

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra experimentální biologie rostlin



**Studium mechanismu posttranskripčního
a transkripčního umlčování transgenů
v buněčné linii tabáku BY-2**

Study of the mechanism of posttranscriptional and transcriptional
transgene silencing in tobacco BY-2 cell line

Vojtěch Čermák

Diplomová práce

Praha 2012

Vedoucí práce:

RNDr. Lukáš Fischer, Ph.D.

Konzultanti:

RNDr. Miroslav Srba

RNDr. Lenka Dvořáková, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením výše uvedeného školitele. Veškeré použité zdroje a literatura byly řádně citovány. Tato práce nebyla použita jako závěrečná práce k získání jiného nebo obdobného druhu vysokoškolské kvalifikace.

V Praze dne 27. 8. 2012

Bc. Vojtěch Čermák

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli RNDr. Lukáši Fischerovi, Ph.D. za vedení této práce, cenné rady, korektury tohoto textu a trpělivost. Dále bych chtěl poděkovat svým konzultantům RNDr. Lence Dvořákové, Ph.D. a RNDr. Mirkovi Srbovi a společně s nimi také Mgr. Dimitriji Tyčovi za zaškolení do jednotlivých metod, případné rady a výpomoc. Dík také patří ostatním členům laboratorního týmu: Bc. Miloši Duchoslavovi, Halce Hrabákové, DiS. a dalším za různorodou výpomoc a za podíl na tvorbě příjemného pracovního prostředí. Ze stejných důvodů bych také poděkoval ostatním členům z Katedry experimentální biologie rostlin, jako je například RNDr. Aleš Soukup, Ph.D., RNDr. Lenka Havelková, Ph.D., Mgr. Ivan Kulich, Mgr. Stanislav Vosolsobě a mnozí další. Děkuji samozřejmě i svým rodičům a blízkým za jejich podporu a trpělivost.

Diplomová práce byla financována z grantů MŠMT – projekty Centrum základního výzkumu – Integrovaný výzkum rostlinného genomu (LC06004) a Výzkumný záměr – Signalizace a molekulární mechanismy buněčné odpovědi (MSM 0021620858)

Abstrakt

RNA interference je jedním z mechanismů, který umožňuje buňkám regulovat aktivitu genů, ovlivňovat tvorbu a udržování heterochromatinu a chránit je před invazivními nukleovými kyselinami. U rostlin je RNA interference spouštěna přítomností dvoušroubovicové RNA, která je štěpena proteinem Dicer na malé RNA o délce převážně 20-24nt. Tyto malé RNA mohou v komplexu s proteinem Argonaut na základě sekvenční komplementarity řídit štěpení mRNA, blokování translace, či modifikace chromatinu. V důsledku tak může být genová exprese umlčována buď posttranskripčně (tím že je bráněno vzniku proteinu z již vytvořené mRNA, PTGS) a nebo transkripčně (tím že je bráněno vzniku transkriptu, TGS).

Záměrem této práce bylo připravení různých způsobů spouštění posttranskripčního umlčování a porovnání jejich funkčnosti a účinnosti. Dalším krokem pak byla příprava systému, který by měl umožnit sledování jednotlivých kroků přechodu posttranskripčního umlčování na umlčování transkripční. Tyto tzv. indikátorové linie by měly dovolit sledovat časování a dynamiku tohoto procesu s využitím fluorescenčních proteinů. Připravovaný systém umožní také vyhodnocení různých faktorů na průběh tohoto procesu – jedním z nich je RNA-dependentní RNA polymeráza 6, která hraje hlavní roli v samovolném spouštění PTGS.

V práci je použita jako modelový organismus tabáková buněčná linie BY-2, která dovoluje snadnou přípravu a analýzu velkého množství nezávislých klonů. Umožňuje proces studovat jak na populacích buněk, tak na jednotlivých buňkách za dobře kontrolovatelných podmínek.

Byly připraveny a analyzovány tři konstrukty pro indukci umlčování. Všechny tři byly schopné spouštět umlčování. Jako nejúčinnější způsob se ukázal ten, který k tomu využíval vlásenku z RNA. Dále byly připraveny dva konstrukty pro tvorbu indikátorových linií a byly otestovány a vyhodnoceny možnosti přípravy těchto linií. Také byl úspěšně izolován gen pro RNA-dependentní RNA polymerázu 6.

Klíčová slova: RNA interference, PTGS (posttranskripční umlčování), TGS (transkripční umlčování), tabáková buněčná linie BY-2, RdDM (metylace DNA řízená malými RNA), fluorescenční proteiny, umlčování transgenů, RDR6 (RNA-dependentní RNA polymeráza 6)

Abstract

The RNA interference is a mechanism, which allows cells to regulate their genes functions, to establish and maintain heterochromatin and to defend them against invasive nucleic acids. In plants, RNA interference is initiated by double-stranded RNA, which is processed by Dicer into small RNAs, usually 20-24nt long. These small RNAs form a complex with Argonaut protein that participates in different processes based on sequence complementarity. This complex can guide mRNA cleavage, translation blocking and chromatin modifications, resulting either into posttranscriptional silencing (by preventing translation of already existing mRNA, PTGS) or transcriptional silencing (by preventing transcription of mRNA, TGS).

The first step of this thesis was to establish different ways of triggering PTGS and to evaluate their functionality and efficiency. The next step was a preparation of a system which would allow to study the transition from posttranscriptional to transcriptional silencing. These so called “indicator lines” should allow to observe the timing and dynamics of this process by utilizing fluorescent proteins. This system is also going to enable to evaluate, how different factors are involved in this process – one of the factors is RNA-dependent RNA polymerase 6 (RDR6) which plays an essential role in spontaneous triggering of PTGS.

In this work, the tobacco BY-2 cell line was used as a model organism. Large number of independent clones can be established using this cell line and it also enables to study cell populations or single cells in precisely controlled conditions.

Three different constructs for induction of silencing were prepared and their silencing potential was assessed. All three constructs were able to trigger gene silencing. The silencing based on hairpin RNA was the most efficient. Two different constructs for preparation of indicator lines were created and the feasibility of preparing such lines was evaluated. The gene for RDR6 was successfully isolated.

Keywords: RNA interference, PTGS (posttranscriptional gene silencing), TGS (transcriptional gene silencing), tobacco BY-2 cell line, RdDM (RNA-directed DNA methylation), fluorescent proteins, transgene silencing, RDR (RNA-dependent RNA polymerase)

Obsah

Abstrakt.....	7
Abstract.....	8
Seznam použitých zkratk.....	11
1. Úvod.....	13
1.1. Cíle.....	14
2. Přehled literatury.....	15
2.1. Úvod k RNA interferenci.....	15
2.2. Složky RNAi.....	16
2.2.1. Proteiny biogeneze malých RNA.....	16
2.2.2. Malé RNA.....	20
2.2.3. Argonaut.....	25
2.3. Mechanismy RNAi, umlčování exprese genů.....	26
2.3.1. Posttranskripční umlčování exprese genů.....	26
2.3.2. Transkripční umlčování exprese genů.....	27
2.3.2.1. Metylace DNA.....	27
2.3.2.1.1. RdDM.....	28
2.3.2.2. Modifikace histonů a jejich vliv na metylaci DNA.....	31
2.3.2.3. Demethylace DNA.....	32
3. Materiál a metody.....	34
3.1. Modelové organismy a jejich kultivace.....	34
3.1.1. Escherichia coli a Agrobacterium tumefaciens.....	34
3.1.2. Tabáková linie BY-2.....	35
3.2. Plazmidy.....	36
3.2.1. pGreen 0129, pGreen 0029 a pSoup.....	37
3.2.2. pDrive.....	39
3.2.3. pER8.....	40
3.2.4. psmRS-GFP.....	40
3.3. Transformace modelových organismů.....	41
3.3.1. Příprava elektrokompetentních bakterií E. coli.....	41
3.3.2. Příprava elektrokompetentních bakterií A. tumefaciens.....	42
3.3.3. Transformace bakterií.....	42

3.3.4. Transformace a kotransformace tabákové buněčné linie BY-2.....	43
3.4. Práce s DNA.....	44
3.4.1. Izolace rostlinné DNA.....	44
3.4.2. Izolace plazmidové DNA z E. coli a A. tumefaciens.....	45
3.4.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	45
3.4.3.1. Seznam použitých primerů.....	46
3.4.4. Restrikční štěpení.....	47
3.4.4.1. Defosforylace.....	48
3.4.4.2. Zatupení konců.....	48
3.4.5. Agarózová gelová elektroforéza.....	49
3.4.5.1. Izolace DNA fragmentu z agarózového gelu.....	49
3.4.6. Ligace.....	50
3.4.6.1. TA-klonování.....	50
3.4.6.2. Odsolení ligační směsi.....	50
3.4.7. Sekvence.....	51
3.5. Sledování změn fluorescence a indukce umlčování.....	51
3.5.1. Analýza obrazových dat.....	51
4. Výsledky.....	53
4.1. Indukce umlčování.....	53
4.1.1. Tvorba konstruktů.....	53
4.1.2. Indukce umlčování v liniích stabilně transformovaných GFP.....	57
4.1.3. Opakování indukce umlčování s vybranými klony.....	65
4.1.4. Dodatečné kontroly.....	69
4.2. Indikátorové linie.....	71
4.2.1. Tvorba konstruktů.....	73
4.2.2. Spouštění umlčování pomocí vlásenky u indikátorových linií.....	78
4.3. Příprava konstruktů pro změnu exprese RDR6.....	80
5. Diskuse.....	85
5.1. Indukce umlčování.....	85
5.2. Indikátorové linie.....	91
5.3. Pokračování experimentální práce do budoucna.....	95
6. Závěry.....	96
7. Seznam použité literatury.....	97

Seznam použitých zkratk

A. thaliana – *Arabidopsis thaliana*

A. tumefaciens – *Agrobacterium tumefaciens*

AGO – Argonaut

antiGFP – konstrukt s GFP v antisense orientaci

ATXR – Arabidopsis trithorax-related protein

bp – Base pairs

CLSY – CLASSY

CMT – Chromomethylase

DCL – Dicer-like

DMS – Defective in meristem silencing

DRD1 – Defective in RdDM 1

dH₂O – destilovaná voda

dNTP – deoxyribonukleotidy

DME – Demeter

DML – DME-like

DMSO – Dimethyl sulfoxide

DRB – dsRNA binding proteins

DRM – Domains rearranged methyltransferase

dsRBD – dsRNA-binding domain

dsRNA – double-stranded RNA

E. coli – *Escherichia coli*

GFP – Green fluorescent protein

GFP-bT – konstrukt s GFP, které není zakončeno terminátorem

GFP-IR – konstrukt s GFP tvořící invertovanou repetici

hc-siRNA – heterochromatic siRNA

HDA6 – Histone deacetylase 6

HEN1 – Hua Enhancer1

IDN2 – Involved in de novo

JMJ14 – Jumonji-C 14

LTR – Long terminal repeat

MET1 – Methyltransferase 1

miRNA – microRNA

N. tabacum – *Nicotiana tabacum*

nat-siRNA – natural *cis*-antisense transcript siRNA

nt – Nucleotides

NRP(A-E)(1-12) – Nuclear RNA polymerase (A-E) (1-12)

PCR – Polymerase chain reaction

Pol II, IV, V – DNA-dependent RNA polymerase II, IV, V

PTGS – Posttranscriptional gene silencing

RdDM – RNA directed DNA methylation

RDM1 – RNA Directed DNA Methylation 1
RDR – RNA-dependent RNA polymerase
RISC – RNA-induced silencing complexes
RNAi – RNA interference
ROS – Repressor of silencing
RPM – Revolutions per minute
SDE – Silencing defective
SGS – Suppressor of gene silencing
siRNA – small interfering RNA
SHH1 – Sawadee homeodomain homolog 1
SPT5 – Suppressor of Ty Insertion 5
sRNA – small RNA
SUVH – SU(VAR)3-9 homologue
T-DNA – Transfer DNA
ta-siRNA – *trans*-acting siRNA
TGS – Transcriptional gene silencing
Tris – tris-hydroxymetyl-aminometan
XRN – exoribonuclease

1 Úvod

Tato práce se zabývá problematikou související s procesem RNA interference (RNAi). Téma práce spadá do oblasti epigenetiky a molekulární genetiky. RNAi je klíčovým mechanismem regulace genové exprese a řídí tak diferenciaci buněk, morfogenezi, reakce na stres a reakce na rozmanité stimuly. RNAi se také podílí na udržování heterochromatinu, správné organizaci centromer a telomer. Jednou z hlavních funkcí tohoto procesu a zřejmě také důvod, proč se v evoluci vyvinul, je ochrana organismu proti invazivním nukleovým kyselinám, jako jsou viry a transposony. Proces RNAi má zásadní význam pro biotechnologie, kde byl z počátku vnímán jako problematický jev, neboť často bránil dosažení kýžených výsledků při tvorbě transgenních organismů, ale v poslední době začíná v této oblasti nacházet i své uplatnění například díky možnosti snadno epigeneticky vypnout expresi konkrétních genů bez nutnosti změny vlastní genetické informace. Objev RNAi umožnil mnohem hlouběji nahlédnout do řady jevů, jimiž se molekulární biologie zabývá a s prohlubujícím se porozuměním tomuto procesu se objevují stále další jevy, které ovlivňuje. Mezi jevy, které umožnil rozvoj znalostí procesu RNAi alespoň z části pochopit patří nejen posttranskripční a transkripční umlčování, ale i řada epigenetických jevů jako jsou paramutace a také vysvětluje význam části nekódující DNA. RNAi je mezi eukaryoty široce konzervována a patří tak k jejich apomorfiím. Obdobný systém, který však k tomu eukaryotnímu není homologní, se nachází u prokaryot (zejména u archebakterií) a také slouží jako obrana proti invazivním nukleovým kyselinám (Terns & Terns 2011). U rostlin jsou pak jednotlivé složky RNAi široce diverzifikovány, což je zřejmě dáno potřebou flexibility, která souvisí s přisedlým způsobem života.

Princip RNAi jako první popsali Craig C. Mello a Andrew Fire ve svém článku, který publikovali roku 1998, a kde na příkladu *Caenorhabditis elegans* jasně ukázali, že existuje proces regulace genové exprese spouštěný dvouvláknovou RNA (Fire et al. 1998). Ještě v témže roce byl stejný výsledek dokázán i na rostlinách (Waterhouse et al. 1998). V roce 2006 obdrželi Fire i Mello za tento svůj objev Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu. První myšlenka, že by RNA mohla sloužit jako složka mechanismů regulujících aktivitu genů však pochází již od stejných autorů, kteří navrhli první model regulace genové exprese (Jacob & Monod 1961). A stejně tak vlastní projevy RNAi byly pozorovány dříve, než došlo k popsání vlastního mechanismu. První pozorování RNAi bylo na rostlinách, konkrétně na petúniích, již koncem osmdesátých let. Při pokusu o zvýraznění barvy květů zvýšením exprese příslušného genu došlo k jevu opačnému, tedy ztrátě barvy. Postupem času byly popsány další případy jak

posttranskripčního umlčování, tak umlčování transkripčního a metylace DNA řízené RNA. Řada těchto procesů se vysvětlovala tak, že antisense RNA párováním s cílovou molekulou buď blokovala její funkci, nebo že tvorbou dvouvláknové RNA spouštěla degradační mechanismy (Baulcombe 1996). Princip RNAi je však založen na malých RNA, které na základě komplementarity spouští sekvenčně specifické katalytické procesy. Popsání tohoto principu následně umožnilo určit, že transkripční i posttranskripční umlčování vychází ze stejného základu (Sijen et al. 2001). Tento fakt také ukazuje funkční provázání obou procesů – posttranskripční a transkripční umlčování se tak mohou navzájem ovlivňovat. Právě ke studiu dynamiky přechodu mezi posttranskripčním a transkripčním umlčováním směřuje i obsah této práce, která by měla položit základ některých přístupů a metod pro další výzkum této problematiky.

1.1 Cíle

Hlavním cílem diplomové práce bylo připravit a otestovat různé způsoby spouštění posttranskripčního umlčování a následně připravit systém, který by umožnil sledovat přechod takto spuštěného posttranskripčního umlčování na umlčování transkripční.

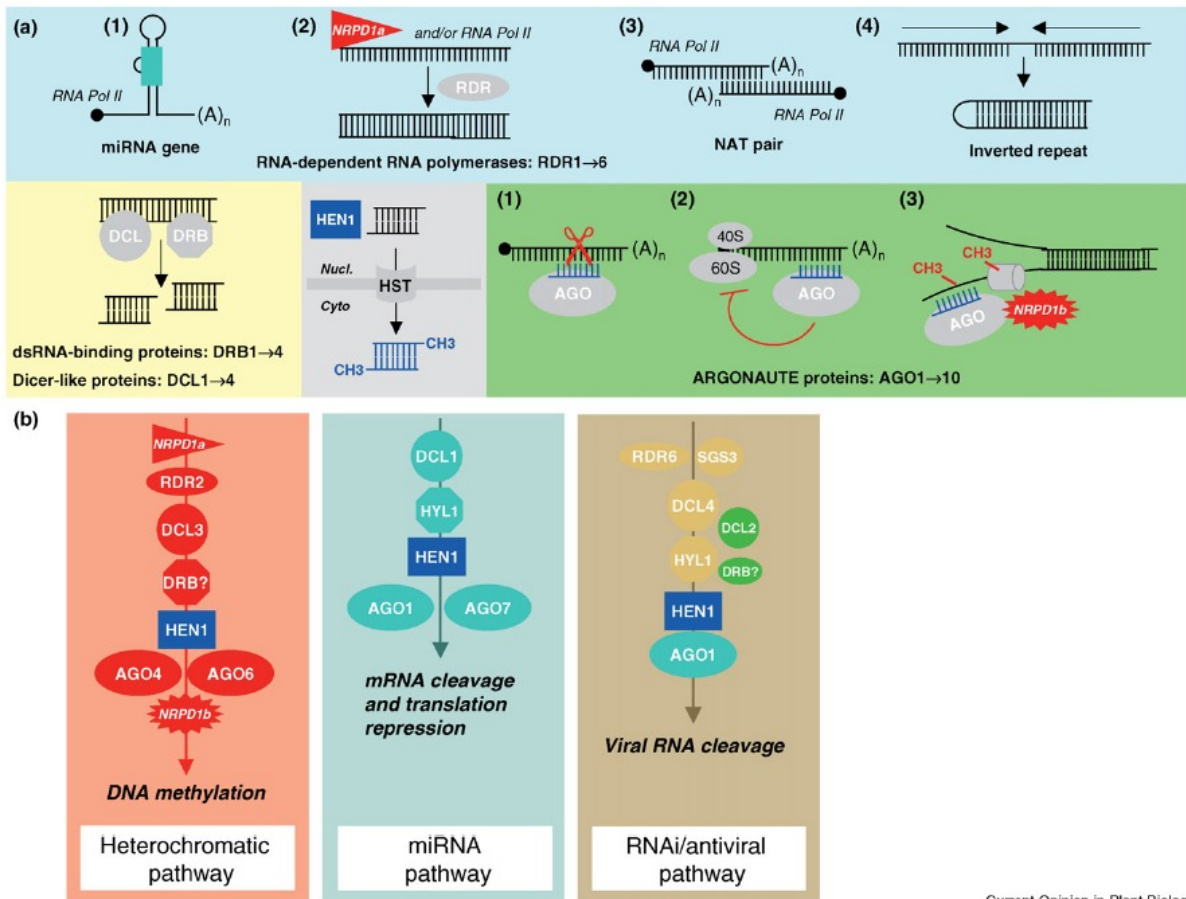
- 1) Spouštění posttranskripčního umlčování.
 - Příprava tří různých konstruktů schopných spouštět posttranskripční umlčování GFP.
 - Transformace buněčné linie BY-2 těmito konstrukty a vyhodnocení účinnosti a průběhu jimi spouštěného umlčování.
- 2) Příprava systému pro sledování přechodu umlčování posttranskripčního na umlčování transkripční (příprava indikátorových linií).
 - Tvorba konstruktů pro indikátorové linie, které umožní detekovat metylaci kódující (transkribované) sekvence a metylaci promotoru.
 - Otestování tvorby a použitelnosti indikátorových linií transformací konstruktů pro indikátorové linie společně s konstruktem pro spouštění posttranskripčního umlčování do buněčné linie BY-2.
- 3) Izolace genů RNA-dependentní RNA polymerázy 6 a příprava konstruktů pro změnu její exprese.

2 Přehled literatury

2.1 Úvod k RNA interferenci

RNA interference (RNAi) je významný proces sloužící u rostlin především k regulaci genové exprese ve vývoji a stresových reakcích, obraně proti invazním nukleovým kyselinám a udržování heterochromatinu. Základem RNAi jsou malé RNA (sRNA) většinou o délce 21-24 nt, které umožňují efektorovému komplexu rozpoznat cílovou molekulu (RNA nebo DNA) na základě komplementarity. U rostlin je RNAi vždy spojena s přítomností dvoušroubovicové RNA (dsRNA), která slouží jako prekurzor pro vznik malých RNA. U řady jiných organismů však existují i způsoby tvorby sRNA bez nutnosti prekurzoru v podobě dsRNA. Dvoušroubovicová RNA může v rostlinné buňce vzniknout několika způsoby (Obr. 2.1): transkripcí antisense RNA (ta interaguje s mRNA), transkripcí invertované repetice (takovýto transkript vytváří vlásenku) a nebo tvorbou komplementárního vlákna činností RNA-dependentních RNA polymeráz (ať už rostlinných či virových). Vzniklá dsRNA je rozpoznávána enzymem Dicer – u rostlin Dicer-like (DCL), a ten vyštěpí duplex malé RNA. Jedno z vláken duplexu je následně rozeznáno proteinem Argonaut (AGO), který zprostředkovává jednak nalezení cílové molekuly a jednak vlastní proces umlčování, a to buďto sám o sobě (tento protein má mimo jiné schopnost štěpit RNA) a nebo v komplexu s jinými proteiny.

RNA interference se v určitých obměnách vyskytuje prakticky u všech eukaryot a její základní složky (RNA-dependentní RNA polymeráza, Dicer a Argonaut) byly s největší pravděpodobností přítomny už u posledního společného předka všech eukaryot (Cerutti & Casas-Mollano 2006).



Current Opinion in Plant Biology

Obr. 2.1: Stručný přehled procesů RNAi. (a) První řádek – vznik dvoušroubovicové RNA: (1) sekundární struktura prekursoru miRNA s dvouvláknovým úsekem, (2) syntéza druhého vlákna pomocí RNA-dependenční RNA polymerázy, (3) párování mRNA s antisense RNA a (4) vlásenka vznikající přepisem invertované repetice. Druhý řádek (zleva): vystřížení duplexu sRNA, úpravy a případný transport sRNA, mechanismy působení: (1) štěpení, (2) blokování translace a (3) modifikace chromatinu. (b) Základní dráhy RNAi a proteiny, které se jich účastní. Převzato z: (Voinnet 2008)

2.2 Složky RNAi

2.2.1 Proteiny biogeneze malých RNA

Základem pro vznik malých RNA jsou většinou transkripty DNA-dependenčních RNA polymeráz (pokud se zrovna nejedná o sRNA virového původu). Doposud popsané geny specializované na tvorbu nekódující RNA (ncRNA), ze které dále vznikají různé sRNA, jsou běžně přepisovány **Pol II** – jedná se např. o prekursory miRNA a ta-siRNA (viz dále; Vazquez et al. 2010). Kromě Pol I, II a III, které se vyskytují u všech eukaryot, se u rostlin vyvinuly ještě další dvě polymerázy: **Pol IV** a **V**¹, které se specializovaly především na metylaci DNA (RdDM, RNA directed DNA methylation). Pol IV se podílí na produkci sRNA, kdežto Pol V působí až v pozdějších krocích celého procesu (při vlastní

¹ Pol IV a V byly dříve značeny jako Pol IVa resp. Pol IVb a jejich podjednotky NRPD1a a NRPD1b.

metylaci) a přímo z jejího transkriptu žádné sRNA nevznikají (tento proces je podrobně popsán v kapitole 2.3.2.1.1). Obě tyto polymerázy se v evoluci vyvinuly z Pol II a také s ní sdílí přibližně polovinu svých podjednotek (stejně jako ostatní eukaryotní polymerázy i tyto se skládají z celkem 12 podjednotek). Jako první se pravděpodobně vyvinula Pol IV a z ní poté duplikací Pol V (Luo & Hall 2007). Tyto polymerázy se odlišují především svojí katalytickou podjednotkou NRPD1 respektive NRPE1², ta se také označuje jako největší podjednotka. Hlavním znakem, který největší podjednotky odlišuje, je jejich C-terminální doména, která nese motivy zřejmě potřebné pro vazbu ostatních složek RdDM – u obou je to DeCL-like (defective chloroplast and leaves) doména a u NRPE1 to je navíc ještě WG/GW motiv, který je obecně využíván k vazbě proteinu Argonaut (AGO). Druhá největší podjednotka (NRPD2) je u *Arabidopsis* jen jedna, a tak je oběma polymerázami sdílena. U jiných rostlinných druhů se počty druhé největší podjednotky liší a například u kukuřice jsou hned tři geny – tato rozmanitost v počtu některých vedlejších podjednotek svědčí o stále silném evolučním tlaku na vývoj těchto polymeráz (Pontes et al. 2006; El-Shami et al. 2007; Luo & Hall 2007; Haag et al. 2009; Ream et al. 2009; Sidorenko et al. 2009; Kanno et al. 2010). Pol IV je zodpovědná za tvorbu sRNA z přibližně 94 % všech lokusů, které sRNA produkují. Naprostá většina těchto sRNA pochází z oblastí transposonů a repetice, na jejichž umlčování se podílí proces RdDM (Mosher et al. 2008). Předpokládá se, že Pol IV je schopna do určité míry rozeznávat metylovanou DNA, aby tak mohla tuto metylaci udržovat (Onodera et al. 2005). Kromě toho má však Pol IV i roli v produkci nat-siRNA a také při přijetí RNAi signálů šířených na dálku prostřednictvím vodivých pletiv (Borsani et al. 2005; Brosnan et al. 2007; Katiyar-Agarwal et al. 2007).

Jednovláknové RNA transkripty mohou být převedeny na dvouvláknové RNA pomocí RNA-dependentních RNA polymeráz (**RDR**). RDR jsou jednou ze základních složek RNAi a jsou tak u většiny eukaryot a ačkoliv se například u savců přímo žádný jejich homolog nevyskytuje, tak jejich role v produkci některých siRNA byla částečně zastoupena podjednotkou telomerázy (Maida et al. 2009). U *Arabidopsis* je celkem šest genů pro RDR, které odpovídají dvěma ze tří rodin eukaryotických RDR (Zong et al. 2009). Rodina zahrnující RDR3-5 (také RDR3a-c) patří k nejméně probádané a o konkrétních funkcích těchto RDR nic známo není. Do druhé rodiny patří RDR1, RDR2 a RDR6 – tyto RDR jsou probádány mnohem detailněji. Jak se ukázalo u ostatních eukaryotních polymeráz, tak RDR mohou operovat různými způsoby – syntéza může začínat buď s primerem (kterým může být

² U *Arabidopsis thaliana* jsou podjednotky DNA-dependentních RNA polymeráz značeny NRP(A-E)(1-12), kde písmeno A-E odpovídá polymeráze I-V, číslo určuje podjednotku v rámci daného typu polymerázy a pokud je potřeba, tak se pomocí malého písmene za názvem ještě rozlišují různé izoformy.

sRNA) a nebo může být na primeru nezávislá a komplementární vlákno může být syntetizováno v celé délce templátu a nebo může RDR na náhodném místě templátu syntetizovat přímo sRNA (Makeyev & Bamford 2002). U rostlinných RDR se schopnost syntetizovat sRNA přímo neprokázala a zřejmě tuto schopnost nemají. Schopnost využít sRNA jako primer se zatím podařilo prokázat jen pro homologa RDR2 u pšenice, *in vitro* studie u RDR6 ani sekvenace některých jejích produktů zatím však nic takového neukázaly (Tang et al. 2003; Curaba & Chen 2008; Rajeswaran et al. 2012). Na rozdíl od některých ostatních složek RNAi je u RDR velmi nízká redundance mezi jejich funkcemi (Kasschau et al. 2007). RDR1 hraje hlavní roli v protivirové obraně (její exprese je řízena kyselinou salicylovou), ovšem v této funkci může být nahrazena i RDR6, vzhledem k tomu, že viry jednotlivé složky RNAi často inhibují (Diaz-Pendon et al. 2007). RDR2 je nezbytná pro tvorbu siRNA účastnících se RdDM, kde interaguje přímo s Pol IV. Kromě RdDM také ovlivňuje přijetí RNAi signálů šířeného na dálku prostřednictvím vodivých pletiv, případně některé nat-siRNA (Brosnan et al. 2007; Kasschau et al. 2007; Ron et al. 2010; Law et al. 2011). RDR6 produkuje ta-siRNA, ovlivňuje některé nat-siRNA, podílí se zřejmě na umlčování některých transposonů a je důležitou složkou sense-PTGS, tedy posttranskripčního umlčování spouštěného RNA, která je k cílové molekule v sense orientaci a zároveň nespolečá na produkci sRNA ze sekundární struktury s dvoušroubovicovým úsekem (Borsani et al. 2005; Yoshikawa et al. 2005; Voinnet 2008; Zheng et al. 2010). Aby takováto RNA mohla spouštět umlčování, musí k ní být dosyntetizováno komplementární vlákno. RDR6 pravděpodobně rozpoznává tzv. aberantní RNA, tedy RNA, kterým chybí 5' čepička či 3' poly-A konec. Aberantní RNA může vzniknout buďto rozštěpením dané RNA proteinem Argonaut s sRNA a nebo předčasnou terminací elongace či pročtením se skrz terminátor. RDR6 nerozpoznává aberantní RNA přímo a v *in vitro* podmínkách není schopna odlišit standardní transkript od transkriptu, který postrádá 5' čepičku nebo 3' poly-A konec. Standardní transkript však je před RDR6 zřejmě chráněn proteiny, které jsou asociovány s 5' a 3' koncem, nicméně ani pouhá přítomnost aberantního transkriptu není dostatečnou podmínkou pro to, aby k němu RDR6 dosyntetizovala komplementární vlákno. V buňce je totiž řada mechanismů, které takovéto nestandardní RNA odstraňují a nedávají tak šanci RDR6 je zavčas vyhledat. Aby tedy RDR6 mohla spustit umlčování, je zřejmě potřeba, aby množství aberantních RNA daného transkriptu překročilo určitou hladinu, při které již nebudou moci degradační mechanismy v buňce tyto transkripty dostatečně rychle odstraňovat. Takový mechanismus je zřejmě nezbytný, neboť transkripční aparát není dokonalý a určité množství aberantních RNA produkuje i u běžných genů, které nemají být posttranskripčně

umličovány (Gazzani et al. 2004; Herr et al. 2006; Luo & Chen 2007; Curaba & Chen 2008). Určité transkripty jsou například proti vstupu do dráhy RNAi specificky chráněny pomocí 5'-3' exoribonukleázy XRN4, která rozpozná aberantní transkripty vzniklé štěpením pomocí sRNA na základě konkrétních sekvenčních motivů a degraduje je (Rymarquis et al. 2011). Někdy je naopak potřeba, aby vzniklé aberantní RNA po štěpení pomocí sRNA do dráhy RNAi vstoupily, v těchto případech je RDR6 k danému transkriptu často cíleně atrahována. Na tomto procesu se zřejmě přímo či nepřímo podílí AGO, který danou RNA naštěpil (Manavella et al. 2012). Jedním z proteinů, který pak tomuto procesu napomáhá je SGS3 (Suppressor of Gene Silencing), jehož správná funkce je potřeba pro produkci většiny sRNA závislých na RDR6. SGS3 patří do rodiny proteinů, které se účastní i dalších procesů sovisejících s RNAi a je pro ně charakteristická především přítomnost XS domény. XS doména je schopná vázat dsRNA s 5' přesahy (např. tedy sRNA navázanou na cílovou molekulu). Jednou z funkcí SGS3 je stabilizace RNA po štěpení pomocí komplexu sRNA s proteinem Argonaut (Elmayan et al. 2009; Fukunaga & Doudna 2009; Xie et al. 2012). Dalším proteinem, který v tomto procesu hraje zatím blíže nespecifikovanou roli, je předpokládaná RNA helikáza SDE3 (Silencing Defective 3), ta pravděpodobně interaguje s některým z AGO proteinů (Jauvion et al. 2010; Karlowski et al. 2010).

