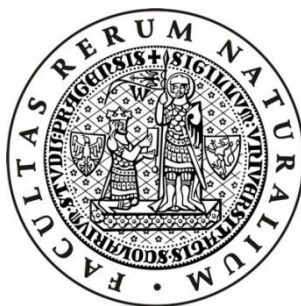


**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra experimentální biologie rostlin**



Variabilita exprese a umlčování transgenů v rostlinách bramboru a v buněčné linii tabáku BY-2

doktorská disertační práce

Eva Nocarová

Školitel: RNDr. Lukáš Fischer, Ph.D.

Praha 2010

Poděkování

Na prvním místě bych ráda poděkovala Dr. Lukášovi Fischerovi za přátelské vedení a podporu během mého doktorského studia, za jeho cenné rady při vypracovávání práce a korektury předkládaného textu.

Dále děkuji Prof. Zdeňkovi Opatrnému, za jeho podporu především v počátcích mého studia.

Za příjemné pracovní prostředí a ochotu poskytnutí rady a pomoci děkuji všem kolegům z laboratoře, jmenovitě pak zejména Dr. Andree Kuthanové, Dr. Lence Dvořákové a Halce Hrabákové. Stejně tak děkuji i kolegům ze spolupracujícího týmu vedeného Dr. Kateřinou Schwarzerovou.

Všem ostatním kolegům z Katedry experimentální biologie rostlin děkuji především za vytvoření milého a přátelského prostředí.

Poděkování patří také mému manželovi a rodině za trpělivost a pochopení pro mé studium.

Práce byla podpořena z následujících grantových projektů MŠMT:

COST 843.30 – Interakce hormonálních a nonhormonálních faktorů v řízení regeneračních a vývojových procesů v explantátových kulturách bramboru

Výzkumné centrum LC06004 – Integrovaný výzkum rostlinného genomu

Výzkumné centrum LC06034 – Regulace morfogeneze rostlinných buněk a orgánů

Prohlašuji, že jsem nepředložila tuto práci ani její podstatnou část k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Obsah

Seznam zkratek	1
1. Úvod.....	2
2. Cíle práce	3
3. Literární přehled	4
4. Výsledky	6
4.1 Studium heterogenity exprese transgenů v tabákové linii BY-2 – klonování transgenních linií BY-2	6
4.2 Dlouhodobé sledování exprese genů pro GFP a NPTII u transgenních rostlin bramboru a koordinované umlčování obou transgenů.	9
4.3 Použití 5-azacytidinu k demethylaci umlčených transgenů u bramboru na úrovni celých rostlin a opětovné umlčování transgenů u regenerovaných rostlin	11
4.4 Aplikace 5-azacytidinu pro obnovení exprese genu pro GFP v tabákových liniích BY-2 ..	13
5. Diskuse.....	15
5.1 Variabilita exprese genu pro GFP v buněčných liniích BY-2 a její příčiny	15
5.2 Umlčování exprese genů pro GFP a NPTII u bramboru.....	16
5.3 Koordinované umlčování exprese tandemově uspořádaných transgenů u bramboru	17
5.4 Využití 5-azacytidinu pro obnovení exprese transgenů	18
6. Závěry	20
7. Seznam použité literatury	21
8. Přílohy.....	26
Cloning of transgenic tobacco BY-2 cells; an efficient method to analyse and reduce high natural heterogeneity of transgene expression	
Coordinated silencing of two tandem reporter genes in vegetatively propagated potato lines	
The use of 5-azacytidine to reactivate silenced transgenes on the whole plant level	

Seznam zkratek

AzaC – 5-azacytidin

BY-2 – buněčná linie tabáku (*Nicotiana tabacum*) cv. Bright Yellow 2

CaMV 35S – tkáňově nespecifický 35S promotor viru kvěťákové mozaiky

DCL – Dicer-like protein (protein podobný živočišnému enzymu Dicer)

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DNMT1 – DNA methyltransferase 1 (udržovací cytosin-5-methyltransferáza)

DRM2 – domain rearranged methyltransferase 2 (*de novo* cytosin-5-methyltransferáza)

dsRNA – dvouřetězcová RNA

GFP – green fluorescent protein - zelený fluorescenční protein

MET1 – methyltransferase 1 (udržovací cytosin-5-methyltransferáza, ortholog DNMT1)

mRNA – mediátorová RNA

NPTII – neomycin fosfotransferáza

PTGS – posttranskripční umlčení exprese genu

RNA – ribonukleová kyselina

RT-PCR – reverzní transkripce následovaná polymerázovou řetězovou reakcí

siRNA – malá interferující RNA (jednořetězcová RNA o délce 20-25 nukleotidů, účastníci se sekvenčně specifického umlčování genů a transgenů)

T-DNA – transferová DNA (úsek DNA přenášený z Ti plasmidu agrobaktéria do rostlinné buňky)

TGS – transkripční umlčení exprese genu

1. Úvod

Transgenní technologie je v poslední době široce využívána pro vývoj nových zemědělských plodin, jelikož nabízí jednodušší zavedení genetických znaků do pěstovaných druhů rostlin a mnohem přesnější provedení v porovnání s často omezenými možnostmi a pracnými postupy, které nabízí klasické šlechtění. Genetické manipulace rostlin se také staly hojně využívanou metodou sloužící k mnoha účelům ve výzkumu biologie rostlin.

Velmi často však lze pozorovat variabilitu a nestabilitu exprese transgenů v populacích transgenních rostlin transformovaných stejným konstruktem. Spolehlivá dlouhodobá aktivita transgenů je přitom nezbytným předpokladem pro zemědělskou rostlinnou produkci, ale také ovlivňuje využitelnost transgenních rostlin v základním výzkumu především při kvantitativních experimentech. Vysoká variabilita exprese rekombinantních konstruktů u jednotlivých transformantů často nutí ke kompromisům při porovnávání různých konstruktů nebo si minimálně žádá velké počty vzorků, aby byly zabezpečeny smysluplné výsledky. Je také velmi pravděpodobné, že z důvodu vysoké variability exprese transgenů byly z některých experimentů vytvořeny nesprávné závěry. Situaci dále komplikuje porovnávání transgenních linií připravených při nezávislých experimentech nebo dokonce různými metodami.

Stabilita a variabilita exprese transgenů se může lišit v závislosti na vlastní sekvenci transgenů, uspořádání T-DNA a použitých regulačních oblastech, zejména síle promotoru. Dalšími důležitými faktory ovlivňujícími expresi transgenů je počet kopií T-DNA v genomu a místo jejich začlenění. Určitou roli však může sehrát i vnější prostředí rostliny, kdy například stres může u náchylných rostlin spustit umlčování transgenů.

Předkládaná disertační práce přispívá k objasnění některých procesů souvisejících s umlčováním a variabilitou exprese transgenů u rostlin. V souvislosti s řešením dané problematiky byly zavedeny nové metody studia transgenních rostlin. Dílčí výsledky vyplňují drobné mezery v množství prázdných míst mozaiky poznání této obsáhlé problematiky.

2. Cíle práce

- Nalézt příčiny heterogenity exprese genu pro GFP v transgenních liniích tabáku BY-2 a dosáhnout jejího snížení.
- Nalézt faktory ovlivňující hladinu exprese a umlčování genu pro GFP a NPTII v transgenních rostlinách bramboru.
- Navrhnout postupy využití 5-azacytidinu (inhibitoru udržovací metylace DNA) pro obnovení exprese umlčených transgenů v rostlinách bramboru a v buněčných liniích tabáku BY-2.

3. Literární přehled

Míra a stabilita exprese transgenů může být primárně ovlivněna složením vnesené rekombinantní DNA. De Bolle a kol. (2003) zkoumali dopad různých regulačních elementů na míru a variabilitu exprese transgenů u *Arabidopsis thaliana*. Exprese nebyla ovlivněna terminátory ani 5'netranslatovanými oblastmi, na rozdíl od promotorů, které výrazně ovlivnily nejen míru exprese, ale i její variabilitu (De Bolle *et al.*, 2003).

