragment	pufr [μl]	T4 ligáza [μl]	dH_2O [μl]
Složení	10-50	stechiometricky	1,5	1	do 15

3.4.2.7. Odsolení ligační směsi

K odsolení ligační směsi byly použity „odsolovací“ kolonky vyrobené dle Atrazhev *et* Elliott, 1996. Byl připraven přesně 100mM roztok glukózy s 1% agarózou. Rozehřátý byl rozlit po přibližně 1,4 ml do 1,5ml mikrozkuvek. Zkumavky byly následně přelepeny běžnou laboratorní páskou a kolmo propíchnuty 200 μl špičkou, zasahující asi 5-7 mm do neztuhlé agarózy. Po důkladném utužení v lednici byly špičky vyjmuty a mikrozkuvky neprodyšně utěsněny parafilmem. Do doby použití byly skladovány v lednici při teplotě cca 5 °C v uzavřené nádobě.

Ligační směs k odsolení (tj. 15 μl) byla přenesena do jamky v „odsolovací“ kolonce vzniklé po odstranění špičky. Uzavřená kolonka byla umístěna do lednice s teplotou blízkou 5 °C a inkubována 1,5 hod. Odsolený roztok byl odebrán do nové mikrozkuvky a připraven k transformaci bakterií elektroporací (viz kap. 3.4.1.3.).

3.4.2.8. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Jde o metodu amplifikace vybraného úseku DNA v několika opakujících se krocích pomocí termostabilní DNA dependentní DNA polymerázy.

Templátová DNA byla nejprve denaturována při 94 °C na dvě samostatná vlákna. Ochlazením směsi na teplotu optimální pro použité primery (ssDNA oligonukleotidy s délkou okolo 20 nt) došlo k jejich asociaci s denaturovanými jednovláknovými DNA. Zvýšením teploty na 72 °C byla aktivována činnost termostabilní DNA polymerázy, která pak dosyntetizovala DNA k templátovým „jednovláknům“. Kroky denaturace, „nasedání“ primerů a amplifikace byly opakovány 20-30x v závislosti na požadovaném výsledku (s vyšším počtem cyklů vzrůstá riziko chyby způsobené *Taq* polymerázou). Při amplifikaci určitého genu pro následné klonování, byl proto volen nižší počet cyklů a poslední syntetická fáze byla prodloužena o 10 min. Pro testování bakteriálních kolonií na přítomnost požadovaného konstruktů byl volen vyšší počet cyklů. Po skončení posledního z cyklů byla reakční směs chlazená na 4 °C. Použité teploty v jednotlivých krocích a obecné složení reakční směsi viz tab. 3.11. a 3.12.

Reakce probíhala vždy v 0,5ml tenkostěnných mikrozkušnicích v termocykleru MJ Research PTC-200, který umožňuje naprogramování reakce spolu s rychlými změnami teplot, včetně zahřívání více mikrozkušnic.

Tab. 3.11.: Program amplifikace DNA pomocí PCR. Tab. 3.12.: Složení obecné reakční směsi.

Program	Teplota [°C]	Čas [min]
1. Predenaturace	94	3
2. Denaturace	94	0,5
3. Nasedání primerů	Specifická ¹	0,5
4. Prodlužování	72	Specifický ²
5. Chlazení	4	∞

Složení	Objem [μl]
dH ₂ O	6,7
Pufr	1
MgCl ₂	0,6
dNTP's	0,2
Primer přímý	0,2
Primer zpětný	0,2
DNA ³	1
<i>Taq</i> polymeráza	0,1

¹Závisí na délce primeru a obsahu GC párů (nejčastěji mezi 55-60 °C).

²Doba amplifikace je závislá na procesivitě *Taq* polymerázy a délce množenoého úseku (zpravidla na 1kb ~ 1 min).

³U plazmidů ředěná dH₂O 1:100.

3.4.2.9. TA-klonování

Tato metoda, při níž byl použit komerční kit „PCR Cloning Kit“ firmy Qiagen, využívá vlastnosti některých DNA dependentních DNA polymeráz (např. *Taq*) přidávat na konec polymerovaného řetězce jednonukleotidový 3' přesah adenosinu.

Do programu PCR reakce byla vložena před závěrečnou fází chlazení polymerační fáze – 10min ~ 72 °C. Produkty PCR tak byly opatřeny na 3' konci adenosiny, přes které mohou být zaligovány do vhodného malého klonovacího vektoru (= „pDRIVE“).

Všechny potřebné komponenty reakční směsi (vyjma dH₂O) byly rozmrazeny a následně ihned vloženy na led. Reakční směs byla připravena v tenkostěnné 0,5 ml PCR mikrozkuhavce. Byl smíchán 1 μl „pDRIVE“ (=50ng), 5 μl „Ligation Master Mix“, 1-4 μl PCR fragmentu dle koncentrace (13 ng PCR produktu na každých 100 bp jeho délky) a variabilní množství dH₂O do celkového objemu 10 μl. Směs byla inkubována v termocykleru 3 h při 12 °C, pak následně 10 min při 70 °C. Poté byla ligační směs odsolena (kapitola 3.4.2.7.) a elektroporována do bakterií (kap. 3.4.1.3.).

Vložení PCR produktu do tohoto malého klonovacího vektoru skýtá řadu výhod – „pDRIVE“ se v transformovaných bakteriích nachází ve velkém počtu kopií a při jeho izolaci je dosahováno vysokého výtěžku. Dále umožňuje tzv. „modrobílou selekci“ – je-li PCR produkt správně „zaligován“ do „pDRIVE“, přeruší gen *LacZ* pro utilizaci substrátu (Xgal) přidávaného do kultivačního média transformovaných bakterií a rekombinantní kolonie jsou pak bílé. Není-li vložen PCR produkt do „pDRIVE“, gen pro *LacZ* je funkční a substrát je produktem tohoto genu přeměněn v modrý precipitát – kolonie jsou modré. V neposlední řadě obsahuje „pDRIVE“ řadu dalších restrikčních míst, pomocí kterých může být PCR fragment po amplifikaci v bakteriích restrikčně vyštěpen (kap. 3.4.2.2.) a použit při dalším klonování.

3.4.2.10. Sekvence

U vzorku, jenž měl být osekvenován, byla změřena koncentrace DNA (viz kap. 3.4.2.5.). Do tenkostěnné sekvenační mikrozkuhavky bylo přidáno 100-200 ng DNA, maximálně však 13,7 μl a 0,3 μl příslušného 10μM primeru. Zbytek byl případně doplněn dH₂O do 14 μl. Připravený sekvenační vzorek byl předán do laboratoře sekvenace DNA PřF UK. Obdržené sekvence byly vyhodnocovány v programu Chromas LITE verze 2.01 a porovnávány programem Blast se sekvencemi ve veřejně dostupných databázích.

3.4.3. *De novo* regenerace rostlin bramboru po ošetření 5-azacytidinem

Tato metoda sloužící k demethylaci transkripčně umlčených oblastí transgenů blokováním udržovací DNA metyltransferázy 5-azacytidinem (AzaC) byla vyvinuta na školitelském pracovišti Nocarovou a Fischerem (nepublikované výsledky). Spočívá v ošetření aktivně se dělících buněk s metylovaným transgenem AzaC a následné selekci regenerantů na médiu s antibiotikem (jež je inaktivováno produktem jednoho z metylovaných tandemově uspořádaných transgenů).

K regeneraci sloužila transgenní linie lilku bramboru (R28; Nocarová *et al.*, 2009), která transkripčně umlčela transgen nesoucí gen pro rezistenci ke kanamycinu a gen pro *RS-GFP*. Rostliny byly odvozeny z vrcholových segmentů kultivovaných na LS médiu v kelímcích Sigma 4-6 týdnů.

Zásobní roztok AzaC byl připraven rozpuštěním 50 mg AzaC v 10 ml dH₂O a jeho sterilizací přes předfiltr Nalgene s velikostí pórů 0,22 μm. Sterilní roztok byl po 1 ml rozdělen do sterilních 1,5ml mikrozkrumavek a skladován v mrazáku za teploty blízké – 20 °C. Rozmražen a použit byl každý vzorek maximálně 10x.

Dobře vyvinuté listy ze střední části rostlin připravených viz výše byly sterilně nařezány na 2-4 kusy, dle velikosti listů. Tyto listové segmenty pak byly rozloženy svou abaxiální stranou vzhůru na sterilní plastovou Petriho misku (Ø 6cm) s CIM médiem (tab. 3.1.). Na jednu misku bylo umístěno vždy cca 8 listových segmentů. Misky byly po sedmi kusech rozloženy na vysterilizovanou větší skleněnou Petriho misku (Ø 19cm) a kultivovány 3 dny při 23 °C a 16 hod světla. Po uplynutí kultivační doby byly segmenty přeneseny opět na malé Petriho misky s CIM médiem, tentokrát však s přídatkem AzaC (2,5 mg/l média). Znovu byly kultivovány za stejných podmínek a po 4 dnech přeneseny na SIM médium s kanamycinem (50mg/l). Dále byly kultivovány za identických podmínek jako výše, na SIM médiu se subkultivačním intervalem 14 dní.

Regenerující kalusy a posléze celistvé rostliny byly v průběhu regenerace sledovány a snímány pod fluorescenčním mikroskopem (kap. 3.4.4.). Zregenerované rostliny (2 a více cm velké, s vyvinutými listy) byly sterilně odřezávány pomocí žiletky a přenášeny na LS médium s kanamycinem do 100ml Erlenmeyerových baněk. Dále byly kultivovány viz kap. 3.1.4.

3.4.4. Test kanamycinové rezistence

Rezistence transgenních linií brambor ke kanamycinu byla testována jejich regenerací z fragmentů listů. Listy z rostliny v *in vitro* podmínkách byly rozřezány pomocí žiletky na velikost 1-2 cm a rozloženy svou abaxiální stranou vzhůru na pevné SIM médium s kanamycinem (100mg/l). Médium bylo předem rozsekáno pomocí pinzety, za účelem zlepšení kontaktu listů s médiem. Kultivovány byly 3-4 týdny, následně vyhodnoceny (Nocarová *et al.*, 2010).

3.4.5. Reaktivace exprese po ošetření 5-azacytidinem

Pomocí této metody lze předběžně rozlišit, zda byly linie transgenní buněčné linie BY-2 umlčené na transkripční úrovni či na úrovni posttranskripční. Při intenzivním dělení buněk za přítomnosti bloku udržovací metylace, AzaC, dochází u části buněk linií s transkripčně umlčenou expresí transgenů k obnovení této exprese (Nocarová *et Fischer*, nepublikováno)

Buněčné suspenze byly třetí den subkultivačního intervalu (viz kap. 3.1.3.) ošetřeny AzaC (výsledná koncentrace 10 μ M). Po 4 dnech kultivace byly pozorovány případné změny v expresi *GFP* pod fluorescenčním mikroskopem.

3.4.6. Tvorba obrazových dat

Obrazová data byla získávána při focení agarózových gelů na UV transiluminátoru a při snímání celistvých kalusů buněčné linie BY-2 na přístroji G:BOX (Syngene). Snímky byly ukládány pomocí programu GeneSnap (Syngene) ve formátu .TIFF (Tagged Image File Format), dodatečně upravovány v programu Zoner Photo Studio 13 a pro potřeby diplomové práce převáděny do formátu .JPEG (Joint Photographic Experts Group).

Snímky dokumentující regeneraci rostlin brambory či jednotlivé řetízky buněk BY-2 byly pořizovány na fluorescenčním mikroskopu Olympus BX51 s kamerou Apogee U4000. Stejně jako snímky získané z G:BOXu byly dodatečně upravovány a převáděny pro potřeby diplomové práce do .JPEG.

4. Výsledky

4.1. Příprava genových konstruktů

4.1.1. *pCP60-antiRS-GFP (RS-GFP v antisense orientaci)*

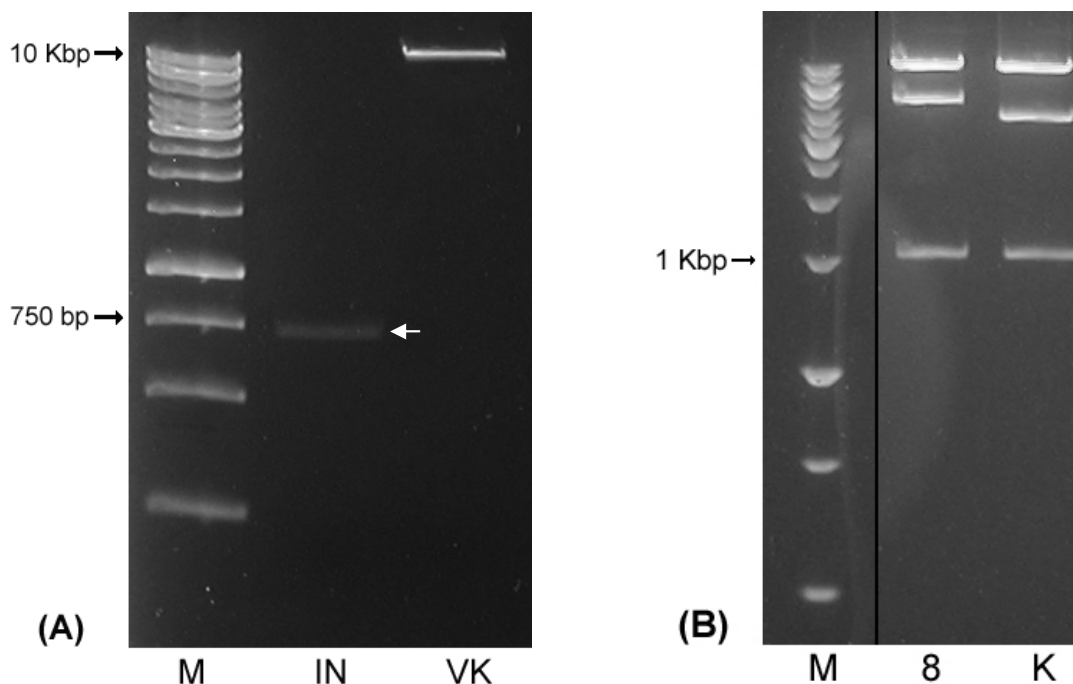
K přípravě tohoto expresního vektoru byly použity plazmidy *pCP60* a *psmRS-GFP* charakterizované v kapitole 3.2.1. respektive 3.2.2.

Plazmid *pCP60* byl linearizován pomocí restriční endonukleázy (kap. 3.4.2.2.) *XbaI*. Restriční směs pak byla inkubována 10 min při 65°C pro dokonalou inaktivaci restriktázy a konce plazmidu byly zatupeny T4 DNA polymerázou (inkubace 20 min při 11°C s přidavkem dNTP) Po inaktivaci polymerázy (10 min při 70°C) byla směs linearizovaného zatupeného vektoru *pCP60* poblíž jednoho ze svých konců štěpena restriktázou *BamHI*. Nakonec byla restriční směs nanesena na agarózový gel a elektroforeticky frakcionována (kap. 3.4.2.3.). Pruh DNA vizualizovaný UV světlem transiluminátoru velikostně odpovídající plasmidu *pCP60* byl bez zbytečných průtahů vyřezán pomocí skalpelu a DNA z něj následně izolována kitem QIAEX II (viz kap. 3.4.2.4.).

Plazmid *psmRS-GFP* byl taktéž linearizován, pomocí restriktázy *SacI* (1 h při 37°C), enzym následně inaktivován a konce plazmidu zatupeny T4 polymerázou (viz výše). Po inaktivaci polymerázy (10 min při 70°C) byla směs linearizovaného vektoru štěpena restriktázou *BamHI* za účelem vyštěpení *RS-GFP*. Směs fragmentů byla nanesena na agarózový gel a stejnými postupy následně izolována DNA o velikosti odpovídající *RS-GFP*.

Části vodného roztoku s připraveným vektorem (*pCP60*) a inzertem (*RS-GFP*) byly před ligací znovu naneseny na agarózový gel a pomocí analytického softwaru (kap. 3.4.6.) byla odhadnuta koncentrace DNA ve vzorcích. Následně byly vektor a inzert ligovány (kap. 3.4.2.6.) s přihlédnutím k jejich koncentracím. Ligační směs byla odsolena (kap. 3.4.2.7.) a transformována do *E. coli* (kap. 3.4.1.3.). Transformovaná kultura *E. coli* byla vyseta na Petriho misku s LB médiem a selekčním agens a kultivována přes noc při 37 °C. Narostlé kolonie byly analyzovány pomocí PCR s primery specifickými pro *RS-GFP* a CaMV 35S promotor (kap. 3.4.2.8.) po deseti v jedné mikrozkušavce. Pozitivní signál – nález varianty *pCP60-RS-GFP* v antisense orientaci (obr. 4.2.) – znamenal izolaci plazmidů (kap.

3.4.2.1.) ze všech deseti klonů a jejich následnou kontrolní restrikci za použití příslušných restriktáz. Objevené klony byly před dalším použitím sekvenovány (kap. 3.4.2.10.) a z bakteriální kultury byla připravena konzerva (800 μ l bakteriální kultury + 200 μ l 50% sterilního glycerolu do 1,5 ml mikrozkušavky a zmrazení v tekutém dusíku, další skladování při -80 °C). Sekvence potvrdila správné začlenění *RS-GFP* do *pCP60* a nepřítomnost mutací.



Obr. 4.1.: **Elektroforetické gely.** (A) Inzert a vektor po sledu štěpení, zatupování a závěrečné izolaci z gelu: IN – inzert (*RS-GFP* vyštěpené z *psmRS-GFP*), VK – vektor (štěpený *pCP60*). (B) Kontrolní restrikce vytvořeného plazmidu *pCP60-antiRS-GFP* enzymy *Bgl*III & *Bam*HI: 8 – plazmid z ověřeného bakteriálního klonu, K – jeden z fragmentů T-DNA je ve vytvořeném plazmidu viditelně delší oproti plazmidu *pCP60* neobsahujícímu *RS-GFP*. M – marker.