Vlastní malé RNA jsou vyštěpovány z dsRNA pomocí proteinu Dicer (u rostlin značen jako **DCL**). Vzniklý duplex sRNA nese 5' monofosfát a 3' hydroxylovou skupinu, na 3' konci je pak dvounukleotidový přesah. Funkci Diceru potřebují ke svému vzniku všechny sRNA, jejichž tvorba je závislá na dsRNA, na rozdíl od piRNA u živočichů a sekundárních siRNA u *Caenorhabditis*, které jsou na Diceru nezávislé (Chapman & Carrington 2007). DCL patří do skupiny ribonukleáz typu III. DCL má několik domén: PAZ, helikázovou doménu, dvě RNase III domény, DUF283 a většinou dvě dsRBD (dsRNA binding domain). RNase III domény dimerizují a štěpí dsRNA tak, že vzniká 3' konec s 2nt přesahem, kromě toho se u savců ukázalo, že jsou schopny i vázat AGO protein; PAZ doména váže 3' konce dsRNA s 2nt přesahem a její vzdálenost od RNase III domény určuje délku výsledné sRNA; DUF283 a dsRBD jsou dsRNA vazebné domény, které jsou zároveň schopné protein-protein interakcí s pomocnými **DRB** (dsRNA binding) proteiny (Tahbaz et al. 2004; Hiraguri et al. 2005; MacRae et al. 2006; Qin et al. 2010). DRB jsou zásadní pro řadu procesů, kterých se DCL účastní, a celkem specificky s DCL dimerizují přes dsRBD domény, které nesou. Arabidopsis kóduje čtyři různé DCL a pět různých DRB, jednoděložné (jako např. rýže) pak mají pět různých DCL a osm DRB (Hiraguri et al. 2005; Margis et al. 2006; Curtin et al. 2008). Jednotlivé DCL jsou v řadě procesů vzájemně silně redundantní, zejména v obraně proti

virům (Gascioli et al. 2005; Deleris et al. 2006). DCL1 (u *Arabidopsis*) je především složkou tvorby miRNA, interaguje s DRB1 (často také značen jako HYL1 – Hyponastic leaves1), se kterým lokalizuje v jádře do specifického druhu Cajalových tělísek (někdy také značených jako D-bodies), jejichž funkcí je právě tvorba miRNA zpracováním jejich prekursorů. DRB1 se v tomto procesu podílí na selekci vlákna z duplexu sRNA, které bude následně tvořit komplex s AGO1. Malé RNA produkované DCL1 jsou převážně 21nt dlouhé (Hiraguri et al. 2005; Ronemus et al. 2006; Fujioka et al. 2007; Eamens et al. 2009). DCL2 hraje roli v produkci řady různorodých siRNA, které jsou převážně 22nt dlouhé, tyto siRNA mají důležitou úlohu ve spouštění tvorby sekundárních siRNA, také je významnou složkou obrany proti virům a v tomto procesu může fungovat nezávisle na DRB proteinech (Borsani et al. 2005; Deleris et al. 2006; Curtin et al. 2008; Mlotshwa et al. 2008). DCL3 je především součástí RdDM. siRNA, které v tomto procesu produkuje, jsou závislé na funkci RDR2 a jsou převážně 24nt dlouhé. Kromě toho hraje spíše vedlejší roli v produkci některých dalších siRNA a v obraně proti virům. DCL3 se nachází v nukleoplazmě a spolu s některými dalšími složkami RdDM kolokalizuje v Cajalových těliscích (Deleris et al. 2006; Pontes et al. 2006; Kasschau et al. 2007). DCL4 je důležitou složkou produkce ta-siRNA a zároveň je hlavním DCL v obraně proti virům. DCL4 pro svoji funkci potřebuje DRB4, ale na rozdíl od DRB1 se DRB4 nepodílí na selekci vlákna z duplexu sRNA, které bude následně interagovat s AGO. DCL4 je lokalizován v jádře a siRNA, které produkuje, jsou většinou 21 nt dlouhé (Yoshikawa et al. 2005; Deleris et al. 2006; Eamens et al. 2009; Hoffer et al. 2011).

Poté, co je duplex malých RNA vystřižen, je stabilizován 2'-*O*-metylací na 3' konci vlákna. Tento proces zajišťuje metyltransferáza **HEN1** (Hua Enhancer1), která je u rostlin potřeba pro metylaci jak siRNA, tak miRNA (u savců k metylaci miRNA nedochází). HEN1 rozpoznává duplexy sRNA, které mají 3' konec s 2nt přesahem a jsou přibližně 21-24nt dlouhé. Pokud je HEN1 nefunkční, pak jsou sRNA uridinylovány a degradovány 3'-5' exonukleázami (Li et al. 2005).

2.2.2 Malé RNA

Malé RNA jsou klíčovou složkou procesů RNAi, neboť umožňují sekvenčně specifické rozpoznání cílové nukleové kyseliny na základě komplementarity. Rostlinné sRNA jsou převážně 21-24nt dlouhé a jejich produkce je indukována přítomností dsRNA, ze které jsou vystřiženy enzymy DCL (jak je popsáno výše). Malé RNA je možné roztřídit do několika skupin na základě způsobu jejich vzniku. Je třeba podotknout, že některé skupiny či jejich názvy nejsou v literatuře ustáleny a řada skupin se vzájemně prolíná. Tento problém je

obzvláště patrný u rostlin, kde řada složek RNAi má velké množství paralogů, které jsou vzájemně redundantní, a tak zatímco miRNA jsou např. u *Drosophily* tvořeny jinými enzymy, než siRNA, tak u *Arabidopsis* se většina enzymů produkujících miRNA podílí i na produkci některých typů siRNA (Chapman & Carrington 2007).

Dobře charakterizovanou skupinou malých RNA jsou microRNA (**miRNA**). Tyto sRNA vznikají z prekursorů s komplexní sekundární strukturou, jež obsahuje vlásenku s nedokonalým párováním bazí. Z každého genu produkujícího miRNA (MIR geny) vzniká obvykle jen jedna konkrétní miRNA. MIR geny často tvoří rodiny, jež dávají vznik miRNA o stejné sekvenci (Meyers et al. 2008). MIR geny jsou přepisovány Pol II za vzniku pri-miRNA, z pri-miRNA je napřed pomocí DCL1, DRB1 a některých dalších proteinů vyštěpena pre-miRNA (část vlásenky se smyčkou) a až z vlastní pre-miRNA je vyštěpen duplex miRNA opět za účasti DCL1 a DRB1 (Hiraguri et al. 2005; Rajagopalan et al. 2006; Ronemus et al. 2006; Kim et al. 2011). U některých miRNA může proces probíhat naopak (tedy napřed je odstraněna část vlásenky se smyčkou a až ze zbytku prekursoru je vyštěpen duplex miRNA) a některé miRNA (zřejmě ty evolučně mladší) jsou produkovány i jinými DCL, než je DCL1 (Rajagopalan et al. 2006; Bologna et al. 2009). Vzniklý duplex miRNA je metylován HEN1 a asociuje s AGO1, ten si z něj vybere tzv. „guide strand“ a druhé vlákno („passanger strand“) rozštěpí. Výběr vlákna ovlivňuje DRB1 (Li et al. 2005; Eamens et al. 2009). Ne u všech miRNA je role guide a passanger strand jednoznačně daná a s AGO1 může asociovat i určitá (někdy i rovnocenná) frakce vlákna druhého (Manavella et al. 2012). Vzhledem k tomu, že miRNA vznikají v jádře (v jednom typu Cajalových tělísek), tak musí být následně exportovány do cytoplazmy. Na exportu se, aspoň v některých případech, podílí exporter HASTY. Forma, v jaké jsou exportovány, přesně známa není, ale vzhledem k tomu, že AGO1 kolokalizuje s proteiny biogeneze miRNA, jaderně lokalizovaný DRB1 ovlivňuje výběr vlákna z duplexu a že některé vlastnosti pre-miRNA mohou ovlivňovat funkčnost AGO1, lze předpokládat, že miRNA jsou exportovány v komplexu s AGO1 (Fang & Spector 2007; Fujioka et al. 2007; Eamens et al. 2009; Manavella et al. 2012). Doposud bylo identifikováno přes 200 MIR genů a některé z nich tvořené miRNA jsou v evoluci velmi silně konzervovány. Hlavní funkcí miRNA je především posttranskripční regulace genové exprese. Podílejí se tak na regulaci genů souvisejících s ontogenezí, reakcí na různé typy stresu a jsou součástí řady dalších procesů (Rubio-Somoza & Weigel 2011). Ve výjimečných případech mohou i některé miRNA indukovat metylaci DNA (Wu et al. 2010). miRNA působí především buněčně autonomně a jen zřídka se šíří i do sousedních buněk (Felippes et al. 2010).

Zbylé sRNA u rostlin, které nespádají pod miRNA, jsou souhrnně označovány jako siRNA. Z siRNA se ale dále vyčleňují některé podskupiny, jejichž biogeneze má určité unikátní prvky.

Prekurzory, ze kterých siRNA mohou vznikat, jsou rozmanité a jedním z nich může být **vlásenka**. Vlášenska vzniká transkripcí invertované repetice a lokusů, které mohou tímto způsobem dávat vzniknout vlásenkám, je v genomu *Arabidopsis* překvapivě hodně (až ke třem tisícům). Vlášensku mohou obecně zpracovávat všechny DCL, zejména DCL2, DCL3 a DCL4. Se zkracující se délkou vlásenky se zřejmě využití jednotlivých DCL posouvá od DCL2, přes DCL4 až po DCL1 a u kratších vlásenek způsob zpracování začíná připomínat dráhu biogeneze miRNA (některé takovéto sRNA se také označují „miRNA-like siRNA“). U některých vlásenek se také ukázala potřeba DCL1, přes to, že se nepodílí přímo na produkci siRNA – možná hraje obdobnou roli, jako při zpracování prekursorů miRNA. Tato pozorování souhlasí s představou, že miRNA se postupně vyvinuly v evoluci z invertovaných repetit (Vazquez et al. 2008; Dunoyer et al. 2010; Wang et al. 2011).

Dalším typem sRNA jsou **nat-siRNA** vznikající z transkriptů jednoho lokusu, kde však běží transkripce v obou směrech (natural antisense transcripts – NAT). Vznikají tak dvě vzájemně komplementární vlákna, která se spolu mohou spojit a vytvářet dsRNA. Tyto antisense transkripty mohou vznikat asi z 9 % genů u *Arabidopsis* a nadpoloviční většina z těchto transkriptů je schopna produkovat nat-siRNA (Jin et al. 2008). Biosyntetická dráha zatím nebyla zcela jasně popsána, kromě standardních složek jejich produkci také ovlivňuje Pol IV a RDR6, případně RDR2. Procesu se účastní různé DCL a nat-siRNA, které produkují, mohou v některých případech být atypicky dlouhé (30-40nt). nat-siRNA tvoří významnou složku reakce rostlin na stresy, kdy právě v reakci na stres dochází k indukci transkripce antisense RNA k umlčovanému genu, nat-siRNA tak působí převážně *in cis* (Borsani et al. 2005; Katiyar-Agarwal et al. 2007; Ron et al. 2010).

Malé RNA mohou také vznikat v důsledku rozštěpení transkriptu jinou sRNA. Proces, kdy v reakci na přítomnost sRNA komplementární k určité části sekvence dochází k produkci sRNA ze sekvencí přilehlých, se nazývá transitivity a vzniklé sRNA bývají označovány jako **sekundární siRNA**. Ve spouštění produkce sekundárních siRNA během PTGS hrají důležitou úlohu siRNA produkované DCL2 a nebo některé miRNA. Jimi rozštěpené transkripty jsou rozpoznány RDR6 (zatím jediná RDR, která byla tímto procesem popsána) a vzniklá dsRNA je štěpena především DCL2 a DCL4. Sekundární siRNA se obvykle šíří oběma směry od místa štěpení (Moissiard et al. 2007; Mlotshwa et al. 2008). Specifickou podskupinu sekundárních

siRNA tvoří **ta-siRNA**, ty vznikají rozštěpením nekódujícího TAS transkriptu za přítomnosti komplementární miRNA. Rozštěpený transkript je rozeznán RDR6 a následně DCL4, který vyštěpuje ta-siRNA ve fázi (tj. štěpí dsRNA od jednoho konce po 21nt úsecích, vzniklé ta-siRNA se tak nepřekrývají). Tento proces vyžaduje transport tam a zpět mezi jádrem a cytoplazmou – prekursor ta-siRNA vzniká v cytoplasmě, vlastní ta-siRNA jsou pak vyštěpovány v jádře a místo působení ta-siRNA se opět nachází v cytoplasmě. Jak název napovídá, tak ta-siRNA regulují zejména cílové transkripty *in trans*, mimo to se vyznačují i svou schopností šířit se mezi buňkami. Existují minimálně čtyři rodiny ta-siRNA, které regulují expresi ARF a MYB transkripčních faktorů a PPR proteinů, podílí se tak například na ustavení polarity listu v morfogenezi (Yoshikawa et al. 2005; Rajagopalan et al. 2006; Kumakura et al. 2009; Felippes et al. 2010). Na ta-siRNA byla provedena řada studií snažících se popsat transitivity spouštěnou miRNA. První teorie zahrnovaly rozštěpení prekursoru na dvou různých místech a nebo použití miRNA o délce 22nt (Axtell et al. 2006; Cuperus et al. 2010). Současný model ukazuje, že produkci sekundárních siRNA spouští miRNA s asymetrickým duplexem, tedy takové případy, kdy v sekvenci komplementárního vlákna chybí nukleotid(y), vlákna duplexu tak bývají často o jiné délce. Vysoké procento 22nt miRNA mezi těmi, co spouštějí produkci sekundárních siRNA, je tak dáno právě různou délkou obou vláken duplexu (Manavella et al. 2012). Štěpení prekursoru na dvou různých místech pak zřejmě slouží k vymezení produkce sekundárních siRNA do konkrétní oblasti prekursoru, tedy mezi obě místa štěpení (Rajeswaran & Pooggin 2011; Rajeswaran et al. 2012). Vznik sekundárních siRNA je také ovlivněn přesností párování konců miRNA k cílové molekule – když konce párují, tak jsou produkty štěpení stabilnější a mohou se tak snáze stát substrátem pro RDR6 (Zhang et al. 2012).

Vůbec nejpočetnější skupinou sRNA v buňce jsou siRNA produkované především z oblastí transposonů a repetit a účastní se procesu RdDM (popsán v kapitole 2.3.2.1.1). Tyto siRNA mají v literatuře různá označení, zde budou značeny jako **hc-siRNA** (heterochromatic-siRNAs). Prekursory k jejich vzniku jsou vytvářeny Pol IV a konvertovány na dsRNA pomocí RDR2, která s Pol IV interaguje. Procesu se účastní i další proteiny, jejichž funkce nebyla zatím jednoznačně určena – proteiny z rodiny CLSY (CLASSY; celkem 4 paralogy; jde zřejmě o chromatin remodelující proteiny nebo helikázy) a SHH1 (Sawadee Homeodomain Homolog 1). Vlastní hc-siRNA jsou vystřihovány pomocí DCL3 a mají tak typickou délku 24nt (Mosher et al. 2008; Law et al. 2011). Aktivita DCL3 může být nahrazena funkcí jiných DCL, vznikající sRNA jsou pak kratší a jejich schopnost řídit RdDM je menší (Kasschau et al. 2007; Mosher et al. 2008). RDR2 a DCL3 kolokalizují s AGO4

v Cajalových těliscích, kde zřejmě dochází k tvorbě komplexu hc-siRNA s AGO4 (Pontes et al. 2006). Ve vztahu k produkci hc-siRNA je možné rozlišit dva typy lokusů (I a II). Na lokusech typu I je pro produkci hc-siRNA kromě Pol IV potřeba ještě Pol V. Role Pol V je nepřímá a posiluje/umožňuje funkci Pol IV na těchto lokusech. Lokusů typu I je přibližně 20-30 % ze všech lokusů produkujících hc-siRNA a jedná se především o mobilní elementy typu SINE a Helitron. Tyto lokusy se vyznačují tím, že jsou kratší než typ II a mají nižší obsah CG sekvencí. Lokusy typu II jsou v produkci hc-siRNA nezávislé na Pol V, na druhou stranu se ukázalo, že pro navedení Pol IV do některých částí těchto lokusů je potřeba Pol II. Lokusy typu II představují především LTR retrotransposony a vyznačují se tím, že jsou delší než typ I a mají vyšší obsah CG sekvencí (Pontier et al. 2005; Mosher et al. 2008; Zheng et al. 2009; Lee et al. 2012). Za zmínku také stojí, že řada na Pol IV závislých sRNA, kterých může být až na sto tisíc, je v endospermu exprimována pouze z maternálních chromosomů, což je zatím nejrozsáhlejší známý případ imprintingu (Mosher et al. 2009).

Malé RNA také mohou být produkovány exogenními zdroji, jako jsou transgeny a viry. Umlčování transgenů je většinou dáno rozpoznáním jejich transkriptů pomocí RDR6 v důsledku produkce aberantních transkriptů (popsáno výše). Důvodů k tvorbě aberantních transkriptů z transgenů může být několik – může dojít k pročtení terminátoru (obzvláště pokud je silný promotor a slabý terminátor) nebo může dojít k předčasné terminaci transkripce, což se může stát např. při lokálním vyčerpání elongačních faktorů v důsledku silné transkripce. Předčasnou terminaci také mohou spouštět tandemové repetice (Luo & Chen 2007).

RNAi je jedním z hlavních mechanismů rostlinné obrany proti virům. Malé RNA produkované v důsledku působení virů bývají označovány jako **viRNA**. Tyto sRNA mohou být produkovány přímo v důsledku virové replikace (pokud jako meziprodukt vznikají dsRNA), ze sekundárních struktur v rámci virových transkriptů a nebo působením rostlinných RDR (zejména RDR1 a také RDR6). Tyto sRNA mohou být vyštěpovány všemi DCL, většinou (záleží ale i na konkrétním viru) je pro jejich produkci nejdůležitější DCL4, následuje DCL2, DCL3 a na konec DCL1 (Deleris et al. 2006). Viry často kódují proteiny sloužící k potlačení RNAi (VSR – Viral Suppressors of RNA Silencing). Evoluční tlak ze strany virů je pravděpodobně jedním z důvodů variability složek RNAi u rostlin (Ding & Voinnet 2007).

2.2.3 Argonaut

Argonaut (AGO) je vlastní efektorovou složkou RNAi. AGO váže sRNA a vzniká tak komplex RISC (RNA-induced silencing complex), který rozpoznává cílovou molekulu působení RNAi na základě komplementarity bazí s sRNA. Vzhledem k tomu, že některé AGO jsou funkčními RNase-H enzymy, tak mají možnost cílovou molekulu samy naštěpit. V jiných případech k ní mohou navést také další proteiny. Některé proteiny, které s AGO interagují mají WG/GW doménu, která je specializovaná právě pro tento účel. Vytvoření RISC také výrazně usnadňuje nalezení komplementární RNA (Baumberger & Baulcombe 2005; Ameres et al. 2007; El-Shami et al. 2007). AGO má tři základní domény: PAZ (váže 3' konec sRNA), MID (váže 5' konec sRNA) a PIWI (je katalytickou doménou; Yuan et al. 2005). O tom, kterou sRNA bude konkrétní AGO vázat, rozhoduje řada faktorů: délka sRNA, identita 5' koncového nukleotidu, na výběr z duplexu sRNA má vliv nižší termodynamická stabilita na 5' konci, koexprese dané sRNA a AGO v příslušném pletivu a zřejmě i subcelulární lokalizace, případně proteiny asociované s produkcí dané sRNA (Tomari et al. 2004; Mi et al. 2008; Takeda et al. 2008; Eamens et al. 2009; Havecker et al. 2010).

AGO je evolučně starý protein, nachází se již u některých prokaryot a je prakticky u všech eukaryot – výjimku tvoří pouze ty, které zřejmě mechanismus RNAi sekundárně ztratily, jako je například *Saccharomyces cerevisiae* (Yuan et al. 2005; Drinnenberg et al. 2009). AGO u eukaryot je možné rozdělit do tří nadrodin: AGO (asociuje s miRNA a siRNA), Piwi (asociuje s piRNA) a WAGO (asociuje se sekundárními siRNA u *Caenorhabditis*). U rostlin se nachází pouze AGO nadrodina, *Arabidopsis* má 10 paralogů AGO a rýže 18. AGO proteiny u *Arabidopsis* je možné rozdělit do tří skupin: 1) AGO1, AGO5 a AGO10; 2) AGO2, AGO3 a AGO7; 3) AGO4, AGO6, AGO8 a AGO9 (Chapman & Carrington 2007; Vaucheret 2008).

AGO1 je hlavním AGO proteinem v PTGS, asociuje s většinou miRNA a také siRNA, které se PTGS účastní. Byl prvním popsáním zástupcem, a dal tak AGO proteinům jejich jméno (fenotyp rostlin s mutantním *ago1* připomínal chapadla loděnky). Preferuje sRNA s 5' uridinem a o délce 21nt. Je také hlavním AGO účastníkem se protivirové obrany. U AGO1 byla prokázána schopnost katalyticky štěpit RNA. AGO1 reguluje sám sebe prostřednictvím miR168 (Bohmert et al. 1998; Baumberger & Baulcombe 2005; Ronemus et al. 2006; Mallory & Vaucheret 2009). AGO5 preferuje sRNA s 5' cytosinem a zřejmě se účastní procesů PTGS, asociuje minimálně s jednou miRNA – miR163 a možná se účastní i obrany proti virům (Takeda et al. 2008). AGO10 je nejbližší příbuzný k AGO1 a je s ním zřejmě do určité míry

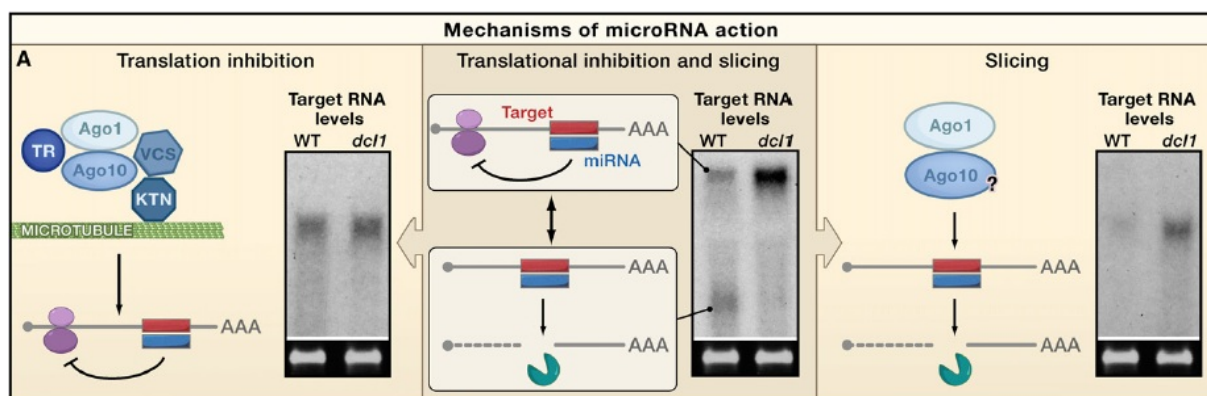
redundantní, hraje důležitou roli ve vývoji apikálního meristému (Brodersen et al. 2008). AGO2 a AGO3 jsou velmi blízce příbuzné, žádná funkce AGO3 zatím popsána nebyla. AGO5 preferuje sRNA s 5' adenosinem a asociuje minimálně s jednou miRNA (miR163). Funguje také jako „záložní“ AGO v protivirové obraně – je regulován miR403. Tato regulace v případě vyřazení AGO1 virovými supresory přestává být funkční a AGO5 je overexprimován a nahrazuje v protivirové obraně AGO1 (Takeda et al. 2008; Harvey et al. 2011). AGO7 řídí produkci ta-siRNA, jejichž tvorba je závislá na miR390 (Adenot et al. 2006). Zbývající AGO patří do tzv. „AGO4 rodiny“ a všechny se účastní RdDM (kromě AGO8, který je zřejmě pseudogenem). AGO z této rodiny váží 24nt sRNA s 5' adenosinem, většina těchto sRNA vzniká z produktů Pol IV. Jsou také schopny štěpit cílovou RNA a tato schopnost je v některých případech TGS potřebná. Při absenci 24nt siRNA jsou tyto AGO částečně destabilizovány na proteinové úrovni. Jednotlivé AGO z této skupiny se vzájemně liší především charakterem své exprese, o čemž také svědčí to, že pokud je jeden z nich exprimován pod promotorem toho druhého, tak jej může z větší části zastoupit. AGO4 je univerzální a je exprimován v celé rostlině, AGO6 je exprimován především v apikálních meristémech (kde zřejmě přebírá hlavní roli v RdDM) a AGO9 je exprimován v zárodečném vaku a apikálním vrcholu embrya (Qi et al. 2006; Havecker et al. 2010; Eun et al. 2011).

2.3 Mechanismy RNAi, umlčování exprese genů

2.3.1 Posttranskripční umlčování exprese genů

Posttranskripční umlčování (PTGS) je, jak již název napovídá, proces, kdy dochází k ovlivnění exprese proteinu na úrovni transkriptu. PTGS může probíhat dvěma způsoby, které se navzájem nevyklučují – štěpením cílového transkriptu a nebo blokováním translace (viz Obr. 2.2). Štěpení cílového transkriptu dokáží zajistit samy proteiny AGO s sRNA. Schopnost štěpit RNA byla zatím prokázána u AGO1, AGO4 a AGO7 (Baumberger & Baulcombe 2005; Qi et al. 2006; Montgomery et al. 2008). Blokování translace pomocí sRNA je zatím jen velmi povrchně popsáný proces, účastní se jej některé proteiny asociované s mikrotubuly, jako je katanin, a některé faktory, které mohou spouštět degradaci RNA – VCS, který odstraňuje čepičku z RNA (Brodersen et al. 2008). Zatím nebylo přesně popsáno, jaké vlastnosti ovlivňují to, který proces bude převládat. Původní hypotézy předpokládaly, že je to ovlivňováno především přesností párování s cílovou molekulou (týká se hlavně miRNA), nicméně se ukazuje, že i když je párování sRNA s cílovou molekulou přesné, tak často dochází i k blokování translace (Brodersen et al. 2008). PTGS může probíhat jak

v cytoplasmě, tak v jádře (Hoffer et al. 2011). Mělo by být také zmíněno, že štěpení transkriptu pomocí sRNA neslouží čistě jen jako degradační proces, ale někdy je i součástí biogenních procesů, např. tvorby sekundárních siRNA.



Obr. 2.2: Mechanismy PTGS: (vlevo) blokování translace, (vpravo) štěpení mRNA a (uprostřed) kombinace obou způsobů. Obrázky obsahují výstup z Northern blotu, kde v pravé dráze je vidět analýza extraktu RNA z rostliny s nefunkční produkcí miRNA jako kontrola a v pravé dráze je extrakt RNA z wild-type rostliny. Převzato z: (Voinnet 2009)

2.3.2 Transkripční umlčování exprese genů

Transkripční umlčování (TGS) je procesem regulace genové exprese na úrovni transkripce. Tento proces tedy ovlivňuje to, zda-li bude transkript vznikat a nebo ne (případně v jaké míře). Transkripčního umlčování je dosaženo modifikacemi chromatinu. Řada těchto modifikací má především signální charakter, kterým je ovlivňována míra acetylace histonů, a tím i kondenzace chromatinu a také vazba řady faktorů, jež ovlivňují transkripci. Pro správné umlčení je pak klíčové, aby se tyto modifikace týkaly oblasti promotoru. Nejvýznamnější a nejprobádanější modifikace představuje metylace DNA a úpravy histonů v podobě jejich metylace a acetylace.

2.3.2.1 Methylace DNA

DNA metylace se u eukaryot týká cytosinů, které jsou pomocí metyltransferáz konvertovány na 5-metylcytosin. U rostlin je tato modifikace klíčovou represivní epigenetickou značkou řídící transkripční umlčování a kondenzaci chromatinu. Methylace DNA má především signální charakter a ačkoliv *in vitro* může ovlivňovat afinitu některých transkripčních faktorů k DNA, tak sama o sobě k umlčení nestačí a i metylovaný promotor za určitých podmínek může spouštět transkripci (Kanazawa et al. 2007; Fischer et al. 2008; Okano et al. 2008). DNA metylace může u rostlin být ve třech různých sekvenčních kontextech: CG, CHG a CHH (kde H je A, C a nebo T), v genomu *Arabidopsis* jsou tyto

sekvence metylovány z 24, 6,7 respektive 1,7 % (což tvoří v souhrnu kolem 6 % veškerých C). Ze vzájemného srovnání metylovaných sekvencí pak vychází, že přibližně 55 % metylací zastupují CG, 23 a 22 pak zastupují CHG respektive CHH (metylace v těchto sekvenčních kontextech budou dále značeny jen metCG/CHG/CHH). Metylace se týká především transposonů, retrotransposonů, rDNA a centromerových repetit. Ve většině případů spolu metylace v různých sekvencích korelují, výraznou výjimku tvoří kódující oblasti genů, kde se nachází téměř výhradně metCG a tato metylace v kódující oblasti je překvapivě častá – týká se až 30 % genů (Zilberman et al. 2007; Cokus et al. 2008; Lister et al. 2008). Přesný význam této metylace zatím popsán nebyl, jednou z možností je, že brání chybné iniciaci transkripce uvnitř genu (Zilberman et al. 2007). Kromě toho zde existuje také silná korelace se schopností regulovat expresi v odpovědi na externí či interní stimuly (Aceituno et al. 2008) a také korelace s rozložením intronů a exonů (Chodavarapu et al. 2010). Metylace v různých sekvenčních kontextech jsou převážně zprostředkovávány odlišnými metyltransferázami – udržovací CG metylaci zprostředkovává téměř výhradně MET1 (Methyltransferase1), CHG pak převážně CMT3 (Chromomethylase3) a CHH převážně DRM2 a DRM1 (Domains Rearranged Methyltransferase). Pro správný průběh metylace jsou dále potřeba ATPázy remodelující chromatin, jako je DDM1 a některé další proteiny (Jeddeloh et al. 1999; Cao et al. 2003; Kankel et al. 2003; Cokus et al. 2008). MET1 je udržovací metyltransferáza metylující hemimetylovanou DNA po replikaci. CMT3 je též udržující metyltransferáza metylující DNA převážně v závislosti na modifikacích histonů. DRM2 je řízena malými RNA v procesu RdDM. Kromě DRM2 patří do rodiny DRM ještě DRM1, ale její role je jen minoritní, a pak také DRM3, který je sice katalyticky neaktivní, ale na průběh metylace prostřednictvím DRM2 má nezanedbatelný vliv (Henderson et al. 2010; Law & Jacobsen 2010).