Důležitým faktorem ovlivňujícím míru a stabilitu exprese transgenů je také počet jeho insercí v genomu a uspořádání jednotlivých kopií v místě inzerce (shrnutí v Butaye *et al.*, 2005). Hobbs a kol. (1990) popsali, že transformované rostliny s vysokou expresí transgenů měly převážně jednu inserci T-DNA, zatímco linie s nízkou expresí jich měly obvykle více v jednom nebo ve více lokusech. Transformované rostliny s více kopiemi T-DNA také mají mnohem větší tendenci k umlčení na posttranskripční úrovni (posttranscriptional gene silencing; PTGS) v porovnání s rostlinami s jednou insercí transgenů (Sallaud *et al.*, 2003; shrnutí v Depicker *et al.*, 2005). Začlenění více kopií T-DNA do genomu může mít za následek tvorbu invertovaných repetitiv, ze kterých po transkripci vznikne dvouřetězcová RNA (dsRNA) (Muskens *et al.*, 2000). Rovněž zřejmě dochází s větší pravděpodobností k překročení prahového množství hladiny transkriptu, což může být také spojeno s indukcí umlčování. Předpokládá se totiž, že vysoká míra exprese je spojena s náhodným výskytem vadných messengerů rozpoznávaných RNA-dependentní RNA polymerázou, která tvoří komplementární vlákno RNA za vzniku dsRNA (Luo and Chen, 2007). Výsledkem štěpení této dsRNA enzymem DCL je vznik malých RNA, tzv. siRNA, klíčových molekul v procesu PTGS i transkripčního umlčování (TGS) závislého na homologii (homology dependent transcriptional gene silencing) (shrnutí v Brodersen and Voinnet 2006). Kromě působení na mRNA se siRNA také podílejí na *de novo* metylaci cytosinů prostřednictvím metyltransferázy DRM2. V tomto procesu hraje klíčovou roli RNA polymeráza V, která přímo interaguje s komplexem siRNA-Argonaut a zprostředkovává tak sekvenčně specifickou metylaci DNA právě na základě komplementarity s siRNA (Cao and Jacobsen, 2002; Wierzbicki *et al.*, 2008; Daxinger *et al.*, 2009).

Exprese transgenů může být také ovlivněna uspořádáním jeho chromozomálního prostředí. Například znaky heterochromatinu se mohou rozšířit na sousedící vnesené DNA sekvence, což má za následek přímé TGS (Kim *et al.*, 2007). Výsledky studií týkající se

pozičního efektu jsou však nejasné a částečně kontroverzní. De Buck a kol. (2004) popsali, že 19 z 21 transgenních linií *Arabidopsis* s jednou kopií T-DNA mělo srovnatelnou míru exprese transgenu, která byla nezávislá na orientaci T-DNA nebo její integraci do genové nebo mezigenové oblasti, do exonu nebo intronu. Tyto neočekávané výsledky mohou však být částečně zkreslené, jak je navrhováno Gelvinem a jeho kolegy (Kim *et al.*, 2007; Gelvin and Kim, 2007), neboť do těchto studií byly zahrnuty pouze selektované linie s aktivní expresí selekčního genu.

Částečné potlačení transkripce i celkové umlčení exprese genu jsou u rostlin zpravidla doprovázeny metylací cytosinů. V případě vnesených genů a parazitické DNA (transpozibilních elementů) je potlačení transkripce často spojeno s metylací cytosinů v promotoru i kódující sekvenci (Fojtova *et al.*, 2003; shrnuto v Teixeira and Colot, 2009). Avšak pouze metylace v sekvenci promotoru blokuje transkripci, přičemž role metylace v kódující oblasti jak transgenu, tak endogenu zůstává nejasná (Lunerova-Bedrichova *et al.*, 2008; Cokus *et al.*, 2008; Lister *et al.*, 2008; Zilberman, 2008). Taková metylace byla detekována u většiny genů *Arabidopsis* a vyskytovala se přednostně u těch s průměrnou mírou exprese (Zilberman *et al.*, 2007).

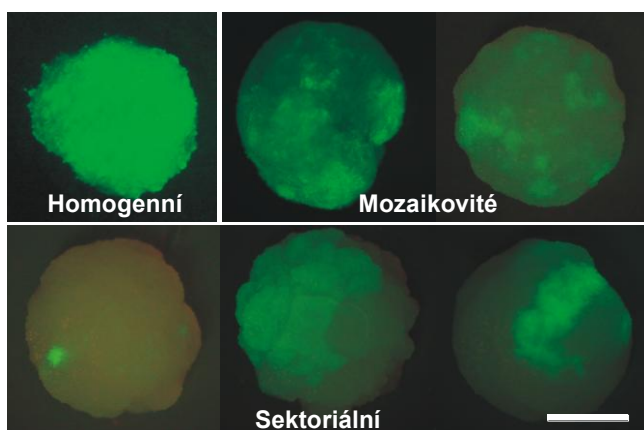
U transgenních rostlin bylo dokumentováno, že demetylační agens 5-azacytidin (AzaC) má potenciál obnovit expresi umlčeného transgenenu u jednotlivých buněk cestou demetylace DNA. V tomto ohledu bylo ošetření AzaC opakovaně použito k rozlišení mezi umlčením na posttranskripční a transkripční úrovni, přičemž se ukázalo jako efektivní pouze u druhého typu, který je spojen s metylací DNA (Wang and Waterhouse, 2000; Emani *et al.*, 2002).

4. Výsledky

4.1 Studium heterogenity exprese transgenů v tabákové linii BY-2 – klonování transgenů v liniích BY-2

Transformace tabákové linie BY-2 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2) byla prováděna metodou agroinfekce s použitím *Agrobacterium tumefaciens* (An, 1985) s T-DNA nesoucí gen pro zelený fluorescenční protein (*GFP*) a gen pro neomycin fosfotransferázu (*NPTII*) zajišťující rezistenci ke kanamycinu.

Po transformaci byly získány kalusy s homogenní expresí genu pro GFP (Obr. 1) pouze u 39 % případů (průměr ze třech nezávislých transformací). Ostatní kalusy obsahovaly oblasti s různou mírou fluorescence v mozaikovitém nebo sektoriálním uspořádání (Obr. 1)



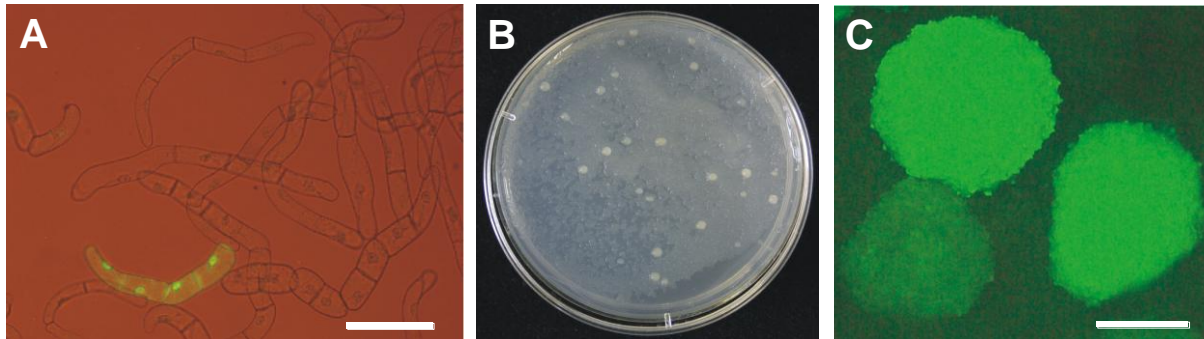
Obrázek 1. Heterogenita fluorescence GFP u kalusů BY-2

Primární kalusy získané po transformaci vykazují homogenní i heterogenní expresi *GFP*. Buněčné populace s různou intenzitou fluorescence *GFP* jsou v kalusech uspořádány mozaikovitě nebo sektoriálně (měřítko = 1mm).