Obr. 4.2.: **Schéma konstruktů *pCP60-RS-GFP* v antisense orientaci.** P – promotor, T – terminátor.

4.1.2. pCP60-E-GFP

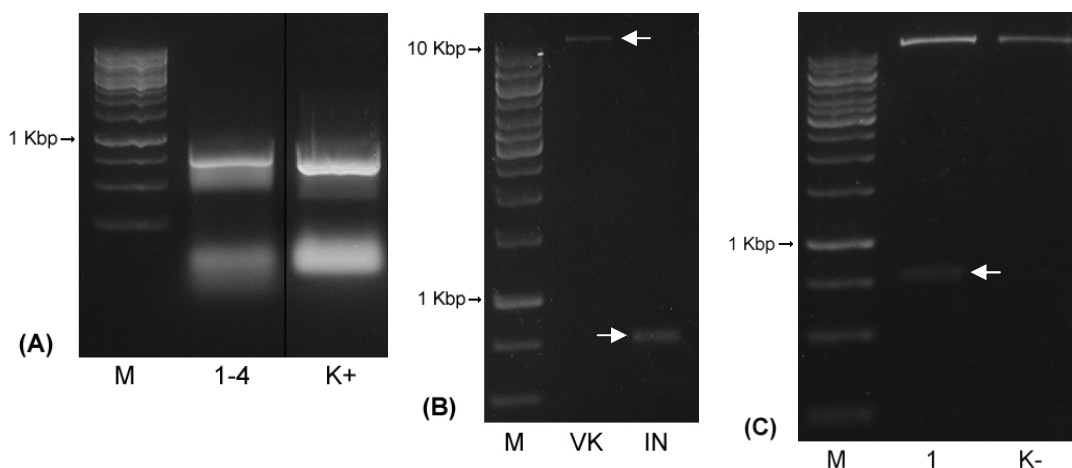
Pro přípravu tohoto konstruktu byly využity plazmidy – *pCP60* (kap. 3.2.1.) a *pGREEN 0029^{MOD}* (kap. 3.2.3.).

Příprava inzertu (*E-GFP*): Nejprve byly navrženy dva primery na amplifikaci *E-GFP* s adaptory obsahujícími restrikční místa – přímý primer obsahoval *BamHI*¹, zpětný *EcoRI* hned za terminační sekvencí. *E-GFP* byl pomocí těchto primerů a metody PCR (kap. 3.4.2.8.) upravené pro TA-klonování (kap. 3.4.2.9.) namnožen. TA-klonováním byl pak namnožený fragment vložen do pomocného vektoru pDRIVE. Ligační směs byla odsolena (kap. 3.4.2.7.) a transformována elektroporací do *E. coli* (kap. 3.4.1.3.). Narostlé kolonie byly po čtyřech testovány pomocí PCR, jež detekovala přítomnost sekvence pro *E-GFP* (viz obr. 4.2.). Z jedné čtveřice klonů, jež byly pozitivní na přítomnost *E-GFP* byly izolovány plazmidy (kap. 3.4.2.1.). Tyto byly podrobeny restrikčnímu štěpení (kap. 3.4.2.2.) enzymem *EcoRI* (je obsažen i v pDRIVEu), elektroforeticky frakcionovány (kap. 3.4.2.3.) a byl nalezen jeden plazmid, který obsahoval začleněný *E-GFP*. Sekvenací byla ověřena jeho správnost (kap. 3.4.2.10.). Ověřený plazmid pDRIVE+*E-GFP* byl poté podroben restrikčnímu štěpení pomocí restriktáz *BamHI* a *EcoRI*, podroben elektroforéze a izolován z agarózového gelu (kap. 3.4.2.4.).

Příprava vektoru (*pCP60*): Vektor *pCP60* byl linearizován pomocí restriktáz *BamHI* a *EcoRI*, podroben elektroforéze a následně izolován z agarózového gelu.

Inzert i vektor byly společně v definovaném množství elektroforeticky frakcionovány a ze snímku byla odhadnuta jejich koncentrace. Následně byly ligovány, ligační směs odsolena a transformována do *E. coli*. Z narostlých kolonií bylo náhodně vybráno 10 ks, ze kterých byly izolovány plazmidy. Tyto byly podrobeny kontrolnímu restrikčnímu štěpení enzymy *BamHI* a *EcoRI*. Plazmid, jehož restrikce odhalila fragment odpovídající délkou *E-GFP*, byl ověřen sekvenací a z příslušného bakteriálního klonu byla připravena konzerva (viz kap. 3.1.1.).

¹Sekvence mezi *BamHI* a iniciačním kodonem *E-GFP* byla stejná jako u dříve připraveného konstruktů *pCP60-RS-GFP* v sense orientaci, tedy: **GGATCCAAGGAGATATAACAATG**.



Obr. 4.3.: **Elektroforetické gely.** (A) Testování kolonií obsahujících pDRIVE s inzercí *E-GFP* pomocí PCR: 1-4 – pozitivní čtveřice kolonií, K^+ – pozitivní kontrola – templátem pro PCR byl *pGREEN 0029^{MOD}*. (B) Vektor a inzert po řadě ošetření a závěrečné izolaci z gelu: VK – vektor (štěpený *pCP60*), IN – inzert (vyštěpené *E-GFP*). (C) Kontrolní restrikce *Bam*HI & *Eco*RI *pCP60-E-GFP*: 1 – plazmid z nalezeného bakteriálního klonu. K^- – *pCP60*, M – marker.



Obr. 4.4.: **Schéma konstruktů *pCP60-E-GFP*.** P – promotor, T – terminátor.

4.1.3. *pCP60-RS-GFP* se dvěma tandemovými promotory

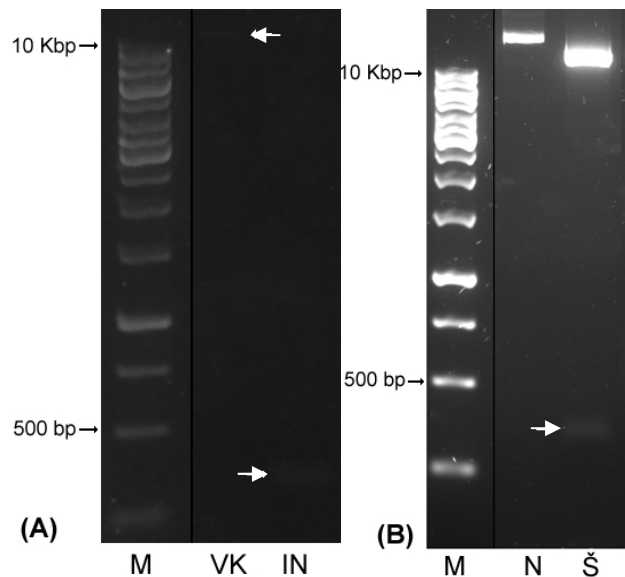
Tento konstrukt (dále jen *pCP60-RS-GFP-DP*) byl připraven duplikací části vektoru *pCP60* (kap. 3.2.1.), která kóduje nopalin syntázový promotor (Pnos). Pnos byl začleněn před CaMV 35S promotor kontrolující transkripci *RS-GFP*.

Příprava inzertu (Pnos): Byly navrženy 2 primery obsahující adaptory s *Hind*III místem – 1 přímý a 1 zpětný. Pomocí modifikované PCR (kap. 3.4.2.8.) pro následné TA-klonování (kap. 3.4.2.9.) s použitím adaptorových primerů byla amplifikována sekvence pro Pnos z *pCP60*. TA-klonováním byl Pnos začleněn do pomocného plazmidu pDRIVE, ligační směs byla odsolena (kap. 3.4.2.7.) a transformována do *E. coli* (kap. 3.4.1.3.). Narostlé kolonie byly po 10 jedincích testovány pomocí PCR, jež detekovala přítomnost sekvence pro Pnos. Při výskytu signálu pro specifický produkt PCR možný pouze v případě inserce Pnos do pDRIVE byla z těchto příslušných deseti jedinců izolována plazmidová DNA (kap. 3.4.2.1.). Všech deset plazmidů bylo podrobeno kontrolní restrikci (kap. 3.4.2.2.) pomocí *Hind*III restriktázy

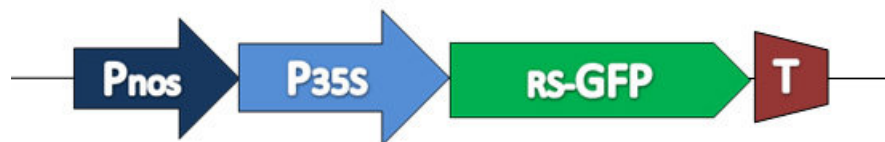
dokazující přítomnost Pnos. Vzorek se správnou inzercí byl podroben znovu restrikci pomocí *HindIII*, frakcionován na agarózovém gelu (kap. 3.4.2.3.) a z něj vyizolován Pnos (kap. 3.4.2.4.). Současně byl plazmid podroben sekvenaci (kap. 3.4.2.10.).

Příprava vektoru (*pCP60*): Plazmid *pCP60* byl restrikčně štěpen pomocí *HindIII*, restrikční směs byla frakcionována na elektroforéze a linearizovaný *pCP60* izolován z agarózového gelu.

Inzert byl ligován do vektoru, ligační směs odsolena a transformována do bakterií. Transformované klony byly testovány pomocí PCR za účelem nalezení klonu se správně orientovaně vloženým Pnos. Z nalezených klonů byly izolovány plazmidy, kontrolně restrikčně štěpeny pomocí *HindIII* a pozitivní vzorky odeslány k sekvenaci.



Obr. 4.5.: **Elektroforetické gely.** (A) Vektor a inzert po řadě ošetření a závěrečné izolaci z gelu: VK – vektor (štěpené *pCP60*), IN – inzert (vyštěpený Pnos). (B) Kontrolní restrikce *HindIII* *pCP60-RS-GFP* se dvěma promotory: N – neštěpený, Š – plazmid štěpený *HindIII*. M – marker.



Obr. 4.6.: **Schéma konstruktů *pCP60-RS-GFP* se dvěma promotory.** P – promotor, T – terminátor.

4.2. Hodnocení míry umlčování transgenů v závislosti na uspořádání T-DNA a nukleotidové sekvenci transgenů

4.2.1. Popis a uspořádání experimentu

Cílem pokusu bylo zjistit, zda-li je míra umlčování závislá: i) na nukleotidové sekvenci reportérového genu (porovnání *RS-GFP* a *E-GFP*, které jsou identické z 98 % na úrovni proteinu, ale jen ze 76 % na úrovni DNA); ii) na přítomnosti transkriptu promotorové oblasti reportérového genu; iii) u vybraných linií s nedetekovatelnou fluorescencí GFP u variant *pCP60-RS-GFP* a *pCP60-RS-GFP-DP* zjistit, zda-li je exprese umlčena na transkripční či posttranskripční úrovni.

Vstupní hypotézou bylo, že sekvenční rozdílnost mezi variantami GFP (24 % dle programu BLAST[®] – www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) se může odrazit i v míře umlčování transgenů. Druhým předpokladem bylo, že konstrukt s *RS-GFP* a dvěma promotory bude ve větší míře umlčován v porovnání s konstruktem s *RS-GFP* a jedním promotorem, kvůli transkripci sekvence *CaMV 35S* promotoru.

Pro popsany experiment byly připraveny dva expresní konstrukty – *pCP60-E-GFP* (kap. 4.1.2.) a *pCP60-RS-GFP-DP* (kap. 4.1.3.). Dále byl používán již dříve připravený konstrukt *pCP60-RS-GFP* (Nocarová *et Fischer*, 2009). Všechny tři konstrukty byly použity k transformaci tabákové buněčné linie BY-2 (dle kap. 3.4.1.4.) a byly tak získány 3 varianty transformované BY-2. Po kokultivaci s agrobaktériem bylo získáno několik set kalusů transgenních linií, které postupně narůstaly na pevném MS médiu se selekčním agens – kanamycinem. Při velikosti 2-3 mm byly kalusy přeneseny na čerstvé MS médium s kanamycinem v počtu 9, respektive 12 kusů na jednu malou Petriho misku o průměru 6 cm. Horní hranice počtu kalusů byla stanovena jako 240 linií z jedné varianty. Ne u všech variant bylo této hranice dosaženo. Kalusové linie byly udržovány jejich subkultivací s přibližně 14denním intervalem po dobu 4 měsíců. Po tuto dobu u nich byla sledována míra exprese *GFP*. Na závěr byla exprese statisticky vyhodnocena.

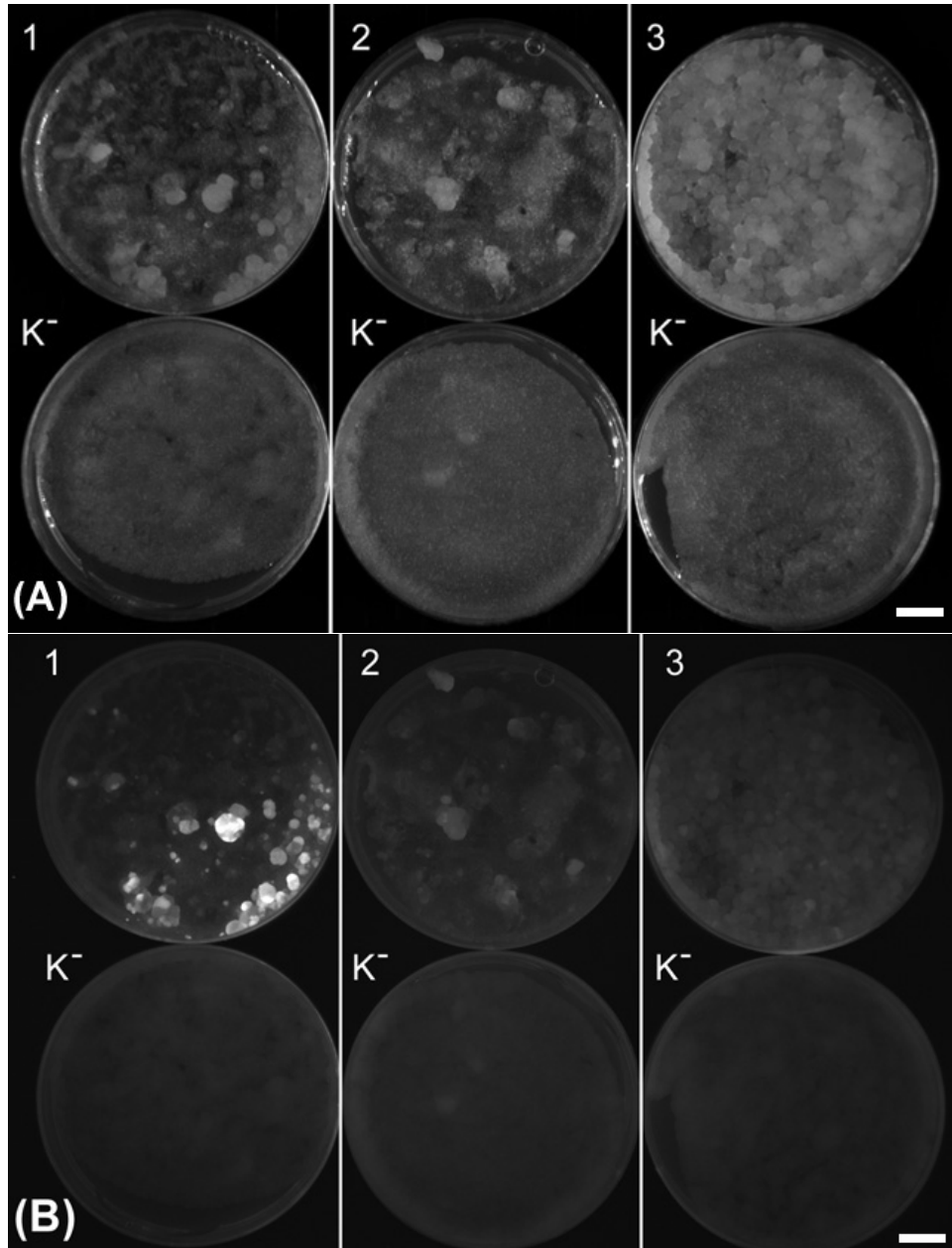
Celkem 6 linií (3 z každé varianty) s nedetekovatelnou expresí *GFP* bylo ošetřeno pomocí AzaC (viz kap. 3.4.5.) za účelem případné reaktivace umlčeného transgenů na transkripční úrovni.

4.2.2. Výsledky

Již při počátečních regeneracích transgenních kalusů (obr. 4.7.) byly mezi variantami patrné rozdíly v míře fluorescence GFP a v účinnosti transformace:

1) Účinnost transformace u linie s *pCP60-RS-GFP* byla řádově vyšší než u ostatních dvou variant.

2) Intenzita signálu GFP byla u varianty s *pCP60-E-GFP* výrazně vyšší než u zbývajících dvou variant (viz graf 4.1.).



Obr. 4.7.: Regenerace kalusů transgenních linií BY-2 na selekčním médiu. (A) Fotografováno v běžném světle bez filtrů. (B) Fotografováno při excitaci modrým světlem za použití filtrů pro GFP. 1 – linie s *pCP60-E-GFP*, 2 – linie s *pCP60-RS-GFP-DP*, 3 – linie s *pCP60-RS-GFP*, K⁻ – kontrolní netransformovaná varianta, (měřítko = 1cm).