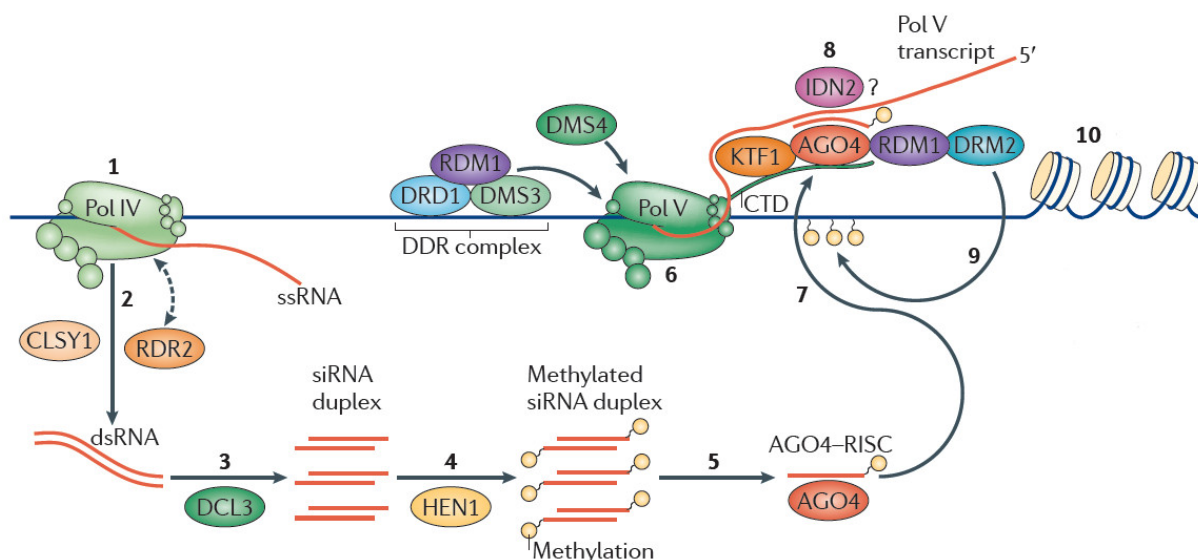
2.3.2.1.1 RdDM

RdDM (RNA-directed DNA methylation) je proces metylace DNA řízený malými RNA (shrnuto na Obr. 2.3). Tento proces se podílí na udržování metylace heterochromatinu, ale především je zatím jediným popsáným procesem schopným navodit metylaci *de novo*. Během *de novo* metylaci dochází k metylaci ve všech sekvenčních kontextech (CG, CHG a CHH). RdDM zodpovídá za přibližně 30 % metylací v genomu *Arabidopsis* (Lister et al. 2008). Tato metylace je řízena převážně 24nt dlouhými sRNA, ve většině případů se jedná o hc-siRNA, které jsou produkovány Pol IV, RDR2 a DCL3 (jak je popsáno výše), ale 24nt sRNA schopné řídit metylaci mohou vznikat i jinými procesy, jako je např. transkripce invertovaných repetit,

tvorba sekundárních siRNA během PTGS a nebo konvergentní transkripce (Sijen et al. 2001; Vaistij et al. 2002; Borsani et al. 2005; Mosher et al. 2008). Tyto sRNA následně asociují s AGO4 (případně AGO6 a AGO9), který na základě sekvenční komplementarity mezi sRNA a transkriptem Pol V určuje místa v genomu, která budou metylována. Pol V je tedy klíčovou složkou umožňující vyhledání cílových sekvencí a navedení metylačního aparátu na tyto sekvence. Pol V zřejmě nerozpoznává žádný konkrétní promotor a její transkripce je iniciována náhodně po genomu. Její transkripty nemají 3' poly-A konec a jsou většinou přibližně 200nt dlouhé (Wierzbicki et al. 2008; Wierzbicki et al. 2009). Pol V pro svoji správnou funkci potřebuje DDR komplex (DRD1, DMS3 a RDM1), který se pravděpodobně podílí na jejím navedení na lokus a/nebo napomáhá transkripci. DRD1 (Defective in RdDM 1) je předpokládán chromatin remodelující protein. DMS3 (Defective in meristem silencing) pravděpodobně vytváří dimer s DMS11 a oba jsou příbuzní k SMC proteinů (kam patří např. cohesiny). RDM1 (RNA-Directed DNA Methylation 1) je protein schopný vázat metylovanou ssDNA (Kanno et al. 2004; Kanno et al. 2008; Wierzbicki et al. 2008; Gao et al. 2010; Law et al. 2010; Lorković et al. 2012). Dalším komponentem ovlivňujícím transkripci Pol V je RDM4 (RNA-Directed DNA Methylation 4) – jedná se o transkripční faktor, který řídí transkripci jak Pol V, tak Pol II a nejspíš i Pol IV, neboť s ní interaguje (He et al. 2009a; Law et al. 2011). Se vzniklým transkriptem tedy asociuje AGO4 s navázanou sRNA. AGO4 tento transkript na některých lokusech štěpí a také interaguje s dalšími proteiny, které celému procesu napomáhají (Qi et al. 2006). Jedním z nich je SPT5-Like (Suppressor of Ty Insertion; také KTF1). Přestože SPT5-L je příbuzný elongačním faktorů, tak vlastní transkripci Pol V neovlivňuje. SPT5-L interaguje s AGO4 a mírně ovlivňuje navedení AGO4 na chromatin, ale tento efekt není dostatečný k tomu, aby vysvětlil míru ztráty metylace v mutantním *spt5-l*, jeho konkrétní funkce v RdDM tak zůstává neznámá (He et al. 2009b; Rowley et al. 2011). Dalšími proteiny, které by potenciálně mohly vázat AGO4 jsou IDN2 (Involved in de novo) a IDN2-Like. Jedná se o proteiny patřící do stejné rodiny jako SGS3 a RdDM se účastní nejméně 5 různých paralogů z této skupiny. Stejně jako SGS3, tak i tyto proteiny váží dsRNA s 5' přesahy přes svoji XS doménu. V *in vitro* podmínkách mohou vázat AGO4 s sRNA a zřejmě mají také DNA vazebnou schopnost (Ausin et al. 2009; Ausin et al. 2012; Xie et al. 2012). Hlavním efektorovým proteinem RdDM je DRM2, jak přesně je k tomuto komplexu proteinů v jádru s Pol V naveden zatím známo není, nejlepším současným kandidátem je podjednotka DDR komplexu – RDM1, který interaguje jak s DRM2, tak s AGO4 (Gao et al. 2010). Pro správnou funkci DRM2 jsou dále také potřeba dva proteiny – SUVH2 a SUVH9 (SU(VAR)3-9 homologue), které váží metylovanou DNA (Johnson et al. 2008).

Na některých lokusech do celého procesu vstupuje ještě Pol II. Zheng et al. 2009 vyizoloval slabou bodovou mutaci v podjednotce Pol II (*nprpb2*), které měla minimální vliv na transkripci (neovlivňovala žádné známé složky RNAi), ale zároveň na některých lokusech docházelo k uvolnění TGS. Jak se ukázalo, tak Pol II je potřeba pro navedení Pol V a Pol IV na lokusy typu II (viz popis hc-siRNA, kap. 2.2.2). Zdá se, že na lokusech typu I potřeba není, nicméně s nimi ale fyzicky interaguje, a protože jde o slabou mutaci, tak nelze vyloučit, že i na těchto lokusech hraje Pol II nějakou roli v RdDM. Jak se dále ukázalo, tak Pol II ke své transkripci v tomto procesu potřebuje DRD1 (nikoliv však DMS3) a interaguje s RDM1 a s AGO4 (Zheng et al. 2009; Gao et al. 2010).

RdDM kromě udržování metylace a *de novo* metylace umožňuje ještě další proces, a tím je šíření metylace z původního místa, na kterém byla indukována. Tento proces principiálně funguje tak, že když dojde k *de novo* metylaci určité sekvence, pak taková metylace může být dále udržována procesem RdDM, což vyžaduje transkripci Pol IV. Pol IV se však může pročíst i do sousedních oblastí a dát tak vzniknout sekundárním sRNA, které pak mohou následně tyto oblasti metylovat (Daxinger et al. 2009). Tento proces se zřejmě v některých ohledech liší od *de novo* metylace, neboť AGO4 v tomto procesu není nahraditelný AGO6 (Eun et al. 2011). Tento mechanismus zároveň umožňuje přechod PTGS na TGS, tedy přechod od metylace kódující sekvence, ke které dochází v důsledku sRNA produkovaných v průběhu PTGS, k metylaci promotoru, a tím zastavení transkripce (Fojtová et al. 2003). Takový proces skýtá pro rostlinu své výhody, pokud se totiž v buňce objeví např. nějaký transposon, jehož transkripce indukuje PTGS, pak je to možnost, jak přejít na umlčení transkripční, které je energeticky výhodnější a bezpečnější. Další roli by tento proces mohl hrát v regulaci transkripce proteinkódujících genů – geny jejichž transkripce je regulována RdDM se vyznačují tím, že součástí jejich promotoru je transposon, či tandemová repetice. Tyto oblasti jsou cílem primární metylace a dá se předpokládat, že pro umlčení takového promotoru bude potřeba, aby se metylace z těchto oblastí rozšířila do vlastních regulačních oblastí promotoru (Baev et al. 2010).



Obr. 2.3: Schéma RdDM: (1) transkripce Pol IV, (2) převod transkriptu na dsRNA, (3) vyštěpení duplexů sRNA, (4) úpravy sRNA duplexů, (5) asociace s AGO4, (6) transkripce Pol V, (7) navedení RISC na transkript Pol V, (8) ustavení metylačního komplexu, (9) metylace DNA a (10) modifikace histonů. Převzato z: (Haag & Pikaard 2011)

2.3.2.2 Modifikace histonů a jejich vliv na metylaci DNA

Modifikace histonů spolu s metylací DNA určují stav chromatinu a rozhodují o tom, jestli daná oblast bude moci být transkribována. Konkrétní mechanismy, jak jsou tyto značky ustavovány a obzvláště pak, jak jsou interpretovány, byly u rostlin zatím popsány jen velmi povrchně, a to z části také kvůli jejich velké rozmanitosti. Modifikace histonů mohou ovlivňovat to, jestli a jak bude DNA metylována a naopak metylace DNA ovlivňuje modifikace histonů. O tomto faktu svědčí už jen to, že DNA, která je přímo navázána na nukleozóm, je více metylována než ta, která na něj přímo navázána není (Chodavarapu et al. 2010). Modifikací histonů může být řada: acetylace, metylace, ubiquitinylace a fosforylace, také mohou být použity různé izoformy histonů. Acetylace je typická pro euchromatin, a tak metylace DNA jsou často doprovázeny deacetylací. Deacetyláza HDA6 (Histone deacetylase 6) je potřeba nejen pro správný průběh *de novo* metylace během RdDM, ale také pro udržovací metylaci pomocí MET1, se kterou přímo interaguje (Aufsatz et al. 2002; Liu et al. 2012).

Mezi nejprobádanější modifikace histonů patří metylace na lysinu (K). U *Arabidopsis* mohou být metylovány čtyři různé lysiny a všechny se nachází na histonu 3 (H3). Lysin může vázat až tři metylové skupiny, a tak může být mono- di- a trimetylován (me1, me2 a me3), přičemž jednotlivé úrovně metylace se mohou funkčně lišit. Methylace na H3K36 a na H3K4 jsou značky pro aktivní oblasti. Zejména pak H3K4me3 se nachází výhradně v aktivně

přepisovaných oblastech, tato značka se vylučuje s udržováním metylace pomocí RdDM a je v takových oblastech odstraňována pomocí demetylázy JMJ14 (Jumonji-C 14; Zhang et al. 2009; Deleris et al. 2010). Jako represivní značky slouží zejména metylace na H3K9 a na H3K27. S metylací DNA nejvíce souvisí H3K9me2. Tuto metylaci obstarávají proteiny SUVH4-6, ty rozeznávají metylovanou DNA a na základě toho dimetylují lysin 9. SUVH4 a CMT3, která naopak rozeznává H3K9me2, tak spolu vytváří smyčku, která při dělení buněk vzájemně udržuje metylaci DNA a H3K9 (Johnson et al. 2007; Bernatavichute et al. 2008; Rajakumara et al. 2011). Naopak metylace H3K27 je na metylaci DNA nezávislá. H3K27me1 se nachází v heterochromatinu a je zprostředkována metyltransferázami ATXR5 a ATXR6 (Arabidopsis Trithorax-Related Protein), H3K27me3 se nachází v euchromatinu, hraje důležitou úlohu v regulaci genové exprese a je zprostředkována proteiny Polycomb komplexu (Zhang et al. 2007; Jacob et al. 2009). Na histonech mohou být metylovány i argininy, doposud bylo popsáno pět míst takovéto metylace, většina z nich je represivního charakteru. Stejně jako lysiny, tak i argininy mohou být až trimetylovány, rozdíl je v tom, že dimetylce může být buďto symetrická a nebo asymetrická, podle toho, kde konkrétně se druhá metylová skupina nachází (Liu et al. 2010).

Kromě acetylací a metylací mohou být histony také ubiquitinylovány. U *Arabidopsis* byla popsána ubiquitinylace na lysinu 143 histonu H2B. Odstranění této značky je nezbytné pro metylaci DNA a H3K9 během RdDM (Sridhar et al. 2007). Obdobně se chová také využití izoformy histonu H2A – H2A.Z, která silně antikoreluje s metylací DNA a vyskytuje se především v 5' oblastech genů (Zilberman et al. 2008).

2.3.2.3 Demetylce DNA

Demetylce DNA může být jednak pasivní, tedy daná sekvence se přestane metylovat a v důsledku následných dělení buňky tak metylovaná DNA vymizí, a nebo aktivní, tedy zprostředkovaná enzymy. U *Arabidopsis* byly popsány čtyři glykosylázy, které se tohoto procesu účastní – DME (Demeter), ROS1 (Repressor of Silencing 1), DML1 a DML2 (Demeter-like). Vzhledem k tomu, že se jedná o glykosylázy, tak odstraňování metylové značky probíhá štěpením fosfodiesterové vazby a vystřížením celého 5-metylcytosinu (Gehring et al. 2006). Zatím není známo jakým způsobem demetylázy určují sekvence, které mají demetylovat. Jednou z možností mohou být sRNA, neboť ROS3, protein tvořící komplex s ROS1, je RNA vazebný protein schopný vázat právě sRNA (Zheng et al. 2008). Demetylázy (ROS1, DML1 a DML2) chrání řadu lokusů (zejména genů) před hypermetylací a tvoří tak protiváhu metyltransferázám, o čemž svědčí i to, že transkripce těchto enzymů je úzce

svázána. U mutací složek RdDM a nebo *met1* dochází k výraznému snížení exprese ROS1 (Huettel et al. 2006; Penterman et al. 2007). Dalšími oblastmi, kde dochází k významné demethylaci, je vegetativní jádro spermatické buňky a endosperm. Demethylace ve vegetativním jádru spermatické buňky je z části pasivní a dána snížením exprese DDM1. Smyslem tohoto procesu je zřejmě reaktivace transposonů, které následně dávají vznik sRNA, které by mohly zabezpečit kompletní metylaci transposonů v generativním jádru (Slotkin et al. 2009). Demethylace v endospermu je zprostředkována DME, jenž je exprimován již v centrální buňce před splynutím a spouští tak imprinting v endospermu reaktivací některých specifických složek Polycomb komplexu. Další význam tohoto procesu by mohl být obdobný jako v předchozím případě – tedy umlčení transposonů v embryu (Gehring et al. 2006; Gehring et al. 2009).

3 Materiál a metody

3.1 Modelové organismy a jejich kultivace

3.1.1 *Escherichia coli* a *Agrobacterium tumefaciens*

Ke klonování plazmidů byly použity dva kmeny *Escherichia coli*: DH5 α a JM109. Kmen DH5 α je standardně používán při přípravě běžných konstruktů, během práce se však ukázalo, že je nevhodný pro klonování některých připravovaných konstruktů, z důvodu přítomnosti repetitivních sekvencí v těchto konstruktech. Pro veškerou následující práci byl proto použit kmen JM109.

Pro transformaci tabákové buněčné linie BY-2 byl použit kmen bakterie *Agrobacterium tumefaciens* C58C1Rif^R (více viz Deblaere et al. 1985).

Bakterie *E. coli* se kultivovaly na LB médiu (složení níže) při 37 °C a bakterie *A. tumefaciens* se kultivovaly na LB nebo YEB médiu (suspenní kultura) při 28 °C. Veškerá práce byla prováděna sterilně. Kultivace v tekutém médiu probíhala aerobně za stálého třepání přes noc (cca 18 hod, 180 RPM, třepačka Ceromat[®] H Biotech International), objem média a nádoba se lišily podle potřeby. Kultivace na pevném médiu probíhala v plastových Petriho miskách o průměru 9 cm s 20-30 ml média. Bakterie *E. coli* se na pevném médiu kultivovaly přes noc a *A. tumefaciens* po dobu tří dnů. Plotny s narostlými bakteriemi byly následně skladovány v lednici. Do média byla přidávána příslušná antibiotika, podle toho, jaké selekční markery (geny rezistence) nesly plazmidy, kterými byly bakterie transformovány (použité koncentrace antibiotik jsou v Tab. 3.1). Bakterie *A. tumefaciens* byly vždy kultivovány na médiu s přidáním antibiotika Rifampicinu.

Vybrané klony bakterií byly uchovávány pro další využití v podobě „konzerv“ – k 800 μ l bakteriální kultury v tekutém LB médiu bylo přidáno 200 μ l 50% sterilního glycerolu v 1,5ml mikrozkuhavce, která byla prudce zamrzána v tekutém dusíku a následně skladována při -80 °C.

Tab. 3.1: LB médium (pevné)

složky	pepton (tripepton)	yeast extract	NaCl	(agar)
g/l dH ₂ O	10	0,5	1	1,75

- LB médium bylo sterilizováno klávováním.

Tab. 3.2: YEB médium

Složky	pepton (tripepton)	yeast extract	sacharóza	MgSO ₄
g/l dH ₂ O	10	1	5	0,5

- Médium bylo sterilizováno klávoáním. Roztok MgSO₄ byl klávoán samostatně (aby se při klávoání nevytvořila sraženina) a do média přidán až před použitím.

Tab. 3.3: Antibiotika – bakterie

antibiotikum	koncentrace zásobního roztoku [mg/ml]	koncentrace v médiu [mg/l]	způsob skladování zásobního roztoku
kanamycin	50	50	dH ₂ O, v lednici
ampicilin	100	100	dH ₂ O, -20 °C
spectinomycin	100	100	dH ₂ O, -20 °C
tetracyklin	5	5	dH ₂ O, -20 °C
rifampicin	10	100	methanol, -20 °C

- Antibiotika byla sterilizována filtrací přes jednorázové filtry Nalgene 0,22 μm, s výjimkou rifampicinu, který není třeba sterilizovat.

3.1.2 Tabáková linie BY-2

Jedná se o linii odvozenou od *in vitro* pěstovaných semenáčků kultivaru *Nicotiana tabacum* cv. „Bright Yellow 2“. Linie je podrobně popsána v práci Nagata et al. 1992.

Linie BY-2 byla pěstována ve tmě při 26 °C na upraveném MS médiu (Murashige & Skoog 1962, podrobnosti v tabulce níže). Kultivace BY-2 probíhala jednak ve formě kalusů a jednak ve formě suspenzí. Veškerá práce s BY-2 byla prováděna za sterilních podmínek.

Kalusy byly pěstovány na pevném MS médiu v plastových Petriho miskách o průměru 6 cm s cca 14 ml média na misku. Do média byla dle potřeby přidána příslušná antibiotika (kanamycin, hygromycin) a claforan (použité koncentrace antibiotik jsou uvedeny v Tab. 3.5). Uspořádání bylo většinou sedm kalusů na jednu misku. Malé Petriho misky pak byly vloženy do jedné větší skleněné, která byla po straně z jedné poloviny utěsněna parafilmem, aby se tak snížil výpar. Subkultivační interval byl přibližně čtyři týdny.

Kultivace suspenzí probíhala ve 100 ml Erlenmeyerových baňkách ve 30 ml tekutého MS média na třepače IKA125 při 280 RPM. Subkultivační interval byl 7 dní, inokulace byla prováděna 1 ml narostlé suspenze. Při zakládání nové suspenze z kalusu byl dostatečně velký kus kalusu (přibližně 1 g) vložen do baňky s 30 ml média a s pomocí 10 ml špičky se zastřiženým koncem byl „rozdroben“ na menší kusy.

Tab. 3.4: **MS médium pro BY-2 (pevné)**

složky	MS soli	KH ₂ PO ₄	myo-inositol	sacharóza	2,4-D	B1	(agar)
g/l dH ₂ O	4,33	0,2	0,1	30	0,0002	0,001	8

- MS soli byly dodány firmou Sigma, konkrétní složení viz: Murashige & Skoog 1962
- Růstový regulátor 2,4-D (kyselina dichlorfenoxyoctová; auxin) byl skladován v lednici jako zásobní roztok o koncentraci 2 mg/ml. Tento roztok byl připraven rozpuštěním 2,4-D v malém objemu 1 M KOH, který byl následně doplněn teplou dH₂O.
- Vitamin B1 (thyamin-hydrochlorid) byl skladován při 4 °C jako zásobní roztok (v dH₂O) o koncentraci 10 mg/l.
- Výsledné pH média bylo upraveno na 5,8 přidáním KOH.
- MS médium bylo následně sterilizováno klávováním.

Tab. 3.5: **Antibiotika – rostliny**

antibiotikum	koncentrace zásobního roztoku [mg/ml]	koncentrace v médiu [mg/l]	způsob skladování
kanamycin	50	50	dH ₂ O, v lednici
hygromycin	25	25	dH ₂ O, -20 °C
taxcef (claforan)	100	100	dH ₂ O, -20 °C

- Antibiotika byla sterilizována filtrací přes jednorázové filtry Nalgene 0,22 µm.

3.2 Plazmidy

Jako vektory byly používány různé bakteriální plazmidy, sloužící jednak ke klonování úseků DNA a jednak k přenosu příslušných sekvencí do cílového organismu, tedy linie BY-2. Při tomto přenosu přechází do cílové buňky pouze T-DNA, ta je na níže uvedených mapách rozpoznatelná, jako úsek mezi dvěma přímými repeticemi (LB a RB). Všechny níže uvedené mapy byly vytvořeny pomocí programu ApE 2.0.42 (biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/).

Vysvětlivky k plazmidovým mapám:

- promotory: P35S, Pnos, Ind.P, P G10-90
- terminátory: NosT, pea 3A T, pea rbcS E9 T
- selekční geny: AmpR, KanR, HygR, SpeR, TetR
- reportérové geny: RS-GFP, mCherry, LacO+LacZ alpha

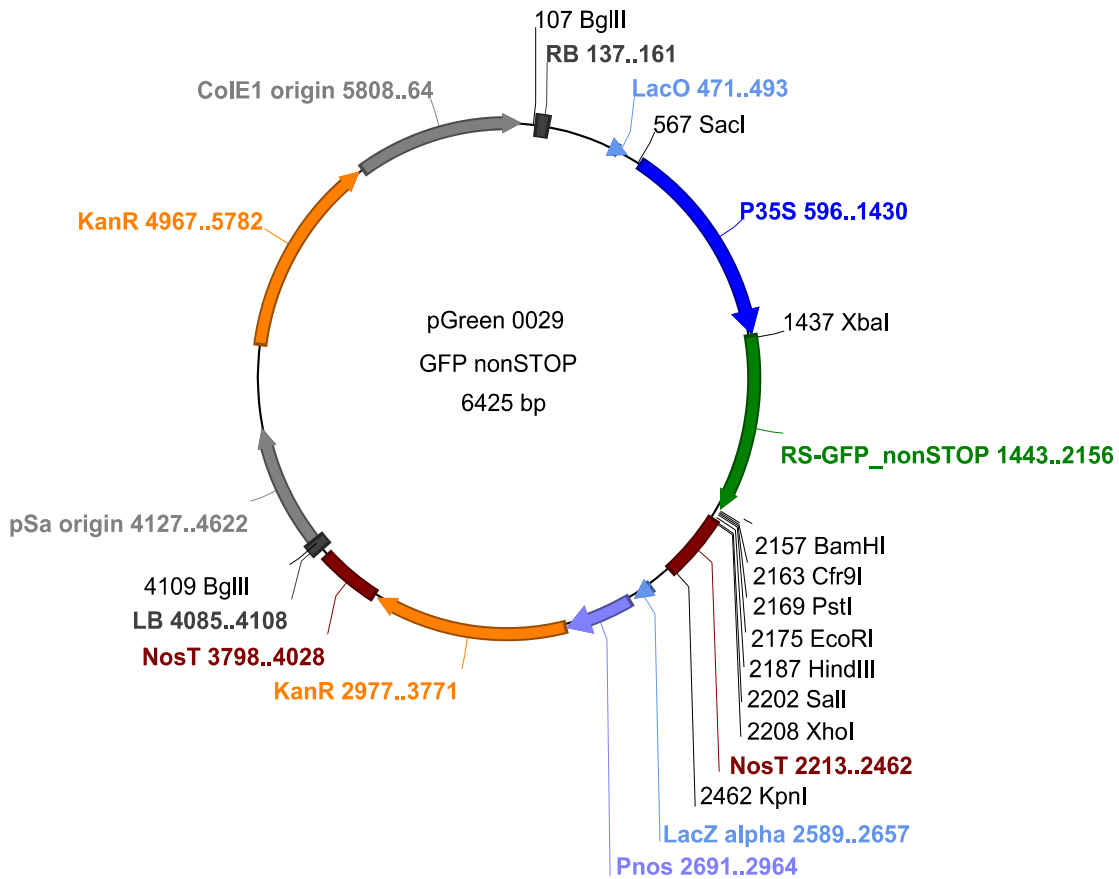
- složky replikace plazmidu: pSa origin, M13 origin, F1 origin, pSa Rep, ColE1 origin, OriV, trfA
- ostatní: LB (left border), RB (right border), XVE fusion protein (receptor estradiolu a aktivátor Ind.P)

3.2.1 pGreen 0129, pGreen 0029 a pSoup

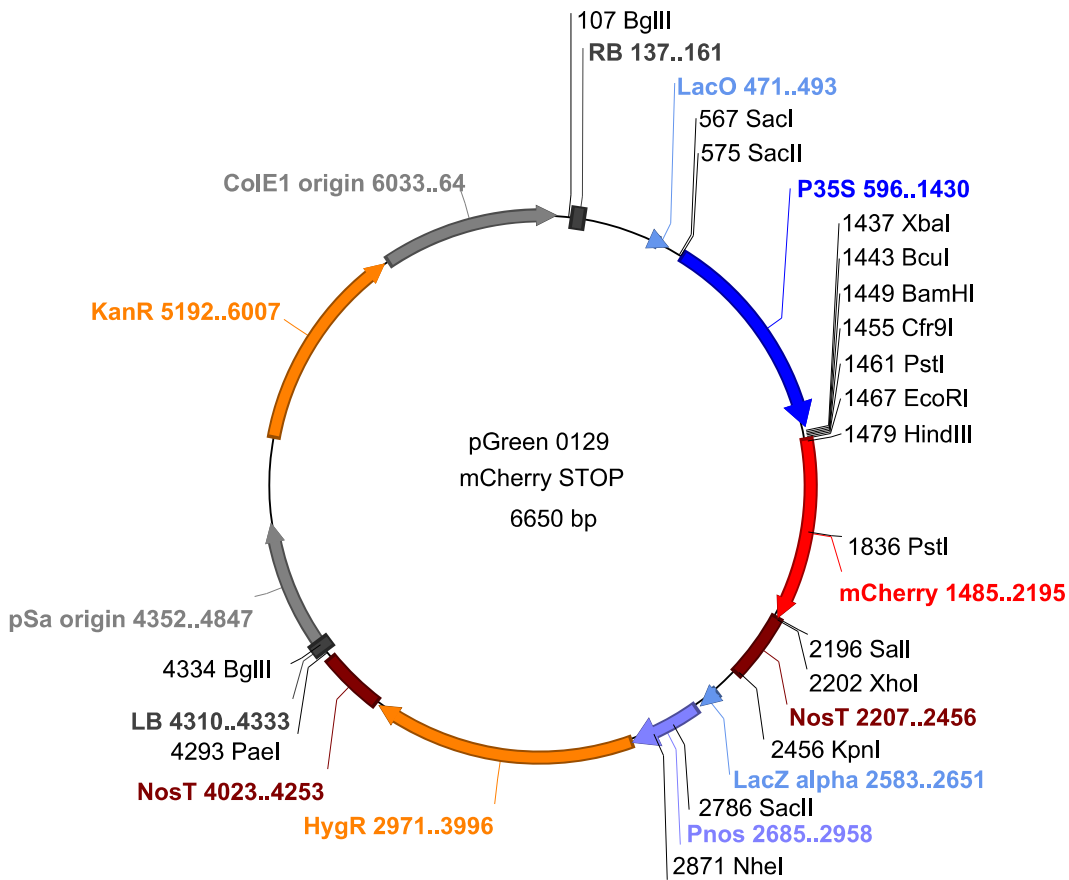
Plazmidy pGreen jsou binární vektory. Při přípravě konstruktů se vycházelo ze dvou plazmidů, které dr. Belinvia a dr. Fischer odvodili na školícím pracovišti od pGreenI (Hellens et al. 2000): pGreen 0029 GFP nonSTOP (Obr. 3.1) pro klonování konstruktů k ovlivnění exprese RDR6 a pGreen 0129 mCherry STOP (Obr. 3.2) pro klonování indikátorových linií. Plazmid pGreen nese kanamycinovou resistenci pro selekci v bakteriích. Rezistence pro selekci v rostlinách je pak u verze 0029 ke kanamycinu a u verze 0129 k hygromycinu. pSoup (Obr. 3.3) je pomocný plazmid nesoucí replikázu, která je potřeba pro replikaci plazmidu pGreen v *A. tumefaciens* (Hellens et al. 2000).

mCherry je červený fluorescenční protein, blíže charakterizován v práci: Shaner et al. 2004.

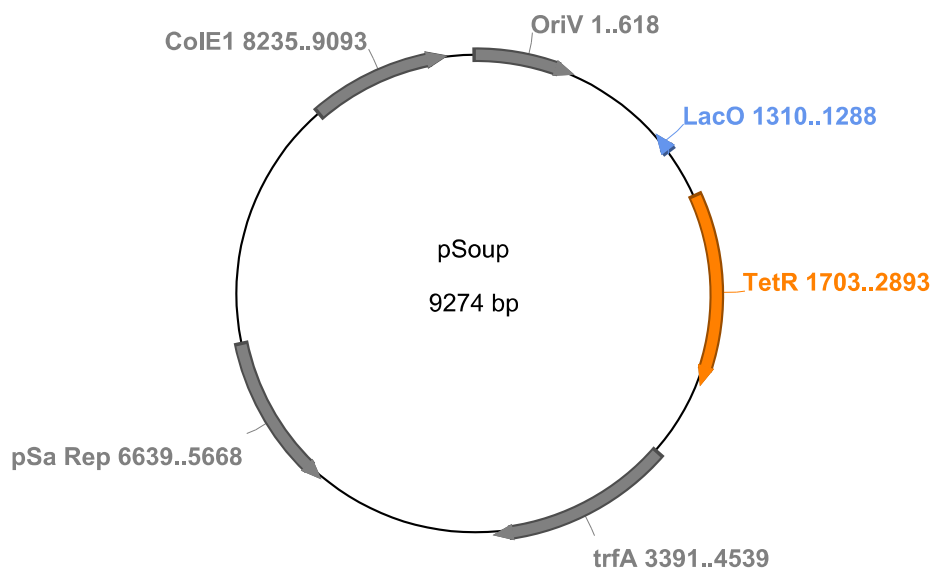
V mapách uvedené velikosti plazmidů pGreen neodpovídají přesně velikostem fragmentů, které je možno vidět při elektroforéze tohoto plazmidu, je to dáno tím, že plazmidy z řady pGreenI integrovaly do počátku replikace (ColE1 origin) kus bakteriální genomové DNA (odhadem 1,5 kbp), tato DNA však nijak nepřekáží funkci plazmidu (Hellens et al. 2000; www.pgreen.ac.uk).