Všechny suspenzní kultury vytvořené z heterogenních kalusů obsahovaly dle očekávání buňky s různou mírou exprese genu pro *GFP*, avšak tuto heterogenitu ve velké míře vykazovaly i suspenze vytvořené z homogenních kalusů (cca 70 %). Pro účely hodnocení exprese genu pro *GFP* v suspenzích byly buňky rozděleny do kategorií podle míry fluorescence *GFP* – vysoká, nízká a žádná. Zastoupení těchto kategorií buněk v suspenzích bylo počítáno po dobu 11 týdnů. U většiny suspenzních linií byla exprese *GFP* genu stabilní, pouze u několika linií byl zaznamenán postupný pokles množství buněk s vysokou fluorescencí *GFP*.

Pro redukci heterogenity transformovaných linií byla zavedena jednoduchá a rychlá metoda přípravy klonů z jednotlivých buněk nebo buněčných řetězků suspenzních kultur. Suspenzní buňky z netransformované linie BY-2 byly v nadbytku přidány k suspenzní kultuře

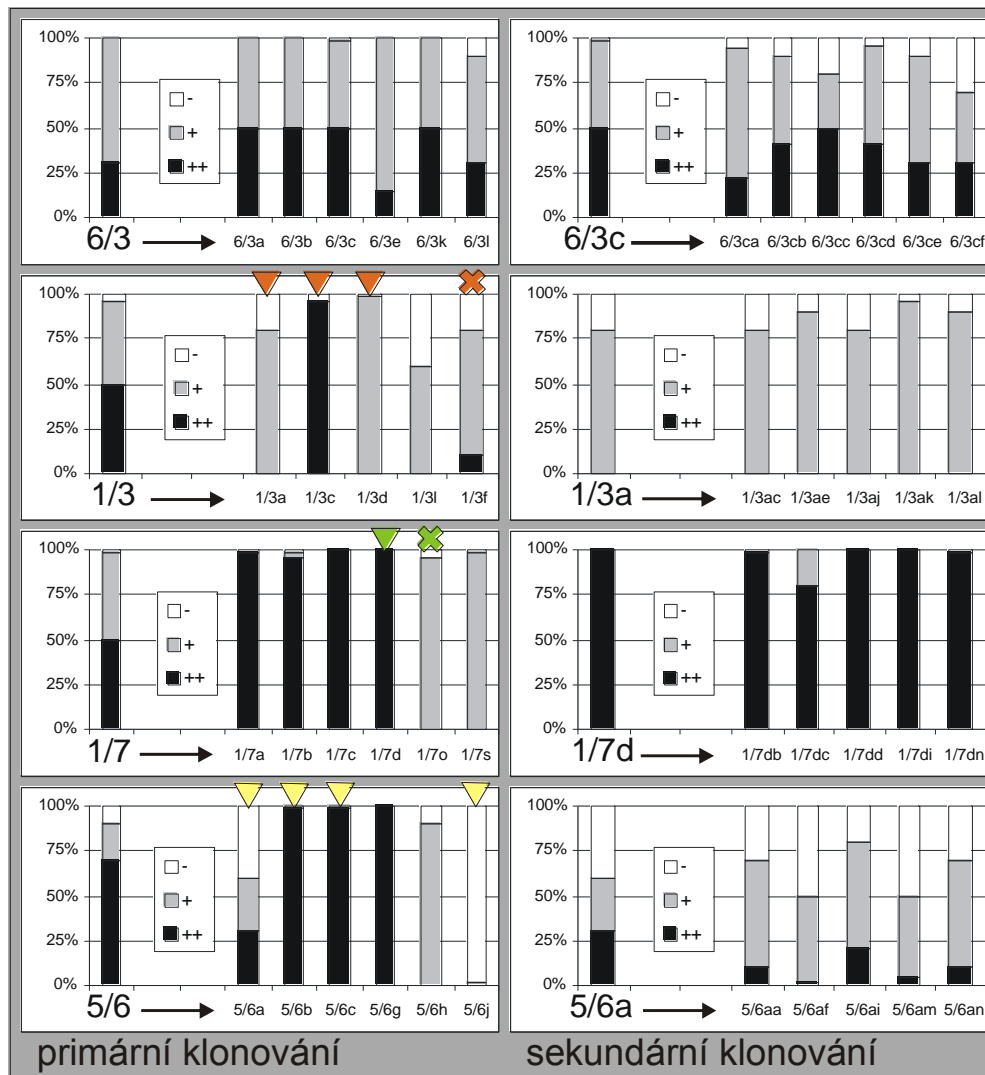
transformovaných (kanamycin rezistentních) buněk ve stacionární fázi růstu (Obr. 2A). Směs byla aplikována na Petriho misku s pevným médiem obsahujícím kanamycin. Již po deseti dnech se na podpůrné vrstvě buněk BY-2 vytvořily makroskopicky viditelné kalusy z rezistentních buněk (Obr. 2B,C). Jednotlivé kalusy byly odebrány na čerstvé médium při dosažení velikosti 1-3 mm. U některých linií bylo klonování po získání suspenzí z těchto kalusů opakováno (sekundární a terciární klonování).



Obrázek 2. Klonování suspenzních kultur BY-2

(A) Směs transformovaných a netransformovaných buněk BY-2 byla vyseta na pevné médium s kanamycinem (měřítko = 100 μ m). (B) Po deseti dnech byly pozorovatelné sekundární klony na podpůrné vrstvě buněk netransformované BY-2. (C) Kalusy po klonování vykazovaly především homogenní fluorescenci GFP (měřítko = 1 mm).

Klonováním suspenzních kultur s heterogenní fluorescencí GFP bylo získáno průměrně 93 % sekundárních kalusů s homogenní fluorescencí GFP (Obr. 2C). Suspenze získané z těchto kalusů však více než z poloviny stále obsahovaly buněčné populace s různou mírou exprese *GFP* genu. Výsledky klonování vybraných linií jsou znázorněny v grafech (Obr. 3). Z některých linií vznikly jak homogenní, tak heterogenní suspenze, avšak např. u linie 1/7 téměř všechny sekundární i terciární suspenze byly homogenní, buďto s vysokou nebo nízkou intenzitou fluorescence GFP (Obr. 3). U linií 6/3 nebo 5/6a se však původní heterogenita fluorescence GFP nezměnila u žádného z odvozených klonů a nepodařilo se ji odstranit ani po terciárním klonování. Následným klonováním sekundárních klonů vzniklo téměř identické potomstvo, jehož expresní vzorec se v proporcích jednotlivých kategorií fluorescence GFP shodoval s původní linií. Klonováním suspenzí s homogenní fluorescencí GFP byly získány homogenní subklony (linie



Obrázek 3. Expresse *GFP* po klonování primárních a sekundárních linií BY-2

Grafy představují kategorie fluorescence *GFP* v suspenzích získaných po klonování brzy po transformaci a v liniích získaných po klonování vybraných sekundárních linií. Klonované linie se nachází vlevo a jejich potomstvo – sublinie, vzniklé jejich klonováním rozlišené písmeny – vpravo. Kategorie fluorescence *GFP*: silná ++, slabá + a žádná -. Vybrané linie (označeno barevnými symboly) byly analyzovány Southernovou hybridizací; v rámci jedné linie jsou stejným symbolem označeny geneticky identické sublinie.

1/7d; Obr. 3). Proporce jednotlivých kategorií fluorescence *GFP* zůstaly stejné u téměř všech heterogenních i homogenních sekundárních suspenzí po celou dobu studie (v řádu měsíců).

Příčiny některých heterogenit byly objasněny molekulárními analýzami. Analýzy T-DNA inzercí u jednotlivých klonů metodou Southernovy hybridizace ukázaly, že linie 1/3 a 1/7 byly složeny z geneticky odlišných klonů, které jsou oddělitelné klonováním. Analyzované sublinie

jsou v grafech označeny barevnými symboly (Obr. 3). Většina sekundárních linií však vykazovala velkou expresní heterogenitu, přestože byly geneticky identické (Obr. 3). Geneticky identické klony linií 1/3 a 5/6 byly následně analyzovány s ohledem na metylaci DNA. Štěpením genomové DNA enzymy citlivými k metylaci a následnou Southernovou hybridizací však nebyly nalezeny rozdíly v metylaci cytosinů v analyzovaných restrikčních místech, kromě kompletně umlčeného klonu 5/6j (Obr. 3), u kterého byla DNA zřejmě metylovaná ve dvou ze třech testovaných restrikčních míst.