Celkem bylo analyzováno 240 linií *pCP60-RS-GFP*, 235 linií *pCP60-E-GFP* a 199 linií *pCP60-RS-GFP-DP*. V průběhu růstu byly kalusy snímány za excitace modrým světlem. Procento linií s nedetekovatelnou expresí GFP bylo vyhodnoceno statisticky: jako statisticky průkazný ($\alpha = 0,05$) byl pomocí X^2 testu vyhodnocen rozdíl v expresi *GFP* mezi variantami *pCP60-RS-GFP* a *pCP60-E-GFP*. Naopak rozdíl mezi variantami *pCP60-RS-GFP* a *pCP60-RS-GFP-DP* byl neprůkazný ($\alpha = 0,05$).

Tab. 4.1.: Počet transgenních kalusů a intenzity jejich fluorescence (kategorie byly stanoveny samostatně v rámci každé varianty).

transgenní varianty BY-2			<i>pCP60-E-GFP</i>	<i>pCP60-RS-GFP</i>	<i>pCP60-RS-GFP-DP</i>
počet kalusů s fluorescencí GFP					
homogenní	jednotlivou	vysokou	24	53	55
		střední	153	137	95
		ND ¹	58	50	49
heterogenní	mozaikovitou ²		16	42	28
	sektoriální ²		24	33	36
celkem kalusů			235	240	199

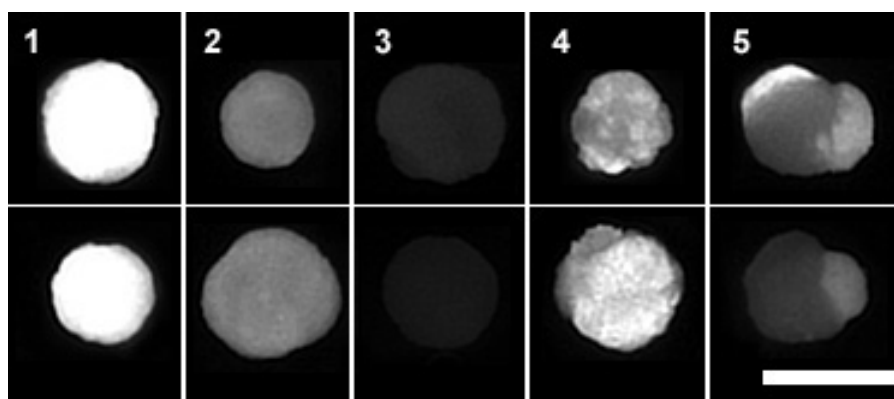
¹nedetekovatelnou

²Heterogenita fluorescence byla stanovována z celkového počtu kalusů s fluorescencí vysokou/střední/nedetekovatelnou. Mozaikovité kalusy byly začleněny do příslušné kategorie na základě převažujícího signálu. Sektoriální kalusy byly považovány za samostatné kalusy a fluorescenční signál každého sektoru byl hodnocen zvlášť. Typy kalusů viz obr. 4.8.

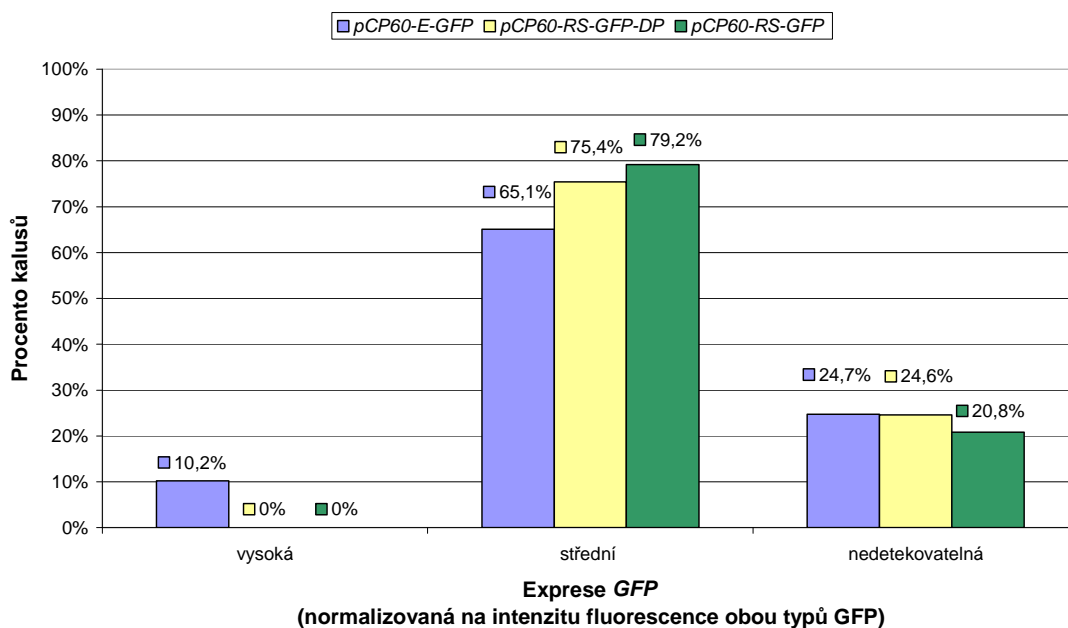
Jak bylo zmíněno výše, transgenní linie varianty *pCP60-E-GFP* vykazovaly mnohem vyšší míru fluorescence než ostatní varianty. Kalusy s vysokou mírou fluorescence u variant *pCP60-RS-GFP* a *pCP60-RS-GFP-DP* by spadaly do kategorie se střední intenzitou fluorescence u varianty *pCP60-E-GFP*. Data z tab. 4.1. proto byla normalizována vzhledem k intenzitě signálu obou typů GFP do druhé tab. 4.2. Pro lepší přehlednost tato normalizovaná tabulka neobsahuje mozaikovité a sektoriální kalusy.

Tab. 4.2.: Počet transgenních kalusů a jejich fluorescence normalizovaná na intenzitu signálu.

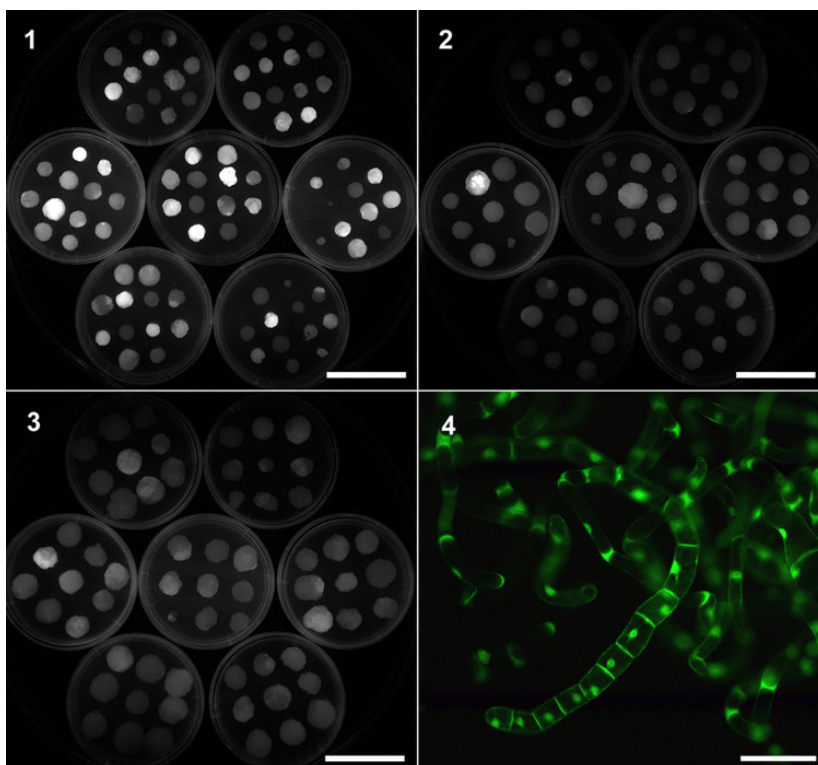
transgenní varianty BY-2			<i>pCP60-E-GFP</i>	<i>pCP60-RS-GFP</i>	<i>pCP60-RS-GFP-DP</i>
počet kalusů s fluorescencí GFP					
homogenní	jednotlivou	vysokou	24	0	0
		střední	153	190	150
		nulovou	58	50	49
celkem kalusů			235	240	199



Obr. 4.8.: Varianty transgenních kalusů s různou expresí GFP. (1) Kalusy s vysokou mírou exprese GFP (odpovídalo pouze var. *pCP60-E-GFP*). (2) Kalusy se střední mírou exprese GFP. (3) Kalusy s nedetekovatelnou expresí (patrně umlčenou) GFP. (4) Heterogenní kalusy s mozaikovitou expresí GFP. (5) Heterogenní sektoriální kalusy, (měřítko = 1 cm).

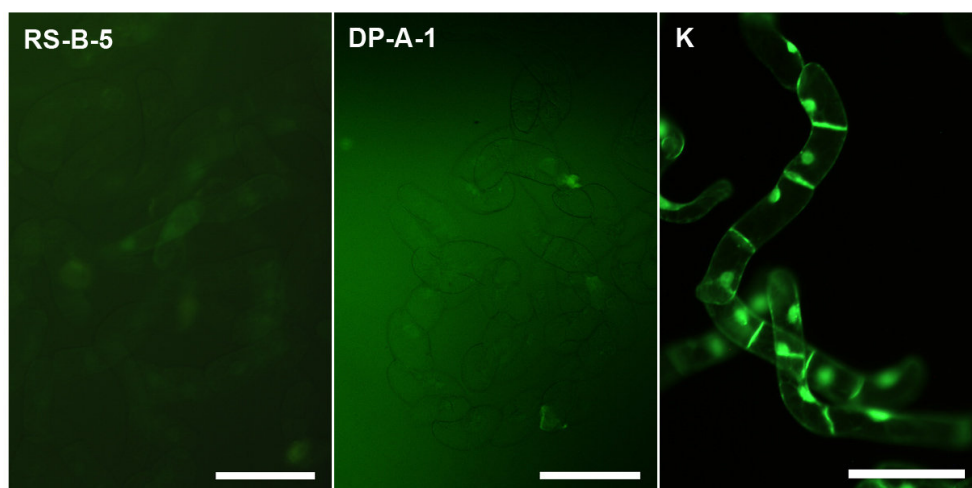


Graf 4.1.: Míra exprese GFP v transgenních liniích BY-2 u jednotlivých variant.



Obr. 4.9.: Přehled transgenních linií všech tří variant s různou mírou exprese *GFP*. (1) Kalusy *pCP60-E-GFP*. (2) Kalusy *pCP60-RS-GFP-DP*. (3) Kalusy *pCP60-RS-GFP*, (měřítko = 4 cm); (4) Detail exprese *GFP* v buňkách transgenní linie *pCP60-E-GFP*, (měřítko = 100 μ m).

U vybraných 6 nesvítících transgenních linií variant *pCP60-RS-GFP* a *pCP60-RS-GFP-DP* ošetřených AzaC nebyla odhalena žádná změna exprese *RS-GFP*, jak naznačuje obr. 4.10.



Obr. 4.10.: Exprese *RS-GFP* u vybraných umlčených transgenních linií BY-2 po aplikaci AzaC. (RS-B-5) I nadále nesvítící linie *pCP60-RS-GFP*. (DP-A-1) I nadále nesvítící linie *pCP60-RS-GFP-DP*. (K) Kontrolní neošetřená svítící linie *pCP60-RS-GFP*, (měřítko = 100 μ m).

4.3. Příprava transgenní linie lilku bramboru s jednou kopií T-DNA náchylnou k umlčení

4.3.1. Popis a uspořádání experimentu

Cílem pokusu bylo připravit transgenní linii lilku bramboru s jednou kopií T-DNA (nesoucí gen pro *NPTII* a *RS-GFP*) náchylnou k umlčování, u které by bylo posléze možné sledovat (při procesu umlčování) změny v metylaci jednotlivých úseků T-DNA.

Na řešitelském pracovišti byla Dr. Nocarovou připravena řada transgenních linií lilku bramboru s různými počty vnesených kopií T-DNA a jak se později ukázalo i s různou mírou náchylnosti k umlčování transgenů. Nocarová *et al.*, 2010 odhalili, že řada těchto linií (náchylných k umlčování) po určitém čase umlčela expresi transgenů nejprve na posttranskripční úrovni a posléze i na úrovni transkripční – metylací promotoru transgenů. Byla tedy vyvinuta metoda obnovení exprese transgenů jeho reaktivací pomocí AzaC (kap. 3.4.3.; Nocarová *et al.*, 2010), která byla aplikována i v rámci předkládané diplomové práce.

❖ Příprava linie náchylné k umlčování:

K obnovení exprese byla vybrána jednokopiová linie R28 umlčená na transkripční úrovni. Postup pokusu viz kap. 3.4.3.

❖ Analýza stavu exprese *RS-GFP* u linie R25:

Transgenní jednokopiová linie R25, odvozená Dr. Nocarovou, se při opakovaných pozorováních pod mikroskopem jevila „podezřele“, co do míry exprese *RS-GFP*. Pouze část buněk jevila známky exprese *RS-GFP*. Bylo proto pojata podezření, že by exprese *RS-GFP* mohla být právě umlčována a pletiva by mohla vykazovat mozaikovitý fenotyp co do umlčení *RS-GFP*.

Předpokladem bylo, že je-li *RS-GFP* mozaikovitě umlčeno v buňkách rostlin R25, regenerací *de novo* by byly získány jednak linie s umlčenou expresí a jednak linie *RS-GFP* stále exprimující, ale náchylné k umlčení, což bylo dílčím cílem práce.

Ze střední části rostlin linie R25 pěstovaných z vrcholových řízků v *in vitro* podmínkách v Sigma kelímcích po dobu přibližně 4-6 týdnů (kap. 3.1.4.) byly sterilně odřezány plně vyvinuté listy. Dále byly pomocí žiletky rozřezány na menší asi 1cm segmenty a přeneseny na malé Petriho misky s SIM médiem bez antibiotik. Segmenty

byly kultivovány za standardních podmínek (kap. 3.1.4.) se 14denním intervalem pasážování.

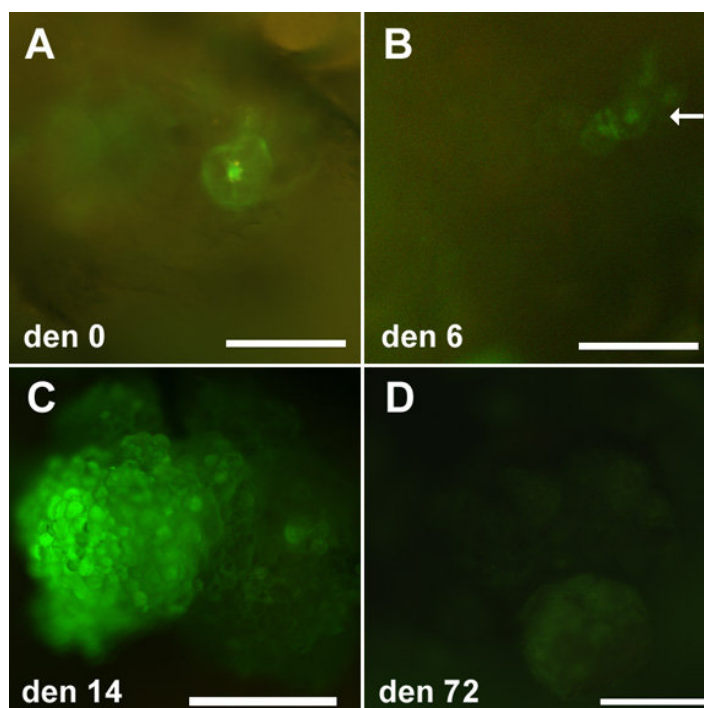
Regenerované rostliny byly kromě sledování pod mikroskopem podrobeny testu na kanamycinovou rezistenci (kap. 3.4.4.), odhalující případné umlčení genu rezistence (*NPTII*).

4.3.2. Výsledky

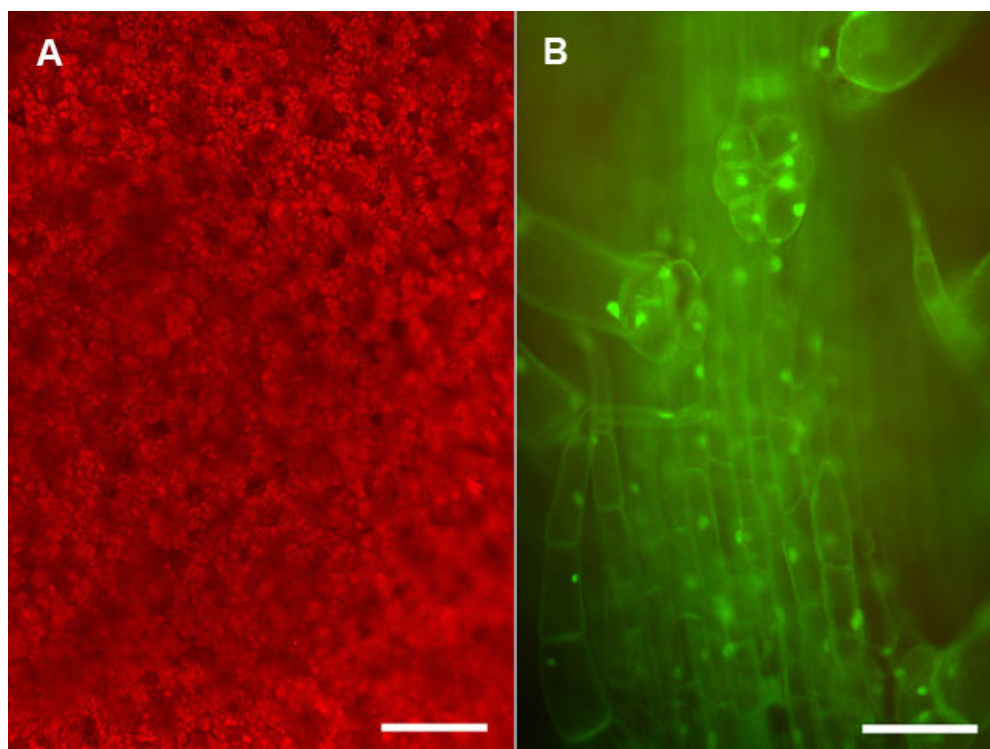
❖ Příprava linie náchylné k umlčování:

V průběhu prvního kola regenerace se po asi 3 měsících objevily rozsáhlé kontaminace a pokus bylo nutno zlikvidovat. Na konci druhého kola regenerací bylo získáno 26 linií lilku bramboru s obnovenou expresí pouze části T-DNA (genu pro rezistenci ke kanamycinu, obnovení exprese *RS-GFP* nebylo prokázáno). Z mechanismu účinku AzaC jako bloku udržovací metylace byla očekávána nejen demethylace *NPTII*, ale i sousedícího *RS-GFP*. Byla však vyslovena domněnka, že vzhledem k náchylnosti linie R28 k umlčování může dojít k umlčení exprese *RS-GFP* v průběhu regenerace před dosažením celistvé rostliny. Regenerující kalusy byly proto při třetím kole regenerací ihned po uplynutí doby kultivace na CIM médiu s AzaC (=den 0) sledovány pod mikroskopem za účelem detekce přechodně obnovené fluorescence *RS-GFP* (obr. 4.10.).