Obr. 3.1: Mapa plazmidu pGreen 0029 GFP nonSTOP



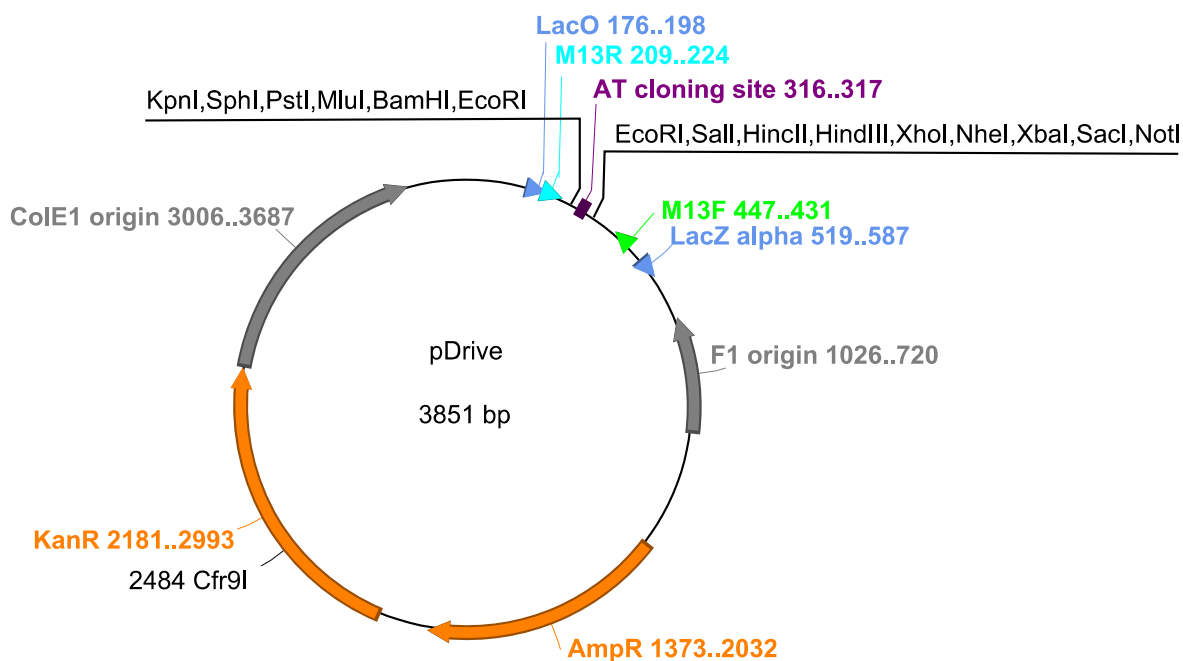
Obr. 3.2: Mapa plazmidu pGreen 0129 mCherry STOP



Obr. 3.3: Mapa plazmidu pSoup

3.2.2 pDrive

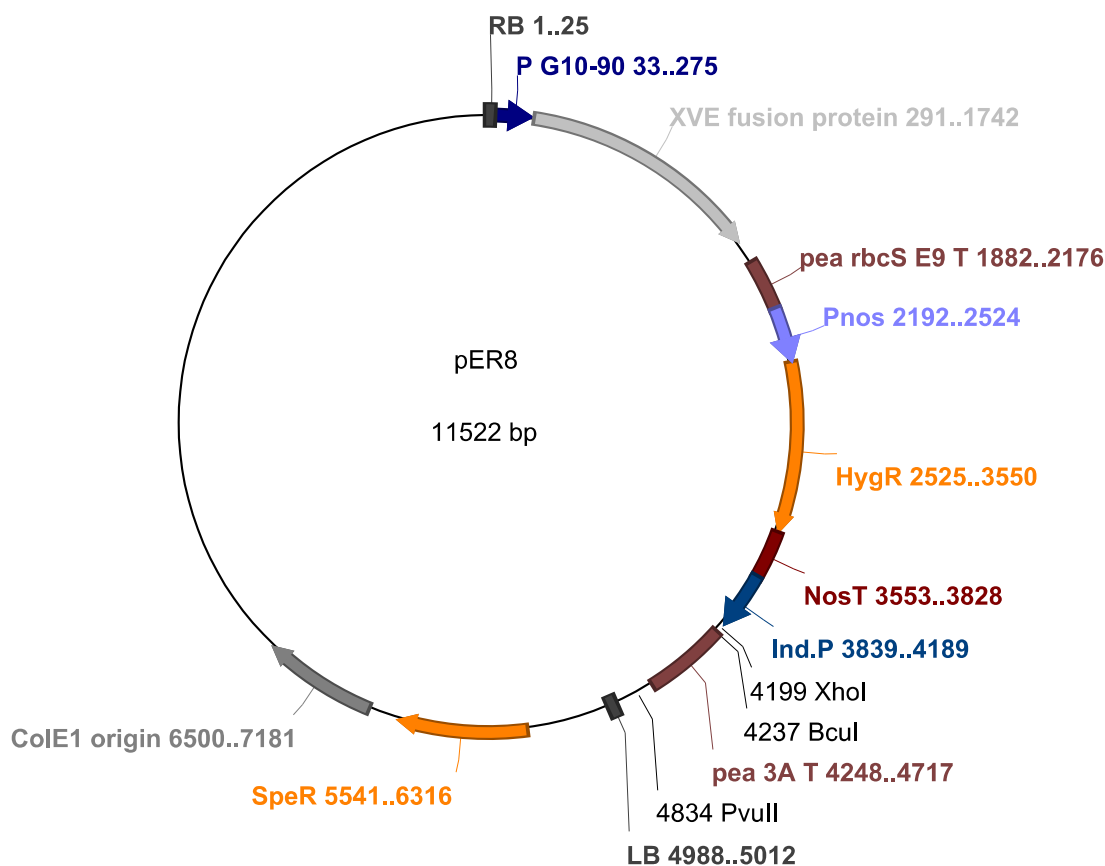
pDrive (Obr. 3.4) je malý mnohokopiový plasmid, který je součástí kitu pro TA-klonování PCR fragmentů (QIAGEN PCR Cloning Kit). Byl použit jako pomocný vektor při klonování PCR fragmentů a také k tvorbě vlásenkových konstruktů. pDrive nese jak ampicilinovou, tak kanamycinovou resistenci.



Obr. 3.4: Mapa plazmidu pDrive

3.2.3 pER8

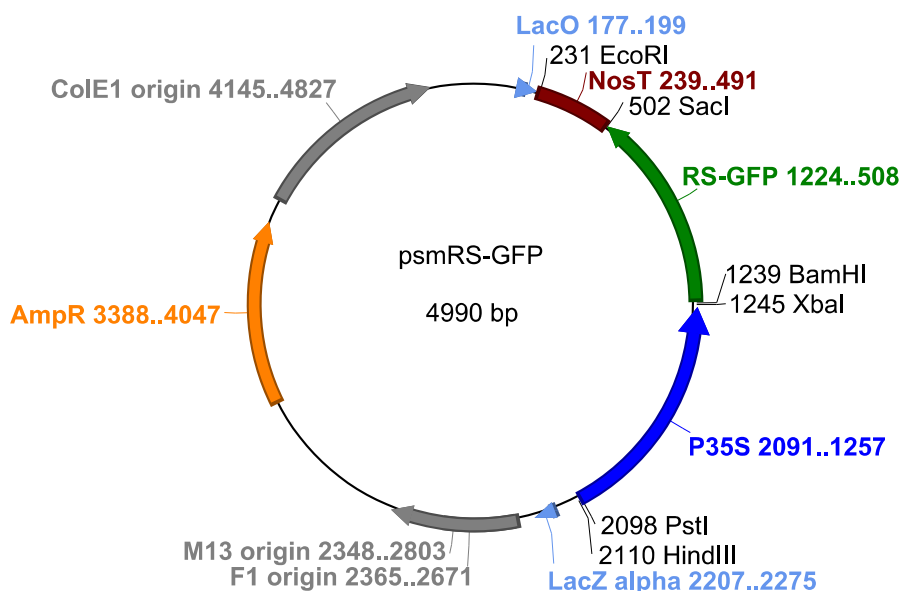
Plazmid pER8 (Obr. 3.5) je binární vektor a nese spectinomycinovou resistenci pro selekci v bakteriích a hygromycinovou resistenci pro selekci v rostlinách. Tento plazmid nese indukibilní promotor, který je aktivován β -estradiolem – na plazmidu je přítomen gen pro fúzní protein, jehož částí je podjednotka lidského receptoru pro estrogen a který slouží k aktivaci tohoto promotoru (Zuo et al. 2000).



Obr. 3.5: Mapa plazmidu pER8

3.2.4 psmRS-GFP

Plazmid psmRS-GFP (Obr. 3.6) byl použit jako zdroj genu RS-GFP. Tento plazmid má ampicilinovou resistenci (Davis & Vierstra 1998).



Obr. 3.6: Mapa plazmidu psmRS-GFP

3.3 Transformace modelových organismů

3.3.1 Příprava elektrokompetentních bakterií *E. coli*

Bakterie byly rozčárkovány na plotně s pevným LB médiem a kultivovány přes noc (detaily kultivace viz kapitola 3.1.1). 1-3 nově narostlé kolonie byly zaočkovány do 50 ml LB média v 100 ml Erlenmayerově baňce a kultivovány přes noc na třepačce. Druhý den bylo 5 ml této suspenze zaočkováno do 400 ml LB média ve 2l Erlenmayerově baňce a kultivováno na třepačce do dosažení optické denzity 0,4 (při $\lambda = 600$ nm a průmětu kyvety 1 cm). Poté byla baňka i s bakteriemi přenesena do ledové lázně na 15-30 min. Veškerá následná práce byla prováděna na ledu. Použitá nádoba i kapaliny byly sterilní a během práce chlazeny na ledu. Všechny centrifugace probíhaly při 4 °C a 1800 g 10 min. Polovina ze 400 ml suspenze byla rozdělena po 25 ml do osmi 50 ml centrifugačních zkumavek (Falkon). Následovala centrifugace, supernatant byl slit a sediment resuspendován v 6 ml vychlazené dH₂O a všechn přenesen do jedné separátní falkony. Celý proces byl zopakován s druhou polovinou suspenze (technicky není možné centrifugovat celý objem 400 ml najednou), ale sediment byl tentokrát resuspendován ve 34 ml dH₂O. Těchto 34 ml suspenze bylo poté doplněno do 40 ml suspenzí vzniklou po předchozí centrifugaci. Následovala centrifugace, slití supernatantu a resuspendování pelet v 25 ml sterilního 10% glycerolu. Suspenze byla znovu centrifugována, supernatant slit a pelet byl resuspendován v 1 ml sterilního 10% glycerolu. Získaná suspenze byla převedena do jedné falkony

a centrifugována. Supernatant byl slit a pelet resuspendován v 800 µl sterilního GYT média. Byla změřena optická denzita při 600 nm (100× zředěné suspenze), aby bylo potvrzeno, že hustota získané suspenze se pohybuje mezi $2 \times 10^{10} - 3 \times 10^{10}$ buněk/ml (za předpokladu, že $1,0 \text{ OD}_{600} = \sim 2,5 \times 10^8$ buněk/ml). Suspenze byla rozpipetována po 40 µl do 1,5ml mikrozkuvek, které byly zamrazeny v tekutém dusíku a skladovány při -80 °C.

Tab. 3.6: GYT médium

složky	100% glycerol	yeast extract	pepton (tripepton)	dH ₂ O
množství	1 ml	12,5 mg	25 mg	9 ml

- GYT médium bylo sterilizováno filtrací přes jednorázové filtry Nalgene 0,22 µm a skladováno v lednici.

3.3.2 Příprava elektrokompetentních bakterií *A. tumefaciens*

Bakterie byly „rozčárkovány“ na Petriho misce s pevným LB médiem a kultivovány 3 dny na LB médiu s rifampicinem (detaily kultivace viz kapitola 3.1.1). 1-3 nově narostlé kolonie byly zaočkovány do 10 ml LB média s rifampicinem ve 100 ml Erlenmayerově baňce a kultivovány přes noc na třepačce. Druhý den byly 4 ml této suspenze zaočkovány do 200 ml YEB média s rifampicinem v 1l Erlenmayerově baňce a kultivovány na třepačce do dosažení optické denzity 0,6 (při $\lambda = 600$ nm a průmětu kyvety 1 cm). Poté byla baňka i s bakteriemi přenesena do ledové lázně na 15-30 min. Veškerá následná práce byla prováděna na ledu. Použité nádoby i kapaliny byly sterilní a během práce chlazeny na ledu. Všechny centrifugace probíhaly při 4 °C a 1800 g 10 min. Suspenze byla rozdělena po 25 ml do osmi 50 ml centrifugačních zkuvek (Falkon). Následovala centrifugace a každá vzniklá peleta byla resuspendována v 25 ml dH₂O. Suspenze byla opět centrifugována a vzniklé pelety resuspendovány v 10 ml dH₂O. Obsah vždy dvou falkon byl slit dohromady a doplněn dH₂O do 25 ml. Suspenze byla centrifugována a pelety resuspendovány ve 2 ml 10% glycerolu a veškerá vzniklá suspenze slita do jedné falkony. Tato suspenze byla centrifugována a výsledný pelet byl resuspendován v 1 ml 10% glycerolu. Suspenze byla rozpipetována po 100 µl do 1,5ml mikrozkuvek, které byly zamrazeny v tekutém dusíku a skladovány při -80 °C.

3.3.3 Transformace bakterií

Kompetentní buňky *E. coli* nebo *A. tumefaciens* (viz kapitola 3.3.1 respektive 3.3.2) byly rozmrazeny na ledu. Byly k nim přidány 3 µl vzorku s plazmidem (většinou odsolená ligační směs, viz kapitola 3.4.6 a podkapitoly) a spolu s ním byly bakterie 1 min inkubovány

na ledu. Poté byly převedeny do vychlazené elektroporační kyvety, v ní vloženy do elektroporátoru (Bio-Rad Gene Pulser Aparatus, nastavený na hodnoty 25 μ F, 200 Ω a 2,5 kV v případě *E. coli*, či 2 kV v případě *A. tumefaciens*) a aplikoval se elektrický pulz. Okamžitě poté se k buňkám přidal 1 ml SOC média (YEB recovery v případě *A. tumefaciens*) a buňky s médiem byly přeneseny do sterilní skleněné zkumavky. Následovala kultivace 1 h v 37 °C (resp. 3 h v 28 °C pro *A. tumefaciens*) na třepačce. Poté byly bakterie vysety na Petriho misku s LB médiem a příslušnými antibiotiky (viz kapitola 3.1.1). Většinou se vysévaly dva různé objemy: 50 a 950 μ l, s tím, že objem 950 μ l byl ještě zakoncentrován tak, že se centrifugací (5000 g, 30s) vytvořil pelet, část supernatantu byla odlita a ve zbylých přibližně 100 μ l se pelet zpětně resuspendoval.

Tab. 3.7: SOC médium

složky	pepton	yeast extract	glukóza	NaCl	KCl	MgCl ₂	MgSO ₄
g/20 ml dH ₂ O	0,4	0,1	0,0721	0,0117	0,0037	0,019	0,0241

- SOC médium bylo sterilizováno filtrací přes jednorázové filtry Nalgene 0,22 μ m a skladováno v lednici.

Tab. 3.8: YEB recovery médium

složky	pepton	yeast extract	sacharóza	MgSO ₄	NaCl	KCl	MgCl ₂
g/l dH ₂ O	10	1	5	0,5	0,58	0,19	0,95

- YEB recovery médium bylo sterilizováno filtrací přes jednorázové filtry Nalgene 0,22 μ m a skladováno v lednici

3.3.4 Transformace a kotransformace tabákové buněčné linie BY-2

Tři dny stará suspenze BY-2 (30 ml; kultivace viz kapitola 3.1.2) byla sterilně přefiltrována filtračním zařízením Nalgene a buňky byly resuspendovány do původního objemu v čerstvém MS médiu. K buňkám bylo přidáno 30 μ l 20 mM acetosyringonu (rozpuštěný v ethanolu a skladovaný v -20 °C). Suspenze byla přibližně 20 \times protažena 10ml špičkou, aby došlo k poranění buněk. Po tomto kroku byly 2 ml suspenze odebrány jako kontrola (na 6cm plastovou Petriho misku). K vlastní suspenzi byly přidány 3 ml suspenze bakterií *A. tumefaciens* transformovaných příslušným plazmidem (ty byly předešlý den zaočkovány do 10 ml YEB s odpovídajícími antibiotiky ve 100ml Erlenmayerově baňce, kultivace agrobaktéria viz kapitola 3.1.1). Výsledná suspenze byla znovu několikrát protažena 10ml špičkou a rozpipetována po 2 ml na 6cm plastové Petriho misky. Následná kokultivace

probíhala ve tmě při 27 °C po dobu 3 dní. V nádobě s Petriho miskami byl ještě kus navlhčené gázy, aby suspenze nevysychala.

Po třech dnech byly buňky na misce resuspendovány v 10 ml 3% sacharózy a ze všech misek přeneseny na jedno filtrační zařízení Nalgene, kde byly propláchnuty 300 ml 3% sacharózy. Následovalo propláchnutí 100 ml MS média s přidaným antibiotikem claforan (viz Tab. 3.5). Promyté buňky byly resuspendovány v malém objemu MS média (2-3 ml) s antibiotikem claforan a rozpipetovány po 500-700 μ l na misky se zpevněným selekčním médiem (0,6% agar, kultivace viz kapitola 3.1.2). Kontrola nebyla promývána, po resuspendování v MS médiu byla přímo přenesena na médium selekční. Při následné kultivaci byl opět v nádobě s Petriho miskami umístěn kus mokré gázy, aby se zabránilo vysychání. Kalusy byly narostlé po 3-4 týdnech kultivace.

Kotransformace probíhala obdobně, pouze se místo 3 ml z jedné suspenze *A. tumefaciens* přidávalo po 1,5 ml od obou klonů nesoucích odlišné plazmidy.

3.4 Práce s DNA

3.4.1 Izolace rostlinné DNA

Upraveno podle Shure et al. 1983. Přibližně 100 mg rostlinného materiálu bylo spolu se dvěma kuličkami z nerezové oceli vloženo do 2 ml mikrozkušavek a zamrazeno v tekutém dusíku. Takto připravený materiál byl homogenizován kulovým mlýnkem Retsch MM301 (6 min, 23 kmitů/s). Do stále ještě zmrzlých mikrozkušavek bylo přidáno 300 μ l extrakčního pufru, a ten byl i s rozpuštěným rostlinným materiálem přenesen do nové 1,5ml mikrozkušavky. K roztoku bylo přidáno 300 μ l směsi fenol:chloroform (1:1, pH 7,9) a vzorek byl důkladně promíchán. Následovala centrifugace 7 min, 4000 g. Horní vrstva (přibližně 300 μ l) byla přenesena do nové 1,5ml mikrozkušavky a bylo k ní přidáno 0,7 objemu isopropanolu a obsah byl opatrně promíchán překlápěním zkumavky. Vysrážený „chuchvalec“ DNA byl přenesen do nové mikrozkušavky s 500 μ l 70% ethanolu. DNA s ethanolem se nechala přibližně 3 min stát a poté se centrifugovala (30 s, 14000 g). Supernatant byl slit a sediment vysušen prouděním vzduchu. Sediment DNA byl rozpuštěn v 200 μ l TE pufru s přidáním 1 μ l RNázy I (inkubováno 30 min při 37 °C, RNáza I byla dodána firmou Fermentas o koncentraci 10 u/ μ l). DNA byla skladována při -20 °C.

Úspěšnost izolace DNA byla ověřena spektrofotometricky: DNA byla 50 \times naředěna a byla měřena absorbance při 260 a 280 nm proti dH₂O na spektrofotometru Thermo Spectronics – BioMate 5. Výsledná koncentrace byla vypočtena podle vzorce:

$c(\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (\varepsilon^{-1} \times A_{260} \times \text{ředění})/1000$; kde ε^{-1} je převrácená hodnota molárního absorpčního koeficientu (pro DNA $\varepsilon^{-1} = 50$).

Tab. 3.9: **Roztoky pro izolaci rostlinné DNA**

TE pufr	10 mM Tris (pH 8.0), 1 mM EDTA
Extrakční pufr	2× izolační pufr:2× roztok močoviny:Na ₂ S ₂ O ₅ v poměru 50:50:1
2× izolační pufr	0,6 M NaCl, 0,1 M Tris (pH 7,5), 40 mM EDTA, 4 % sarcosyl, 1 % SDS
2× roztok močoviny	10 M močovina
Na ₂ S ₂ O ₅	2 M Na ₂ S ₂ O ₅

3.4.2 Izolace plazmidové DNA z *E. coli* a *A. tumefaciens*

Plazmidy byly vždy izolovány z bakteriální kultury přes noc narostlé ve 3 ml LB média ve skleněné zkumavce (kultivace viz kapitola 3.1.1). Izolace byla prováděna kitem firmy Promega: Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System. Postup byl totožný s přibaleným protokolem pro izolaci plazmidové DNA pomocí centrifugace.

Izolace plazmidové DNA z *A. tumefaciens* začínala tím, že po první sedimentaci ze 3 ml suspenze byly bakterie dvakrát promyty 1 ml 1 M NaCl. Následný postup pak byl stejný jako u *E. coli*.

3.4.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR je metodou amplifikace vybraného úseku DNA pomocí termostabilní DNA dependentní DNA polymerázy. Ve všech případech jako DNA polymeráza sloužila Taq polymeráza. Proces probíhá v opakujících se cyklech, kde se cyklus skládá z kroků s odlišnou teplotou (teplota určuje, co se bude v reakční směsi dít). Cyklus začíná denaturací templátové DNA, následuje nasednutí primerů a končí polymerací daného úseku DNA:

Tab. 3.10: **PCR cyklus**

krok	počáteční denaturace	denaturace	nasednutí primerů	polymerace	dosyntetizování
teplota (°C)	94	94	T _m - 5	72	72
trvání (s)	180	30	30	60/kb	600
opakování	1×	25-40×			1×

- Teplota nasednutí primerů je o 5 °C nižší než jejich teplota tání (T_m). Teplota tání byla přibližně stanovena podle vzorce: $T_m = 2\sum(A + T) + 4\sum(C + G)$

- Krok „dosyntetizování“ slouží k dosyntetizování úseků, které nebyly nasyntetizovány v plné délce během cyklu a zároveň souží k přidání A na 3' konce DNA (toho se využívá při TA-klonování)
- Reakce probíhaly v 0,5ml tenkostěnných mikrozkušavkách v termocyleru MJ Research PTC-200.

Tab. 3.11: PCR reakce (50 μ l)

složky	Templátová DNA	10 \times PCR pufr	25 mM MgCl	10 mM dNTP	10 μ M primer	Taq polymeráza, konc. 5u/ μ l
μ l/50 μ l reakce	1	5	3	1	1 + 1	0,5

- Templátová DNA se většinou pohybovala v koncentracích: 50-200 ng/ μ l pro genomovou DNA a 5-10 ng/ μ l pro plazmidovou DNA.
- Jako templát pro PCR byly také někdy používány přímo bakterie. Buďto byla část kolonie nanesena přímo na stěnu mikrozkušavky pro PCR a poté byla přidána reakční směs, a nebo byla část kolonie rozpuštěna v 10 \times zředěném PCR pufru, do PCR reakce se většinou přidávalo 0,5 μ l této suspenze na 20 μ l reakční směsi. Bakterie ve zředěném PCR pufru byly v případě potřeby uchovávány při -20 $^{\circ}$ C. PCR z bakterií byla používána pro selekci klonů transformovaných požadovaným vektorem.

3.4.3.1 Seznam použitých primerů

Tab. 3.12: Seznam použitých primerů

název	restrikční místo	T _m ($^{\circ}$ C)	cílová sekvence	sekvence
PnosF	SacI	62	Pnos	GAGCTCGATCATGAGCGGAGAATTAAG
PnosR	SacI	62	Pnos	GAGCTCGAAACGATCCAGATCCGGTG
antiGFP_F	XhoI	64	RS-GFP	CTCGAGTTATTTGTATAGTTCATCCATGCC
antiGFP_R	BcuI	64	RS-GFP	ACTAGTATGAGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTC
GFP-bT_F	XhoI	64	RS-GFP	CTCGAGATGAGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTC
GFP-bT_R	EcoRV	64	RS-GFP	GATATCTTATTTGTATAGTTCATCCATGCC
IR1_GFP_R	Sall	64	RS-GFP	GTCGACATGAGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTC
IR2_GFP_F	BamHI	64	RS-GFP	GGATCCATGAGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTC
IR2_GFP_R	PstI, XbaI	64	RS-GFP	CTGCAGTCTAGATTATTTGTATAGTTCATCCATGCC
MSPi_F	–	58	MSP	CTCTGCCCTTGTTGTCTCA
MSPi_R	–	58	MSP	GAACTCCTTCAGCATTAGCT
ntRDR6F	Cfr9I	62	ntRDR6	CCCGGGTCCAAAAGTACTTGTGACTCGT

název	restrikční místo	T _m (°C)	cílová sekvence	sekvence
ntRDR6R	XbaI	62	ntRDR6	TCTAGACTTGCAGCCAAAGAGTTGATGA
atRDR6F	XbaI	64	atRDR6	TCTAGATCACTAATCCTCTCTCCAGTCT
atRDR6R	Cfr9I	64	atRDR6	CCCGGGTTAGAGACGCTGAGCAAGAAACT
atRDR6F2	XbaI	64	atRDR6	TCTAGACGAGAGATGGTTTCAGCTATG
atRDR6R2	Cfr9I	64	atRDR6	CCCGGGTAACCTTTTAGAGACGCTGAGC
IR_ntRDR6R	XbaI	62	ntRDR6	TCTAGACCATTGATCATCATCGTCTAAC
atRDR6_S1	–	58	atRDR6	ACTCCTCCTGGGTCTTATC
atRDR6_S2	–	58	atRDR6	CTTGGATCCGTACCACTGA
atRDR6_S3	–	60	atRDR6	CTTTCTCCCAGAAGACCTAC
atRDR6_S4	–	60	atRDR6	ACTGAACCGCATCCTTGATG
atRDR6_S5	–	58	atRDR6	TTTAGGCCGTGCTGTCAAC
atRDR6_S6	–	58	atRDR6	AACTCTACCCAGATTTTCATG
M13F	–	52	–	GTAAAACGACGGCCAGT
M13R	–	46	–	AACAGCTATGACCATG
35S50	–	60	P35S	CACAATCCCCTATCCTTCG
IR_detF	–	64	GFP-IR	AGTTCTTCTCCTTTACTCATGTC
IR_detR	–	64	GFP-IR	ATCCAGAATTCGTGATTGAACTC

3.4.4 Restrikční štěpení

Restrikční štěpení byla prováděna za účelem vyštěpení definovaných fragmentů z plazmidů pro jejich následné klonování a nebo pro mapování vybraných úseků plazmidu za účelem ověření správného průběhu či výsledku klonování. Restriktázy i jejich pufrы pocházely od firmy Fermentas a jednotlivá štěpení byla prováděna podle pokynů výrobce.

Tab. 3.13: Ukázkové restrikční štěpení

složky	Enzym EcoRI (konc. 10 u/μl)	plazmid pDrive (konc. 100 ng/μl)	EcoRI pufr	dH ₂ O
μl/10 μl reakce	0,2	2	1	6,8

- Množství použitého enzymu přímo úměrně roste s počtem restrikčních míst ve štěpeném plazmidu a s množstvím štěpeného plazmidu, naopak klesá s rostoucí přepočtenou aktivitou enzymu (zjištěnou dle počtu restrikčních míst v λ fázi). Enzymu byl brán dvojnásobek oproti vypočtenému množství. Množství enzymu však nepřesahovalo 10 % celkového objemu reakce.

- V tomto konkrétním příkladu běžela reakce 1 h při 37 °C, v případě potřeby by bylo možno před dalším postupem enzym inaktivovat (pro EcoRI 65 °C, 20 min).
- Koncentrace plazmidů se stanovovaly z gelu (viz kapitola 3.4.5)

V některých případech bylo potřeba plazmid naštěpit pouze částečně, tj. aby po reakci zůstala ve směsi frakce plazmidů, u kterých např. jedno z restrikčních míst přítomných na plazmidu nebylo rozštěpeno. V tomto případě se vzalo přesné množství enzymu a provedly se tři varianty štěpení o různých dobách trvání: 5 min, 20 min a 60 min. Ihned po skončení štěpení byl enzym inaktivován. Z těchto tří variant štěpení se posléze vybralo to, které dávalo nejlepší výsledek (tj. požadovaný fragment byl na gelu v nejvyšší koncentraci).

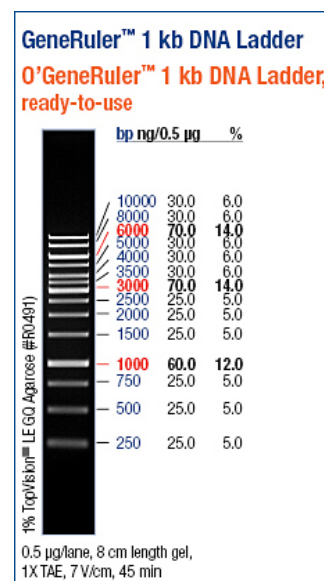
V některých případech bylo po štěpení potřeba upravit konce DNA, to je popsáno v následujících kapitolách: 3.4.4.1 a 3.4.4.2.

3.4.4.1 Defosforylace

Defosforylace slouží k zabránění cirkularizace vektoru bez vloženého fragmentu při klonování v případě, že oba jeho konce jsou navzájem kompatibilní. K tomu byla využita FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase dodávaná firmou Fermentas (v koncentraci 1 u/μl), která je schopna odstranit fosfáty z 5' konců DNA. K reakční směsi (naštěpenému vektoru) o objemu 10 μl bylo po provedení štěpení přidáno 0,6 μl FastAP a následovala inkubace 10 min při 37 °C a po ní inaktivace FastAP 5 min při 75 °C.

3.4.4.2 Zatupení konců

Zatupení konců slouží k odstranění 3' a 5' přesahů, a umožňuje tak spolu ligovat konce, které by jinak po restrikčním štěpení spolu nebyly kompatibilní. K zatupení byla použita T4 DNA polymeráza dodaná firmou Fermentas (v koncentraci 5 u/μl), která má polymerázovou aktivitu a 3'→5' exonukleázovou aktivitu. Protože je polymerázová aktivita silnější, pak v přítomnosti dNTP dojde k dosyntetizování 5' přesahujících konců a odstranění 3' přesahujících konců. K reakční směsi o objemu 10 μl bylo po provedení štěpení přidáno 0,1 μl 10 mM dNTP (pro dosažení cílové koncentrace 0,1 mM dNTP) a 0,1 μl T4 DNA polymerázy. Inkubace probíhala 20 min při 11 °C a po ní následovala inaktivace T4 DNA polymerázy 10 min 75 °C.



Obr. 3.7: marker pro určení délek fragmentů

3.4.5 Agarózová gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza je metoda umožňující dělení DNA na základě délky (případně konformace). Při práci byl používán agarózový gel nejčastěji o koncentraci 1,2 %. Tento gel byl připravován rozvařením 1,2 % agarózy v 0,5× TAE pufru, ke kterému byl přidán pro vizualizaci DNA GelRed™ firmy Biotium, v koncentraci 0,5 µl na 10 ml gelu. Gel se nalil do příslušné formy (s hřebenem pro vytvoření jamek) a nechal se zatuhnout. Po utužení byl gel vložen do vany s 0,5× TAE pufrem (tak, aby hladina gelu překrývala) a do jamek byly nanášeny vzorky DNA s roztokem BPB (v poměru 1:5). Transport DNA gelem byl zajištěn stejnosměrným elektrickým proudem vytvářejícím pole o napětí 4-6 V/cm. Pokud bylo třeba rozdělit delší fragmenty (8-10 kb), které byly blízko u sebe (rozdíl byl menší než 5 %), bylo použito nižší napětí, případně (u delších úseků) i gel o nižší hustotě (0,8 %).

Jako standard pro určení délek fragmentů byl použit 1kb marker GeneRuler™ (Fermentas), viz Obr. 3.7.

Tab. 3.14: **Roztoky pro elektroforézu DNA**

50× TAE (1 l)	242 g Tris, 57,1 ml ledové kyseliny octové, 100 ml 0,5 M EDTA (pH8,0)
BPB	0,025 % bromfenolová modř a 30 % glycerol v 10 mM Tris (pH 7,8)

Gely byly analyzovány pomocí zařízení G:BOX s UV transiluminátorem od firmy SynGene a digitální výstup z tohoto zařízení byl zpracován programem GeneSnap (verze 7.09) od stejnojmenné firmy. Snímky byly ukládány jako 8-bitový TIF soubor, pro potřeby diplomové práce byly převedeny na JPEG soubor s invertovanými barvami (resp. úrovněmi šedi) a pro zvýšení přehlednosti byly ze snímků vystřiženy nepotřebné části (např. když byly štěpeny plazmidy ze dvou různých klonů, byl ponechán jen jeden).