4.2 Dlouhodobé sledování exprese genů pro GFP a NPTII u transgenních rostlin bramboru a koordinované umlčování obou transgenů.

In vitro pěstované rostliny bramboru (*Solanum tuberosum* L., cv. Désirée) byly transformovány metodou agroinfekce s použitím *Agrobacterium tumefaciens* (Dietze *et al.*, 1995) s T-DNA nesoucí gen pro GFP a NPTII.

Pro dlouhodobé sledování exprese genů pro GFP a NPTII bylo z 31 transgenních linií bramboru zregenerovaných po transformaci vybráno 17, které vykazovaly normální růstové charakteristiky, byly rezistentní ke kanamycinu a obsahovaly gen pro GFP. Metodou Southernovy hybridizace genomové DNA bylo v transgenních rostlinách nalezeno cca 1-6 insercí T-DNA.

Míra exprese genu pro GFP byla stanovována měřením intenzity zelené fluorescence v různých orgánech a pletivech bramboru (vrcholový meristém, listy a kořeny). Nejspolehlivější pro měření fluorescence byly kořeny v místě na počátku zóny diferenciaci. Jelikož výsledky měření touto metodou vykazovaly poměrně vysokou variabilitu, porovnávání míry exprese u jednotlivých linií bylo provedeno také metodou kvantifikace GFP založené na imunodetekci na Western blotech. Pro sledování aktivity druhého reportérového genu *NPTII* byl zaveden jednoduchý test založený na tvorbě kalusů na řezných plochách listů či stonkových internodálních segmentů na médiu indukujícím růst kalusů, do něhož byl přidán kanamycin (100 mg/l). Na explantátech rezistentních rostlin se po 2-3 týdnech kultivace vytvořily masivní tmavě zelené kalusy, zatímco u explantátů nerezistentních rostlin byla tvorba kalusů inhibována a segmenty zežloutly. Výsledky kanamycinového testu i imunodetekce GFP na Western blotech korespondovaly s mírou transkripce obou genů zjištěnou pomocí semikvantitativní RT-PCR.

Výše uvedené analýzy transformovaných rostlin byly poprvé prováděny přibližně půl roku po transformaci, kdy již byly narostlé všechny zregenerované rostliny, dále za 1 rok a za 4 roky; tedy 1,5 a 4,5 roku po transformaci. Transformované rostliny byly dle míry exprese genu pro GFP rozděleny do tří kategorií; s vysokou, nízkou a nedetekovatelnou expresí (označeno symboly ++, + a -; Tab. 1).

Snížení nebo umlčení exprese genu pro GFP bylo pozorováno celkem u šesti linií. U jedné linie se naopak exprese během prvního roku zvýšila. Jedna transgenní linie umlčela expresi *GFP* genu

linie	počet kopií T-DNA	Expresa reportérových genů					
		0.5 roku		1.5 roku		4.5 roku	
		<i>NPT II</i>	<i>GFP</i>	<i>NPT II</i>	<i>GFP</i>	<i>NPT II</i>	<i>GFP</i>
R1	1	R	++	R	++	R	++
R10	1	R	++	R	++	R	++
R24	1	R	+	R	+	R	+
R25	1	R	++	R	++	R	++
R26	1	R	++	R	++	R	+
R28	1	R	++	R	-	S	-
R15	2	R	++	R	++	R	++
R16	2	R	+	R	+	R	+
R19	2	R	++	R	++	R	++
R31	2	R	++	R	++	R	++
R18	4	R	+	R	+	R	+
R22	4	R	++	R	+	R	+
R23	4	R	+	R	+	R	+
R5	5	R	+	R	+	R	+
R21	5	R	+	R	-	S	-
R17	6	R	+	R	++	S	-
R30	6	R	-	S	-	S	-

Tabulka 1. Přehled exprese reportérových genů u transgenních linií bramboru uspořádaných podle počtu kopií T-DNA

Expresa reportérových genů (*NPTII* a *GFP*) byla stanovována 6 měsíců, 1.5 roku a 4.5 roku po začátku transformace. Expresa *NPTII* byla hodnocena jako rezistence (R) nebo senzitivita (S) ke kanamycinu. Míra fluorescence *GFP* byla rozdělena do 3 kategorií značících vysokou, nízkou a žádnou expresi *GFP* (označeno symboly ++, + a -). Světle oranžové pozadí zvýrazňuje linie, u nichž došlo ke snížení exprese *GFP*, tmavě oranžové pak linie, u kterých došlo k umlčení exprese obou transgenů. Zelené rámečky upozorňují na situace, kdy umlčení *GFP* prokazatelně předcházelo umlčení *NPTII*.

do půl roku po transformaci, tři linie snížily nebo umlčely expresi *GFP* genu během dalšího roku a 2 linie během dalších 3 let kultivace (oranžové řádky v Tab. 1). Většina těchto linií (4 z 6) obsahovala 4 a více kopií T-DNA, což celkově představuje více než 50 % „vícekopiových“ linií. Naopak snížení nebo umlčení exprese genu pro GFP bylo pozorováno pouze u 20 % linií (2 z 10) s jednou nebo dvěma kopiemi T-DNA. Z uvedeného lze vyvodit, že vysoká exprese genu pro GFP převládala na konci sledovaného období u linií s nízkým počtem T-DNA kopií. Pro většinu linií (4 z 5), které následně snížily nebo umlčely expresi *GFP*, byla charakteristická vysoká počáteční úroveň exprese *GFP*.

Šest měsíců po transformaci byly všechny selektované linie rezistentní ke kanamycinu, což bylo jedno ze selekčních kritérií. Během následujícího roku byla pozorována ztráta rezistence u linie, která již umlčela expresi genu pro GFP během počátečního půl roku. Všechny ostatní linie zůstaly rezistentní ke kanamycinu, ačkoli další 2 linie již umlčely expresi *GFP*. Čtyři a půl roku po transformaci všechny linie s umlčenou expresí genu pro GFP také ztratily kanamycinovou rezistenci. Koordinované umlčování obou transgenů je vyznačeno v Tab. 1 zeleným ohraničením.

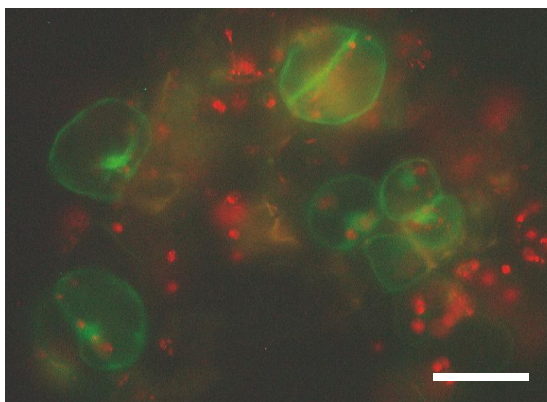
4.3 Použití 5-azacytidinu k demetylacii umlčených transgenů u bramboru na úrovni celých rostlin a opětovné umlčování transgenů u regenerovaných rostlin

Vliv 5-azacytidinu (AzaC) na demetylacii DNA byl studován na rostlinách bramboru s umlčenou expresí obou transgenů. Růst nodálních i apikálních segmentů na médiu s AzaC byl inhibován v závislosti na koncentraci AzaC. Nodální segmenty reagovaly na stejnou koncentraci AzaC nevyrovnaně, proto byly dále použity pouze apikální segmenty, jejichž odpověď byla homogennější. Zatímco 40 μ M AzaC úplně zablokoval růst kořenů i stonku, segmenty kultivované na koncentraci 8x nižší (5 μ M) byly porovnatelné s neošetřenou kontrolou. Fluorescence GFP však nebyla pozorována v nově vznikajících listech na žádné z použitých koncentrací AzaC a rostliny zůstaly plně senzitivní ke kanamycinu.