Fluorescence *RS-GFP* byla v průběhu regenerace prokázána, ovšem kalusy exprimující *RS-GFP* postupně odumřely a zregenerované rostliny (20 linií) z ostatních kalusů fluorescenci opět nevykazovaly (viz obr. 4.11. a 4.12.).



Obr. 4.11.: Průběh regenerace rostlin z transkripčně umlčené linie R28 po ošetření AzaC. (A) Buňky 4. den po růstu na CIM s AzaC. (B) Dělicí se buňky 6.den na SIM, (měřítko = 100 μ m); (C) Kalus exprimující *RS-GFP*, na pozadí kalusy neexprimující *RS-GFP*. (D) Odumírající kalus z obr. C, 72 dní od převedení na SIM, (měřítko = 400 μ m).

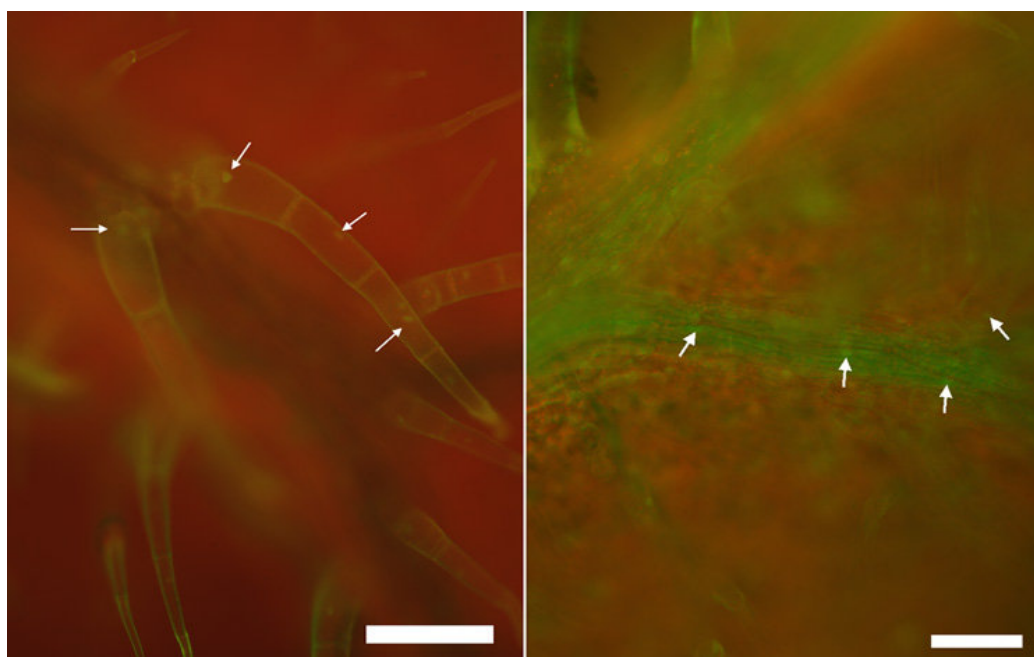


Obr. 4.12.: Rostliny brambor regenerované *de novo* po ošetření AzaC s rozdílnou hladinou exprese *RS-GFP*. (A) List rostliny s umlčenou expresí *RS-GFP* regenerované *de novo* z linie R28. (B) List rostliny dříve odvozené linie R17/33 exprimující *RS-GFP* (Nocarová *et al.*, 2010) odvozená z vícekopiové linie R17, (měřítko = 100 μ m).

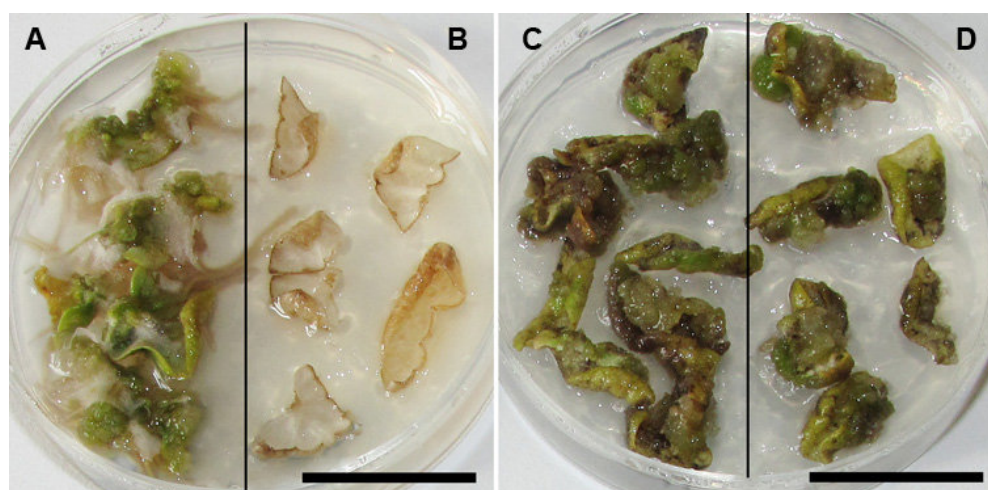
❖ **Stav exprese *RS-GFP* u linie R25:**

Regenerací *de novo* na SIM médiu bez antibiotik se podařilo získat celkem 15 linií. Tyto linie byly snímány pod mikroskopem a u všech byla potvrzena exprese *RS-GFP* (viz obr. 4.13.).

Test kanamycinové rezistence prokázal rezistenci všech regenerovaných linií ke kanamycinu (viz obr. 4.14.). Je tedy možno s určitou pravděpodobností říci, že linie bramboru R25 nebyla mozaikovitá, protože všechny linie z ní zregenerované exprimovaly oba transgeny.



Obr. 4.13.: **Rostliny zregenerované *de novo* z linie R25.** Listy dvou vybraných linií exprimující *RS-GFP*. šipky znázorňují jádra, ve kterých je GFP kumulováno, (měřítko = 100 μ m).



Obr. 4.14.: **Test kanamycinové rezistence na listech linií odvozených z R25.** (A) Linie R17/33 (K⁺). (B) wt – cv. 'Désirée' (K⁻). (C) Odvozená linie č. 11. (D) Odvozená linie č. 12, (měřítko = 2 cm).

4.4. Vliv kultivačních podmínek a ošetření na indukci umlčování exprese transgenů u vícekopiové linie bramboru R17/33 náchylné k umlčování transgenů

4.4.1. Vystavení stresovým podmínkám

Cílem bylo vystavit rostliny bramboru krátkodobě stresovým podmínkám v průběhu regenerace *de novo* a posoudit jejich vliv na míru umlčování zregenerovaných rostlin.

4.4.1.1. Popis a uspořádání pokusu

Jelikož se nepodařilo regenerací *de novo* (z umlčené linie R28) po ošetření AzaC odvodit jednokopiovou linii s obnovenou expresí *RS-GFP* náchylnou k umlčování, byla na tyto pokusy použita linie R17/33. Tato linie obsahující několik kopií transgenů byla odvozena Dr. Nocarovou reaktivací pomocí AzaC z umlčené linie R17. R17/33 tak umožňuje studovat vliv kultivačních podmínek na míru umlčování náchylného transgenů, nedovoluje nám však provádět zamýšlené analýzy metylace T-DNA hydrogensířičitanovým sekvenováním, právě z důvodů většího počtu začleněných kopií.

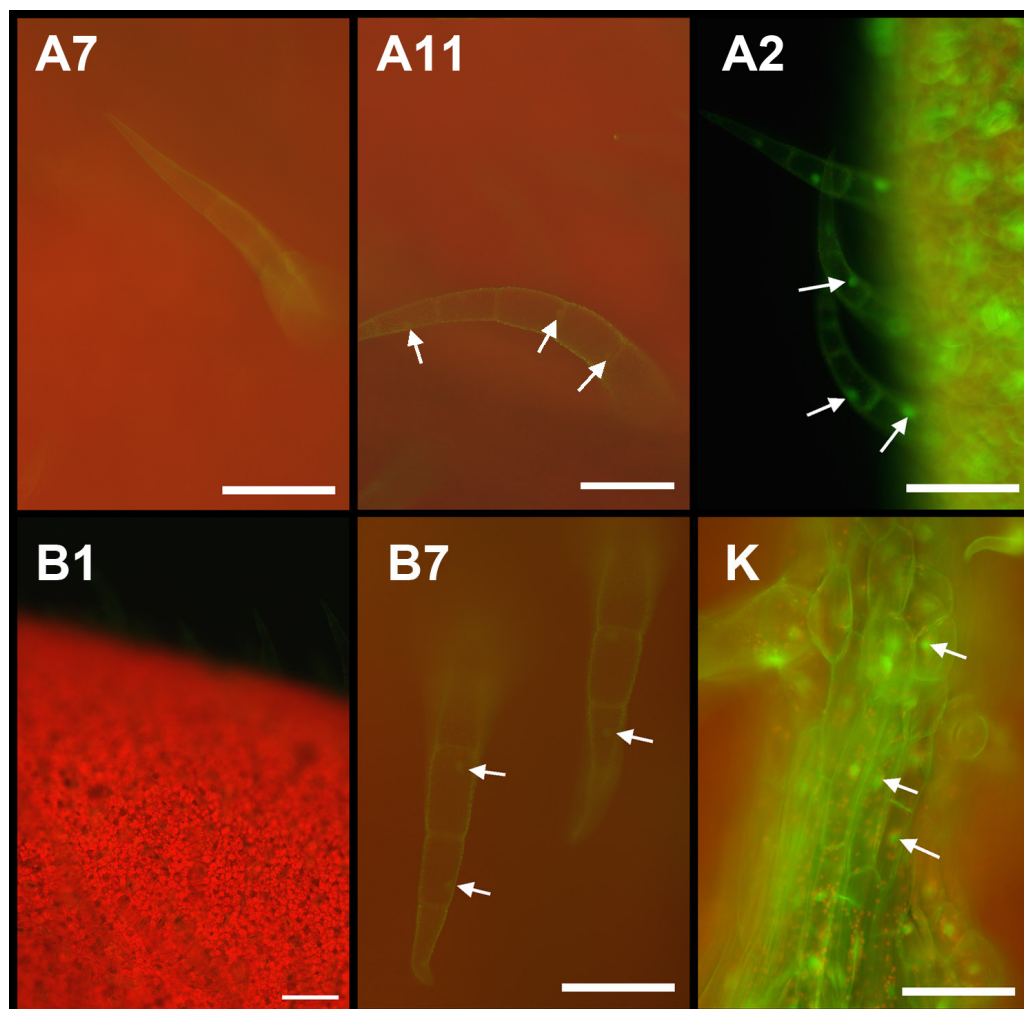
Ze střední části rostlin linie R17/33 pěstovaných z vrcholových řízků v *in vitro* podmínkách v Sigma kelímcích po dobu přibližně 6 týdnů (kap. 3.1.4.) byly sterilně odřezány plně vyvinuté listy. Dále byly pomocí žiletky rozřezány na menší asi 1cm fragmenty a přeneseny po asi 6 kusech na malé Petriho misky (10 kusů) s modifikovaným SIM médiem (viz tab. 4.3.) bez antibiotik. Fragmenty byly po přenesení na klasické SIM (nebyly-li na něm již kultivovány; viz tab. 3.2. a 4.3.) kultivovány za standardních podmínek (kap. 3.1.4.) se 14denním intervalem pasážování. Regenerované celistvé rostliny byly pomocí žiletky odřezány z kalusů a kultivovány na LS médiu ve 100ml Erlenmeyerových baňkách (viz kap. 3.1.4.). Jakmile se vyvinuly první větší lístky, byly rostliny pozorovány pod mikroskopem a byla vyhodnocena míra exprese *RS-GFP*.

Tab. 4.3.: Stresové podmínky během regenerace *de novo* linie R17/33.

varianta stresu	stresový faktor	koncentrace oproti standardnímu SIM	doba působení stresu [hod]
A	nízká hladina glukózy	0,2%	72
B	vysoká hladina kanamycinu	250 mg/l	72
C	vysoká koncentrace NaCl	100 mM	72
D	nízká teplota (5°C)	standardní SIM	24
E	vysoká teplota (45°C)	standardní SIM	24
F	UV	standardní SIM	1/12

4.4.1.2. Výsledky

Po přibližně 4 měsících se podařilo regenerací získat 18 linií po vystavení stresu A (nízká hladina GLU) a 7 linií po vystavení stresu B (vysoká hladina kanamycinu; viz tab. 4.3.). Ostatní zvolená ošetření byla buďto příliš tvrdým stresem a žádné rostliny nezregenerovaly (varianty stresů E, F), nebo explantáty přerostly kontaminacemi (varianty stresů C, D). U rostlin vystavených nízké hladině glukózy bylo nalezeno 7 linií svítících hodně (jako výchozí R17/33), 4 linie svítící slabě a 7 linií nesvítících. U rostlin vystavených vysoké koncentraci kanamycinu byly odhaleny 3 linie svítící slabě a 4 linie nesvítící (viz obr. 4.15.). Opakování pokusu se zařazením neošetřené kontrolní varianty a výše uvedených variant s větším počtem primárních explantátů za účelem získání vyššího počtu regenerovaných linií se z důvodů přestaveb kultivačních místností a následných kontaminací bohužel nezdařilo.



Obr. 4.15.: Rostliny regenerované *de novo* z linie 17/33 vystavené stresovým podmínkám. (A7) Nesvítící linie A7. (A11) Slabě svítící linie A11. (A2) Linie A2 svítící srovnatelně s mateřskou linií 17/33. A = stresem byl nedostatek glukózy. (B1) Nesvítící linie B1. (B7) Slabě svítící linie B7. B = stresem byla vysoká koncentrace kanamycinu, K – linie R17/33, šípky znázorňují jádra buněk trichomů a cévních svazků, ve kterých je akumulované GFP dobře pozorovatelné, (měřítko = 100 μ m).

4.4.2. Přejít rostlina – hlíza – rostlina

Cílem bylo sledovat vliv přechodu rostlina – hlíza – rostlina na indukci umlčování.

4.4.2.1. Popis a uspořádání pokusu

Při tomto pokusu bylo myšleno na praktický aspekt běžného pěstování brambor. Při tvorbě hlíz rostlinou dochází ke značným morfoloogickým, fyziologickým a metabolickým změnám v hlízách, které mohou souviset i s modulací chromatinu a DNA.

Vybrané linie transgenních brambor¹ (viz tab. 4.4.) odvozené Dr. Nocarovou byly snímány pod mikroskopem pro kontrolu trvajících exprese *RS-GFP*, následně byly převedeny z *in vitro* podmínek do podmínek *ex vitro* (viz kap. 3.1.4.), vždy v počtu 2 prokořeněných zkumavek na 1 květník. Z každé varianty 2 květníky. Získané dormantní hlízy byly znovu vsazeny do půdy – v počtu 4 kusů na 1 květník. Jeden květník na jednu variantu. Narostlé rostliny byly snímány pod fluorescenčním mikroskopem za účelem detekce změn v expresi *RS-GFP*.