Množství DNA na gelu (a tím i koncentrace DNA ve vzorku) byly stanovovány porovnáním intenzity jasu daného vzorku na gelu se standardem pomocí programu GeneTools 4.01 od firmy SynGene.

3.4.5.1 Izolace DNA fragmentu z agarózového gelu

Z agarózového gelu byl co nejpřesněji vyříznut bloček obsahující požadovaný fragment DNA. Bloček gelu mohl být zpracován okamžitě a nebo skladován při -20 °C. Vlastní izolace byla prováděna pomocí komerčního kitu firmy Qiagen: QIAEX II Gel Extraction Kit (150). Při izolaci byl dodržován protokol přibalovaný ke kitu, s následujícími rozdíly: množství fragmentu přesně stanovováno nebylo a suspenze QX II bylo přidáváno 10 µl, DNA byla z pelety QX II uvolněna 2× promytím 10 µl 1 mM Trisu (pH 8,5).

3.4.6 Ligace

Ligace slouží ke spojování fragmentů DNA (nejčastěji po restrikním štěpení). Koncentrace fragmentů vzniklých restrikním štěpením byla určena z gelu (viz kapitola 3.4.5). T4 DNA ligáza i ligační pufr byly produktem firmy Fermentas.

Tab. 3.15: Ligační reakce

složky	vektor	insert	pufr	T4 ligáza (konc. 5 u/μl)
μl/10 μl reakce	až do celkového množství 100 ng		1	0,5

- stechiometrický poměr vektor:insert byl 1:7
- reakce běžela 2 h při 15 °C, následovala inaktivace 65 °C 10 min

3.4.6.1 TA-klonování

TA-klonování je metoda sloužící k zaklonování produktů PCR do vektoru pDrive, která využívá schopnosti Taq polymerázy přidávat na 3' konce DNA jeden přesahující deoxyadenosin (pDrive je vektor, který je dodáván linearizovaný a na 3' koncích nese jeden přesahující deoxyuracil). Pro TA-klonování byl použit kit dodávaný firmou Qiagen: PCR Cloning Kit. Klonování probíhala podle návodu dodaného výrobcem. Podmínky inkubace byly stejné jako u standardní ligace (15 °C 2 h, 65 °C 10 min), PCR produkt byl před klonováním „pročištěn“ izolací z gelu.

V případě, že byla koncentrace produktu PCR příliš nízká (více jak 5× nižší, než kolik uvádí protokol), provádělo se klonování do pDrive podle standardního ligačního protokolu (viz kapitola 3.4.6).

V případě TA-klonování bylo také využíváno „modro-bílé“ selekce. Plazmid pDrive nese *LacZ*, který je vložením fragmentu přerušen a stává se tak (většinou) nefunkčním. Na médium bylo přidáváno 40 μl X-gal (zásobní roztok: 20 mg/ml dimethylformamidu). Pokud byl fragment v plazmidu vložen, byly kolonie bakterií standardně bílé, pokud nebyl vložen, byl X-gal metabolizován a kolonie byly modré. Standardně je *lac* operon (*LacO*) aktivován pomocí IPTG, to však přidáváno nebylo, neboť pepton, který byl součástí média je získáván z kaseinu (mléčného proteinu) a je tudíž kontaminován laktózou, která je pro aktivaci *lac* operonu postačující.

3.4.6.2 Odsolení ligační směsi

Pro odsolení ligační směsi byla použita odsolovací kolonka. Tato kolonka byla připravena rozvařením 1 % agarózy ve 100 mM glukóze, tento roztok byl rozpipetován po 1,3 ml do 1,5 ml mikrozkušavek, ty byly přelepeny lepící páskou, do které byla kolmo

dolů zabodnuta 200 μ l špička (tím se vytvořila jamka asi do 1/3 výšky mikroskopické jamky). Kolonky se nechaly zatuhnout a byly skladovány v lednici utěsněné parafilmem, aby nevysychaly.

Při odsolování byla napipetována liguční směs do jamky v odsolovací kolonce a byla v ní ponechána po dobu 1,5 h v lednici.

3.4.7 Sekvenace

Sekvenace byly zpracovány laboratoří sekvenace DNA PřF UK. Vzorky byly připraveny podle pokynů laboratoře: 0,2 ml tenkostěnné mikroskopické jamky se 14 μ l vzorku (0,24 μ mol příslušného primeru a 100-200 ng plazmidové DNA). Výsledky byly zpracovány pomocí programu Chromas 2.01 a pomocí nástroje BLAST na webových stránkách NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.5 Sledování změn fluorescence a indukce umlčování

Změny ve fluorescenci byly sledovány jednak na kalusech rostoucích na pevném médiu a jednak v suspenzních kulturách (standardní podmínky pěstování viz kapitola 3.1.2).

Expresí umlčujících konstruktů byla spouštěna z indukovatelného promotoru na plazmidu pER8 pomocí β -estradiolu dodaného firmou SIGMA (Cat. No. E2758). Koncentrace β -estradiolu v médiu byla 2 μ M (pokud není uvedeno jinak), β -estradiol byl skladován jako zásobní roztok o koncentraci 20 mM rozpuštěný v DMSO při -20 °C a do média byl tedy ředěn 10000 \times .

3.5.1 Analýza obrazových dat

Kalusy byly snímány pomocí zařízení G:BOX od firmy SynGene (excitace: modré LED diody s maximem záření při 465 nm, emisní filtr: FILTSP – 495-600 nm) a digitální výstup z tohoto zařízení byl zpracován programem GeneSnap 7.09, výsledné snímky byly ukládány jako 16-bit TIF soubor. Kalusy byly snímány i s miskami, na kterých rostly (6cm Petriho misky), každá miska byla snímána zvlášť. Kontroly byly snímány společně s umlčovanými kalusy a v rámci jednoho měření byly podmínky snímání vždy identické. Mezi jednotlivými měřeními byla zachována stejná expozice (1,2 s), parametry, které program neumožňoval uložit (přiblížení a zaostření), byly odhadovány přibližně, rozdíly v těchto nastaveních však neměly významný dopad na výsledek (při opakovaném naměření stejného vzorku při různých parametrech, byla průměrná směrodatná odchylka 0,5 %).

Získané snímky byly následně analyzovány pomocí programu NIS-Elements 3.10 (build 637) od firmy Laboratory Imaging. U každého kalusu byla stanovena průměrná intenzita fluorescence (tj. průměrná úroveň jasu). Hodnoty intenzity jsou odvozeny od 16-bit barevné hloubky obrázků, tj. minimum (černá) = 0 a maximum (bílá) = 65535. Intenzity byly měřeny následujícím způsobem: pomocí nástroje „Rastrový ROI editor...“ byla nadefinována plocha každého kalusu na snímku (většinou „autodetekcí“, pokud se dotýkaly, byly plochy odděleny pomocí „ručního kreslení“), když byly všechny plochy kalusů v dané sérii nadefinovány, byla hodnota „Průměr. intenzita“ změřena pomocí nástroje „Měřit pole a ROI“. Získaná data byla uložena a dále zpracována pomocí tabulkového procesoru, jenž je součástí programu LibreOffice 3.5.1.

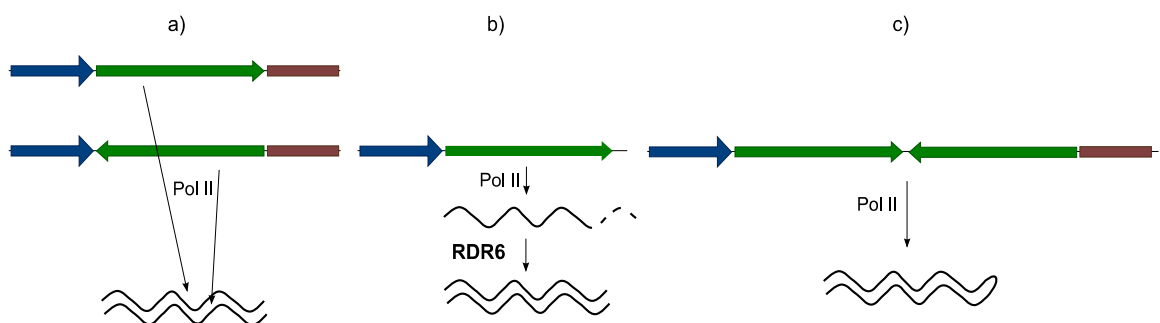
Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu R 2.15.0. Všechny statistické testy byly prováděny na hladině spolehlivosti 0,05. Jako dvouvýběrové testy byly použity: dvouvýběrový t-test, resp. ANOVA v případě normálního rozložení dat a nebo Kruskal-Wallisův test v případě, že rozložení dat nebylo normální. Jako párové testy byly použity: párový t-test v případě normálního rozložení dat a Wilcoxonův test v případě, že rozložení dat nebylo normální. Normálnost rozložení dat byla stanovena Shapiro-Wilkovým testem.

Suspenní kultury byly analyzovány pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus BX51 s kamerou Apogee U4000. Digitální výstup kamery byl zpracován programem MicroCCD 4.1.

4 Výsledky

4.1 Indukce umlčování

Ke spouštění umlčování bylo využito tří různých způsobů tvorby dsRNA (Obr. 4.1). Prvním způsobem je exprese RNA v antisense orientaci k cílovému genu, antisense RNA může párovat s transkriptem cílového genu a vytvořit dsRNA. Druhým způsobem je tvorba RNA bez polyA konce (aberrantní RNA) tak, že se za vlastní gen nevloží terminátor, takováto RNA by měla být rozpoznána RNA-dependentní RNA polymerázou (RDR6), jež dosyntetizuje druhé vlákno a vznikne tak dsRNA. Třetím způsobem použití invertované repetice, RNA pak vytváří dvouvláknový úsek (vlásenku) v rámci jedné molekuly.



Obr. 4.1: Indukce umlčování – a) antisense RNA, b) RNA bez polyA, c) vlásenka

4.1.1 Tvorba konstruktů

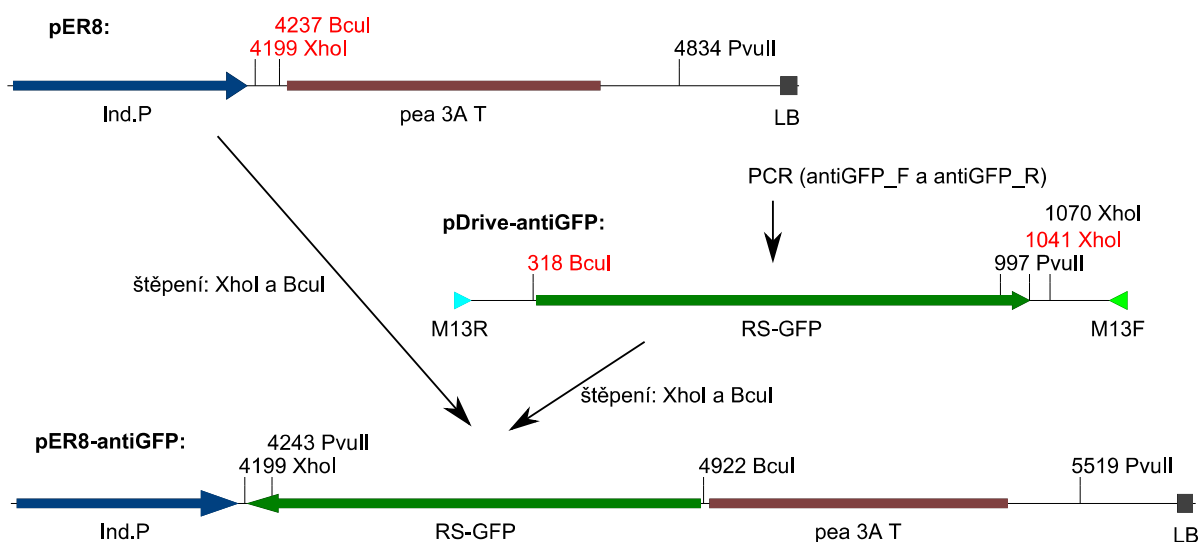
K indukci umlčování byly připraveny tři konstrukty využívající výše zmíněné principy (Obr. 4.1): GFP³ v antisense orientaci (dále antiGFP), GFP bez terminátoru (dále GFP-bT) a GFP v invertované repetici (dále GFP-IR). Všechny tyto tři konstrukty byly umístěny do vektoru pER8, který umožňuje kontrolovanou indukci jejich exprese.

V prvním kroku byly připraveny jednotlivé sekvence tak, aby se následně daly převést s využitím restrikčních enzymů do cílového vektoru. Pomocí PCR a primerů nesoucích příslušné adaptory s restrikčními místy (seznam primerů viz: Tab. 3.12) byly připraveny čtyři sekvence RS-GFP a pomocí AT-klonování vloženy do vektoru pDrive. RS-GFP bylo amplifikováno z plazmidu psmRS-GFP (viz kapitola 3.2.4) v celé délce od START kodónu až po STOP kodón. Vznikly tak čtyři plazmidy: pDrive-antiGFP (insert amplifikován primery antiGFP_F a antiGFP_R), pDrive-GFP-bT (insert amplifikován primery GFP-bT_F a GFP-

3 Vzhledem k tomu, že jediným genem kódujícím GFP protein použitým v této práci je *RS-GFP*, tak je na řadě míst značeno pouze jako *GFP*.

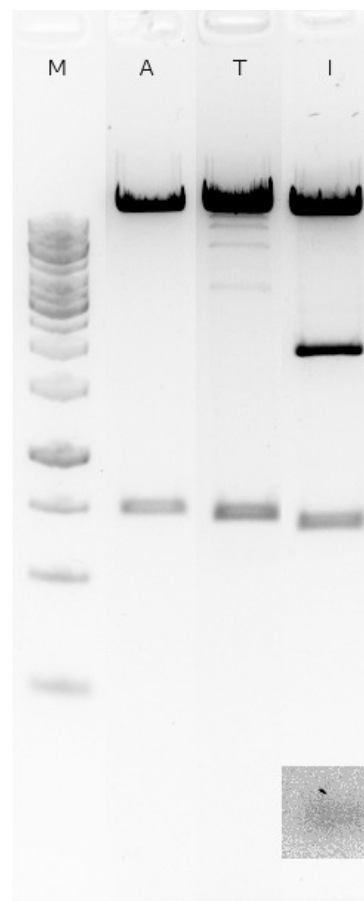
bT_R), pDrive-IR1 (insert amplifikován primery antiGFP_F a IR1_GFP_R) a pDrive-IR2 (insert amplifikován primery IR2_GFP_F a IR2_GFP_R). Získané plazmidy (po vyizolování z bakterií) byly napřed ověřeny restričním štěpením (s použitím restričních enzymů štěpících v místech přidaných adaptory primerů) a následně sekvenací. Sekvence antiGFP nesla jednonukleotidovou záměnu adeninu za thymin na pozici 404 (ve směru od START kodónu), tato mutace byla při kontrole přehlédnuta, nicméně na funkci konstruktů v umlčování by neměla mít žádný vliv.

Příprava pER8-antiGFP (viz Obr. 4.2): plazmidy pDrive-antiGFP a pER8 byly štěpeny restričními enzymy XhoI a BcuI, fragmenty štěpení byly od sebe odděleny na elektroforéze. Po štěpení pER8 byl vyizolován nejdelší fragment a po štěpení pDrive-antiGFP byl vyizolován přibližně 720 bp fragment. Po ligaci a získání bakteriálních klonů byl z několika vybraných plazmid izolován a ověřen restričním štěpením (enzymy XhoI a BcuI, viz Obr. 4.3 dráha A).

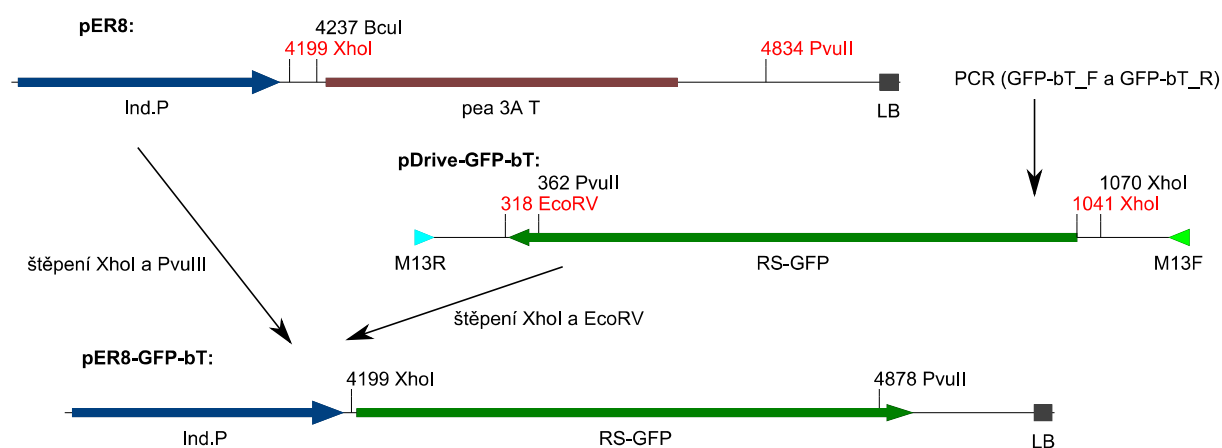


Obr. 4.2: schéma klonování pER8-antiGFP

Příprava pER8-GFP-bT (viz Obr. 4.4): plazmid pDrive-GFP-bT byl štěpen enzymy XhoI a EcoRV a plazmid pER8 byl štěpen enzymy XhoI a PvuII. Enzymy PvuII a EcoRV vytváří tupé konce, a ty jsou tak spolu spojitelné. Enzym PvuII nebyl pro štěpení vektoru pDrive-GFP-bT použit proto, že tento enzym má také restrikční místo v sekvenci RS-GFP. Fragменты štěpení byly od sebe odděleny na elektroforéze. Po štěpení pER8 byl vyizolován nejdelší fragment a po štěpení pDrive-GFP-bT byl vyizolován přibližně 720 bp fragment. Po ligaci a získání bakteriálních klonů byl z několika vybraných plazmidů izolován a ověřen restrikčním štěpením (enzymy XhoI a PvuII, viz Obr. 4.3 dráha T).



Obr. 4.3: kontrolní štěpením: M – marker (1 kb); A – pER8-antiGFP (XbaI a BclI); T – pER8-GFP-bT (XhoI a PvuII); I – pER8-IR (XhoI a PvuII); příliš slabě viditelný fragment byl zvýrazněn



Obr. 4.4: schéma klonování pER8-GFP-bT

Příprava pER8-GFP-IR (viz Obr. 4.5): konstrukt GFP-IR se skládal ze dvou sekvencí RS-GFP v opačných orientacích oddělených sekvencí intronu. Uspořádání, kdy byla obě ramena vlásenky oddělena od sebe intronem, bylo zvoleno na základě empirických poznatků. Přítomnost intronu výrazně zvyšuje účinnost a k umlčování za určitých okolností může dojít

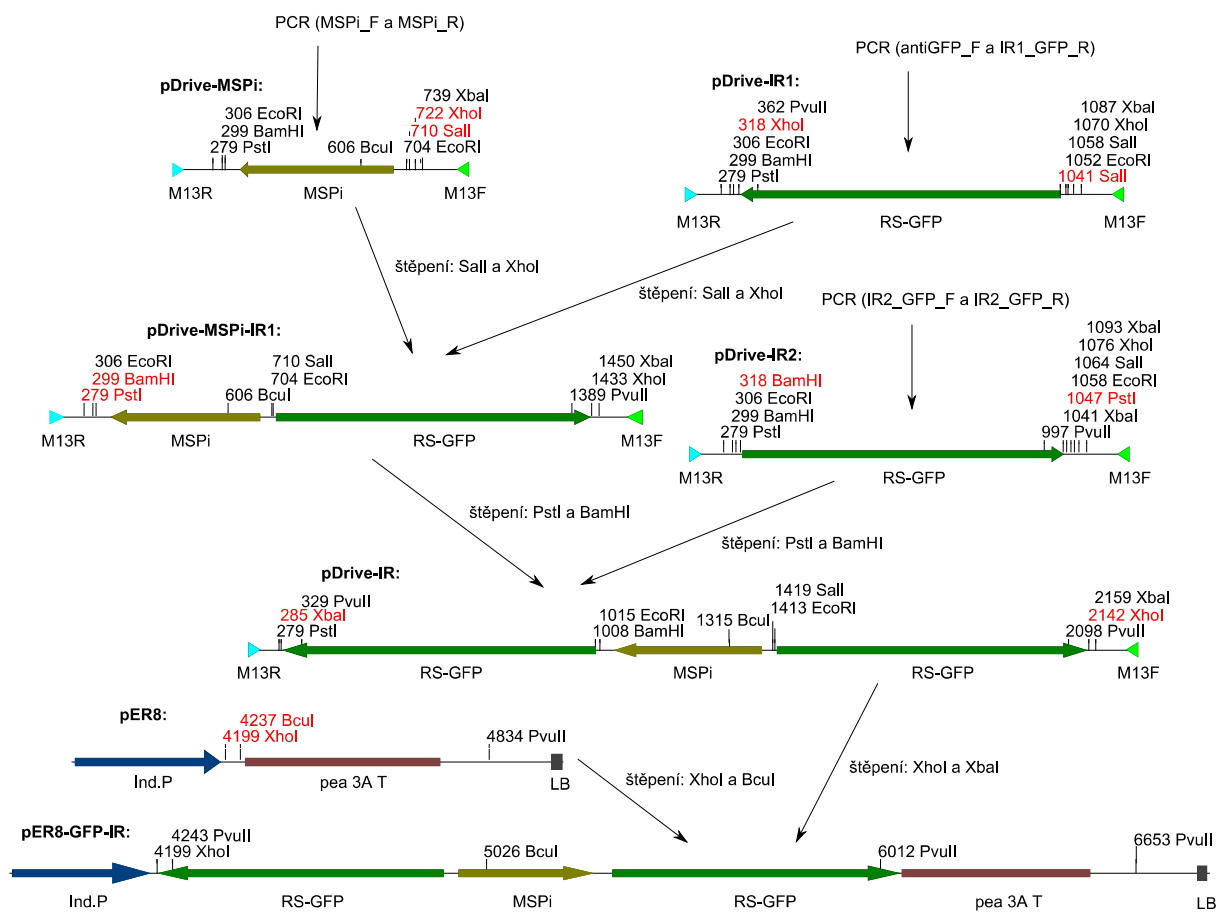
i ve 100 % případech. Proč tomu tak je, není známo, předpokládá se, že proces sestřihu usnadňuje vytvoření párování mezi bazemi obou ramen (Smith et al. 2000). Za tímto účelem byla tedy zvolena sekvence intronu z genu mangan stabilizujícího proteinu (MSP) vyizolovaného z lilku bramboru (*Solanum tuberosum*). Plazmid nesoucí gen pro MSP poskytl Miloš Duchoslav, stejně tak poskytl i sekvenci genu, na základě které byly navrženy příslušné primery. Tomuto genu odpovídá v databázi GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) cDNA pod číslem X17578.1. Vlastní intron byl amplifikován primery MSPi_F a MSPi_R tak, že součástí získané sekvence bylo i 19 resp. 22 nukleotidů z přilehlých exonů. Tento intron nese standardní sekvence v místech, která jsou potřeba pro jeho sestřih (viz např. Shen et al. 2011), a tudíž by měl být při expresi v linii BY-2 vystřižen. Intron byl pomocí AT-klonování vložen do plazmidu pDrive. Po získání bakteriálních klonů byla u několika vybraných ověřena přítomnost plazmidu s vloženým intronem tak, aby bylo možné ověřit i orientaci vloženého intronu v plazmidu. Byla tedy provedena PCR s kombinací primerů M13F a MSPi_R. Z několika takto vybraných bakteriálních klonů byl plazmid vyizolován a následně ještě ověřen restričním štěpením pomocí EcoRI a sekvenací. Sekvence získaného intronu nesla jednonukleotidovou záměnu thyminu za cytosin na pozici 56 (od 3' místa sestřihu), tato mutace však ležela mimo místa nezbytná pro správný sestřih intronu a bylo tedy usouzeno, že správné funkci intronu nijak nepřekáží. Plazmid byl označen jako pDrive-MSPi.

Plazmidy pDrive-MSPi a pDrive-IR1 byly štěpeny restričními enzymy Sall a XhoI, fragmenty štěpení byly odděleny pomocí elektroforézy a příslušné fragmenty byly z gelu vyizolovány – po štěpení pDrive-MSPi to byl fragment o přibližné délce 4,2 kbp a po štěpení pDrive-IR1 fragment o přibližné délce 720 bp. Po ligaci a izolaci plazmidu z vybraných klonů bakterií se však ukázalo, že plazmid se zpětně cirkularizoval, neboť konce DNA po štěpení Sall a XhoI jsou vzájemně komplementární. Byla tedy analyzována větší sada klonů bakterií (104) pomocí PCR, a to tak, aby bylo možné odlišit i orientaci vkládaného fragmentu. Za tímto účelem byly využity primery IR1_GFP_R a M13F a bylo detekováno dostatečné množství klonů se sekvencí IR1 vloženou ve správné orientaci. Z několika klonů byl plazmid vyizolován a následně ověřen restričním štěpením pomocí Sall a XhoI. Vzniklý plazmid byl označen jako pDrive-MSPi-IR1.

Plazmidy pDrive-MSPi-IR1 a pDrive-IR2 byly štěpeny restričními enzymy PstI a BamHI, fragmenty štěpení byly odděleny pomocí elektroforézy a příslušné fragmenty byly z gelu vyizolovány – po štěpení pDrive-MSPi-IR1 to byl fragment o přibližné délce 5 kbp a po štěpení pDrive-IR2 fragment o přibližné délce 720 bp. Následovala ligace obou

fragmentů a elektroporace do bakterií. Z několika vybraných klonů byl plazmid vyizolován a ověřen restričním štěpením enzymy PstI a BamHI. Plazmid byl označen jako pDrive-IR.

Plazmid pER8 byl štěpen restričními enzymy XhoI a BclI a plazmid pDrive-IR byl štěpen enzymy XhoI a XbaI (XbaI a BclI vytváří konce, které jsou vzájemně komplementární). Fragmenty štěpení byly odděleny pomocí elektroforézy a příslušné fragmenty byly z gelu vyizolovány – po štěpení pER8 to byl nejdelší fragment a po štěpení pDrive-IR fragment o přibližné délce 1,9 kbp. Následovala ligace obou fragmentů a elektroporace do bakterií. Z několika vybraných klonů byl plazmid vyizolován a ověřen restričním štěpením enzymy XhoI a PvuII, viz Obr. 4.3 dráha I.



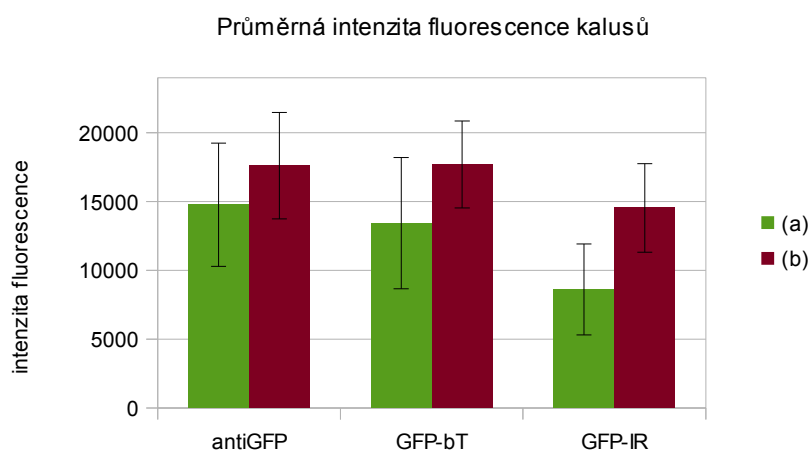
Obr. 4.5: schéma klonování pER8-GFP-IR

4.1.2 Indukce umlčování v liniích stabilně transformovaných GFP

Linie BY-2, která dlouhodobě a stabilně exprimuje RS-GFP pod 35S promotorem (tuto linii poskytla Lenka Dvořáková), byla transformována pomocí agrobaktéria a plazmidů, jejichž příprava je popsána výše: pER8-antiGFP, pER8-GFP-bT a pER8-GFP-IR. Transformace probíhala standardně, jak je popsáno v kapitole 3.3.4. Transformace byla

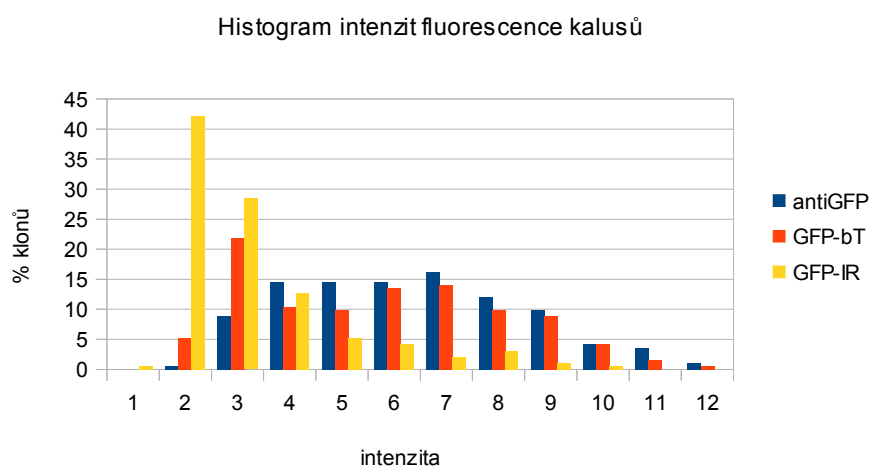
úspěšná a na selekčním médiu (s hygromycinem) od každé ze tří variant narostlo dostatečné množství kalusů (na negativní kontrole žádné kalusy nenarostly).

Náhodně vybrané narostlé kalusy byly přesazeny na čerstvé médium v počtu přibližně 19 na miskou (Obr. 4.6). Celkem bylo přesazeno 192 kalusů transformovaných antiGFP a GFP-bT a 190 kalusů transformovaných GFP-IR. Po týdnu byly všechny tyto kalusy nasnímány a byly změřeny intenzity fluorescence. Překvapivým zjištěním bylo, že většina kalusů transformovaných konstruktem GFP-IR nesvítí⁴, a nebo svítí slabě, jak je patrné jednak z grafu porovnání průměrné intenzity fluorescence (IF) všech kalusů (Chyba: zdroj odkazu nenalezen, zelené sloupce) a také z grafu porovnávajícího četnost kalusů o daných intenzitách fluorescence (Graf 4.2). Statistická významnost rozdílu byla stanovena Kruskal-Wallisovým testem (data nemají normální rozložení). Odlišnost intenzity fluorescence GFP-IR od obou dalších variant je signifikantní ($p = 2 \times 10^{-16}$), signifikantní je i rozdíl mezi antiGFP a GFP-bT, p-hodnota však v tomto případě byla mnohem blíže hladině spolehlivosti ($p = 0,004$).



Graf 4.1: Průměrná intenzita fluorescence kalusů získaných po transformaci umlčujícími konstrukty (bez indukce). **(a)** Náhodně vybrané klony při prvním přesazení, **(b)** všechny klony vybrané pro pokusy s umlčováním. Chybové úsečky udávají směrodatnou odchylku.