Porovnáním rozsahu inhibice růstu na různých koncentracích AzaC a v médiu skladovaném po různou dobu před nasazením segmentů byl stanoven poločas rozpadu AzaC přibližně na 2 dny.

Jelikož nebyl pozorován žádný vliv AzaC na obnovení exprese genu pro GFP na stonkových segmentech, AzaC byl aplikován na listové explantáty kultivované na médiu

indukujícím růst kalusů, aby se umožnil přímý kontakt dělících se buněk s AzaC v médiu. Zatímco AzaC v koncentraci 40 μ M inhiboval růst kalusů, na médiu s 10 μ M nebo 20 μ M AzaC byly po několika dnech kultivace ojediněle pozorovány buňky se zelenou fluorescencí GFP na řezných plochách listů (Obr. 4). Po čase však již nebylo možné v narůstající mase buněk fluorescenci GFP zaznamenat. Pro selekci buněk s obnovenou expresí *NPTII* genu byl do média přidán kanamycin. Kombinace AzaC a kanamycinu však zřejmě způsobila přílišný stres, který měl za následek rychlé hnědnutí explantátů a inhibici tvorby kalusů.

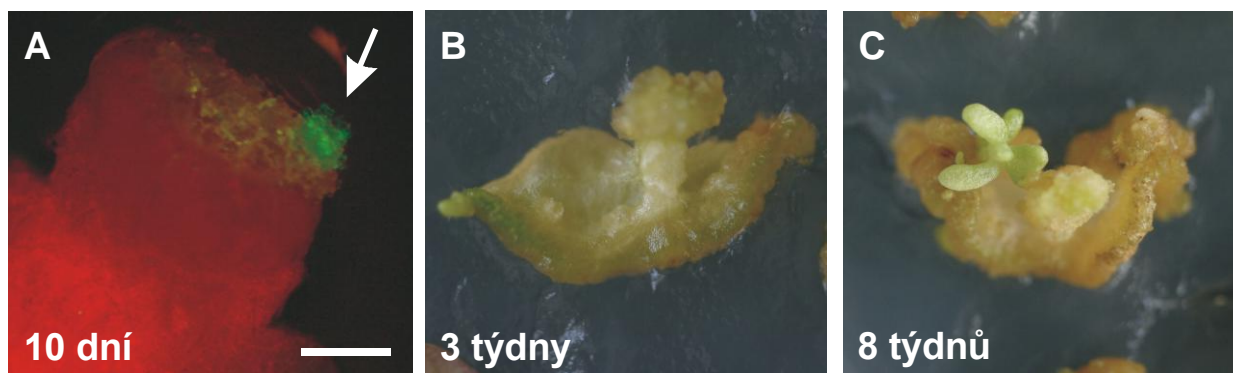


Obrázek 4. Obnovení exprese *GFP* u bramboru na úrovni jednotlivých buněk

Na médiu indukujícím růst kalusů se již 3 dny po aplikaci AzaC na řezných plochách listů objevují buňky s obnovenou expresí *GFP* (měřítko = 100 μ m).

Testováním různého časování aplikace AzaC a kanamycinu byl optimalizován postup *de novo* regenerace rostlin rezistentních ke kanamycinu. Listové explantáty byly nejdříve kultivovány 3 dny na médiu indukujícím růst kalusů a pak 4 dny na stejném médiu s přidavkem 10 μ M AzaC. Poté byly explantáty opakovaně přenášeny každé 2 týdny na médium indukující růst prýtů obsahující kanamycin (bez AzaC), dokud zregenerované rostlinky nebyly dost velké k odštížení (asi po 2 měsících). Průběh *de novo* regenerace rostlin s obnovenou expresí transgenů znázorňuje Obr. 5.

Reakce na ošetření AzaC a stabilita obnovené exprese dvou reportérových genů se lišila u „vícekopiové“ linie R17 a linie R28 s jednou kopií T-DNA. Dva ze šesti R17 regenerantů obnovily expresi obou transgenů. U ostatních regenerantů linie R17 a všech čtyřech regenerantů linie R28 bylo obnovení exprese genu pro GFP viditelné v jednotlivých buňkách po aplikaci AzaC, avšak žádný z regenerantů již neměl aktivní expresi genu pro GFP.



Obrázek 5. Obnovení exprese transgenů na úrovni celých rostlin

(A) Brzy po aplikaci AzaC je možné mezi tvořícími se kalusy na řeznách plochách listů pozorovat kalusy s obnovenou expresí *GFP* (měřítko = 500 μm). (B) Tři týdny po aplikaci AzaC jsou na médiu s kanamycinem pozorovatelné zelené kalusy na žlutnoucím zbytku listu, které značí obnovení exprese *NPTII* u vznikajících kalusů. (C) Z některých kalusů následně regenerují rostlinky s obnovenou expresí *NPTII* nebo zároveň i *GFP*.

Při následném desetiměsíčním monitoringu těchto linií nedošlo k žádné změně exprese u jednoho regeneranta linie R28 a u obou regenerantů linie R17 s obnovenou expresí *GFP* genu. Linie se sekundárně umlčenou expresí některého z transgenů byly dále pravidelně ošetřovány AzaC pro testování, zdali je možné u nich obnovit expresi umlčených transgenů demethylací DNA. U regenerantů linie R28 bylo obnovení exprese *GFP* genu možné až 6 měsíců po regeneraci. Tyto linie následně umlčely expresi genu pro *NPTII*, jehož obnovení bylo úspěšné hned po detekci umlčování. U dvou regenerantů linie R17 mělo umlčování podobný vývoj jako u R28 regenerantů, pouze bylo o něco rychlejší.

4.4 Aplikace 5-azacytidinu pro obnovení exprese genu pro GFP v tabákových liniích BY-2

U obou rostlinných materiálů – buněčné suspenze tabáku i rostlin bramboru, které byly transformovány stejným konstruktem i stejnou metodou, se umlčování projevvalo podobnými znaky, avšak v jedné věci se zásadně lišilo. U bramboru bylo umlčování *GFP* genu vždy provázeno následným umlčením *NPTII* genu, avšak u BY-2 nebyla nikdy zaznamenána ztráta kanamycinové rezistence.

Při testování účinku AzaC na obnovení exprese genu pro GFP u buněk BY-2 bylo obnovení exprese možné až u buněk linií umlčených více než 3-6 měsíců; u linií s umlčeným

genem pro GFP týdny nebo měsíce nebyla žádná změna pozorována. Testováním různých koncentrací, časování a způsobů aplikace AzaC bylo zjištěno, že přidání AzaC do suspenze dává vyšší frekvenci obnovení a lépe reprodukovatelné výsledky než aplikace ke kalusům do pevného média. K získání maximální míry obnovení exprese *GFP* (u 5-10 % živých buněk v závislosti na linii) byl přidán AzaC v optimální koncentraci 10 μ M do exponenciálně rostoucí suspenze (třetí den sedmidenního subkultivačního intervalu). Aplikace ve stacionární fázi růstu měla slabý nebo žádný efekt a aplikace v lag fázi silně inhibovala buněčné dělení. Inhibice růstu byla zřejmá dokonce i po aplikaci v exponenciální fázi růstu. Buněčná denzita byla viditelně nižší; téměř 30 % buněk bylo mrtvých (oproti 6,5 % u neošetřené kontroly) a mnoho buněk bylo na konci subkultivačního intervalu malformovaných.

Pro získání linií obsahujících pouze buňky s obnovenou expresí *GFP* genu byla využita metoda klonování. Po aplikaci AzaC (10 μ M) k umlčeným buňkám v exponenciální fázi růstu, bylo provedeno na konci subkultivačního intervalu klonování. Asi u 7 % kalusů (ze 400) byla po klonování viditelná fluorescence GFP. Tato fluorescence však byla slabá a heterogenní. U některých linií bylo dosaženo pouze přechodného obnovení exprese genu pro GFP a během několika týdnů došlo k opětovnému umlčení exprese *GFP* genu ještě v kalusech.