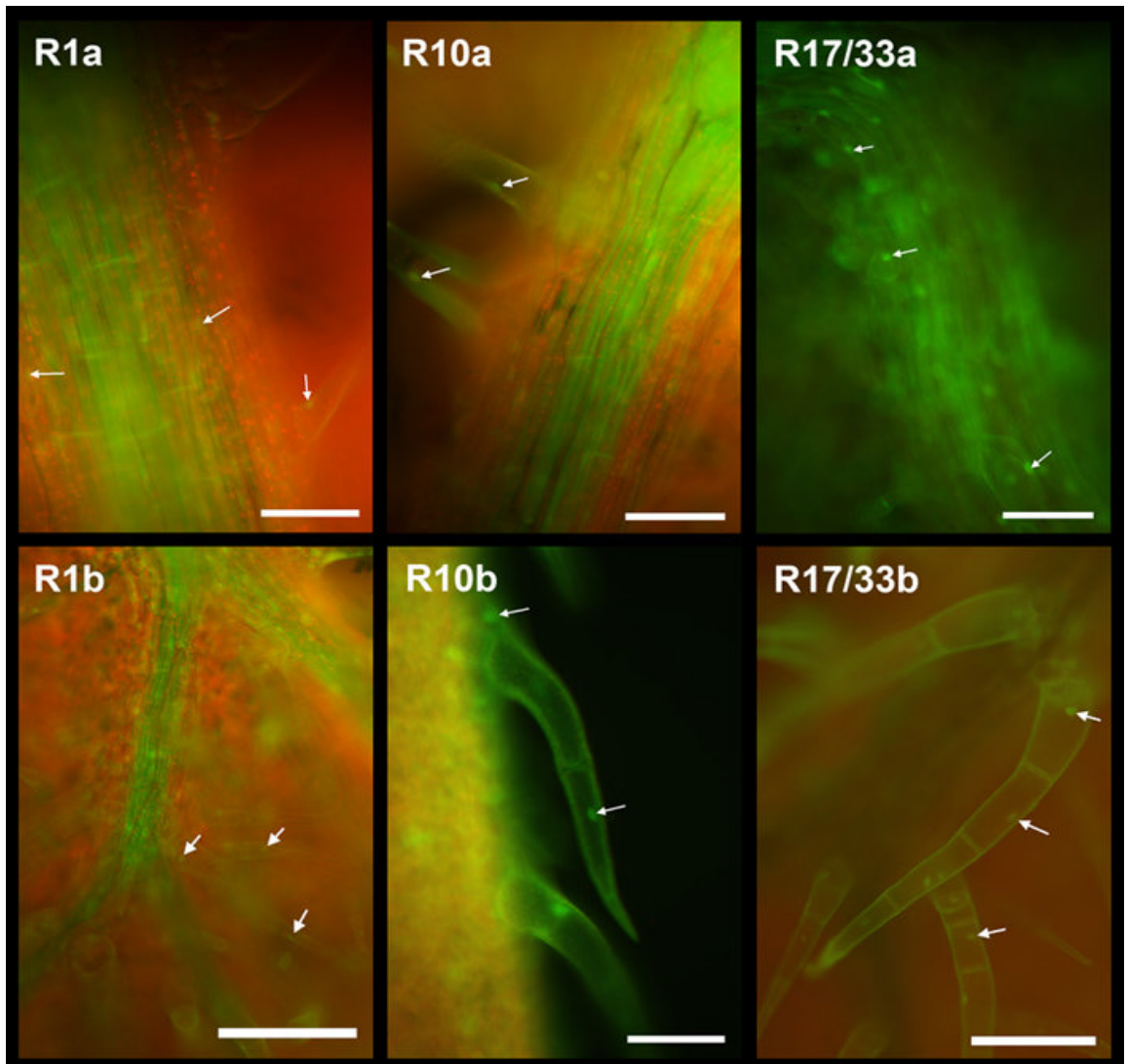
Tab. 4.4.: **Stručná charakteristika vybraných linií brambor pro studium exprese *RS-GFP* při přechodu rostlina – hlíza – rostlina.**

linie	charakteristika
R17/33	vícekopiová transgenní linie náchylná k umlčování transgenů, obnovená regenerací <i>de novo</i> za přítomnosti AzaC (tzv. reaktivací – kap. 3.4.3.)
R1	jednokopiová transgenní linie, stabilně exprimující <i>RS-GFP</i> více než 5 let
R10	jednokopiová transgenní linie, stabilně exprimující <i>RS-GFP</i> více než 5 let

4.4.2.2. Výsledky

Z květníků s hlízami všech tří variant postupně vyrašily 2-4 rostliny na květník. Plně vyvinuté listy byly odřezány a byla u nich sledována míra exprese *RS-GFP* a porovnávána s mateřskými liniemi z *in vitro* podmínek. Exprese *RS-GFP* se u žádné z rostlin všech tří transgenních linií nelišila od exprese *RS-GFP* u mateřské linie (viz obr. 4.16.). Tzn. že přechod těchto transgenních linií přes stádium hlízy nevyvolal umlčování exprese transgenů.

¹Všechny tyto linie obsahují konstrukt *pCP60-RS-GFP* v sense orientaci.



Obr. 4.16.: Exprese *RS-GFP* u vybraných linií transgenních brambor před a po přechodu přes stádium hlízy. **R1a, R10a, R17/33a** – vybrané transgenní linie brambor exprimující *RS-GFP* před přechodem přes hlízu. **R1b, R10b, R17/33b** – tytéž linie po přechodu přes hlízu; šípky znázorňují jádra buněk trichomů a cévních svazků, ve kterých je akumulované GFP dobře pozorovatelné, (měřítko = 100 μ m).

4.4.3. Infiltrace antisense *RS-GFP* konstruktem *in vitro*

Cílem bylo zavést metodu infiltrace agrobaktériem *in vitro* a pomocí ní indukovat umlčování exprese *RS-GFP* v linii náchylné k umlčování.

4.4.3.1. Popis a uspořádání pokusu

Jako umlčující konstrukt pro linii R17/33 (popsaná výše) byl použit *pCP60-antiRS-GFP* (kap. 4.1.1.), který by měl spouštět posttranskripční umlčování (tvorbou dsRNA spojením vláken v sense a antisense orientaci – viz obr. 2.4.).

Standardní infiltrace (viz také kap. 3.1.4.) počíná tvorbou malého vpichu do spodní strany infiltrovaného listu pomocí jehly. Injekční stříkačka bez jehly je pak přiložena k tomuto vpichu a tlakem na píst proti listu s rankou opřenu o ukazovák druhé ruky je infiltrační roztok vtlačěn do mezenchymu listu bez jeho většího poškození. Vše probíhá *ex vitro*, nesterilně.

V našem případě jsme chtěli rostliny pěstovat i nadále sterilně, za účelem *de novo* regenerace rostlin z různých částí infiltrované rostliny. Bylo by tak možné získat informace o stabilitě umlčení u různých linií v důsledku šíření umlčujícího signálu, vlivu infiltrované oblasti na již vytvořené listy či listy narostlé až po infiltraci.

Linie R17/33 byla pro potřeby infiltrace pěstována ve 2 Sigma kelímcích po 7 rostlinách narostlých z vrcholových řízků po dobu přibližně 6 týdnů. Nejprve byla vyzkoušena metoda infiltrace *in vitro*. Příprava infiltračního roztoku vycházela ze standardní přípravy agrobaktéria (kap. 3.4.1.5.), ovšem všechny kroky byly prováděny vysoce sterilně. Kelímek č. 1 sloužil jako kontrolní – rostliny z něj nebyly transformovány. Víko z kelímku č. 2 bylo asi na 10 minut odkryto sterilně ve flowboxu, aby rostliny mírně povadly a lépe pak přijímaly infiltrační roztok. Jedna rostlina z kelímku byla vybrána jako testovací, pro zvolení nejvhodnější techniky infiltrace. Spodnější, již plně vyvinutý, list byl zvolen jako referenční a byla mu odštířena přibližně polovina listové čepele, tak abychom mohli později určit, které listy byly infiltrovány. Listy nad ním, také plně vyvinuté byly použity k testování různých technik infiltrace *in vitro* (viz tab. 4.5.).

Pomocí techniky uvedené v tab. 4.5 pod bodem 4 bylo infiltrováno v témže kelímku zbylých 6 rostlin. Vždy část čepele jednoho listu ze střední části rostliny byla uštířena (= referenční list) a první list nad tímto byl infiltrován. Testovací rostlina byla odstraněna. Rostliny byly v průběhu času snímány pod mikroskopem a byla sledována míra exprese *RS-GFP*.

Tab. 4.5.: **Techniky infiltrace listů transgenních brambor *in vitro* umlčujícím konstruktem.**

list	technika infiltrace
1	z listové čepele byla odřezána špička a na vzniklou řeznou plochu byl injekční stříkačkou injikován infiltrační roztok
2	na abaxiální straně listů byly vytvořeny 4 povrchové řezné rány, na které byl injikován infiltrační roztok tak, aby zůstal na této ploše
3	v horní polovině listu byl vytvořen jeden vpich, na který byl injikován infiltrační roztok, tak aby tam ulpěl
4	v horní polovině listu bylo pomocí jehly na stříkačce s infiltračním roztokem vytvořeno několik vpichů za současného vypouštění infiltračního roztoku
5	na abaxiální straně listu v jeho horní polovině byl vytvořen malý vpich, prostřednictvím kterého byla snaha tlakem na píst proti pinzetě injikovat roztok do mezofylu

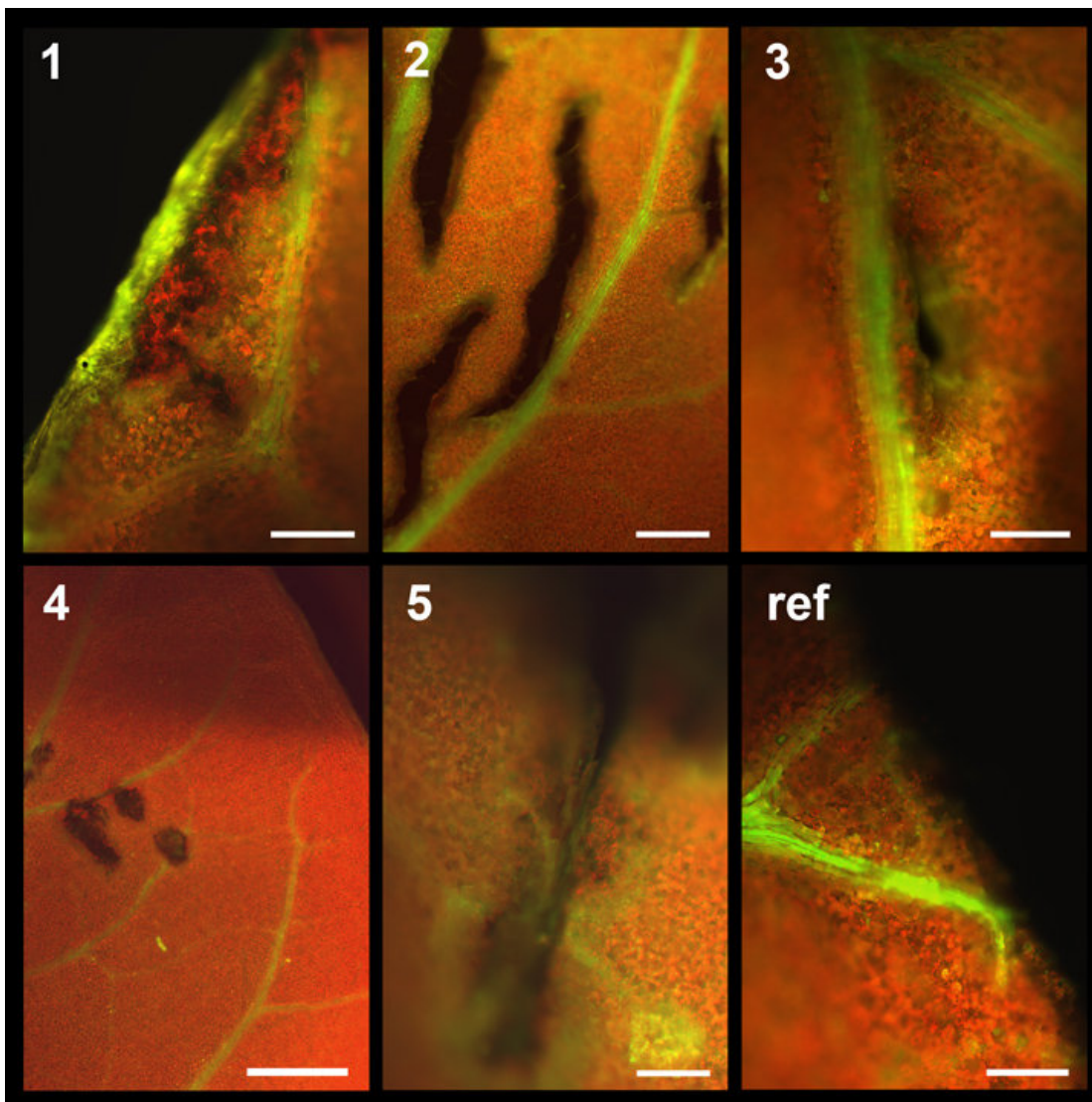
4.4.3.2. Výsledky

Jako nejvhodnější technika infiltrace *in vitro* byla zvolena technika 4 – několik vpichů jehlou do horní poloviny listu za současného vypouštění infiltračního roztoku z injekční stříkačky (tab. 4.5.). Ukázala se být jednou z nejméně destruktivních technik (oproti více destruktivním technikám 1 a 2), současně účinná (technika 3 se jevila jako nedostatečná) a málo pracná, navíc s nízkým rizikem kontaminací (technika 5 byla náročná na nástroje, manipulaci a s vyšším rizikem případných kontaminací; viz obr. 4.17.)

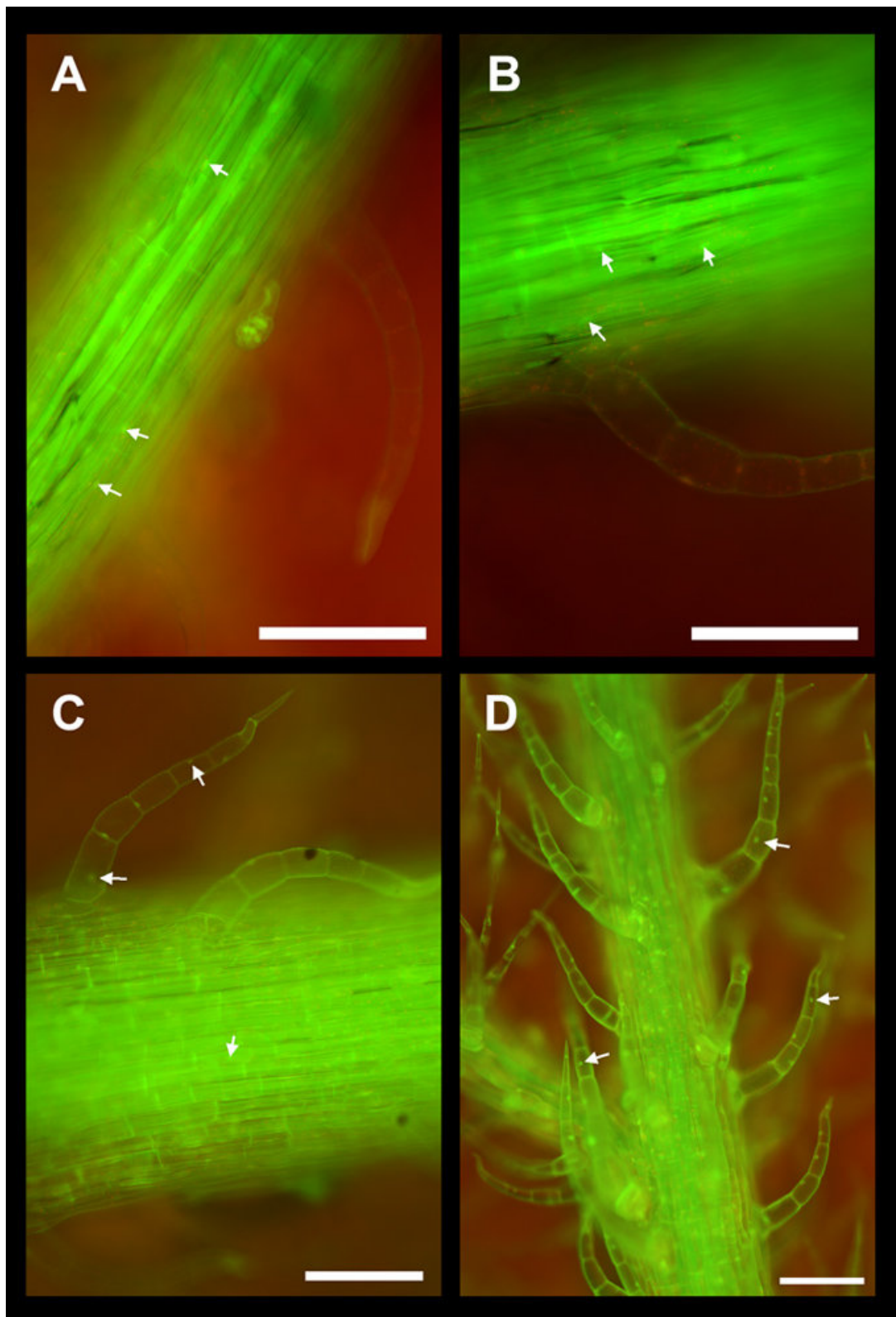
Pomocí techniky 4 se podařilo infiltrovat 6 rostlin, jejichž listy byly následně pozorovány pod mikroskopem. Fluorescence byla u rostlin nejprve sledována ve 3denních, později ve 14denních intervalech. Celou dobu však nebyly patrné významné rozdíly v expresi *RS-GFP* mezi infiltrovanými rostlinami a rostlinami kontrolními, neinfiltrovanými (pouze došlo k menšímu snížení exprese *RS-GFP* v listu pod infiltrací a v infiltrovaném listu; viz obr. 4.18). Teprve po 45 dnech od infiltrací poklesla oproti kontrole výrazně intenzita fluorescence u tří typů sledovaných listů – v infiltrovaném listu, listu nad místem infiltrace a mladém, po infiltraci narostlém listu (viz obr. 4.19.).