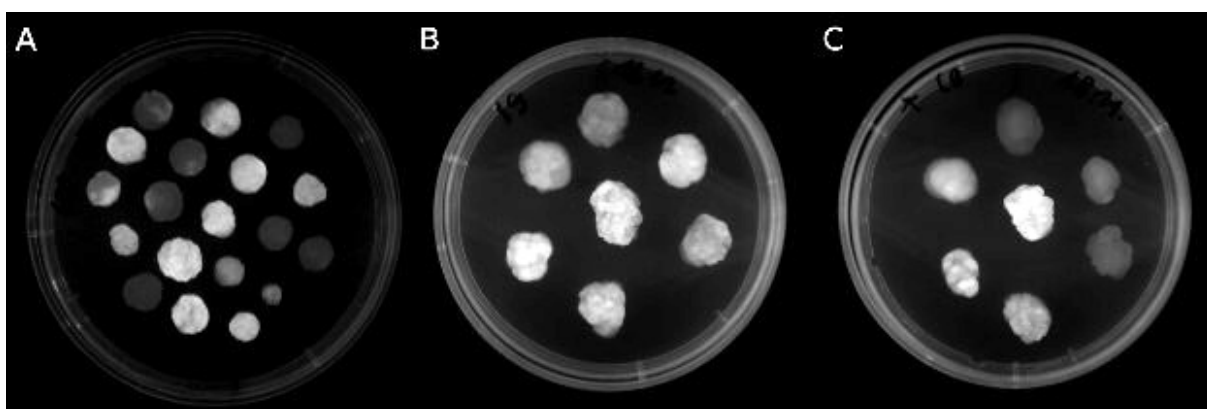
4 Pro lepší srozumitelnost textu je pojem „intenzita fluorescence“ často označován jako „svícení“.



Graf 4.2: Četnost kalusů o daných intenzitách fluorescence získaných po transformaci umlčujícími konstrukty (bez indukce), kategorie 1 zahrnuje intenzity 0-4999, hodnoty pak pokračují dále po 2000 až do hodnoty 26999 (horní hranice 12. kategorie)

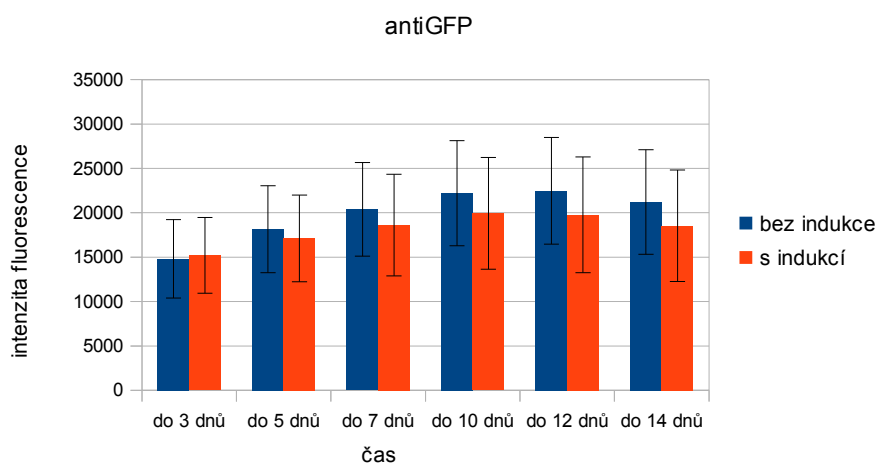
Vzhledem k tomu, že řada kalusů nesvítla či svítla velmi slabě, byly odebrány ještě další kalusy získané po transformaci. Tentokrát však již nebyly náhodně vybrány, ale byly vybírány na základě fluorescence (35 kalusů od antiGFP a GFP-bT, 72 od GFP-IR)

Na těchto klonech byl následně sledován průběh umlčování. Byly vybrány svítící kalusy (hodnoceno subjektivně), jejichž průměrné hodnoty intenzity fluorescence pro každou variantu jsou uvedeny na grafu Chyba: zdroj odkazu nenalezen ve sloupcích označených jako (b). Každý z kalusů byl rozpůlen vedví, jedna půlka kalusu byla přesazena na médium bez indukce (sloužila jako kontrola) a druhá půlka byla přesazena na médium s indukcí (viz Obr. 4.6). Následně byla měřena fluorescence po dobu 14 dnů v intervalu 2-3 dny. Celkem bylo takto analyzováno 105 klonů od antiGFP, 119 klonů od GFP-bT a 70 klonů od GFP-IR.

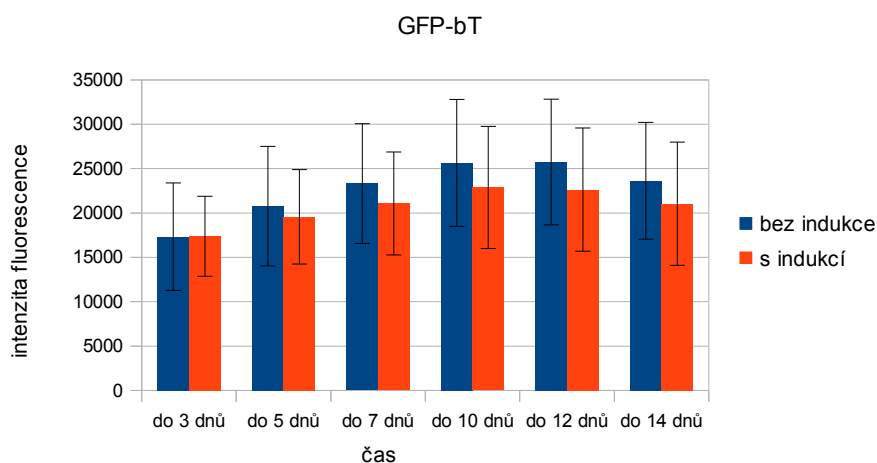


Obr. 4.6: Příklad sledování fluorescence kalusů: A – kalusy přesazené po transformaci (GFP-bT), B a C – pokusy s indukcí umlčování (GFP-IR, 7. den od přesazení), B je na médiu bez indukce a C je na médiu s indukcí. Pozice klonů na misce s médiem bez indukce (B) odpovídá pozici na misce s indukcí (C).

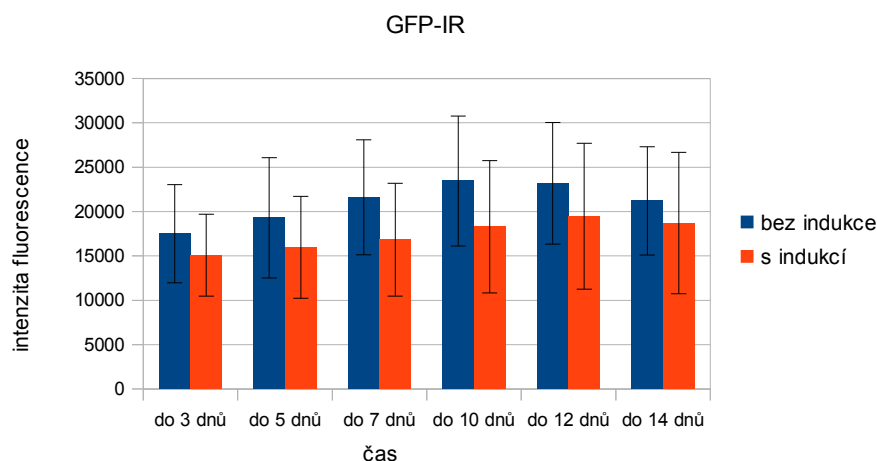
Konkrétní hodnoty průměrné intenzity fluorescence ze všech měření jsou v grafech 4.3, 4.4 a 4.5. Z těchto hodnot byla vypočítána „míra umlčení“ – tedy relativní pokles intenzity fluorescence kalusů na médiu s indukcí vzhledem k intenzitě fluorescence kalusů na médiu bez indukce, tj. „míra umlčení“ = $100 - (IF \text{ indukce} / IF \text{ bez indukce}) \times 100$ [%] (shrnuto v Tab. 4.1).



Graf 4.3: Srovnání průměrné intenzity fluorescence kalusů s antiGFP na médiu bez indukce a s indukcí v čase po indukci, chybové úsečky udávají směrodatnou odchylku



Graf 4.4: Srovnání průměrné intenzity fluorescence kalusů s GFP-bT na médiu bez indukce a s indukcí v čase po indukci, chybové úsečky udávají směrodatnou odchylku



Graf 4.5: Srovnání průměrné intenzity fluorescence kalusů s GFP-IR na médiu bez indukce a s indukcí v čase po indukci, chybové úsečky udávají směrodatnou odchylku

Statistická významnost rozdílu intenzity fluorescence mezi kalusy na médiu bez indukce a s indukcí byla stanovena párovými testy. Kromě měření ve 3. dni pro antiGFP a GFP-bT jsou všechny rozdíly signifikantní, konkrétní výsledky p-hodnoty pro data ze 7. dne měření: antiGFP – $1,7 \times 10^{-4}$ (párový t-test), GFP-bT – $1,1 \times 10^{-4}$ (Wilcoxonův test) a GFP-IR – $1,1 \times 10^{-9}$ (Wilcoxonův test).

Tab. 4.1: Průměrná míra umlčení (%)

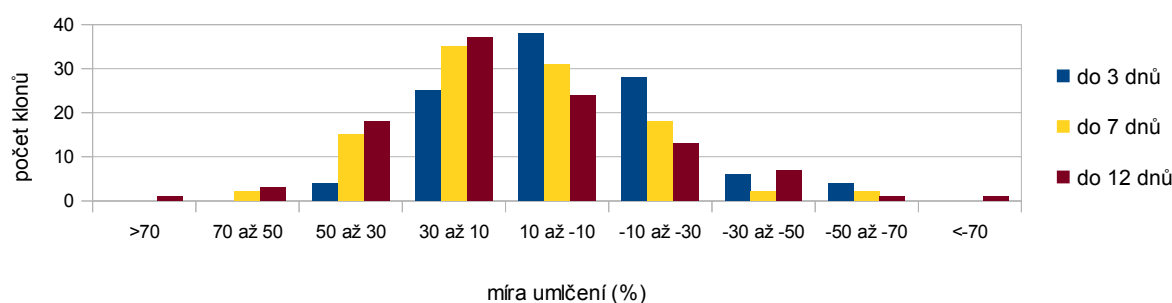
varianta	do 3 dnů	do 5 dnů	do 7 dnů	do 10 dnů	do 12 dnů	do 14 dnů
antiGFP	-5,22	3,80	7,16	8,51	9,83	10,50
GFP-bT	-5,70	1,71	6,42	7,99	9,64	9,29
GFP-IR	11,72	15,40	21,68	21,87	16,56	12,29

Rozdíl v míře umlčení mezi antiGFP a GFP-bT není prokazatelný, liší se však míra umlčení GFP-IR v porovnání jak k antiGFP, tak k GFP-bT a to až do 10. dne měření, poté přestává být rozdíl signifikantní (porovnáváno Kruskal-Wallisovým testem). Konkrétní výsledky p-hodnoty v 7. dni měření: antiGFP v porovnání s GFP-bT – 0,93, antiGFP v porovnání s GFP-IR – $1,9 \times 10^{-5}$ a GFP-bT v porovnání s GFP-IR – $7,3 \times 10^{-6}$.

Míra umlčení u GFP-bT roste až do 12. dne, rozdíl mezi 12. a 14. dnem již není signifikantní. Stejně tak i míra umlčení u antiGFP roste až do 12. dne, nicméně už rozdíl mezi 10. a 12. dnem je jen velmi těsně pod hladinou spolehlivosti ($p = 0,0499$; ověřováno párovým t-testem). Míra umlčení u GFP-IR roste do 7. dne, rozdíl mezi 7. a 10. dnem signifikantní není a poté začíná míra umlčení klesat (všechny výsledky byly ověřovány párovými testy).

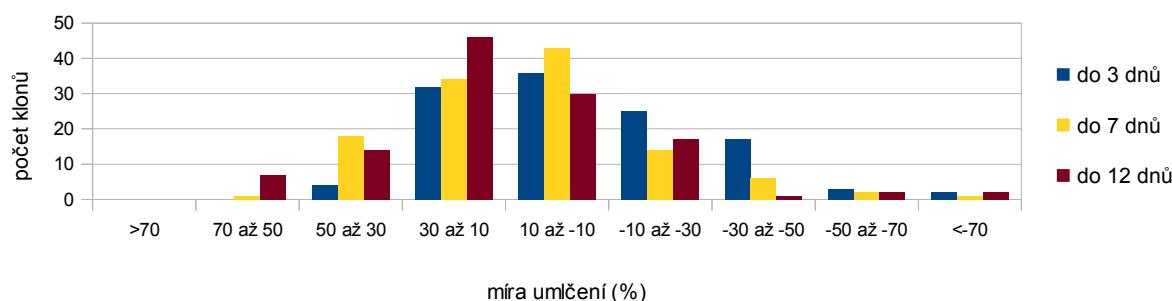
Z grafů 4.6, 4.7 a 4.8 lze vyčíst četnost klonů o dané míře umlčení pro každou variantu.

antiGFP - četnost klonů dle míry umlčení



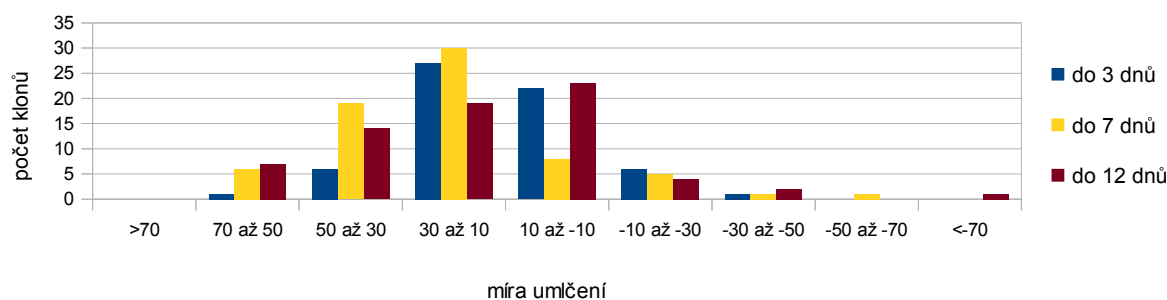
Graf 4.6: Četnosti antiGFP klonů o dané míře umlčení ve třech různých časech měření.

GFP-bT - četnost klonů dle míry umlčení



Graf 4.7: Četnosti GFP-bT klonů o dané míře umlčení ve třech různých časech měření.

GFP-IR - četnost klonů dle míry umlčení

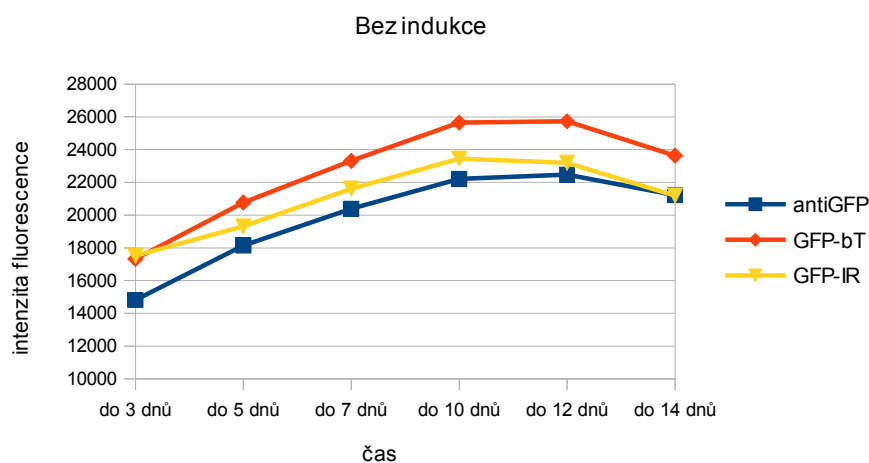


Graf 4.8: Četnosti GFP-IR klonů o dané míře umlčení ve třech různých časech měření.

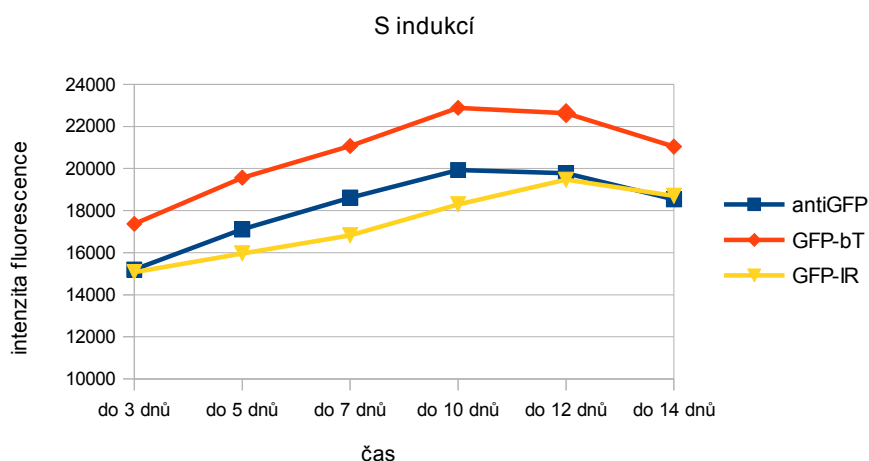
Na grafech 4.9 a 4.10 jsou vzájemná porovnání průběhů průměrných intenzit fluorescence všech kalusů z jednotlivých variant bez a s indukcí. Průběh křivek popisujících vývoj intenzity fluorescence u variant antiGFP a GFP-bT se významně neliší (s jedinou výjimkou mezi 12. a 14. dnem na médiu bez indukce; porovnány byly relativní přírůstky/úbytky pomocí dvouvýběrových testů), GFP-bT však dosahuje celkově vyšších

intenzit fluorescence. Naproti tomu průběh křivky popisující vývoj intenzity fluorescence GFP-IR se od obou zbylých variant liší – na médiu bez indukce z 3. na 5. den roste pomaleji a poté již má křivka obdobný průběh jako u obou zbylých variant (pouze mezi 7. a 10. dnem se významně liší od GFP-bT a mezi 12. a 14. dnem se významně liší od antiGFP); na médiu s indukcí mezi 3. a 7. dnem roste pomaleji (o polovinu), mezi 7. a 10. dnem není významný rozdíl, mezi 10. a 12. dnem pak roste rychleji a mezi 12. a 14. dnem se významně liší pouze od GFP-bT.

Z těchto výsledků je dále patrné, že v průběhu času u variant antiGFP a GFP-bT roste intenzita fluorescence pomaleji na médiu s indukcí oproti médiu bez indukce, tento rozdíl je významný až do 12. dne (porovnány byly relativní přírůstky pomocí párových testů). U GFP-IR roste intenzita fluorescence na médiu s indukcí pomaleji pouze do 7. dne, přírůstek mezi 7. a 10. dnem se výrazně neliší od přírůstku na médiu bez indukce a po 10. dni se trend obrací a přírůstek intenzity fluorescence je vyšší na médiu s indukcí. Pokles míry umlčení u GFP-IR po 10. dni dále tedy může být dán tím, že na médiu s indukcí roste intenzita fluorescence po delší dobu než na médiu bez indukce.

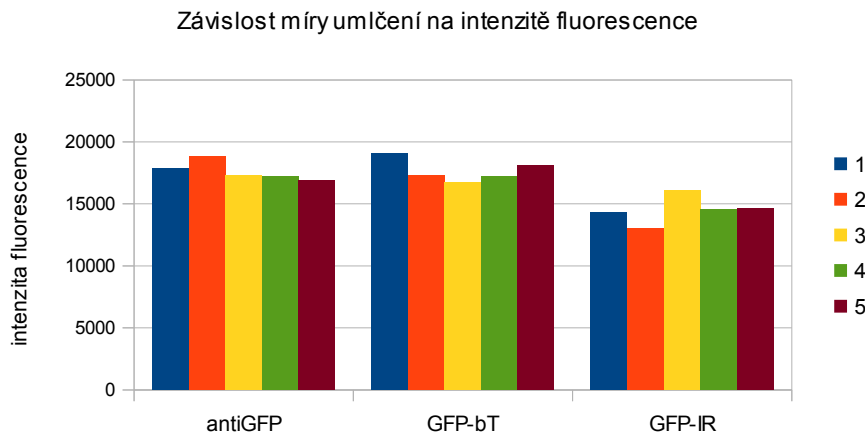


Graf 4.9: Vzájemné srovnání vývoje intenzity fluorescence na médiu bez indukce mezi jednotlivými variantami (průměrné hodnoty všech kalusů).



Graf 4.10: Vzájemné srovnání vývoje intenzity fluorescence na médiu s indukcí mezi jednotlivými variantami (průměrné hodnoty všech kalusů).

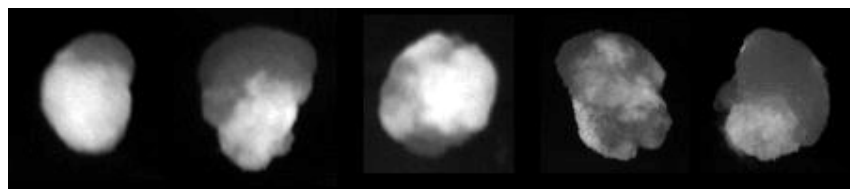
Bylo provedeno srovnání schopnosti umlčovat v závislosti na intenzitě fluorescence jednotlivých klonů. Graf 4.11 znázorňuje průměrné intenzity fluorescence kalusů po transformaci, tedy ještě před začátkem experimentu s umlčováním. Tato měření jsou rozdělena do pěti skupin podle míry umlčení v 7. den měření. Z grafu nevyplývá žádná zjevná závislost.



Graf 4.11: Průměrné míry umlčení kalusů před zahájením pokusů s umlčováním. Klony jsou rozděleny do pěti kategorií, podle míry umlčení v 7. den měření. Kategorie 1 je pětina klonů s nejvyšší mírou umlčení, kategorie 2 je pětina klonů s 2. nejvyšší mírou umlčení atd. až po kategorii 5, což je pětina klonů s nejnižší mírou umlčení.

V poslední řadě bylo zjišťováno, jestli tyto výsledky nemohly být zkresleny dalšími faktory. Prvním z nich byl fakt, že u některých kalusů nebyla fluorescence homogenní a druhým bylo to, že některé kalusy měly „narezlou“ barvu. Slabé zabarvení dohněda není pro

čerstvé kalusy typické a může naznačovat působení stresu např. v důsledku kontaminace (tu se však prokázat nepodařilo a tento stav nebyl „nakažlivý“ – tj. normálně vypadající kalusy, které rostly na misce s těmi „narezlými“ vypadaly po celou dobu stejně a neměly tendenci s časem „nareznout“). Do skupiny „nehomogenní“ a nebo „narezlé“ byly zařazeny všechny klony, kde aspoň jeden ze dvojice kalusů vykazoval tento fenotyp. Fenotypy byly porovnávány subjektivně, příklady nehomogenních kalusů jsou na Obr. 4.7. Obě tyto skupiny kalusů měly nižší intenzity fluorescence a tento rozdíl byl většinou signifikantní, nicméně vliv na míru umlčování se ani v jednom případě nepodařilo prokázat. Hodnoty pro danou skupinu klonů z 10. dne měření byly vždy porovnány dvouvýběrovými testy se zbytkem klonů, p-hodnoty pro nehomogenní byly $> 0,46$ a pro „narezlé“ byly $> 0,61$. Průměrné míry umlčení pro tyto skupiny jsou v Tab. 4.2.



Obr. 4.7: Příklady kalusů, které byly klasifikovány jako nehomogenní.

Tab. 4.2: Míry umlčení (%) pro nehomogenní a „narezlý“ fenotyp

varianta	nehomogenní			„narezlé“		
	klonů	pozitivní	negativní	klonů	pozitivní	negativní
antiGFP	17	10,82	8,05	18	8,22	8,55
GFP-bT	27	2,52	9,60	28	4,79	8,98
GFP-IR	18	24,06	21,06	6	23,33	21,69

- Položka „pozitivní“ udává průměrnou hodnotu míry umlčení ze všech klonů, který daný fenotyp vykazovaly. Položka „negativní“ udává průměrnou hodnotu míry umlčení ze všech klonů, který daný fenotyp nevykazovaly.

4.1.3 Opakování indukce umlčování s vybranými klony

Na základě předchozích výsledků bylo vybráno 6 dobře umlčujících klonů od každé varianty. Na těchto klonech byl jednak předchozí pokus zopakován a jednak byly také odzkoušeny další dvě varianty ošetření: použití pětinasobné koncentrace estradiolu a aplikace estradiolu na povrch kalusu (tj. kromě estradiolu v médiu byl na čerstvě přesazený kalus přidán ještě další v podobě 20 μ l tekutého MS média s 2 μ M β -estradiolu).

Výsledné míry umlčení pro 12. den jsou uvedeny v tabulce 4.3. Výsledek z prvního měření a z opakování je u antiGFP stejný ($p = 1,00$), u GFP-bT byla míra umlčení při druhém měření nižší, ale tento rozdíl nebyl v daném vzorku významný ($p = 0,16$), u GFP-IR byla míra umlčení při druhém měření také nižší a tento rozdíl byl na hranici hladiny spolehlivosti ($p = 0,05$).

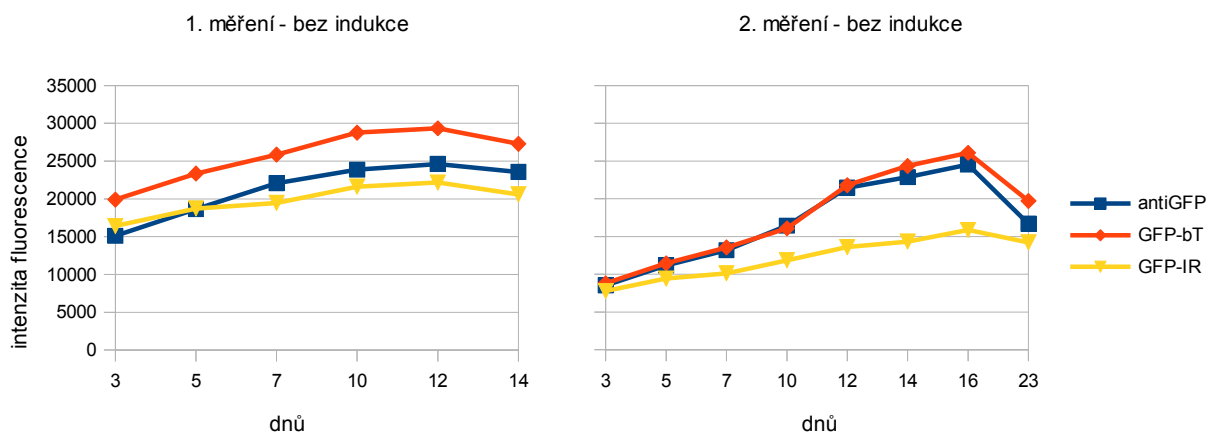
Umlčení se mezi variantami indukce: 2 μM estradiolu a 2 μM estradiolu s přidáním dalšího estradiolu na povrch kalusu, nijak signifikantně neliší ($p > 0,17$). Mezi variantami indukce: 2 μM estradiolu a 10 μM estradiolu, je umlčení na vyšší koncentraci estradiolu nižší (pro antiGFP není rozdíl významný: $p = 0,06$; pro GFP-bT a GFP-IR významný je: $p < 0,02$). Všechny tyto výsledky byly ověřeny párovými testy.

Tab. 4.3: **Průměrná míra umlčení (%)**

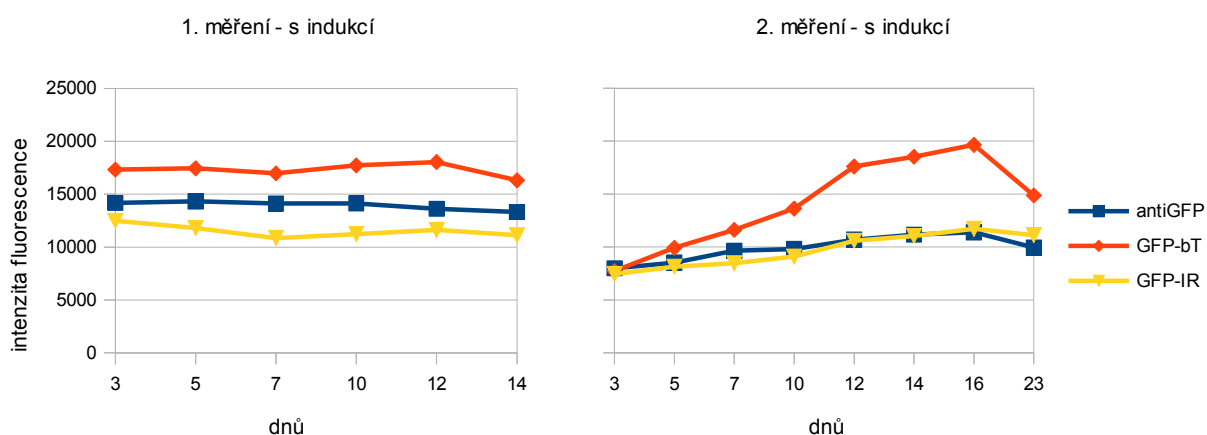
varianta	1. měření	2. měření		
	2E	2E	2E+	10E
antiGFP	42,97	43,90	37,24	30,07
GFP-bT	36,98	16,00	18,37	1,24
GFP-IR	44,53	20,96	15,01	8,00

- Výsledky jsou uvedeny pro 12. den měření. 2E je míra umlčení při 2 μM estradiolu na indukčním médiu, 2E+ je míra umlčení při 2 μM estradiolu na indukčním médiu s přidáním dalšího estradiolu na povrch kalusu a 10E je míra umlčení při 10 μM estradiolu na indukčním médiu.

Na grafech 4.12 a 4.13 je možné srovnat průběh intenzity fluorescence z prvního pokusu (1. měření) a z opakování pokusu (2. měření; pouze varianta 2E). Při opakování pokusu byly počáteční intenzity mnohem nižší a intenzita fluorescence dosahovala maxima později. Vzhledem k nízkému počtu měřených klonů není většina pozorovaných rozdílů statisticky signifikantních. Jedním statisticky významným rozdílem v intenzitách fluorescence ve 12. den měření je rozdíl u GFP-IR na médiu bez indukce mezi prvním a druhým pokusem ($p = 0,02$; ověřeno párovým testem).



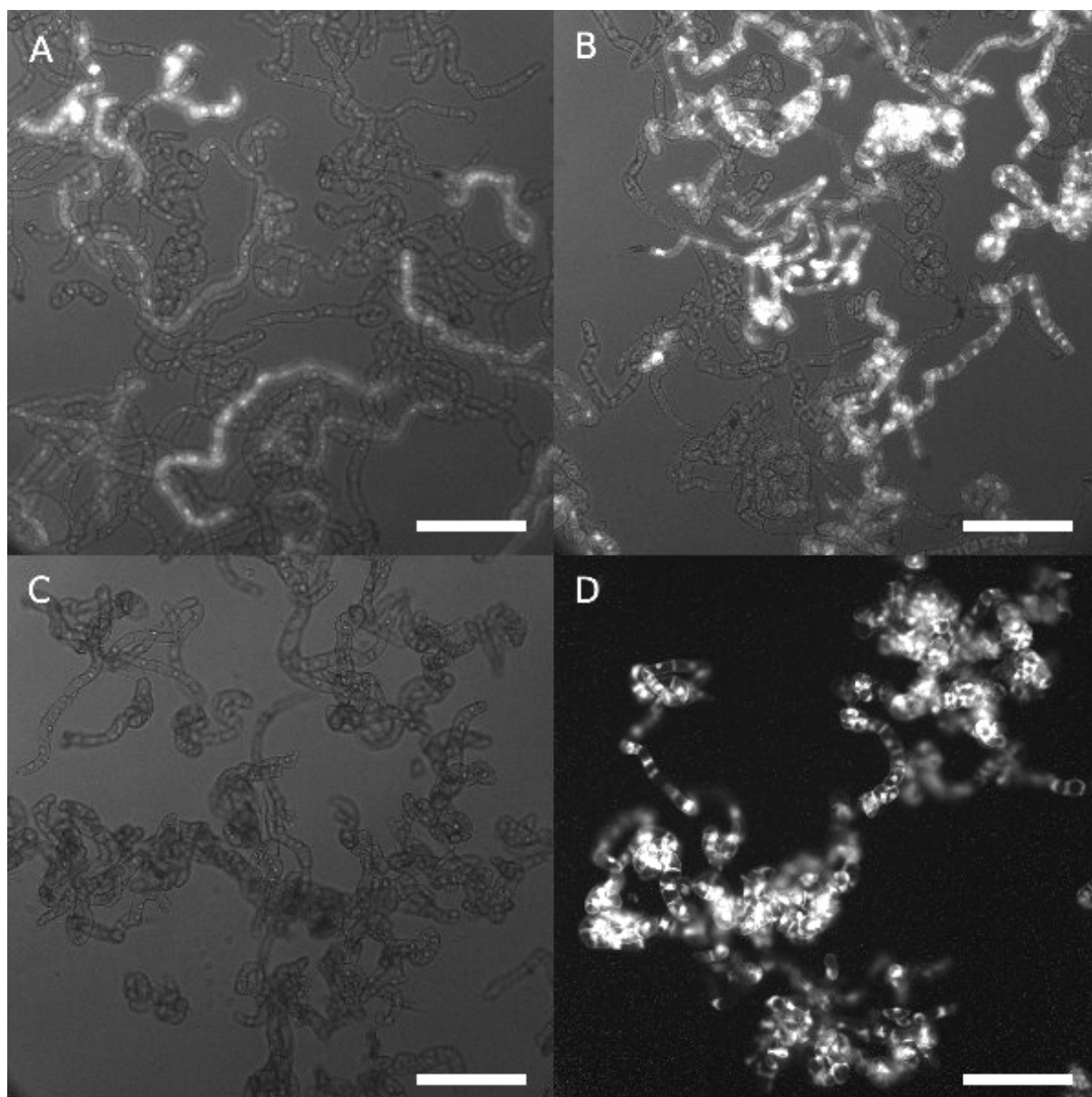
Graf 4.12: Vzájemné srovnání vývoje průměrné intenzity fluorescence na médiu bez indukce mezi jednotlivými variantami (stejných šest klonů na variantu) v prvním pokusu a v opakovaném pokusu.