5. Diskuse

5.1 Variabilita exprese genu pro GFP v buněčných liniích BY-2 a její příčiny

Analýza fluorescence GFP u buněčných linií BY-2 získaných po transformaci ukázala, že ve většině linií je exprese vneseného genu velmi heterogenní. Většina heterogenit v expresi byla s největší pravděpodobností důsledkem epigenetických změn, avšak u některých linií byla odhalena i genetická heterogenita - Southernova hybridizace genomové DNA izolované z vybraných klonů linií 1/7 a 1/3 totiž ukázala, že primární kalusy mohou obsahovat buněčné populace s různými insercemi T-DNA.

Expres *GFP* se ale lišila i mezi geneticky identickými klony, ačkoli buňky byly fenotypově homogenní a byly kultivovány za stabilních podmínek. Toto naznačuje, že i jiné faktory než vnější, vývojové (van Leeuwen *et al.*, 2001, Down *et al.*, 2001) nebo stresové (Müller *et al.*, 1996) mohou indukovat změny v expresi vnesených genů. Genová exprese je obecně ovlivněna specifickými chromatinovými značkami, které mohou být přítomny na DNA i asociovaných proteinech (shrnutí v Henderson and Jacobsen, 2007). Naše analýza metylace *GFP* genu vybraných geneticky identických linií odhalila, že cytosiny byly metylovány pouze v některých analyzovaných restrikčních místech a pouze u linie 5/6j, která kompletně umlčela expresi *GFP*. Všechny ostatní pozorované rozdíly v síle a heterogenitě exprese *GFP* byly tedy buď nezávislé na metylaci DNA, nebo se metylace vyskytla v jiných, než analyzovaných restrikčních místech.

Poziční efekt v místě začlenění transgenu do chromozómu je známý svým vlivem na expresi transgenu (shrnutí v Depicker *et al.*, 2005), avšak zdá se, že nemá takový dopad (Schubert *et al.*, 2004), jak bylo dříve popisováno (Pröls and Meyer, 1992). Různá místa nebo uspořádání T-DNA inzercí mohou ovlivnit přístupnost nebo vnímavost transgenu k epigenetické regulaci jak na transkripční, tak na posttranskripční úrovni (Fischer *et al.*, 2008, Fojtova *et al.*, 2003; shrnutí v Depicker *et al.*, 2005). V případě začlenění do oblasti heterochromatinu se epigenetická informace téměř vždy odrazí do struktury chromatinu začleněné T-DNA, což má za následek umlčení transgenu (Francis and Spiker, 2005, Kim *et al.*, 2007, Gelvin and Kim, 2007). V našich experimentech se exprese *GFP* často lišila mezi klony s identickými T-DNA insercemi, dokonce i u klonů linie 5/6 s jednou kopií T-DNA (Obr. 3). V předchozích studiích byly analyzovány exprese transgenu u klonů vytvořených delší dobu po integrační události (van

Leeuwen *et al.*, 2001, Down *et al.*, 2001). V našem případě však využití buněčných kultur a jejich klonování umožnilo analyzovat klony, které byly vytvořeny bezprostředně po integraci transgenů. Protože naše výsledky ukázaly, že expresní vzorce *GFP* byly stabilní a dědičné v klonovaných liniích, různé expresní vzorce pozorované mezi geneticky identickými klony byly zřejmě založené a stabilizované u potomků primárně transformovaných buněk brzy po integrační události. Proces integrace holé T-DNA je nutně doprovázen vytvořením nového specifického chromatinového uspořádání (Gelvin and Kim, 2007). Naše výsledky jasně dokumentují, že v určitých inzerčních místech je ustanovení různých epigenetických stavů nebo expresních vzorců transgenů náhodné a nezávislé na chromozomálním prostředí.

5.2 Umlčování exprese genů pro GFP a NPTII u bramboru

Umlčování, které bylo také jednou z příčin heterogenity nebo nestability exprese *GFP* u BY-2 linií, bylo detailněji studováno u transgenních linií bramboru. Klíčovými faktory ovlivňujícími umlčování transgenů jsou počáteční míra exprese a počet kopií transgenů (Hobbs *et al.*, 1990; Linn, 1990; Sallaud *et al.*, 2003). Tento poznatek dobře koresponduje s výsledky studia umlčování *GFP* v liniích bramboru během 4,5 let po transformaci. Jelikož faktory ovlivňující jak krátkodobé (většina publikovaných studií), tak dlouhodobé umlčování (naše výsledky), jsou podobné, dá se předpokládat, že tyto faktory fungují jako predispozice. Zda skutečně dojde k umlčení exprese je pravděpodobně náhodné a záleží na mnoha okolnostech.

Frekvence umlčování transgenů u transgenních linií bramboru se snižovala s časem. Umlčování genu pro *GFP* bylo pozorováno u tří linií mezi prvním a druhým hodnocením (období jednoho roku) a pouze u dvou linií v průběhu dalších tří let. Příčinou snížené frekvence umlčování pravděpodobně nebyla stabilizace exprese transgenů v čase, ale spíše pozitivní selekce linií s nižší predispozicí k umlčování.

Jelikož místo inzerce může ovlivnit expresi transgenů, lze očekávat, že exprese dvou genů v tandemovém uspořádání přenášených v rámci jedné T-DNA by mohlo v některých případech korelovat. U všech linií bramboru, kde bylo detekováno umlčování, bylo na konci sledovaného období dosaženo umlčeného stavu u obou transgenů (*GFP* i *NPTII*). Toto pozorování je v rozporu s výsledky Ottavianiho a kol. (1993), kde bylo prezentováno studium exprese reportérového genu *GUS* a *NPTII* genu u transgenních rostlin bramboru v podobném

experimentálním uspořádání. Autoři popsali u třech ze sedmi linií pouze umlčení genu *GUS*. Jelikož naše výsledky ukázaly, že existuje časová prodleva několika měsíců mezi umlčením obou genů, absence umlčování *NPTII* genu v práci Ottavianiho a kol. (1993) může pramenit z příliš krátké doby hodnocení. Transgenní linie BY-2 však v našich experimentech také ukázaly umlčení pouze jednoho genu (při použití stejně uspořádané T-DNA jako při transformaci bramboru). Umlčení genu pro GFP u BY-2 nikdy nebylo doprovázeno umlčením sousedního *NPTII* genu, a to ani po několika letech po umlčení genu pro GFP.

5.3 Koordinované umlčování exprese tandemově uspořádaných transgenů u bramboru

V našich experimentech s rostlinami bramboru předcházelo umlčování genu *GFP* ve všech zaznamenaných případech umlčování genu *NPTII*. Tato posloupnost mohla být spojena s mírou exprese reportérových genů – *GFP* byl kontrolován silnějším promotorem (*CaMV 35S*), než *NPTII* (nopalín-syntázový promotor). Tento předpoklad je také podporován výsledky Ottavianiho a kol. (1993), kteří pozorovali umlčení pouze v případě *GUS* genu řízeného *CaMV 35S* promotorem a nepozorovali umlčování *NPTII* regulovaného nopalín-syntázovým promotorem. Pravděpodobný mechanismus umlčování zřejmě tkví v silné transkripci transgenů vlivem *CaMV 35S* promotoru, která může vést k tvorbě poškozených mRNA, které mohou být substrátem pro RNA-dependentní RNA polymerázu (Luo and Chen, 2007). Tento enzym tvoří dsRNA, počáteční substrát pro tvorbu siRNA přímo zapojených do posttranskripčního genového umlčování (PTGS; Dalmay *et al.*, 2000, shrnuto v Brodersen and Voinnet, 2006).