Bohužel dlouho trvající negativní průběh pokusu ve smyslu nezměněné míry exprese *RS-GFP* vyvolal podezření na špatně založený pokus a rostliny byly po odběru posledních vzorků k mikroskopování zlikvidovány. Nemohlo být tedy

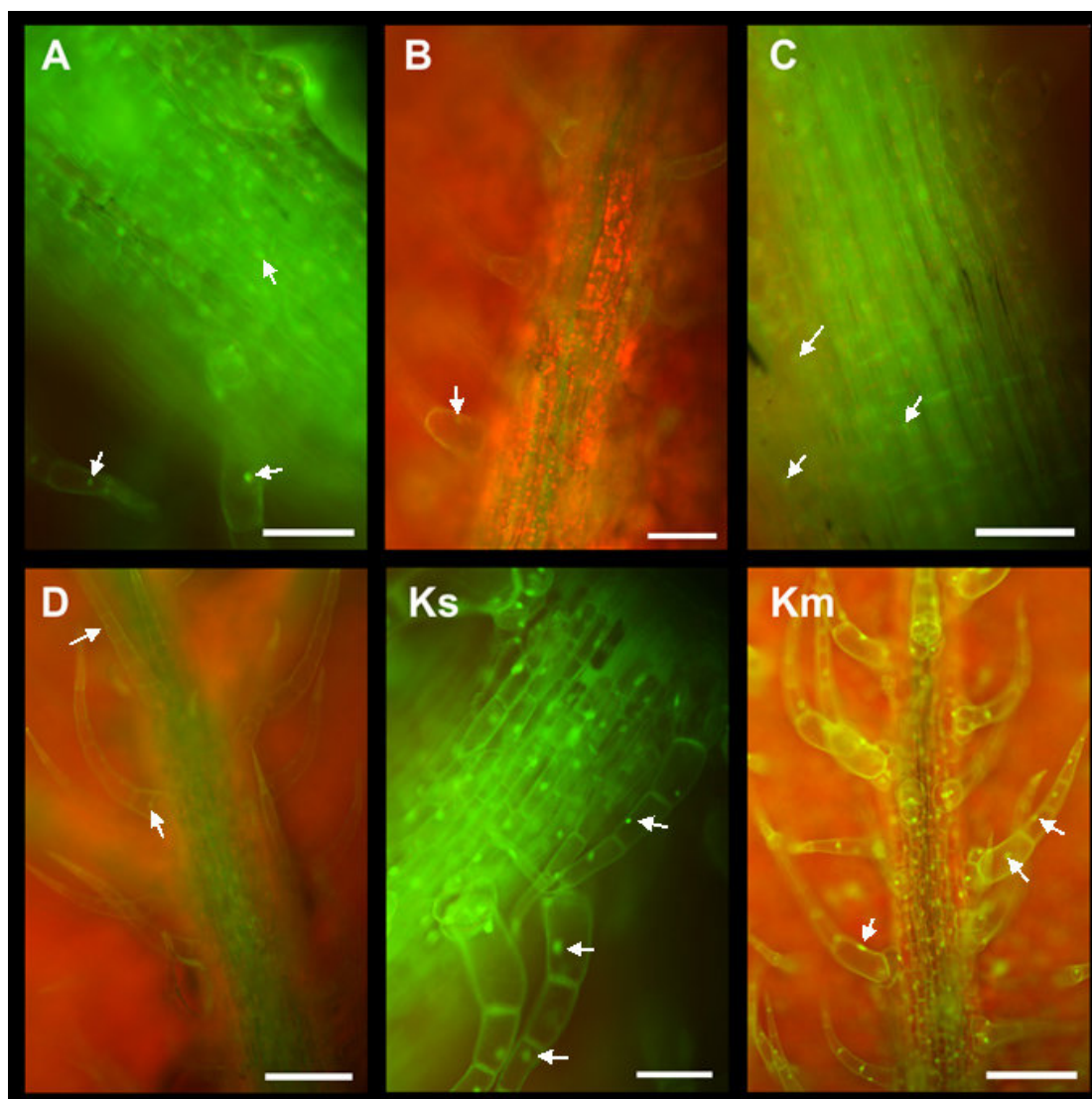
přistoupno k regeneracím rostlin z různých částí rostlin a ke sledování exprese *RS-GFP* u regenerantů.



Obr. 4.17.: Vliv různých technik infiltrace listů transgenních brambor *in vitro* umlčujícím konstruktem na pletiva. (1-5) Jednotlivé techniky infiltrace – viz tab. 4.5. ref – referenční list s ustřiženým okrajem, pro 1, 3, 5, ref: (měřítko = 200 μ m); pro 2: (měřítko = 500 μ m); pro 4: (měřítko = 1 mm).



Obr. 4.18.: **Expresa *RS-GFP* u různých listů rostlin infiltrovaných umlčujícím konstruktem.** (A) Referenční list – první pod infiltrovaným: na trichomu patrná snížená exprese *GFP*. (B) Infiltrovaný list: na trichomu patrná snížená exprese *GFP*. (C) První list nad infiltrovaným. (D) Mladý list na infiltrované rostlině s nezměněnou expresí *GFP*; šipky znázorňují jádra buněk trichomů a cévních svazků, ve kterých je akumulované *GFP* dobře pozorovatelné, (měřítko = 200 μ m).



Obr. 4.19.: Expres *RS-GFP* u různých listů rostlin 45 dní od infiltrace umlčujícím konstruktem. (A) Referenční list – první pod infiltrovaným. (B) Infiltrovaný list: celkově patrná snížená exprese *GFP*. (C) První list nad infiltrovaným. (D) Mladý list na infiltrované rostlině se sníženou expresí *GFP* (srovnání s obr. 4.18.D). (Ks) List neinfiltrované R17/33 odpovídající svou polohou na stonku a stářím referenčnímu listu infiltrovaných rostlin. (Km) Mladý list neinfiltrované R17/33; šipky znázorňují jádra buněk trichomů a cévních svazků, ve kterých je akumulované *GFP* dobře pozorovatelné, (měřítko = 100 μm , u **Km** a **D** – měřítko = 200 μm).

5. Diskuze

5.1. Závislost míry umlčování transgenu na uspořádání T-DNA a charakteru transgenu

Jedním z cílů diplomové práce bylo připravit expresní konstrukty, transformovat jimi tabákovou buněčnou linii BY-2 a porovnat mezi variantami míru umlčování. Rozdíly mezi variantami by mohly pomoci poodhalit závislost umlčování transgenů na charakteru T-DNA. Tento poznatek by posléze šel aplikovat do praxe – „správné“ navržení dané T-DNA by rovnou snižovalo pravděpodobnost umlčení transgenu vnášeného do rostliny.

Mnoho studií rozkrylo přímou spojitost mezi mírou umlčování a mírou exprese transgenu (např. Que *et al.*, 1997; De Bolle *et al.*, 2003). V molekulární biologii jsou díky svým vlastnostem zhusta využívány promotory s velmi vysokou mírou exprese, odvozené z rostlinných virů. V buňkách pak dochází k intenzivní transkripci, doprovázené zvýšenou pravděpodobností nedostatečné terminace transkripce. Výsledkem jsou aberantní transkripty (zejména bez poly-A konce), které mohou být rozpoznávány rostlinám specifickými RNA dependentními RNA polymerázami, které k aberantním transkriptům vytvářejí komplementární vlákna. Vzniknuvší dsRNA pak vede k posttranskripčnímu umlčování daného transgenu (kap. 2.1.3.; Luo *et al.*, 2007). I v rostlinách existují geny, jež jsou s vysokou mírou transkribovány, jak ovšem rostlina rozezná případné vlastní aberantní transkripty od těch cizorodých není zela jasné (Sohn, 2011). Jisté je, že RNA dependentní RNA polymeráza „soutěží“ o aberantní transkripty s exosomální degradační dráhou, a tedy jen z některých aberantních transkriptů se vytváří dsRNA spouštějící PTGS (Moazed, 2009).

Expese transgenů je kromě vlastního charakteru T-DNA ovlivňována i pozičním efektem (místem začlenění T-DNA; van Blokland *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2007) a počtem vnesených kopií T-DNA (Hobbs *et al.*, 1990; Nocarová *et al.*, 2010). V uspořádání našeho pokusu by ale měl být vzhledem k vysokému počtu hodnocených linií vliv těchto faktorů zanedbatelný, jelikož z podstaty přenosu T-DNA agrobaktériem by měly mít všechny tři konstrukty stejnou pravděpodobnost začlenění do heterochromatinových stejně jako do euchromatinových oblastí, v jedné i ve více kopiích. Prvním zajímavým pozorováním byla řádově vyšší účinnost transformace u varianty *pCP60-RS-GFP* než u ostatních dvou variant. Díky tomu bylo také největší

množství transgenních linií (240) odvozeno právě z této varianty (tab. 4.2.). Všechny tři varianty transformací byly prováděny současně, za stejných podmínek, se stejným materiálem. Jelikož se ale použité konstrukty nelišily z hlediska rezistenčního genu, který by mohl ovlivnit účinnost transformace, je pravděpodobné, že pozorovaný rozdíl v účinnosti je důsledkem nějakého rozdílu v postupu transformace. Jediná chyba metodického charakteru mohla nastat při promývání suspenze agrobaktéria a tabákových buněk přes filtrační aparát Nalgene (kap. 3.4.1.4.). Část buněčné linie BY-2 totiž ulpívala na mlynářském hedvábí, které se k filtraci používalo, a docházelo tak ke ztrátám. Pro potvrzení či vyvrácení této pracovní hypotézy by bylo nutné experiment zopakovat.

Cílem pokusu bylo posoudit vliv kódující sekvence transgenu a transkripci promotorové oblasti na míru umlčování. Srovnání intenzity fluorescence u všech třech variant ukázalo, že intenzita fluorescence E-GFP u nejvíce svítících transgenních linií *pCP60-E-GFP* je výrazně vyšší než u nejvíce svítících transgenních linií *pCP60-RS-GFP* (obr. 4.7.B.). Obě varianty zeleného fluorescenčního proteinu se na úrovni proteinu liší jen několika aminokyselinovými substitucemi, ale na úrovni DNA byla sekvence *E-GFP* masivně optimalizována (humanizována) pro expresi v lidských buňkách (Bierhuizen *et al.*, 1997). Porovnání studie Bierhuizena *et al.* (1997) také ukazuje vyšší míru intenzity fluorescence u var. E-GFP ve srovnání s var. RS-GFP. Vyšší intenzita fluorescence E-GFP není tedy pravděpodobně dána jeho vyšší mírou exprese. I přesto by pro vyvrácení veškerých pochyb bylo potřeba izolovat proteiny ze srovnatelně (co do intenzity signálu) svítících transgenních linií BY-2 obou variant *GFP* a porovnat hladiny proteinů.

Co se týče zastoupení linií s umlčenou expresí *GFP* v rámci variant, prokázal χ^2 test statisticky průkazný ($\alpha = 0,05$) rozdíl mezi srovnávanými variantami *pCP60-RS-GFP* a *pCP60-E-GFP*. To potvrzuje naši hypotézu, že kódující sekvence genu v tomto případě může mít vliv na míru umlčování. Zde však vyvstávají určité pochyby, zda-li nemůže být vyšší míra umlčování u varianty s *E-GFP* dána vyšší primární mírou exprese transgenu, neboť je u neumlčených linií pozorována silnější fluorescence. T-DNA nesoucí gen pro E-GFP byla ale vytvořena zcela identicky s T-DNA nesoucí *RS-GFP*, včetně 5' nepřekládané oblasti. Navíc je podle studie Bierhuizena *et al.* (1997) vyšší intenzita fluorescence očekávatelná.

Rozdíl v míře umlčování mezi variantami *pCP60-RS-GFP* a *pCP60-RS-GFP-DP* byl statisticky neprůkazný ($\alpha = 0,05$), což není v rozporu s původní hypotézou, dle níž bylo očekáváno, že tandemové uspořádání promotorů před sekvencí *RS-GFP* (*pNOS::p35S::RS-GFP*) způsobí větší míru umlčování na transkripční úrovni, díky transkripci promotorové oblasti (35S) a tvorbě sekundárních siRNA, které následně zprostředkují RdDM 35S promotoru (více v kap. 2.1.3.2.2.; Daxinger *et al.*, 2009). Frekvence primárního postranskripčního umlčování se však u srovnávaných konstruktů nemusí lišit. Testování reaktivovatelnosti exprese *RS-GFP* u vybraných umlčených linií obou variant však rozdíl v míře transkripčního umlčování neprokázalo, což mohlo být způsobeno tím, že hypotéza není správná či dalšími důvody, které budou analyzovány při dalším studiu.

5.2. Příprava transgenní linie bramboru náchylné k umlčování s jednou kopií T-DNA

Jedním z dalších cílů této diplomové práce bylo získat transgenní linii lilku bramboru s jednou kopií T-DNA obsahující gen pro *RS-GFP*, náchylnou k umlčování transgenů. Právě jedna kopie T-DNA na genom rostliny nám umožní plánované analýzy metylace transgenů hydrogensířičitanovým sekvenováním (Frommer *et al.*, 1992). Transgenní linie s nestabilní expresí transgenů v průběhu času jsou nevhodné pro běžné využití. V našem případě naopak mohou posloužit ke studiu vlivu kultivačních podmínek a ošetření na indukci umlčování. Některé novější studie totiž odhalují výrazný vliv vnějšího prostředí (abiotický stres, nedostatek živin apod.) na spouštění umlčování (Sunkar *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007). Lepší pochopení mechanismů spouštění umlčování nám umožní účinně selektovat linie náchylné k umlčování a získat tak rychle linie s dlouhodobou stabilní expresí transgenů.

Existenci linií transgenních brambor náchylných k umlčování prokázala také studie Dr. Nocarové *et al.* (2010). Po transformaci rostlin lilku bramboru konstruktem obsahujícím *NPTII* a *RS-GFP* došlo u některých linií v průběhu času k dřívějšímu či pozdějšímu umlčení exprese *GFP* a následně i *NPTII* na transkripční úrovni. Ostatní linie exprimovaly oba geny dlouhodobě stabilně. Umlčování genů na transkripční úrovni je doprovázeno metylací promotorových oblastí, které zřejmě předchází metylace transkribované sekvence (Daxinger *et al.*, 2009). Při replikaci DNA

je metylace udržovány pomocí DNA cytosin-5-metyltransferáz, přičemž klíčovou roli zde hraje MET1 (Finnegan *et* Dennis, 1993; viz kap. 2.1.2.2.), kterou lze inhibovat aplikací 5-azacytidinu, jak naznačila již práce Santi *et al.* (1984). Nocarová *et al.* (2010) vyvinuli metodu regenerace *de novo* za přechodného ošetření AzaC, která vede k částečné reaktivaci umlčených transgenů u regenerovaných rostlin..

Pomocí této metody byly v rámci předkládané práce regenerovány rostliny z linie R28, jež měla umlčenou expresi obou výše zmíněných genů. Následné pozorování regenerantů pod mikroskopem ovšem neprokázalo expresi *RS-GFP*. Jako selekční agens byl použit kanamycin – u rostlin, které regenerovaly a rostly na kanamycinu, muselo tedy dojít k demethylaci promotoru kontrolujícího gen pro *NPTII* (zajišťující rostlinám rezistenci vůči kanamycinu). Proč nedošlo i k demethylaci genu pro *RS-GFP* není jasné. Byla ovšem vyslovena hypotéza, zda-li se exprese *RS-GFP* neaktivuje pouze krátkodobě a nežli zregenerují celistvé rostliny, zda nedojde opět k jejímu umlčení na posttranskripční úrovni (viz kap. 2.1.3.2.2.). Pokus s regenerací *de novo* po ošetření AzaC byl proto opakován a případná přechodná aktivace exprese *RS-GFP* byla sledována ihned po přenesení na selekční SIM médium. Jak je patrné z panelu obrázků č. 4.11. u některých buněk opravdu došlo k obnovení exprese *RS-GFP*, jak dokumentují svítící jádra buněk a později i fluorescence u několika málo celistvých kalusů. Svítící kalusy byly sledovány po celou dobu regenerací, ale nakonec při poslední kontrole, 72 dní po převedení na SIM médium, byl i poslední označen za odumřelý. Nejednalo se o kontaminaci – v okolí regenerovaly další kalusy, ovšem bez viditelné exprese *RS-GFP*. Lze se domnívat, že vzhledem k regeneraci na médiu s kanamycinem došlo k umlčení exprese *NPTII*, následkem čehož kalus odumřel.

V případě linie R28 je tedy pravděpodobně reaktivace *RS-GFP* pomocí AzaC pouze krátkodobé a velice záhy dochází k opětovnému umlčení. Z těchto důvodů se nám nejspíše nepodařilo získat reaktivací linie R28 jednokopiovou transgenní linii náchylnou k umlčování transgenů pro další plánované pokusy. Pro bližší pochopení mechanismu reaktivace a opětovného umlčení by ovšem bylo dobré analyzovat metylační vzor regenerovaných rostlin v průběhu času. V tomto ohledu již byly provedeny první kroky – byla izolována DNA z rostlin získaných záhy po regeneraci za přítomnosti AzaC a následně s odstupem jednoho roku a podrobena ve spolupráci s Dr. Dvořákovou modifikaci cytozinů pro hydrogensířičitanové sekvenování (Frommer *et al.*, 1992). Nyní zbývá vyhodnotit získané sekvenace.

Vzhledem k opakovanému neúspěchu při reaktivaci linie R28 byla v kolekcích linií připravených Dr. Nocarovou hledána jiná linie, náchylná k umlčování, kterou by šlo použít pro obnovení exprese transgenů. Shodou okolností při jiných pokusech bylo při pozorování fluorescence RS-GFP u linie R25 (s jednou kopií T-DNA) vzneseno podezření, zda-li u této linie, dosud stabilně exprimující *NPTII*, resp. *RS-GFP*, nedochází právě k procesu umlčování. Část buněk sice vykazovala fluorescenci, v některých buňkách se zdála exprese nedetekovatelná. Bylo rozhodnuto prozkoumat aktuální stav exprese transgenů u této linie. Řada studií naznačuje vznik umlčujícího signálu v určitých buňkách a jeho následné šíření rostlinou (Voinnet *et Baulcombe*, 1997; Voinnet, 2005). Některé buňky v „podezřelé“ linii R25 by tedy mohly být již umlčeny a jiné nikoliv. Regenerací *de novo* by se pak mohlo podařit přímo získat vedle již umlčených linií i křížené jednokopiové transgenní linie náchylné k umlčování. Tento předpoklad se ovšem neprokázal. U všech zregenerovaných rostlin z mateřské R25 byla pod mikroskopem prokázána fluorescence a následný kanamycinový test potvrdil i expresi genu *NPTII* (viz obrázky 4.13. a 4.14.). Exprese *RS-GFP* se u linie R25 tedy jevila mozaikovitou pravděpodobně vinou svého aktuálního fyziologického stavu (Down *et al.*, 2001; van Leeuwen *et al.*, 2001).