Graf 4.13: Vzájemné srovnání vývoje průměrné intenzity fluorescence na médiu s indukcí mezi jednotlivými variantami (stejných šest klonů na variantu) v prvním pokusu a v opakovaném pokusu.

V dalším kroku bylo umlčování zopakováno v suspenzních kulturách, tento pokus byl proveden ve spolupráci s kolegou Dimitrijem Tyčem. Od každé varianty byly vybrány tři dobře umlčující klony a byly převedeny do tekutého média. Kultivace probíhala standardně. Do média, ve kterém byly suspenze sloužící jako kontrola, bylo přidáno DMSO, které množstvím odpovídalo DMSO, jež bylo přidáno spolu s estradiolem do indukčního média (tedy 3 μ l na baňku). Pátý a sedmý den kultivace byly buňky nasnímány pod mikroskopem

(výsledky pro 5. den jsou na Obr. 4.8) a bylo spočteno množství svítících a nesvítících buněk, zastoupení nesvítících buněk u jednotlivých klonů je uvedeno v tabulce 4.4.



Obr. 4.8: Fluorescence GFP u buněk v suspenzní kultuře 5. den po indukci umlčování. A – antiGFP (klon 5F), B – GFP-bT (klon 4C), C – GFP-IR (klon 8C) a D – GFP-IR před indukci umlčování. Měřítka: 300 μm .

Tab. 4.4: Procento buněk bez pozorovatelné fluorescence GFP při umlčování v suspenzní kultuře

varianta	klon	5. den		7. den	
		indukce	kontrola	indukce	kontrola
antiGFP	5F	70	0	85	0
	11C	66	20	82	-
	13D	75	-	76	-
GFP-bT	1E	16	0	61	0
	3D	13	0	50	0
	4C	50	0	54	0
GFP-IR	1G	100	20	-	-
	8C	100	0	100	0
	9B	75	20	87	0

- Tam, kde jsou proškrtlá pole, kultura špatně narostla, a tak výsledek nebyl analyzován.

4.1.4 Dodatečné kontroly

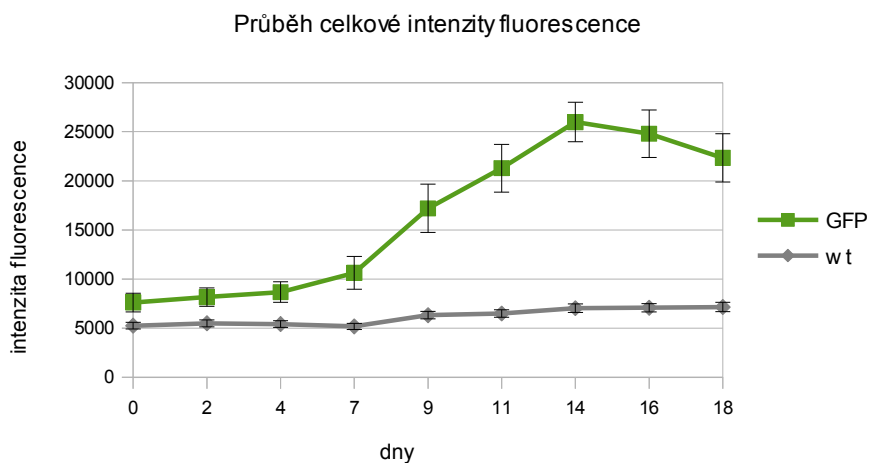
Vzhledem k tomu, že v pokusech s kalusy nebyla zahrnuta kontrola, která by zohledňovala vliv DMSO, a kontrola testující vliv koncentrace estradiolu na samotnou expresi GFP (pod konstitutivním promotorem) a celkové chování kalusů BY-2, byl proveden pokus sledující vliv různého množství DMSO a estradiolu jednak na ničím netransformované BY-2 a jednak na BY-2 stabilně exprimující GFP pod 35S promotorem. Na netransformované BY-2 (dále jen wt) a BY-2 exprimující GFP (ten samý klon, který je použitý pro supertransformaci v kapitole 4.1.2, dále jen GFP) bylo aplikováno 7 různých ošetření:

- čisté MS médium (dále jen K)
- DMSO s MS médiem v poměru 1:10000 (2D; odpovídá přidání estradiolu do cílové koncentrace 2 μ M)
- MS médium s 2 μ M estradiolu (2E)
- DMSO s MS médiem v poměru 1:10000 a přidání 20 μ l stejně upraveného tekutého MS média na povrch kalusu (2D+)
- MS médium s 2 μ M estradiolu a přidání 20 μ l stejně upraveného tekutého MS média na povrch kalusu (2E+)
- DMSO s MS médiem v poměru 1:2000 (10D; odpovídá přidání estradiolu do cílové koncentrace 10 μ M)

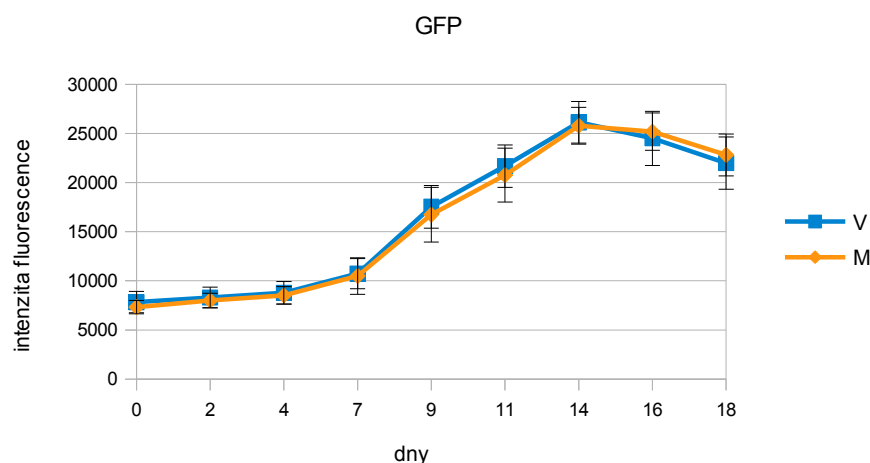
- MS médium s 10 μ M estradiolu (10E)

Uspořádání pokusu bylo stejné jako v předchozích případech (7 kalusů na misku, snímání po 2-3 dnech). Od každého ošetření bylo 7 wt kalusů a 7 GFP kalusů (celkem tak v pokusu bylo 98 kalusů). GFP a wt kalusy byly na miskách vzájemně promíseny. Kromě těchto faktorů byl sledován vliv velikosti přesazeného kalusu na intenzitu fluorescence, některé kalusy tak byly přesazeny menší (3 od wt a GFP z každého ošetření) a některé byly přesazeny větší (4 od wt a GFP z každého ošetření; kalusy co jsou zde uvedeny jako „větší“ byly přibližně dvakrát větší, než ty, co jsou uvedeny jako „menší“).

Na grafu 4.14 je vynesena vývoj intenzity fluorescence kalusů transformovaných GFP a také vývoj intenzity fluorescence netransformovaných BY-2 (tedy v podstatě fluorescence pozadí), která se v závislosti na stáří kalusu pohybuje od 5000 až mírně nad 7000. Z grafu 4.15 je pak vidět, že intenzita fluorescence nezávisí na velikosti přesazovaného kalusu, což bylo pro 9. den měření ověřeno dvouvýběrovým testem a žádný rozdíl se prokázat nepodařilo ($p = 0,2777$).

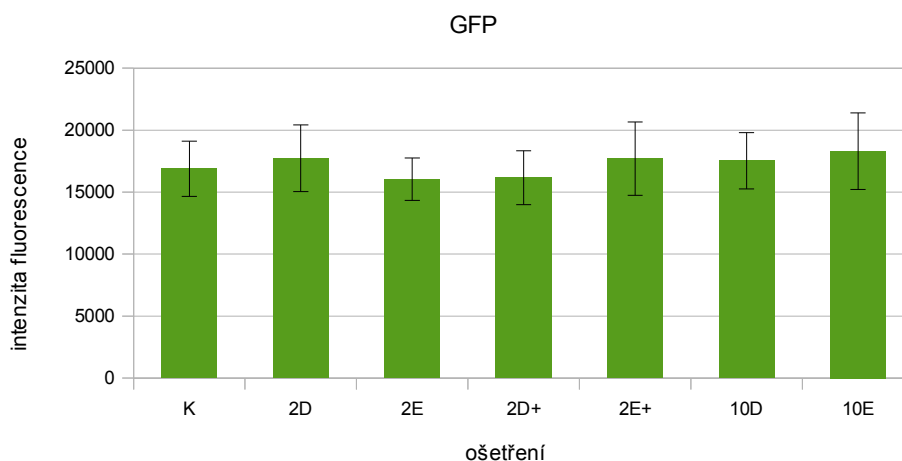


Graf 4.14: Vývoj zprůměrované intenzity fluorescence kalusů s GFP a netransformovaných kalusů (wt), chybové úsečky udávají směrodatnou odchylku.



Graf 4.15: Vývoj intenzity fluorescence kalusů transformovaných GFP, V – větší kalusy, M – menší kalusy, chybové úsečky udávají směrodatnou odchylku.

Graf 4.16 ukazuje závislost intenzity fluorescence kalusů transformovaných GFP na typu ošetření v 9. den měření. Tyto intenzity fluorescence byly porovnány dvouvýběrovými testy a u žádného z ošetření se nepodařilo prokázat rozdíl oproti kontrole ($p > 0,34$). Stejně srovnání bylo provedeno i pro netransformované kalusy a ani zde nebyl oproti kontrole prokázán významný rozdíl ($p > 0,07$).



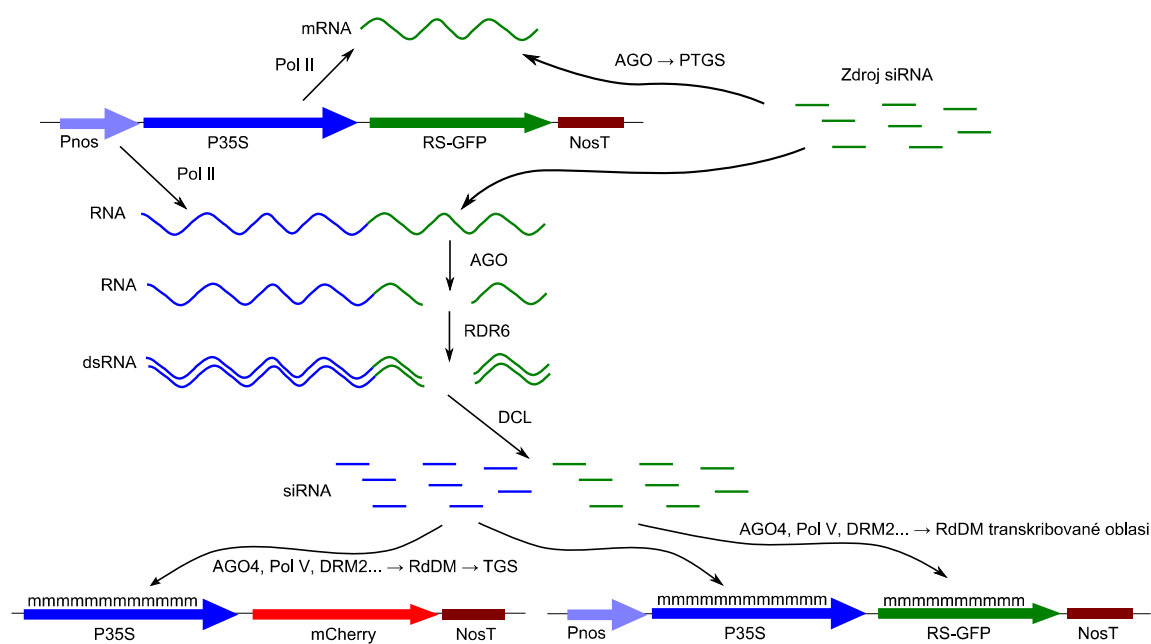
Graf 4.16: Průměrné intenzity fluorescence 9. den měření při různých ošetřeních (vysvětlivky popisků v textu), chybové úsečky udávají směrodatnou odchylku.

4.2 Indikátorové linie

Další náplní diplomové práce byla příprava tzv. indikátorových linií – transformovaných linií BY-2 pro sledování přechodu od PTGS k TGS. Tento systém je navržen tak, aby umožnil snadno vizuálně sledovat jednotlivé kroky tohoto procesu pomocí

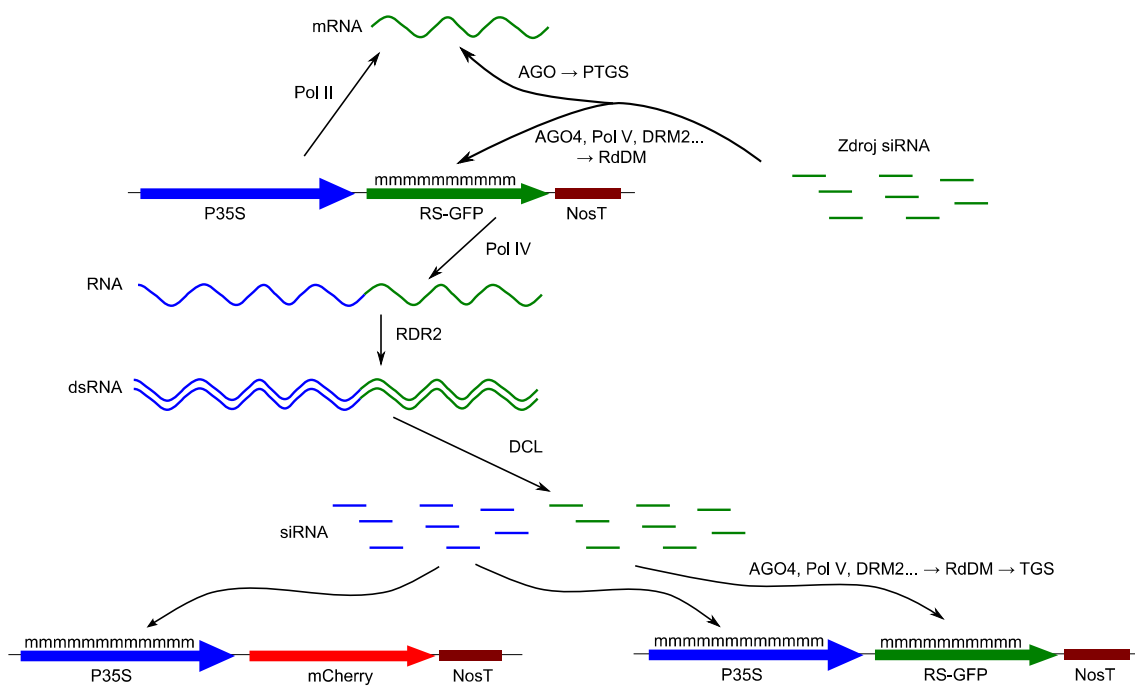
fluorescenčních proteinů. Systém má v principu fungovat následovně: indukuje se (posttranskripční) umlčování RS-GFP (viz kapitola 4.1) a jak bude toto umlčování postupně přecházet na TGS, tak buďto v souvislosti s metylací transkribované sekvence a nebo v souvislosti s metylací promotoru, dojde k (transkripčnímu) umlčení mCherry. Úspěšné spuštění primárního PTGS by bylo pozorováno jako ztráta zelené fluorescence a daný krok přechodu na TGS by byl pozorován jako ztráta červené fluorescence.

Umlčení mCherry při metylaci transkribované sekvence má být dosaženo tím, že před RS-GFP jsou dva různé promotory (viz schéma na Obr. 4.9). Druhý promotor (P35S), který je identický s promotorem před mCherry, tak bude přepisován a jeho sekvence tedy bude přítomna na některých transkriptech spolu s RS-GFP. Takové transkripty budou štěpeny siRNA proti RS-GFP a následně principem tranzitivity (viz kapitola 2.2.2) by mělo dojít ke vzniku siRNA i proti sekvenci promotoru. Ve stejnou chvíli budou v buňce vznikat siRNA proti RS-GFP i proti P35S. Spolu s metylací kódující sekvence RS-GFP by tak mělo dojít také k metylaci P35S, a tím i umlčení mCherry.



Obr. 4.9: Schéma systému pro detekci metylace transkribované oblasti

Umlčení mCherry při metylaci promotoru RS-GFP bude dosaženo tím, že před RS-GFP a mCherry je stejný promotor (P35S; viz schéma na Obr. 4.10). siRNA navozující *de novo* metylaci promotoru před RS-GFP budou tedy fungovat i na promotoru před mCherry a k metylaci obou promotorů by tak mělo dojít zároveň.



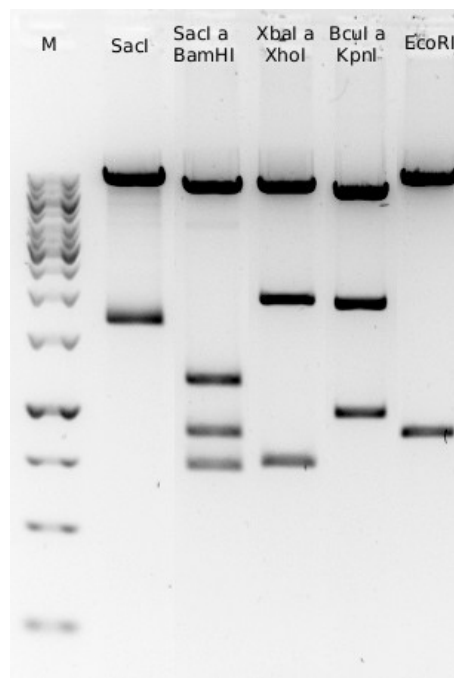
Obr. 4.10: Schéma systému pro detekci metylace promotoru

Plazmidy s konstrukty pro indikátorové linie nesou stejné geny resistance pro selekci v rostlinách, jako plazmidy s konstrukty pro indukci umlčování. Odlišné resistance nebylo možné použít z důvodu, že je plánováno linie BY-2 v budoucnu supertransformovat ještě dalšími konstrukty (např. pro změny exprese RDR6) a k dispozici jsou pouze dvě resistance (k hygromycinu a kanamycinu). Jelikož kotransformace dvěma konstrukty se stejnou resistencí nedává příliš velký podíl kotransformovaných klonů a jejich selekce je zdlohavější než se předpokládalo, byly připraveny i konstrukty pro indikátorové linie, které nenesou žádnou resistenci a umožňují tak kotransformované klony selektovat na základě přítomnosti fluorescence.

4.2.1 Tvorba konstruktů

Základem k tvorbě konstruktů pro indikátorové linie byl plazmid pGreen 0129 mCherry STOP (viz kapitola 3.2.1). V prvním kroku byl tento plazmid štěpen enzymy BamHI a SmaI, zároveň byl plazmid psmRS-GFP štěpen napřed enzymem EcoRI, načež následovalo zatupení konců, a dále pak byl štěpen enzymem BamHI. Produkty štěpení byly rozděleny pomocí elektroforézy a příslušné fragmenty byly vyizolovány z gelu (linearizovaný pGreen – nejdelší fragment a RS-GFP+NosT – přibližně 1 kbp fragment). Z několika získaných bakteriálních klonů byl plazmid vyizolován a ověřen restričním štěpením pomocí Sall a BamHI. Výsledný plazmid byl označen jako pGreen-IL2.

V druhém kroku byl plazmid pGreen 0129 mCherry STOP štěpen napřed enzymem SacI, načež následovalo zatupení konců, a poté enzymem HindIII. Plazmid pGreen-IL2 byl napřed štěpen enzymem EcoRI a opět následovalo zatupení konců a poté byl štěpen enzymem HindIII. Produkty štěpení byly rozděleny pomocí elektroforézy a příslušné fragmenty (linearizovaný pGreen-IL2 – nejdelší fragment a 35S promotor – přibližně 840 bp fragment) byly vyizolovány z gelu. Poté, co byly bakterie transformované ligační směsí vysety na selekční médium, došlo k tomu, že narostly kolonie dvou různých velikostí. Po izolaci plazmidů z několika vybraných klonů se ukázalo, že fragmenty restričního



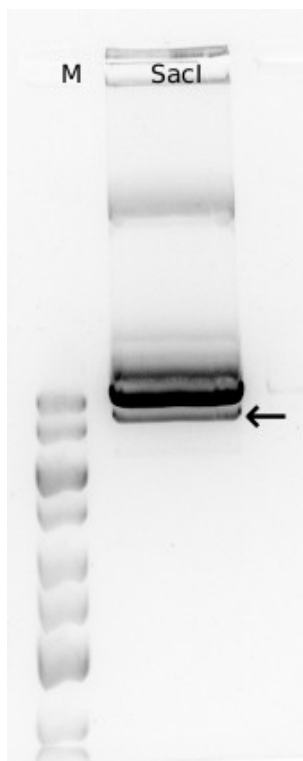
Obr. 4.11: kontrolní štěpení pGreen-IL-SP; M – marker

štěpení neodpovídají očekávání a liší se i mezi klony navzájem (štěpeno BamHI a HindIII a posléze i dalšími kombinacemi restričních enzymů). Z některých klonů se nepodařilo plazmid ani vyizolovat (přestože se vytvořily kolonie na selekčním médiu). Po otestování 21 různých klonů bylo usouzeno, že přítomnost dvou 35S promotorů v konstrukt způsobuje, že kmen bakterií DH5α daný konstrukt rekombinuje. Ta samá ligační směs tak byla elektroporována do kmene bakterií JM109. Po získání jednotlivých kolonií byl plazmid z devíti z nich vyizolován a ověřen restričním štěpením pomocí BamHI a HindIII – plazmid ze sedmi klonů byl ověřen jako správný, jeden z plazmidů se vyizolovat nepodařilo a druhý byl bez vloženého insertu (tj. vkládaného 35S promotoru). Jeden z vybraných klonů byl ověřen ještě dalšími kombinacemi restričních enzymů (viz Obr. 4.11). Získaný konstrukt nesl pracovní označení pGreen-IL-SP a byl již cílovým konstruktem pro detekci přechodu metylace do promotoru.

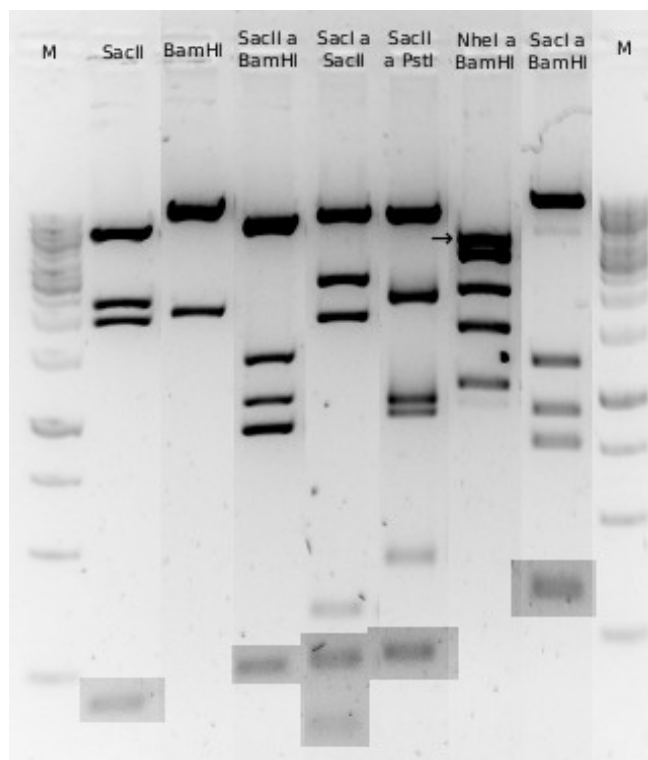
Ve třetím kroku byl připraven konstrukt pro detekci metylace transkribované sekvence. Napřed byl pomocí primerů PnosF a PnosR amplifikován nopalín syntázový promotor (Pnos) a vložen do pomocného plazmidu pDrive (vlození bylo ověřeno štěpením pomocí EcoRI a sekvenací). Následně byl plazmid pDrive-Pnos štěpen pomocí enzymu SacI a plazmid pGreen-IL-SP byl částečně štěpen (parciální digescce) tímž enzymem. Produkty štěpení byly rozděleny pomocí elektroforézy na 0,8% gelu a příslušné fragmenty byly vyizolovány (asi 320 bp fragment po štěpení pDrive-Pnos a ten nejkratší z fragmentů nad 9 kbp po štěpení pGreen-IL-SP – viz Obr. 4.12). Po získání bakteriálních klonů byla ověřována přítomnost

insertu a jeho správná orientace a pozice v konstruktu pomocí PCR s využitím primerů PnosF a 35S50. Jelikož docházelo k recirkularizaci plazmidu podařilo se mezi 194 klony bakterií najít pouze tři, které dávaly pozitivní signál. Pomocí řady restričních štěpení těchto tří klonů bylo ověřeno, že jeden z nich má správné uspořádání (viz Obr. 4.13). Získaný konstrukt nesl pracovní označení pGreen-IL-DP.

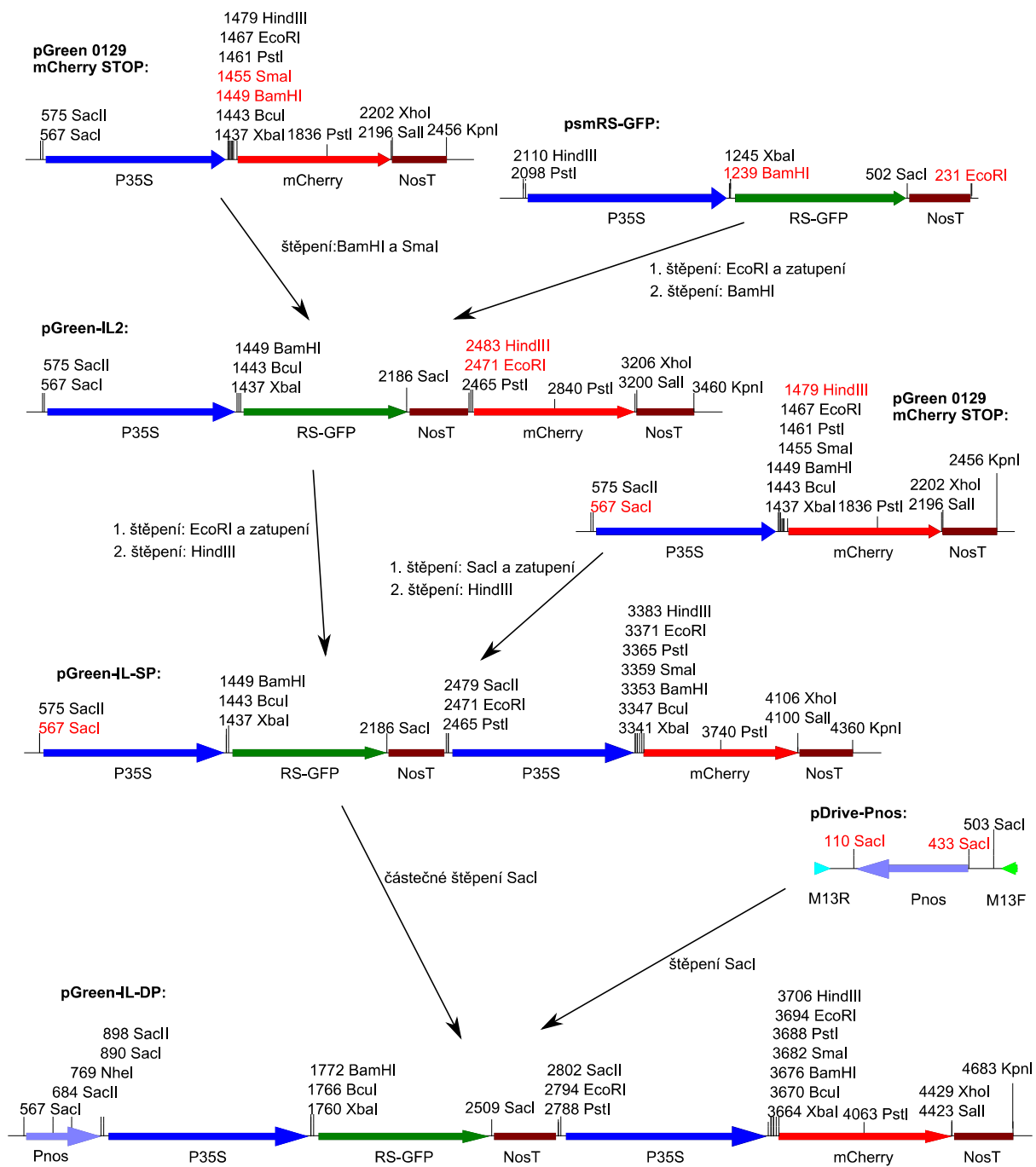
Celý průběh klonování je shrnut na Obr. 4.14.