Umlčování genu pro GFP bylo prokazatelně následováno umlčováním *NPTII* genu u třech geneticky různých (nezávislých) transgenních linií. Kromě toho u linií R17 a R28 bylo úspěšně zopakováno postupné umlčování i po obnovení exprese dříve umlčených transgenů (pomocí 5-azacytidinu). Na základě těchto výsledků se domníváme, že tato nezávislá umlčování sdílela podobný mechanismus. Proto byl navržen následující scénář umlčování sestávající ze 4 kroků: 1) primární umlčení na posttranskripční úrovni (PTGS) vzniklé pravděpodobně náhodně v několika buňkách rostliny; 2) siRNA produkovaná těmito buňkami se následně šíří po rostlině (jak je shrnuto ve Voinnet 2005); 3) dochází k přepnutí umlčování *GFP* z posttranskripčního na transkripční (TGS) doprovázené metylací promotoru (Fojtová *et al.*, 2003), jak bylo nepřímo potvrzeno účinkem 5-azacytidinu, (AzaC) demetylačního agens DNA (Santi *et al.*, 1984); 4) a na

závěr se metylace šíří z promotoru *GFP/35S* na *NPTII* gen a nopalín-syntázový promotor. Expres *NPTII* genu se tedy zřejmě umlčovala přímo na transkripční úrovni, jak lze vyvozovat z účinků AzaC na většinu umlčených linií. (Výjimku tvořili dva regeneranti s obnovenou expresí *NPTII* odvození od linie R17. Umlčování těchto linií se vymyká výše uvedenému modelu zřejmě z důvodu, že linie R17 je „vícekopiová“. Obnovování a umlčování jednotlivých kopií se může výrazně lišit v časování i v charakteru. Kromě toho, více kopií transgenů v genomu může interagovat *in trans* během PTGS, což situaci ještě více komplikuje.)

5.4 Využití 5-azacytidinu pro obnovení exprese transgenů

AzaC způsobuje demetylací blokováním aktivity udržovací metyltransferázy (Santi *et al.*, 1984) podobné savčí DNMT1 (ortholog MET1 u *Arabidopsis*) nebo dokonce indukuje jejich degradaci (Ghoshal *et al.*, 2005). Tyto enzymy přidávají metylovou skupinu cytosinům v hemimetylovaných CG palindromech po replikaci DNA (Jones and Taylor, 1981). Pro demetylací DNA 5-azacytidinem je proto třeba, aby probíhala replikace DNA, neboť pouze nově syntetizované vlákno DNA může být demetylováno. V našich experimentech bylo skutečně pozorováno obnovení exprese transgenů pouze po aplikaci AzaC k aktivně se dělícím buňkám; BY-2 buňky v exponenciální fázi růstu a dediferencované rychle rostoucí buňky kalusu u bramboru.

Podmínkou pro dostatečné obnovení exprese umlčených transgenů u buněk bramboru bylo pouze přechodné vystavení aktivně rostoucích buněk nízkým dávkám AzaC. Frekvence demetylace však nebyla dostatečná, aby umožnila regeneraci celých rostlin s obnovenou expresí bez jejich selekce na kanamycinu. Jelikož je kanamycin potenciální inhibitor buněčného dělení u nerezistentních rostlin, musí být aplikován až po ošetření AzaC. Bez ošetření 5-azacytidinem se při *de novo* regeneraci netvořily kalusy (nedošlo k obnovení exprese *NPTII* genu) ani nebyla pozorována u buněk fluorescence GFP, na rozdíl od dřívějších pozorování Guo s kolegy (1999), kteří pozorovali spontánní obnovení exprese transkripčně umlčeného transgenů u regenerovaných rostlin *Nicotiana benthamiana*. V našem systému však vedla k získání regenerantů s obnovenou expresí umlčených transgenů pouze kombinace postupné aplikace AzaC a kanamycinu. V tomto uspořádání kanamycin inhiboval dělení citlivých buněk kalusu, i proto možná nevznikl prostor

pro spontánní obnovení způsobené změnami v metylačním vzorci transgenu, který se může objevit po indukci tvorby kalusu (Krizova *et al.*, 2009).

Linie s obnovenou expresí dříve umlčeného transgenu obsahují inzerci transgenu, která je prokazatelně náchylná k umlčení. Tyto linie tak představují vhodný materiál pro zkoumání mechanismu umlčení a dopadu různých vnějších faktorů na iniciaci tohoto procesu. Identifikace způsobu ošetření nebo podmínek, které by spolehlivě indukovaly umlčování transgenů u linií citlivých k umlčení, může umožnit včasnou selekci linií s vyšším potenciálem stabilní exprese.

6. Závěry

- U suspenzních kultur buněčné linie tabáku BY-2 odvozených z kalusů po transformaci bylo po transformaci téměř 90 % linií tvořeno buňkami s různou mírou fluorescence GFP.
- Nově zavedená metoda klonování umožnila získání téměř poloviny klonů s homogenní expresí *GFP* z primárně heterogenních linií BY-2.
- Heterogenita exprese *GFP* u transgenních linií BY-2 měla původ jednak genetický (primární linie obsahovaly buňky s různými inzercemi T-DNA) a jednak epigenetický.
- Epigenetická heterogenita linií BY-2 souvisela s umlčováním transgenů, tvorbou stabilních epigenetických stavů brzy po transformaci a „permanentní heterogenitou“ projevující se kolísavými změnami v expresi *GFP*.
- Snížení nebo umlčení exprese transgenů u bramboru bylo pozorováno přednostně u linií s vyšším počtem insercí T-DNA a s vyšší počáteční expresí *GFP*.
- Umlčení vždy postupně postihlo oba vnesené geny, přičemž vymizení exprese *GFP* předcházelo (v řádu měsíců) ve všech sledovaných případech ztrátě rezistence ke kanamycinu (umlčení genu *NPTII*), což naznačuje vzájemné propojení mezi umlčováním obou transgenů.
- Stejná posloupnost v umlčení obou transgenů byla také pozorována u umlčených linií po obnovení exprese transgenů 5-azacytidinem, který způsobuje demetylaci DNA.
- Byl navržen možný mechanismus postupného umlčování transgenů v rámci celých rostlin zahrnující čtyři následné kroky: 1) posttranskripční umlčení exprese (PTGS) genu pro GFP vyvolané zřejmě náhodně v jedné či více buňkách rostliny; 2) rozšíření po celé rostlině prostřednictvím siRNA; 3) přechod PTGS na transkripční umlčování *GFP* prostřednictvím metylace promotoru; 4) rozšíření metylace na sousední sekvenci *NPTII*.
- Analýza inhibičního efektu 5-azacytidinu na vrcholové segmenty rostlin bramboru umožnila stanovení poločasu rozpadu 5-azacytidinu v kultivačním médiu na přibližně dva dny.
- U obou rostlinných materiálů došlo k účinnému obnovení exprese transgenů 5-azacytidinem pouze při aplikaci k intenzivně se dělícím buňkám.
- Kombinací přechodného ošetření listových segmentů bramboru 10 μ M 5-azacytidinem a *de novo* regenerací na selekčním médiu s kanamycinem byla optimalizována metoda získávání rostlin bramboru s přechodně nebo stabilně obnovenou expresí dříve umlčených transgenů.

7. Seznam použité literatury

An GH. 1985. High-efficiency transformation of cultured tobacco cells. *Plant Physiology*, **79**, 568-570.

Brodersen P, Voinnet O. 2006. The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends in Genetics* **22**, 268-280.

Butaye KMJ, Cammue BPA, Delaure SL, De Bolle MFC. 2005. Approaches to minimize variation of transgene expression in plants. *Molecular Breeding* **16**, 79-91.

Cao XF, Jacobsen SE. 2002. Role of the Arabidopsis DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. *Current Biology* **12**, 1138-1144.

Cokus SJ, Feng SH, Zhang XY, Chen ZG, Merriman B, Haudenschild CD, Pradhan S, Nelson SF, Pellegrini M, Jacobsen SE. 2008. Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. *Nature* **452**, 215-219.

Dalmay T, Hamilton A, Rudd S, Angell S, Baulcombe DC. 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**, 543-553.

Daxinger L, Kanno T, Bucher E, van der Winden J, Naumann U, Matzke AJM, Matzke M. 2009. A stepwise pathway for biogenesis of 24-nt secondary siRNAs and spreading of DNA methylation. *Embo Journal* **28**, 48-57.