5.3. Posouzení vlivu kultivačních podmínek a ošetření na indukci umlčování transgenů u linie náchylné k umlčování

Cílem této části práce bylo nalézt podmínky či ošetření, při nichž by pravidelně docházelo k rychlému umlčení exprese transgenů u linií náchylných k umlčení. To by umožnilo takto efektivně selektovat transgenní linie s vysokou stabilitou exprese transgenů ihned po transformaci, čímž by se výrazně zrychlilo a zjednodušilo hodnocení linií, včetně jejich následného případného převodu do polního testování.

Jelikož se nepodařilo získat transgenní linii náchylnou k umlčování reaktivací s pomocí AzaC z linií R28 či R25 byla nakonec pro naše účely použita jiná transgenní linie s obnovenou expresí – R17/33. Tuto linii, jak bylo zmíněno dříve, odvodila Dr. Nocarová. Její drobná nevýhoda spočívá ve větším počtu začleněných kopií T-DNA na genom (Nocarová *et al.*, 2010), která znemožňuje plánované analýzy metylace T-DNA.

V předchozích experimentech prováděných na řešitelském pracovišti bylo zjištěno, že aplikace stresových podmínek na intaktní rostliny *in vitro* nevede ke změnám v expresi sledovaných transgenů. Proto bylo v rámci předkládané práce stresové ošetření kombinováno s procesem *de novo* regenerace. Obě aplikované stresové podmínky, které vedly k regeneraci rostlin, vyvolaly u části odvozených linií změnu v expresi *RS-GFP*. Po prvním kole regenerací se ovšem nepodařilo získat dostatečný počet jedinců, jejichž analýza by dovolovala vyvozovat jasné závěry. Následné opakování pokusu i se zařazením neošetřené kontroly, která byla testována jen v předchozích experimentech dr. Nocarové (nepublikované výsledky) selhalo na kontaminacích pocházejících pravděpodobně z rozsáhlých přestaveb interiérů budovy ve Viničné 5. Je tak možné vyvodit pouze několik předběžných závěrů. Stresové podmínky měly jednoznačný vliv na expresi *RS-GFP*, a to spuštěním umlčování *RS-GFP*, u některých odvozených linií, jak dokazuje panel obrázků 4.15. U varianty stresu v podobě nedostatku glukózy byl získán stejný poměr linií svítících jako mateřská R17/33 a linií nesvítících. Menší množství získaných linií vykazovalo slabší expresi *RS-GFP* – jistě bude zajímavé dále sledovat slabě svítící linie, jestli po čase umlčí expresi *RS-GFP* definitivně, nebo provést analýzu přítomnosti malých RNA u linií s umlčenou expresí a odhalit tak úroveň umlčení (transkripční či posttranskripční).

U varianty stresu v podobě vysoké koncentrace kanamycinu nebyla dokonce odhalena žádná linie ze 7 odvozených, která by vykazovala stejnou míru exprese jako linie mateřská. Pouze 3 linie exprimovaly *RS-GFP* na nízké hladině a u 4 linií nebyla fluorescence vůbec detekována.

Pokud by se opravdu i za použití většího počtu vstupních explantátů a zisku více linií potvrdil tento výrazný vliv použitých stresových faktorů (zejména kanamycinu) na míru exprese transgenů a zároveň se ukázalo, že exprese u linií stabilně exprimujících ovlivněna není, mohla by aplikace uvedeného ošetření na nově získané transgenové linie dovolit relativně rychlý výběr linií stabilních v expresi sledovaného transgenů.

Dalším aplikovatelným poznatkem o umlčování transgenů bylo sledování exprese transgenů při přechodu rostlin s různou náchylností k umlčování (R1, R10, R17/33 – viz tab. 4.4.) přes hlízu zpět k rostlině. Pokusy neodhalily změny v expresi *RS-GFP* ani u jedné z linií. Jistě tyto výsledky nelze zobecňovat pro jakýkoliv transgen

a jakoukoliv linii, ale i tak naznačují ve srovnání se změnou exprese po aplikaci výše uvedených stresových podmínek, že pravděpodobně vnější podmínky prostředí budou více ovlivňovat expresi transgenu než fyziologické změny na úrovni vlastní rostliny.

Cílem metody infiltrace antisense konstruktem *pCP60-antiRS-GFP* bylo zavést efektivní metodu infiltrace *in vitro* a u infiltrovaných rostlin náchylných k umlčování sledovat dynamiku umlčování v rámci rostlinných pletiv a přechod PTGS na TGS. Kritéria pro výběr techniky infiltrace *in vitro* z několika testovaných (viz tab. 4.5.) byla zejména přijatelná míra destruktivity pro infiltrovaný list, snadná proveditelnost, nízká pravděpodobnost kontaminací a dostatečný kontakt infiltračního roztoku s poraněným listem. Jako nejlepší v tomto ohledu se jevila technika 4 z tab. 4.5. U infiltrovaných rostlin byla proti neošetřené kontrole sledována změna v expresi *RS-GFP*, lze se tedy domnívat, že zavedená metoda infiltrace *in vitro* byla úspěšná. Pokus nebyl ani z vnějšku kontaminován.

Zpočátku sledování míry exprese *RS-GFP* v listech infiltrovaných rostlin bylo pozorováno jen nevýrazné snížení exprese *RS-GFP*. Zpětně vzhledem k výsledkům, kdy u 3 typů sledovaných listů (tj. infiltrovaný, první nad infiltrovaným a mladý list narostlý o infiltraci; viz kap. 4.4.3.2.) došlo po 45 dnech k velmi výraznému poklesu exprese *RS-GFP* se lze domnívat, že prvotní snížená exprese byla pravděpodobně již příznakem počínajícího umlčování šířeného floémem. Infiltrovaná linie R17/33 náchylná k umlčování obsahuje 6 kopií T-DNA začleněných na genom (Nocarová *et al.*, 2010), je tedy možné, že počáteční pokles v jinak velmi vysoké expresi *RS-GFP* dané použitým CaMV 35S promotorem a počtem kopií na genom, mohl být vyvolán právě spouštěným posttranskripčním umlčováním. Je však ale možné, že svou roli ve snížení exprese *RS-GFP* hrálo i agrobaktérium, pomocí něhož byly rostliny infiltrovány. Zde je potřeba říci, že bohužel nebyla zavedena kontrola, jež by byla infiltrována agrobaktériem nesoucím „prázdný“ vektor (tzn. neobsahující antisense konstrukt), a která by tak vyvrátila možnost nescifického spuštění umlčování *RS-GFP* vlivem infekce agrobaktériem *per se*.

Pokus se sledováním změn v expresi *RS-GFP* byl po odběru lístků z poslední infiltrované rostliny (tj. 45 dní od infiltrace) zlikvidován. Nemohly tedy být provedeny zamýšlené pokusy s regeneracemi infiltrovaných rostlin *de novo*, z listů z různých pozic na rostlině vzhledem k infiltrovanému listu, sledující průběh umlčování a jeho šíření rostlinou. Do budoucna bychom chtěli pokus s infiltracemi zopakovat s větším

počtem rostlin a zavedením zmiňované kontroly R17/33 infiltrované prázdným vektorem. Následně bude provedena *de novo* regenerace rostlin z listů z různých pozic na rostlině (viz výše) a porovnána míra exprese *RS-GFP* u jednotlivých regenerantů.

5.4. Budoucnost RNAi

Zpočátku se zdály být důsledky RNAi molekulárním biologům rostlin spíše na obtíž, ovlivňující negativně expresi vnášených transgenů a interferující tak s řadou aplikací, které vyžadují stálou vysokou hladinu exprese. Se zlepšujícími se znalostmi v problematice umlčování genů/transgenů se ale začaly objevovat první studie plně si uvědomující široké možnosti RNAi pro citlivou kontrolu exprese genů (Vance *et Vaucheret*, 2001).

Zejména u rostlin jsou poznatky ze studia RNAi již zhusta aplikovány ve šlechtění rostlin – např. za účelem zvýšení tolerance k abiotickým a biotickým stresům, zlepšení nutričních vlastností plodin, inaktivace alergenů či tvorby toxických látek, zvýšení odolnosti plodů ke skladování, modulace barvy či vůně květu, modulace sekundárních metabolitů, produkce bezsemenných odrůd a mnohých dalších (shrnutí v Jagtap *et al.*, 2011). Řada studií byla úspěšná, např. zvýšení kyselin olejové a stearové v semenech bavlníku (Liu *et al.*, 2002), produkce bezkofeinové kávy (Ogita *et al.*, 2004), zvýšení produkce karotenoidů a flavonoidů v rajčatech (Davuluri *et al.*, 2005), vznik rezistence slivoně švestky k viru šarky švestek (Hily *et al.*, 2007) či ananasového melounu k viru kroužkovitosti papáji (Krubphacchaya *et al.*, 2007) a mnohé další.

Studie posledních let se u rostlin zaměřují na detailní popis mechanismů RNAi – např. na lokalizaci komponent aparátu RdDM v rámci jádra (Li *et al.*, 2008) či identifikaci dalších proteinů účastnících se RdDM (Gao *et al.*, 2010; Zheng *et al.*, 2010). Velká pozornost je také věnována studiu miRNA, jakožto endogenních regulátorů genové exprese a to nejen ve šlechtění rostlin (shrnutí v Liu *et Chen*, 2010; Reichel *et al.*, 2011), ale hlavně u živočichů, kde byla zjištěna spojitost mezi řadou chorob a modulací genové exprese prostřednictvím miRNA (Lu *et al.*, 2005; Volinia *et al.*, 2006; Lanford *et al.*, 2010). Některé studie se také zabývají strukturními analýzami jednotlivých komponent aparátu RNAi (Jinek *et Doudna*, 2009).

Ačkoliv je naše poznání mechanismů RNAi již na velice dobré úrovni, je zde celá řada otázek dosud nezodpovězena – jako například jakým způsobem jsou chromatin

remodulující proteiny naváděny k chromatinu. Svou roli zde mohou hrát asociace s dalšími zatím neznámými proteiny – nadějně se v tomto ohledu jeví u huseníčku kupř. protein SPT5L/KTF1 (Rowley *et al.*, 2011). Nebo jakým způsobem jsou modifikační enzymy rekrutovány, jak mohou miRNA regulovat svou vlastní expresi nebo jakým způsobem interagují jednotlivé komponenty RNAi na různých úrovních.

6. Závěry

Tato diplomová práce navázala na předchozí výsledky Dr. Nocarové zabývající se variabilitou v expresi a umlčování transgenů v rostlinách bramboru a v tabákové buněčné linii BY-2.

- i) Byly připraveny 2 expresní konstrukty, jež byly posléze spolu s třetím, již dříve připraveným, úspěšně transformovány do buněčné linie BY-2. Podařilo se prokázat, že míra umlčování transgenů je závislá na jeho nukleotidové sekvenci. Dílčím výstupem bylo zjištění, že intenzita fluorescence u varianty fluorescenčního proteinu E-GFP je ve shodě s Bierhuizenem *et al.* (1997) i při excitaci modrým světlem výrazně vyšší oproti v laboratoři standardně využívané variantě RS-GFP. Nepodařilo se potvrdit spojitost mezi transkripcí promotorové sekvence a indukcí umlčování na transkripční úrovni.
- ii) Z linie bramboru R28 s umlčenou expresí vnesených genů se pomocí metody regenerace *de novo* po ošetření 5-azacytidinem (za účelem získání jednokopiové transgenní linie náchylné k umlčování) podařilo získat pouze linie s obnovenou expresí *NPTII* genu. Reaktivace *RS-GFP* byla prokázána pouze dočasně v regenerujících kalusech, kde byla následně záhy umlčena. Vhodnost transgenní linie bramboru R25 k získání jednokopiové linie náchylné k umlčování se nepotvrdila.
- iii) Při testování vlivu vybraných faktorů na indukcii a míru umlčování u vícekopiové linie R17/33 náchylné k umlčování bylo zjištěno, že vysoká koncentrace kanamycinu či nedostatek glukózy v průběhu regenerace *de novo* velmi výrazně snižují či umlčují expresi *RS-GFP* a mohly by tak po dodatečném statistickém vyhodnocení na větším počtu jedinců sloužit v praxi k „odfiltrování“ linií náchylných k umlčování a selekci linií dlouhodobě stabilně exprimujících transgen. Přechod vybraných transgenních linií brambor s různou náchylností k umlčování přes dormantní stádium hlízy neprokázal vliv na umlčování exprese transgenů.

iv) Byla zavedena efektivní metoda infiltrace *in vitro* agrobaktériem nesoucím umlčující antisense *RS-GFP* konstrukt, jenž byl také připraven v rámci předkládané práce. Studium infiltrovaných rostlin prokázalo šíření umlčujícího signálu rostlinou až po 45 dnech od infiltrace.

7. Použitá literatura

- Aufsatz, W., Mette, M. F., Van Der Winden, J., Matzke, M. & Matzke, A. J.M, 2002. HDA6, a putative histone deacetylase needed to enhance DNA methylation induced by double-stranded RNA. *The EMBO Journal*, 21(24), s.6832–6841.
- Bartel, D. P., 2004. MicroRNAs:: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, 116(2), s.281–297.
- Baulcombe, D., 2004. RNA silencing in plants. *Nature*, 431(7006), s.356–363.
- Baumberger, N. & Baulcombe, D.C., 2005. Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(33), s.11928.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. & Hannon, G. J, 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818), s.363–365.
- Bierhuizen, M., 1997. Green Fluorescent Protein Variants as Markers of Retroviral-Mediated Gene Transfer in Primary Hematopoietic Cells and Cell Lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 234(2), s.371–375.
- De Bolle, M. F.C, Butaye, K. M.J, Coucke, W.J.W., Goderis, I.J.W.M., Wouters, P.F.J., van Boxel, N., Broekaert, W.F. & Cammue, B., 2003. Analysis of the influence of promoter elements and a matrix attachment region on the inter-individual variation of transgene expression in populations of Arabidopsis thaliana. *Plant Science*, 165(1), s.169–179.
- Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P.E., Sunkar, R. & Zhu, J.-K., 2005. Endogenous siRNAs Derived from a Pair of Natural cis-Antisense Transcripts Regulate Salt Tolerance in Arabidopsis. *Cell*, 123(7), s.1279–1291.
- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y.Y., Sieburth, L. & Voinnet, O., 2008. Widespread Translational Inhibition by Plant miRNAs and siRNAs. *Science*, 320(5880), s.1185–1190.
- Bühler, M. & Moazed, D., 2007. Transcription and RNAi in heterochromatic gene silencing. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(11), s.1041–1048.
- Burgyán, J. & Havelda, Z., 2011. Viral suppressors of RNA silencing. *Trends in Plant Science*, 16(5), s.265–272.
- Butaye, Katleen M.J., Cammue, B.P.A., Delauré, S.L. & De Bolle, Miguel F.C., 2005. Approaches to Minimize Variation of Transgene Expression in Plants. *Molecular Breeding*, 16(1), s.79–91.
- Cao, X. & Jacobsen, S. E, 2002. Role of the Arabidopsis DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. *Current Biology*, 12(13), s.1138–1144.
- Carmell, M. A., 2002. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes & Development*, 16(21), s.2733–2742.
- Cedar, H. & Bergman, Y., 2009. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet*, 10(5), s.295–304.
- Cokus, S.J., Feng, S., Zhang, Xiaoyu, Chen, Zugen, Merriman, B., Haudenschild, C.D., Pradhan, S., Nelson, S.F., Pellegrini, M. & Jacobsen, Steven E., 2008. Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. *Nature*, 452(7184), s.215–219.
- Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S. & Baulcombe, D.C., 2000. An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell*, 101(5), s.543–553.
- Davuluri, G.R., van Tuinen, A., Fraser, P.D., Manfredonia, A., Newman, R., Burgess, D., Brummell, D.A., King, S.R., Palys, J., Uhlig, J., Bramley, P.M., Pennings, H.M.J. & Bowler, C., 2005. Fruit-specific RNAi-mediated suppression of DET1 enhances carotenoid and flavonoid content in tomatoes. *Nature Biotechnology*, 23(7), s.890–895.

- Daxinger, L., Kanno, T., Bucher, E., Van Der Winden, J., Naumann, U., Matzke, A. J.M & Matzke, M., 2008. A stepwise pathway for biogenesis of 24-nt secondary siRNAs and spreading of DNA methylation. *The EMBO journal*, 28(1), s.48–57.
- Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M. & Leemans, J., 1985. Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants. *Nucleic acids research*, 13(13), s.4777.
- Deleris, A., 2006. Hierarchical Action and Inhibition of Plant Dicer-Like Proteins in Antiviral Defense. *Science*, 313(5783), s.68-71.
- Down, R.E., Ford, L., Bedford, S.J., Gatehouse, L.N., Newell, C., Gatehouse, J.A. & Gatehouse, A.M.R., 2001. Influence of plant development and environment on transgene expression in potato and consequences for insect resistance. *Transgenic research*, 10(3), s.223–236.
- Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D., Sharp, P.A. & others, 2003. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(12; SUPP), s.7–17.
- Eamens, A., Vaistij, F.E. & Jones, L., 2008. NRPD1a and NRPD1b are required to maintain post-transcriptional RNA silencing and RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 55(4), s.596–606.
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A. & Jones, P.A., 2004. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 429(6990), s.457–463.
- Finnegan, E.J. & Dennis, E.S., 1993. Isolation and identification by sequence homology of a putative cytosine methyltransferase from Arabidopsis thaliana. *Nucleic Acids Research*, 21(10), s.2383-2388.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. & Mello, C C, 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), s.806-811.
- Fojtova, M., Van Houdt, H., Depicker, A. & Kovarik, A., 2003. Epigenetic switch from posttranscriptional to transcriptional silencing is correlated with promoter hypermethylation. *Plant Physiology*, 133(3), s.1240-1250.
- Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Collis, C.M., Watt, F., Grigg, G.W., Molloy, P.L. & Paul, C.L., 1992. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(5), s.1827.
- Gan, H., Lin, X., Zhang, Z., Zhang, W., Liao, S., Wang, L. & Han, C., 2011. piRNA profiling during specific stages of mouse spermatogenesis. *RNA*, 17(7), s.1191-1203.
- Gao, Z., Liu, H.-L., Daxinger, Lucia, Pontes, O., He, Xinjian, Qian, W., Lin, Huixin, Xie, M., Lorkovic, Z.J., Zhang, S., Miki, D., Zhan, X., Pontier, D., Lagrange, T., Jin, H., Matzke, Antonius J M, Matzke, Marjori, Pikaard, C.S. & Zhu, J.-K., 2010. An RNA polymerase II- and AGO4-associated protein acts in RNA-directed DNA methylation. *Nature*, 465(7294), s.106-109.
- Girard, A., Sachidanandam, R., Hannon, Gregory J. & Carmell, Michelle A., 2006. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature*. 442(7099), s.199-202.
- Hannon, Gregory J., 2002. RNA interference. *Nature*, 418(6894), s.244-251.
- Herr, A.J., Jensen, M.B., Dalmay, T. & Baulcombe, D.C., 2005. RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5718), s.118-120.
- Hily, J.M., Ravelonandro, M., Damsteegt, V., Bassett, C., Petri, C., Liu, Z. & Scorza, R., 2007. Plum pox virus coat protein gene intron-hairpin-RNA (ihpRNA) constructs provide resistance to plum pox virus in *Nicotiana benthamiana* and *Prunus domestica*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 132(6), s.850-858.
- Hobbs, S.L., Kpodar, P. & DeLong, C.M., 1990. The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. *Plant Molecular Biology*, 15(6), s.851-864.

- Holliday, R. & Pugh, J.E., 1975. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science (New York, N.Y.)*, 187(4173), s.226-232.
- Hunter, C., Sun, H. & Poethig, R.S., 2003. The Arabidopsis heterochronic gene ZIPPY is an ARGONAUTE family member. *Current biology*, 13(19), s.1734–1739.
- Hutvagner, G. & Simard, M.J., 2008. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1), s.22–32.
- Chan, Simon W-L, Henderson, Ian R & Jacobsen, Steven E, 2005. Gardening the genome: DNA methylation in Arabidopsis thaliana. *Nature Reviews. Genetics*, 6(5), s.351-360.
- Chinnusamy, V. & Zhu, J.-K., 2009. RNA-directed DNA methylation and demethylation in plants. *Science in China Series C: Life Sciences*, 52(4), s.331-343.
- Jackson, J.P., Lindroth, A.M., Cao, Xiaofeng & Jacobsen, Steven E, 2002. Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature*, 416(6880), s.556-560.
- Jackson, J.P., Johnson, L., Jasencakova, Z., Zhang, Xing, PerezBurgos, L., Singh, P.B., Cheng, X., Schubert, I., Jenuwein, Thomas & Jacobsen, Steven E., 2004. Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for DNA methylation and gene silencing in Arabidopsis thaliana. *Chromosoma*, 112(6), s.308-315.
- Jagtap, U.B., Gurav, R.G. & Bapat, V.A., 2011. Role of RNA interference in plant improvement. *Naturwissenschaften*, 98(6), s.473-492.
- Jean Finnegan, E. & Dennis, E.S., 1993. Isolation and identification by sequence homology of a putative cytosine methyltransferase from Arabidopsis thaliana. *Nucleic acids research*, 21(10), s.2383.
- Jeddeloh, J.A., Stokes, T.L. & Richards, E.J., 1999. Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. *Nature Genetics*, 22(1), s.94-97.
- Jinek, M. & Doudna, J.A., 2009. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature*, 457(7228), s.405-412.
- Kanno, Tatsuo, Huettel, B., Mette, M Florian, Aufsatz, Werner, Jaligot, E., Daxinger, Lucia, Kreil, D.P., Matzke, Marjori & Matzke, Antonius J M, 2005. Atypical RNA polymerase subunits required for RNA-directed DNA methylation. *Nature Genetics*, 37(7), s.761-765.
- Kasschau, K. D, Fahlgren, N., Chapman, E.J., Sullivan, C.M., Cumbie, J.S., Givan, S.A. & Carrington, J. C, 2007. Genome-wide profiling and analysis of Arabidopsis siRNAs. *PLoS biology*, 5(3), s.e57.
- Kim, S.I. & Gelvin, S.B., 2007. Genome-wide analysis of Agrobacterium T-DNA integration sites in the Arabidopsis genome generated under non-selective conditions. *The Plant journal*, 51(5), s.779–791.
- Krubphachaya, P., Jurícek, M. & Kertbundit, S., 2007. Induction of RNA-mediated resistance to papaya ringspot virus type W. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 40(3), s.404-411.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K. & Jenuwein, T, 2001. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*, 410(6824), s.116-120.
- Lanford, R.E., Hildebrandt-Eriksen, E.S., Petri, A., Persson, R., Lindow, M., Munk, M.E., Kauppinen, S. & Orum, H., 2009. Therapeutic Silencing of MicroRNA-122 in Primates with Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Science*, 327(5962), s.198-201.
- Law, J.A. & Jacobsen, Steven E, 2010. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews. Genetics*, 11(3), s.204-220.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S. & Kim, V.N., 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956), s.415-419.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H. & Kim, V.N., 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*, 23(20), s.4051-4060.

- van Leeuwen, W., Ruttink, T., Borst-Vrens, A.W., van der Plas, L.H. & van der Krol, A.R., 2001. Characterization of position-induced spatial and temporal regulation of transgene promoter activity in plants. *Journal of Experimental Botany*, 52(358), s.949-959.
- Li, Carey F., Henderson, Ian R., Song, L., Fedoroff, N., Lagrange, T. & Jacobsen, Steven E., 2008. Dynamic Regulation of ARGONAUTE4 within Multiple Nuclear Bodies in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics*, 4(2), s.e27.
- Linsmaier, E.M., & Skoog, F., 1964. Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 18, s.100-127.
- Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., Downing, J.R., Jacks, T., Horvitz, H.R. & Golub, T.R., 2005. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435(7043), s.834-838.
- Luo, Z. & Chen, Zhixiang, 2007. Improperly terminated, unpolyadenylated mRNA of sense transgenes is targeted by RDR6-mediated RNA silencing in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 19(3), s.943-958.
- MacRae, I.J., Zhou, K. & Doudna, J.A., 2007. Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(10), s.934-940.
- Malagnac, F., Bartee, L. & Bender, J., 2002. An *Arabidopsis* SET domain protein required for maintenance but not establishment of DNA methylation. *The EMBO Journal*, 21(24), s.6842-6852.
- Mathieu, O. & Bender, J., 2004. RNA-directed DNA methylation. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 21), s.4881-4888.
- Meister, G. & Tuschl, T., 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431(7006), s.343-349.
- Mello, Craig C & Conte, D., Jr, 2004. Revealing the world of RNA interference. *Nature*, 431(7006), s.338-342.
- Mette, M F, Aufsatz, W, van der Winden, J., Matzke, M.A. & Matzke, A.J., 2000. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *The EMBO Journal*, 19(19), s.5194-5201.
- Moazed, D., 2009. Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature*, 457(7228), s.413-420.
- Murashige, T., & Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, s.473-493.
- Muskens, M.W., Vissers, A.P., Mol, J.N. & Kooter, J.M., 2000. Role of inverted DNA repeats in transcriptional and post-transcriptional gene silencing. *Plant Molecular Biology*, 43(2-3), s.243-260.
- Moazed, D., 2009. Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature*, 457(7228), s.413-420.
- Nagata, T., Nemoto, Y. & Hasezawa, S., 1992. Tobacco BY-2 cell line as the 'HeLa' cells in the cell biology of higher plants. *Int. Rev. Cytol.*, 132(1), s.1-30.
- Neuhaus, J.M., Ahl-Goy, P., Hinz, U., Flores, S. & Meins, F., Jr, 1991. High-level expression of a tobacco chitinase gene in *Nicotiana glauca*. Susceptibility of transgenic plants to *Cercospora nicotianae* infection. *Plant Molecular Biology*, 16(1), s.141-151.
- Nocarova, E. & Fischer, L., 2009. Cloning of transgenic tobacco BY-2 cells; an efficient method to analyse and reduce high natural heterogeneity of transgene expression. *BMC Plant Biology*, 9, s.44.
- Nocarova, E., Opatrný, Z. & Fischer, L., 2010. Successive silencing of tandem reporter genes in potato (*Solanum tuberosum*) over 5 years of vegetative propagation. *Annals of Botany*, 106(4), s.565-572.

- Ogita, S., Uefuji, H., Morimoto, M. & Sano, H., 2004. Application of RNAi to confirm theobromine as the major intermediate for caffeine biosynthesis in coffee plants with potential for construction of decaffeinated varieties. *Plant Molecular Biology*, 54(6), s.931-941.
- Onodera, Y., Haag, J.R., Ream, T., Nunes, P.C., Pontes, O. & Pikaard, C.S., 2005. Plant Nuclear RNA Polymerase IV Mediates siRNA and DNA Methylation-Dependent Heterochromatin Formation. *Cell*, 120(5), s.613-622.
- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J. & Chen, X., 2002. CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology: CB*, 12(17), s.1484-1495.
- Park, Y.D., Papp, I., Moscone, E.A., Iglesias, V.A., Vaucheret, H., Matzke, A.J. & Matzke, M.A., 1996. Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 9(2), s.183-194.
- Pontes, O., Li, Carey Fei, Nunes, P.C., Haag, J., Ream, T., Vitins, A., Jacobsen, Steven E. & Pikaard, C.S., 2006. The *Arabidopsis* Chromatin-Modifying Nuclear siRNA Pathway Involves a Nucleolar RNA Processing Center. *Cell*, 126(1), s.79-92.
- Pontier, D., Yahubyan, G., Vega, D., Bulski, A., Saez-Vasquez, J., Hakimi, M.-A., Lerbs-Mache, S., Colot, V. & Lagrange, T., 2005. Reinforcement of silencing at transposons and highly repeated sequences requires the concerted action of two distinct RNA polymerases IV in *Arabidopsis*. *Genes & Development*, 19(17), s.2030-2040.
- Qi, Y., He, Xingyue, Wang, X.-J., Kohany, O., Jurka, J. & Hannon, Gregory J., 2006. Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature*, 443(7114), s.1008-1012.
- Que, Q., Wang, H.Y., English, J.J. & Jorgensen, R.A., 1997. The Frequency and Degree of Cosuppression by Sense Chalcone Synthase Transgenes Are Dependent on Transgene Promoter Strength and Are Reduced by Premature Nonsense Codons in the Transgene Coding Sequence. *The Plant Cell*, 9(8), s.1357-1368.
- Ratcliff, F., Harrison, B.D. & Baulcombe, D.C., 1997. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science (New York, N.Y.)*, 276(5318), s.1558-1560.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D. & Jenuwein, T., 2000. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, 406(6796), s.593-599.
- Ream, T.S., Haag, J.R., Wierzbicki, A.T., Nicora, C.D., Norbeck, A.D., Zhu, J.-K., Hagen, G., Guilfoyle, T.J., Paša-Tolić, L. & Pikaard, C.S., 2009. Subunit Compositions of the RNA-Silencing Enzymes Pol IV and Pol V Reveal Their Origins as Specialized Forms of RNA Polymerase II. *Molecular Cell*, 33(2), s.192-203.
- Rhoades, M.W., Reinhart, B.J., Lim, L.P., Burge, C.B., Bartel, B. & Bartel, David P., 2002. Prediction of plant microRNA targets. *Cell*, 110(4), s.513-520.
- Romano, N. & Macino, G., 1992. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular Microbiology*, 6(22), s.3343-3353.
- Rowley, M.J., Avrutsky, M.I., Sifuentes, C.J., Pereira, L. & Wierzbicki, A.T., 2011. Independent Chromatin Binding of ARGONAUTE4 and SPT5L/KTF1 Mediates Transcriptional Gene Silencing J. Paszkowski, ed. *PLoS Genetics*, 7(6), s.e1002120.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York
- Simon, W.L.C., Henderson, I. R & Jacobsen, S. E., 2005. Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *NATURE REVIEWS/ GENETICS*, 6, s.351.
- Siomi, H. & Siomi, M.C., 2009. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature*, 457(7228), s.396-404.

- Sogo, J.M., Stahl, H., Koller, T. & Knippers, R., 1986. Structure of replicating simian virus 40 minichromosomes. The replication fork, core histone segregation and terminal structures. *Journal of Molecular Biology*, 189(1), s.189-204.
- Sohn, S.-H., Choi, M.S., Kim, K.-H. & Lomonosoff, G., 2011. The epigenetic phenotypes in transgenic *Nicotiana benthamiana* for CaMV 35S-GFP are mediated by spontaneous transgene silencing. *Plant Biotechnology Reports*, 5(3), s.273-281.
- Song, J.-J., Smith, S.K., Hannon, Gregory J & Joshua-Tor, L., 2004. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5689), s.1434-1437.
- Sunkar, R., Chinnusamy, V., Zhu, J. & Zhu, J.-K., 2007. Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends in Plant Science*, 12(7), s.301-309.
- Tavernarakis, N., Wang, S.L., Dorovkov, M., Ryazanov, A. & Driscoll, M., 2000. Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes. *Nature Genetics*, 24(2), s.180-183.
- Van Blokland, R., Van der Geest, N., Mol, J.N.M. & Kooter, J.M., 1994. Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover. *The Plant Journal*, 6(6), s.861-877.
- Vance, V., 2001. RNA Silencing in Plants--Defense and Counterdefense. *Science*, 292(5525), s.2277-2280.
- Vaucheret, H. & Fagard, M., 2001. Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends in Genetics: TIG*, 17(1), s.29-35.
- Verdel, A., 2004. RNAi-Mediated Targeting of Heterochromatin by the RITS Complex. *Science*, 303(5658), s.672-676.
- Voinnet, O & Baulcombe, D.C., 1997. Systemic signalling in gene silencing. *Nature*, 389(6651), s.553.
- Voinnet, Olivier, 2005. Non-cell autonomous RNA silencing. *FEBS Letters*, 579(26), s.5858-5871.
- Voinnet, Olivier, 2009. Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs. *Cell*, 136(4), s.669-687.
- Volinia, S., Calin, G.A., Liu, C.-G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., Prueitt, R.L., Yanaihara, N., Lanza, G., Scarpa, A., Vecchione, A., Negrini, M., Harris, C.C. & Croce, C.M., 2006. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(7), s.2257-2261.
- Vrbsky, J., Akimcheva, S., Watson, J.M., Turner, T.L., Daxinger, Lucia, Vyskot, B., Aufsatz, Werner & Riha, K., 2010. siRNA-mediated methylation of Arabidopsis telomeres. *PLoS Genetics*, 6(6), s.e1000986.
- Wassenegger, M., Heimes, S., Riedel, L. & Sanger, H.L., 1994. RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell*, 76(3), s.567-576.
- Wierzbicki, A.T., Haag, J.R. & Pikaard, C.S., 2008. Noncoding Transcription by RNA Polymerase Pol IVb/Pol V Mediates Transcriptional Silencing of Overlapping and Adjacent Genes. *Cell*, 135(4), s.635-648.
- Wingard, S.A., 1928. Hosts and symptoms of ring spot, a virus disease of plants. *Journal of Agricultural Research*, 37(3), s. 127-155.
- Xie, Z., Allen, E., Wilken, A. & Carrington, James C, 2005. DICER-LIKE 4 functions in trans-acting small interfering RNA biogenesis and vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(36), s.12984-12989.
- Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, Kristin D, Lellis, A.D., Zilberman, D., Jacobsen, Steven E & Carrington, James C, 2004. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biology*, 2(5), s.E104.
- Zaratiegui, M., Irvine, D.V. & Martienssen, R.A., 2007. Noncoding RNAs and Gene Silencing. *Cell*, 128(4), s.763-776.

- Zhang, Xiaoyu, Henderson, Ian R, Lu, C., Green, P.J. & Jacobsen, Steven E, 2007. Role of RNA polymerase IV in plant small RNA metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(11), s.4536-4541.
- Zhang, Xiaoyu, Yazaki, J., Sundaresan, A., Cokus, S., Chan, Simon W.-L., Chen, H., Henderson, Ian R., Shinn, P., Pellegrini, M., Jacobsen, Steve E. & Ecker, J.R., 2006. Genome-wide High-Resolution Mapping and Functional Analysis of DNA Methylation in Arabidopsis. *Cell*, 126(6), s.1189-1201.
- Zhao, B., Liang, R., Ge, L., Li, Wei, Xiao, H., Lin, Hongxuan, Ruan, K. & Jin, Y., 2007. Identification of drought-induced microRNAs in rice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354(2), s.585-590.
- Zheng, Z., Xing, Y., He, X.-J., Li, Wenbo, Hu, Y., Yadav, S.K., Oh, J. & Zhu, J.-K., 2010. An SGS3-like protein functions in RNA-directed DNA methylation and transcriptional gene silencing in Arabidopsis. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 62(1), s.92-99.