De Bolle MFC, Butaye KMJ, Coucke WJW, Goderis IJWM, Wouters PFJ, van Boxel N, Broekaert WF, Cammue BPA. 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**, 169-179.

De Buck S, Windels P, De Loose M, Depicker A. 2004. Single-copy T-DNAs integrated at different positions in the Arabidopsis genome display uniform and comparable beta-glucuronidase accumulation levels. *Cellular and Molecular Life Sciences* **61**, 2632-2645.

Depicker A, Sanders M, Meyer P. 2005. Transgene silencing. In: Meyer P, ed. *Plant Epigenetics*, Vol. 19. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd., 1-31.

Dietze J, Blau A, Willmitzer L. 1995. *Agrobacterium* – mediated transformation of potato (*Solanum tuberosum*). In: Potrykus I, Spangenberg G, eds. *Gene Transfer to Plants*, Berlin, Germany: Springer-Verlag, 24-29.

- Down RE, Ford L, Bedford SJ, Gatehouse LN, Newell C, Gatehouse JA et al.** 2001. Influence of plant development and environment on transgene expression in potato and consequences for insect resistance. *Transgenic Research* **10**, 223-236.
- Emani C, Sunilkumar G, Rathore KS.** 2002. Transgene silencing and reactivation in sorghum. *Plant Science* **162**, 181-192.
- Fischer U, Kuhlmann M, Pecinka A, Schmidt R, Mette MF.** 2008. Local DNA features affect RNA-directed transcriptional gene silencing and DNA methylation. *Plant Journal* **53**, 1-10.
- 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**, 1240-1250.
- Francis KE, Spiker S.** 2005. Identification of Arabidopsis thaliana transformants without selection reveals a high occurrence of silenced T-DNA integrations. *Plant Journal* **41**, 464-477.
- Gelvin SB, Kim SI.** 2007. Effect of chromatin upon Agrobacterium T-DNA integration and transgene expression. *Biochimica et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression* **1769**, 410-421.
- Ghoshal K, Datta J, Majumder S, Bai SM, Kutay H, Motiwala T, Jacob ST.** 2005. 5-Aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal. *Molecular and Cellular Biology* **25**, 4727-4741.
- Guo HS, Lopez-Moya JJ, Garcia JA.** 1999. Mitotic stability of infection-induced resistance to plum pox potyvirus associated with transgene silencing and DNA methylation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12**, 103-111.
- Henderson IR, Jacobsen SE.** 2007. Epigenetic inheritance in plants. *Nature* **447**, 418-424.
- Hobbs SLA, Kpodar P, Delong CMO.** 1990. The Effect of T-Dna Copy Number, Position and Methylation on Reporter Gene-Expression in Tobacco Transformants. *Plant Molecular Biology* **15**, 851-864.
- Jones PA, Taylor SM.** 1981. Hemimethylated Duplex Dnas Prepared from 5-Azacytidine-Treated Cells. *Nucleic Acids Research* **9**, 2933-2947.
- Kim SI, Veena, Gelvin SB.** 2007. Genome-wide analysis of Agrobacterium T-DNA integration sites in the Arabidopsis genome generated under non-selective conditions. *Plant Journal* **51**, 779-791.

- Krizova K, Fojtova M, Depicker A, Kovarik A.** 2009. Cell Culture-Induced Gradual and Frequent Epigenetic Reprogramming of Invertedly Repeated Tobacco Transgene Epialleles. *Plant Physiology* **149**, 1493-1504.
- Linn F, Heidmann I, Saedler H, Meyer P.** 1990. Epigenetic Changes in the Expression of the Maize A1 Gene in Petunia-Hybrida - Role of Numbers of Integrated Gene Copies and State of Methylation. *Molecular & General Genetics* **222**, 329-336.
- Lister R, O'Malley RC, Tonti-Filippini J, Gregory BD, Berry CC, Millar AH, Ecker JR.** 2008. Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in Arabidopsis. *Cell* **133**, 523-536.
- Lunerova-Bedrichova J, Bleys A, Fojtova M, Khaitova L, Depicker A, Kovarik A.** 2008. Trans-generation inheritance of methylation patterns in a tobacco transgene following a post-transcriptional silencing event. *Plant Journal* **54**, 1049-1062.
- Luo ZH, Chen ZX.** 2007. Improperly terminated, unpolyadenylated mRNA of sense transgenes is targeted by RDR6-mediated RNA silencing in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**, 943-958.
- Müller E, Lorz H, Lutticke S.** 1996. Variability of transgene expression in clonal cell lines of wheat. *Plant Science* **114**, 71-82.
- Muskens MWM, Vissers APA, Mol JNM, Kooter JM.** 2000. Role of inverted DNA repeats in transcriptional and post-transcriptional gene silencing. *Plant Molecular Biology* **43**, 243-260.
- Ottaviani MP, Smits T, Tencate CHH.** 1993. Differential Methylation and Expression of the Beta-Glucuronidase and Neomycin Phosphotransferase Genes in Transgenic Plants of Potato Cv Bintje. *Plant Science* **88**, 73-81.
- Pröls F, Meyer P.** 1992. The methylation patterns of chromosomal integration regions influence gene activity of transferred DNA in Petunia hybrida. *Plant Journal* **2**, 465-475.
- Sallaud C, Meynard D, van Boxtel J, Gay C, Bes M, Brizard JP, Larmande P, Ortega D, Raynal M, Portefaix M, Ouwerkerk PBF, Rueb S, Delseny M, Guiderdoni E.** 2003. Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics. *Theoretical and Applied Genetics* **106**, 1396-1408.
- Santi DV, Norment A, Garrett CE.** 1984. Covalent Bond Formation Between A Dna-Cytosine Methyltransferase and Dna Containing 5-Azacytosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **81**, 6993-6997.

Schubert D, Lechtenberg B, Forsbach A, Gils M, Bahadur S, Schmidt R. 2004. Silencing in Arabidopsis T-DNA transformants: The predominant role of a gene-specific RNA sensing mechanism versus position effects. *Plant Cell* **16**, 2561-2572.

Teixeira FK, Colot V. 2009. Gene body DNA methylation in plants: a means to an end or an end to a means? *Embo Journal* **28**, 997-998.

van Leeuwen W, Ruttink T, Borst-Vrens AWM, van der Plas LHW, van der Krol AR. 2001. Characterization of position-induced spatial and temporal regulation of transgene promoter activity in plants. *Journal of Experimental Botany* **52**, 949-959.

Voinnet O. 2005. Non-cell autonomous RNA silencing. *FEBS Letters* **579**, 5858-5871.

Wang MB, Waterhouse PM. 2000. High-efficiency silencing of a beta-glucuronidase gene in rice is correlated with repetitive transgene structure but is independent of DNA methylation. *Plant Molecular Biology* **43**, 67-82.

Wierzbicki AT, Haag JR, Pikaard CS. 2008. Noncoding Transcription by RNA Polymerase Pol IVb/Pol V Mediates Transcriptional Silencing of Overlapping and Adjacent Genes. *Cell* **135**, 635-648.

Zilberman D, Gehring M, Tran RK, Ballinger T, Henikoff S. 2007. Genome-wide analysis of Arabidopsis thaliana DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nature Genetics* **39**, 61-69.

Zilberman D. 2008. The evolving functions of DNA methylation. *Current Opinion in Plant Biology* **11**, 554-559.

8. Přílohy

Cloning of transgenic tobacco BY-2 cells; an efficient method to analyse and reduce high natural heterogeneity of transgene expression

Nocarova E, Fischer L.

BMC Plant Biology 9: 44, 2009 *IF* 4,03

Coordinated silencing of two tandem reporter genes in vegetatively propagated potato lines

Nocarova E, Opatrny Z, Fischer L.

Annals of Botany submitted, 2010 *IF* 2,76

The use of 5-azacytidine to reactivate silenced transgenes on the whole plant level

Nocarova E, Fischer L.

Annals of Botany submitted, 2010 *IF* 2,76