Obr. 4.12: částečné štěpení pGreen-IL-SP; M – marker; šipka ukazuje fragment, který byl izolován



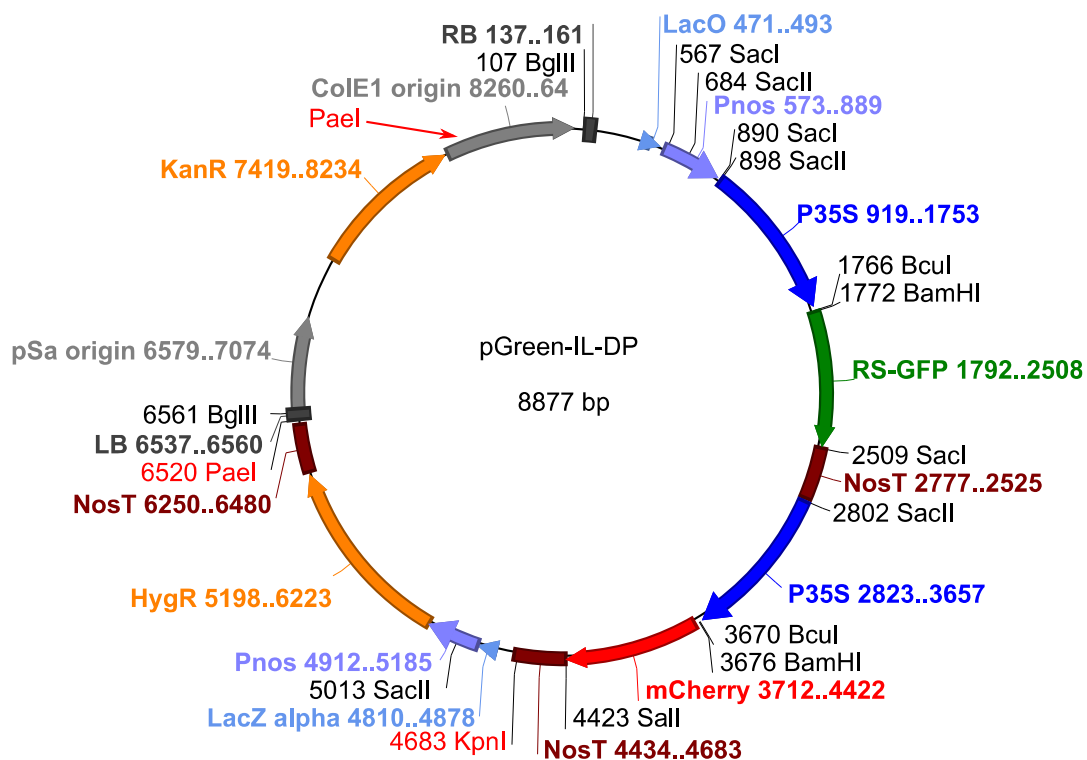
Obr. 4.13: kontrolní štěpení pGreen-IL-DP; M – marker; příliš slabě viditelné fragmenty byly zvýrazněny; šipka značí nedoštěpený fragment



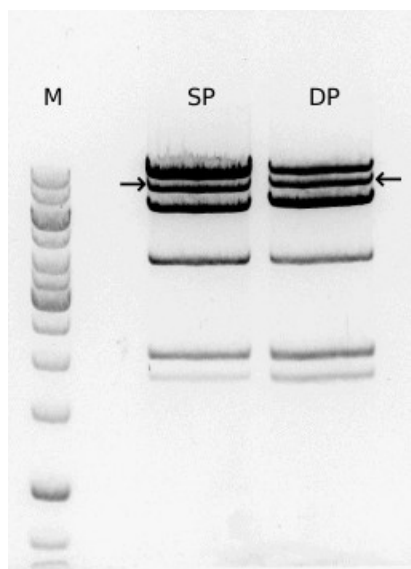
Obr. 4.14: schéma klonování konstruktů pGreen-IL-SP a pGreen-IL-DP

Po přípravě konstruktů pro indikátorové linie byl z těchto konstruktů dodatečně ještě odstraněn gen pro hygromycinovou resistenci. U obou konstruktů (pGreen-IL-SP a pGreen-IL-DP, mapa viz Obr. 4.15) byla reakce provedena stejným postupem. Plazmidy byly v prvním kroku štěpeny KpnI, následně byly částečně štěpeny PaeI (oproti sekvenci plazmidu uvedené na oficiální stránce pGreen, se v plazmidu nachází ještě jedno restrikční místo pro PaeI, pravděpodobně v DNA vložené z bakteriálního genomu, viz kapitola 3.2.1) a produkty

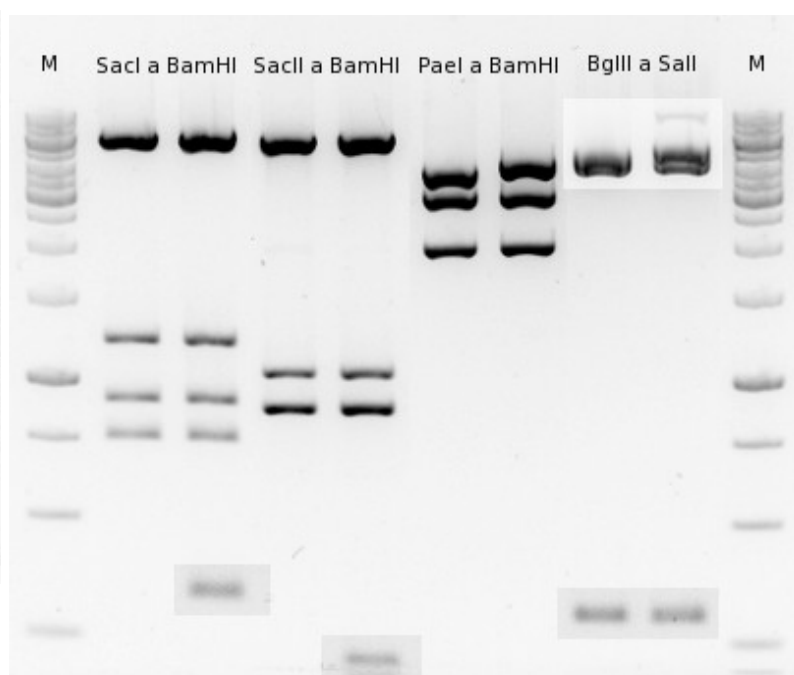
štěpení byly zatupeny. Fragmenty byly rozděleny pomocí elektroforézy na 0,8% gelu a byl vyizolován fragment o přibližné délce 9 kbp (druhý nejdelší, viz Obr. 4.16). Fragment byl cirkularizován a transformován do bakterií, po vyizolování byl plazmid ověřen restričním štěpením (BcuI a PaeI a posléze i dalšími kombinacemi restričních enzymů, viz Obr. 4.17). Výsledné konstrukty byly označeny pGreen-IL-SPnH pro detekci metylace promotoru a pGreen-IL-DPnH pro detekci metylace transkribované sekvence.



Obr. 4.15: mapa pGreen-IL-DP (relevantní části jsou u pGreen-IL-SP stejné), červené názvy enzymů označují restriční místa pro odstranění genu resistance; šipkou je označeno přibližné umístění druhého restričního místa PaeI



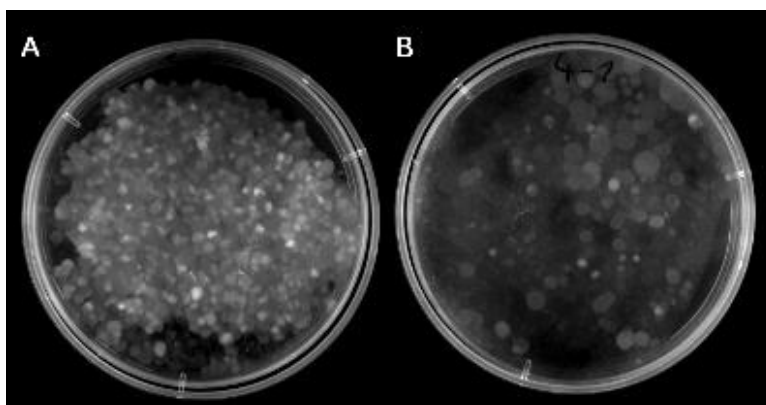
Obr. 4.16: úplné štěpení KpnI a částečné štěpení PaeI; M – marker, SP – pGreen-IL-SP a DP – pGreen-IL-DP; šipky ukazují fragmenty, které byly izolovány



Obr. 4.17: kontrolní štěpení pGreen-IL-SPnH (vždy první ve dvojici) a pGreen-IL-DPnH (vždy druhý ve dvojici); M – marker; příliš slabě viditelné fragmenty byly zvýrazněny

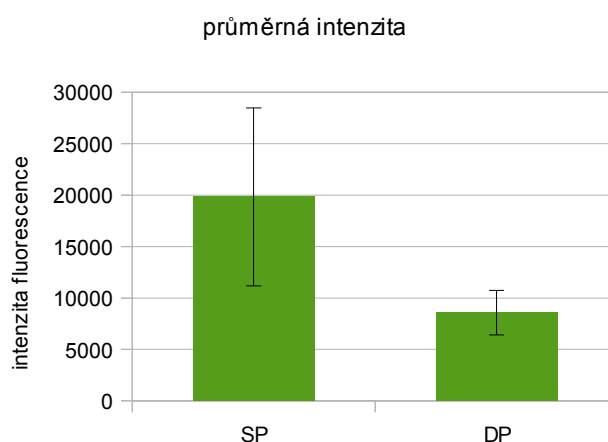
4.2.2 Spouštění umlčování pomocí vlásenky u indikátorových linií

Linie BY-2 byla kotransformována dvěma kombinacemi plazmidů: pGreen-IL-SP s pER8-GFP-IR (dále jen jako varianta SP) a pGreen-IL-DP s pER8-GFP-IR (varianta DP). Po obou transformacích kalusy na médiu se selekcí (hygromycinem) narostly, u varianty SP ve výrazně větším množství (viz Obr. 4.18). Na kontrole žádné kalusy nenarostly. Kalusy byly poté přesazeny na čerstvé médium v počtu přibližně 20 na miskou. Od každé varianty bylo vybráno 49 klonů s nejvyšší fluorescencí GFP (selektce klonů s indikátorovými konstrukty), každý kalus byl rozpuštěn vedví a jedna půlka byla přesazena na médium bez indukce a druhá na médium s indukcí (klony nesoucí zároveň umlčující konstrukt s GFP-IR by měly po indukci umlčet expresi RS-GFP). Kalusy byly následně snímány v intervalu 2-3 dny po dobu 12 dnů.



Obr. 4.18: Kalusy narostlé po transformaci: A – varianta SP, B – varianta DP.

Vlastnost, kterou bylo možné pozorovat již po transformaci, byl zjevný rozdíl v intenzitě fluorescence mezi oběma variantami. U varianty SP se vyskytovaly kalusy, které dosahovaly mnohem vyšších intenzit než u varianty DP. Porovnání průměrné intenzity fluorescence obou variant ze 7. dne měření na médiu bez indukce je na grafu 4.17. Tento rozdíl je statisticky významný ($p = 6,4 \times 10^{-14}$; porovnáváno Kruskal-Wallisovým testem).



Graf 4.17: Průměrní intenzita kalusů na médiu bez indukce 7. den měření, chybové úsečky udávají směrodatnou odchylku.

Průměrná míra umlčení v 7. den měření u obou variant byla -7 %, nejedná se však o statisticky významný rozdíl ($p > 0,17$; porovnáváno Wilcoxonovým testem). I přes to, že se indukce umlčování na celkové průměrné intenzitě nijak neprojevila, tak u obou variant byly klony, které na médiu s indukcí měly nižší intenzitu fluorescence. Konkrétně těch, kde byl pokles více než o 10 % bylo u varianty SP 19 a u varianty DP 12.

Od každé varianty bylo vybráno 8 klonů, u kterých zřejmě mohlo dojít k umlčování. Z těchto klonů byla vyizolována genomová DNA a pomocí PCR byla ověřena přítomnost konstruktů GFP-IR. Pro tuto PCR byly navrženy primery IR_detF a IR_detR, neboť jiné kombinace dostupných primerů dávaly při reakci nespecifický produkt, a výsledky tak nebyly jednoznačné. U varianty SP se přítomnost GFP-IR potvrdila ve čtyřech případech, u varianty DP se přítomnost GFP-IR v žádném z klonů potvrdit nepodařilo. Byla tedy vyizolována DNA z dalších dvanácti klonů od varianty DP, ani u těchto klonů se však pomocí PCR nepodařilo přítomnost GFP-IR prokázat.

Čtyři klony, u kterých byla potvrzena úspěšná kotransformace, byly převedeny do suspenzní kultury. U jednoho z klonů (1E) bylo pozorováno jen velmi málo svítících buněk (pod 10 %) a tak dále testován nebyl. Další dva klony (3G a 4C) vykazovaly celkem dobré úrovně zelené a červené fluorescence a alespoň přes 70 % svítících buněk, avšak nevykazovaly žádnou reakci na ošetření estradiolem. Čtvrtý klon (7D) měl obdobné množství buněk se zelenou fluorescencí, ale červená fluorescence byla téměř nedetekovatelná, tento klon však po ošetření estradiolem dosáhl úplného umlčení zelené fluorescence.

4.3 Příprava konstruktů pro změnu exprese RDR6

Pro zvýšení exprese RNA dependetní RNA polymerázy 6 (RDR6) v tabákové buněčné linii BY-2 byl vybrán gen *RDR6* z *Arabidopsis thaliana* (dále jen *atRDR6*). Konstrukt pro zvýšení exprese RDR6 nese záměrně gen z jiného organismu než je *Nicotiana tabacum*, aby se tak snížilo riziko, že bude exprese tohoto genu v linii BY-2 regulována – některé ze složek RNAi totiž bývají běžně regulovány negativní zpětnou vazbou pomocí malých RNA (viz kapitola 2.2.3). Sekvenční podobnost mezi geny *RDR6* z *A. thaliana* a *N. tabacum* je 69 %.

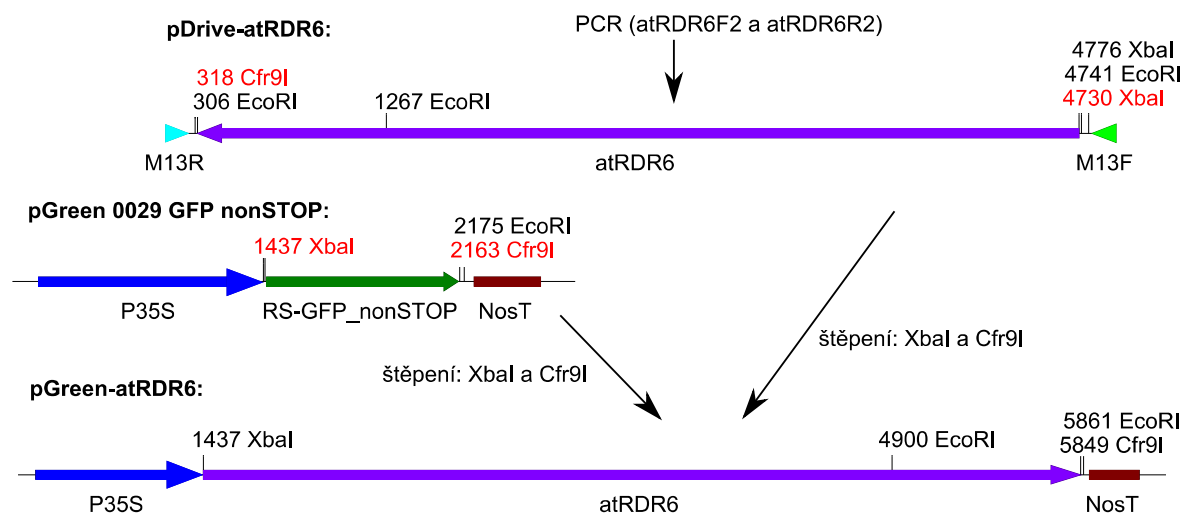
Pro snížení exprese RDR6 v tabákové buněčné linii BY-2 byl vytvořen vlásenkový konstrukt z 5' oblasti genu *RDR6* (necelých 800 bp) vyizolovaného z linie BY-2 (dále jen *ntRDR6*). Vlášenska byla navržena obdobně jako v případě GFP-IR, viz kapitola 4.1.1.

Obě připravené sekvence byly umístěny pod 35S promotor.

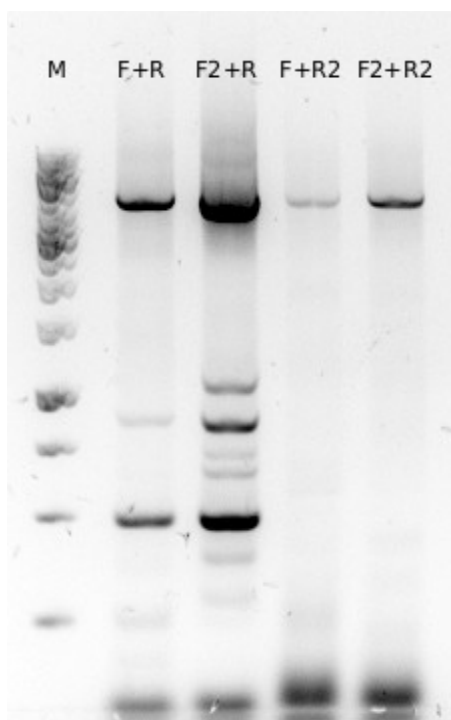
Konstrukt pro zvýšení exprese RDR6 (viz Obr. 4.19): Byla vyizolována DNA z *Arabidopsis thaliana* kultivar *Columbia* (rostlinný materiál pro izolaci poskytl Ondřej Smetana). Na základě sekvence dostupné v TAIR databázi (www.arabidopsis.org) pod označení AT3G49500.1 byly navrženy primery (*atRDR6F* a *atRDR6R*, nasedající v 5' a 3' nepřekládané oblasti) pro izolaci genu *atRDR6* a byla provedena PCR. Koncentrace získaného fragmentu (i při opakování PCR za jiných podmínek) byla velmi nízká, a proto byla navržena

další sada primerů (atRDR6F2 a atRDR6R2) a byla s nimi provedena PCR. Ani s novými primery však nebyla koncentrace výsledného fragmentu nijak vysoká a při ligaci se kýžený konstrukt získat nepodařilo (60 klonů ověřováno pomocí PCR s použitím primerů atRDR6F2 a atRDR6R2 a 6 klonů ověřováno restričním štěpením enzymem EcoRI). Byly tedy vyzkoušeny všechny kombinace připravených primerů, aby se dalo určit, která je nejvhodnější (viz Obr. 4.20). Napřed byla vybrána kombinace atRDR6F2 a atRDR6R (vznikalo nejvíce požadovaného fragmentu i přesto, že vznikal i nespecifický produkt), ovšem s touto kombinací se výsledku nepodařilo dosáhnout (zřejmě kvůli nespecifické amplifikaci; výsledky ověřovány PCR). Proces byl tak opakován znovu s primery atRDR6F2 a atRDR6R2, napřed v původním uspořádání, poté ve dvojnásobném objemu (tj. v reakci bylo: 16,75 μ l vyizolovaného PCR fragmentu, 0,25 μ l pDrive, 2 μ l pufr, 1 μ l T4 ligáza). Ačkoliv se tentokrát podařilo dosáhnout zatím nejvyšší koncentrace požadovaného fragmentu (5 ng/ μ l), po ligaci opět nebyly detekovány žádné klony, které by nesly hledaný konstrukt (108 klonů testováno PCR s primery atRDR6F2 a atRDR6R2), nicméně při kontrolní PCR z ligační směsi se kombinací s primery M13 podařilo získat signál naznačující, že vlastní ligační reakce proběhla v pořádku. Bylo tedy usouzeno, že problém je v detekci správných klonů pomocí PCR. Z 12 vybraných klonů byl plazmid vyizolován a ověřen restričním štěpením pomocí EcoRI a u 10 klonů byl potvrzen hledaný konstrukt. Tři z těchto klonů byly vybrány a ověřeny pomocí sekvenace (kromě M13 primerů byly pro sekvenaci použity i za tímto účelem navržené primery atRDR6_S1-6). Jeden ze získaných klonů nenesl žádnou mutaci (ostatní nesly 7 respektive 9 mutací) a byl tak požit pro následné klonování, plazmid je dále značen pDrive-atRDR6.

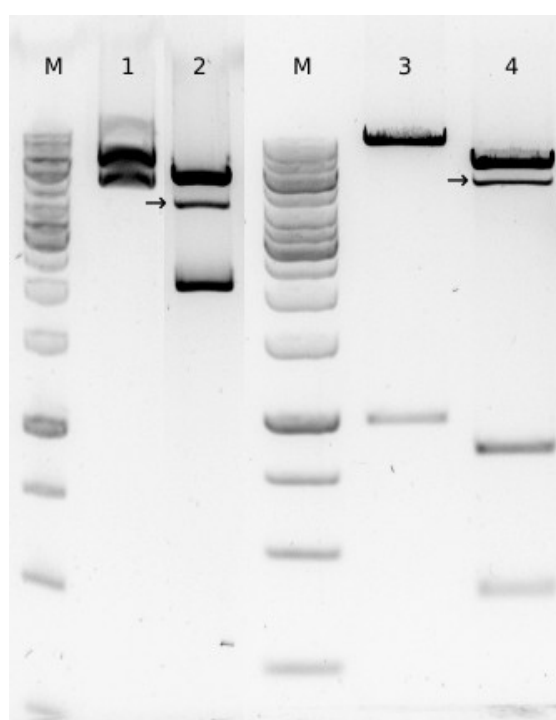
Plazmidy pDrive-atRDR6 a pGreen 0029 GFP nonSTOP byly štěpeny restričními enzymy XbaI a Cfr9I. Produkty štěpení byly rozděleny pomocí elektroforézy a příslušné fragmenty byly vyizolovány (plazmid pGreen – nejdelší fragment a atRDR6 – fragment o přibližné délce 4,4 kbp). Z několika vybraných klonů byl plazmid vyizolován a ověřen restričním štěpením enzymy XbaI a Cfr9I a posléze také enzymem EcoRI (viz Obr. 4.21 dráhy 1 a 3). Plazmid byl označen jako pGreen-atRDR6.



Obr. 4.19: Schéma klonování konstruktů pGreen-atRDR6



Obr. 4.20: testování účinnosti různých kombinací primerů pro amplifikaci *atRDR6* z genomové DNA; M – marker, F až R2 – primery atRDR6F až atRDR6R2



Obr. 4.21: kontrolní štěpení pGreen-atRDR6 (1 – XbaI a Cfr9I, 3 – EcoRI) a pGreen-IR-ntRDR6 (2 – XbaI a PstI, 4 – EcoRI); M – marker (vztahuje se k drahám vpravo); šipka značí DNA, která se do vzorku dostala pravděpodobně jako kontaminace při izolaci plazmidu z bakterií

Konstrukt pro snížení exprese RDR6 (viz Obr. 4.22): Byla vyizolována DNA z tabákové buněčné line BY-2. Na základě sekvence kódující oblasti *ntRDR6* uvedené v GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) databázi pod označením AB361628.1, byly s využitím nástroje BLAST na webových stránkách NCBI dohledány EST (Expressed sequence tags)

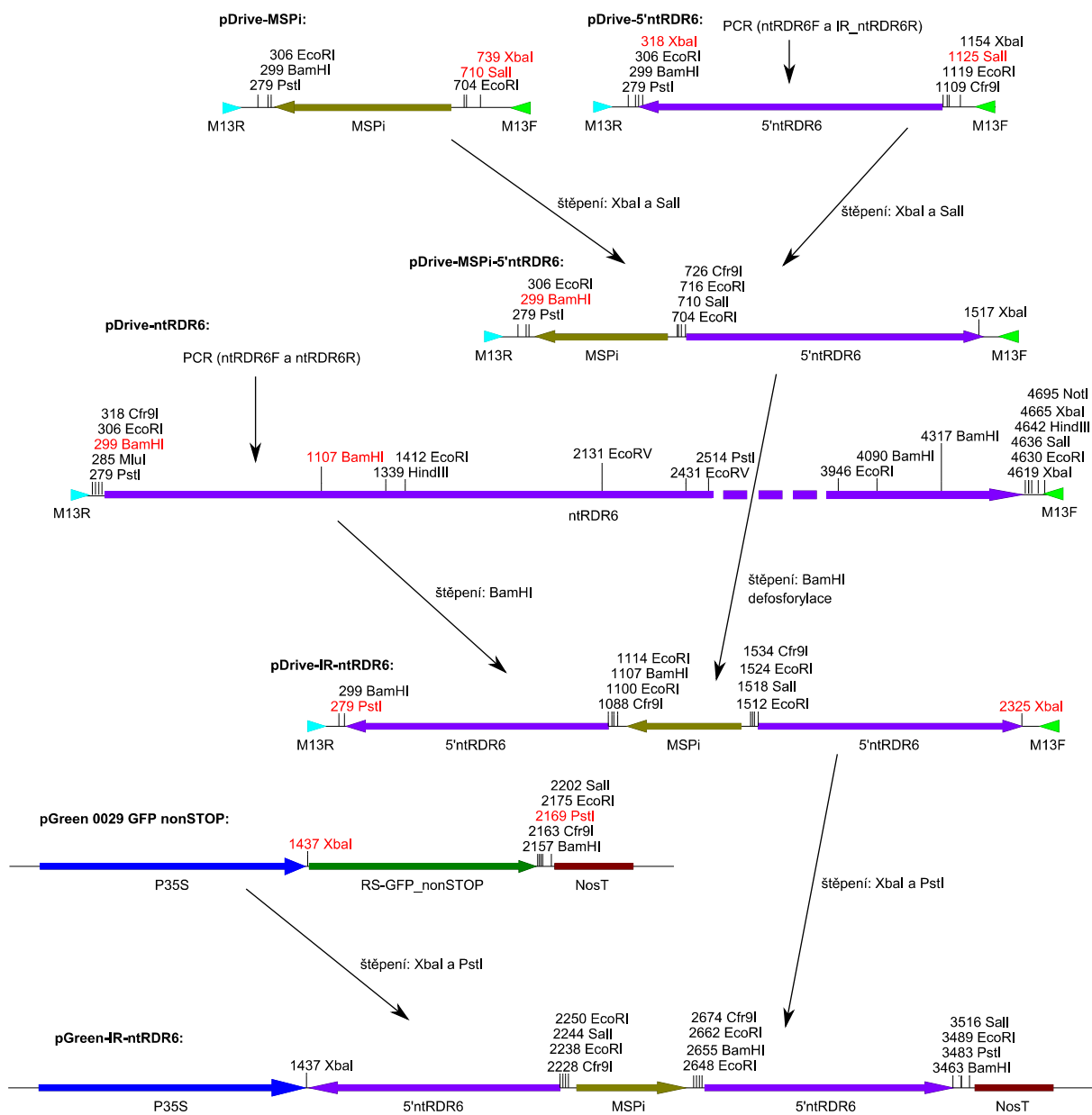
sekvence odpovídající 5' a 3' nepřekládaným oblastem *ntRDR6*. Na základě těchto sekvencí byly navrženy primery (ntRDR6F a ntRDR6R) a byla s nimi provedena PCR z vyizolované DNA. Původním záměrem bylo snižovat expresi RDR6 pomocí antisense RNA, a proto byl gen *ntRDR6* izolován v celé délce, později však bylo rozhodnuto pro použití vlásenky, neboť je účinnější a vzhledem k délce genu i jednodušší na přípravu. Fragment získaný po PCR byl vložen do vektoru pDrive a výsledný plazmid (dále pDrive-ntRDR6) byl ověřen restričním štěpením pomocí enzymů Cfr9I a XbaI a posléze i dalšími kombinacemi enzymů. U dvou vybraných klonů byly 5' a 3' konce (přes 800 bp) vloženého fragmentu osekvenovány. Vybraný klon nesl v 5' oblasti 2 mutace, ty by však funkci vlásenky v umlčování neměly výrazněji ovlivnit.

Byla provedena PCR z plazmidu pDrive-ntRDR6 s kombinací primerů ntRDR6F a IR_ntRDR6R, vzniklý fragment byl vložen do vektoru pDrive a výsledný plazmid (dále pDrive-5'ntRDR6) byl ověřen restričním štěpením enzymem EcoRI a následně i sekvenací.

Plazmidy pDrive-MSPi (viz kapitola 4.1.1) a pDrive-5'ntRDR6 byly štěpeny enzymy XbaI a Sall. Produkty štěpení byly rozděleny pomocí elektroforézy a příslušné fragmenty (linearizovaný pDrive-MSPi – přibližně 4,2 kbp fragment a 5' oblast ntRDR6 – přibližně 800 bp fragment) byly vyizolovány z gelu. Z několika klonů, získaných po ligaci a elektroporaci do bakterií, byl plazmid (dále pDrive-MSPi-5'ntRDR6) vyizolován a ověřen štěpením enzymy XbaI a Sall.

Plazmid pDrive-ntRDR6 byl štěpen enzymem BamHI a plazmid pDrive-MSPi-5'ntRDR6 byl štěpen enzymem BamHI a následně defosforylován. Produkty štěpení byly rozděleny pomocí elektroforézy a příslušné fragmenty (linearizovaný pDrive-MSPi-5'ntRDR6 – přibližně 5 kbp fragment a 5' oblast ntRDR6 – přibližně 800 bp fragment) byly vyizolovány z gelu. Po ligaci a elektroporaci bylo několik klonů ověřeno pomocí PCR tak, aby bylo možné určit orientaci vloženého fragmentu (primery ntRDR6F a M13R). Z vybraných klonů byl plazmid (dále pDrive-IR-ntRDR6) vyizolován a ověřen štěpením pomocí BamHI a také Cfr9I.

Plazmidy pDrive-IR-ntRDR6 a pGreen 0029 GFP nonSTOP byly štěpeny restričními enzymy XbaI a PstI. Produkty štěpení byly rozděleny pomocí elektroforézy a příslušné fragmenty byly vyizolovány (plazmid pGreen – nejdelší fragment a IR-ntRDR6 – fragment o přibližné délce 2 kbp). Z několika vybraných klonů byl plazmid vyizolován a ověřen restričním štěpením enzymy XbaI a PstI a posléze také enzymem EcoRI (viz Obr. 4.21 dráhy 2 a 4). Plazmid byl označen jako pGreen-IR-ntRDR6



Obr. 4.22: schéma klonování konstruktů pGreen-IR-ntRDR6

5 Diskuse

5.1 Indukce umlčování

Prvním cílem práce byla příprava a otestování různých způsobů indukce umlčování. Za tímto účelem byl vybrán reportérový gen pro GFP a všechny tři známé způsoby vzniku dsRNA v buňce: tvorba antisense RNA, která páruje s transkriptem umlčovaného konstruktů, tvorba aberantní RNA (při absenci terminátoru), k níž je komplementární vlákno syntetizováno RDR6, a tvorba vlásenky, která vzniká transkripcí invertované repetice. Všechny tyto přístupy mohou v principu vést k tvorbě dsRNA, jak je ukázáno na obrázku 4.1, a mohou tak spouštět umlčování, jak bylo opakovaně experimentálně doloženo (Waterhouse et al. 1998; Smith et al. 2000; Luo & Chen 2007). Uvedené konstrukty byly navrženy především za účelem sledování průběhu přechodu PTGS na TGS v indikátorových liniích, a tak bylo nutné mít možnost spustit jejich transkripci v určitý okamžik. Možnost indukovatelného spouštění umlčování umožňuje nejen sledovat průběh celého procesu (při použití konstitutivního promotoru by bylo umlčování spuštěno hned po transformaci, kdy proces ještě není technicky možné analyzovat), ale také dává možnost celý proces zopakovat v té samé linii. Pro indukovatelnou expresi byl zvolen vektor pER8, jež nese promotor indukovatelný lidským hormonem β -estradiolem (Zuo et al. 2000). Tento systém je obecně považován za vysoce spolehlivý, s nedetekovatelnou mírou transkripce při absenci induktoru a zároveň schopný dosáhnout relativně vysokých hladin exprese (až osminásobek účinnosti 35S promotoru). Způsob indukce β -estradiolem navíc pro rostliny není toxický a ani je nijak jinak neovlivňuje (Zuo et al. 2000; Moore et al. 2006). Tento systém byl zároveň i úspěšně testován na BY-2 linii (Dohi et al. 2006; Lee et al. 2009). Důvod volby BY-2 jakožto modelového organismu a GFP jakožto reportérového genu je diskutován v kapitole 5.2.

První rozdíly mezi jednotlivými konstrukty byly pozorovány již po transformaci ještě před započítím samotné indukce umlčování. Toto pozorování bylo překvapivé, neboť bez indukce by k transkripci docházet nemělo a nemělo by být tedy spuštěno ani samotné umlčování. Rozdíl mezi GFP-IR a ostatními konstrukty byl až příliš velký na to, aby jej bylo možné vysvětlit odlišnými podmínkami transformace. Nadto všechny tři transformace byly prováděny současně a tudíž za velmi podobných podmínek. Po všech třech transformacích narostlo dostatečné a obdobné množství kalusů naznačující, že během vlastní transformace zřejmě nedošlo k chybě v postupu. Nejpríměřším vysvětlením tak je, že promotor spouštěl transkripci i v absenci induktoru. Ačkoliv je použitý promotor obecně považován v tomto

ohledu za spolehlivý, tak je možné v literatuře narazit na případy, i když jen výjimečné, kdy byla pozorována transkripce i v absenci induktoru (Vlot et al. 2008; Kang et al. 2009). Alternativou je, že by k transkripci mohlo docházet, aniž by byla způsobena vlastním inducibilním promotorem. Někteří autoři již dříve pozorovali transkripci transgenů invertované repetyce, a s tím spojené umlčování, bez toho, aniž by byl v konstruktu přítomen promotor, který by mohl tuto transkripci spouštět (Sijen et al. 2001; Rutherford et al. 2004). Tento jev by mohl být vysvětlen určitou nízkou hladinou transkripce, která zřejmě do nějaké míry zasahuje většinu genomu. Jak bylo ukázáno u živočichů, tak přibližně 90 % genomu je transkribováno, a to i přes to, že například u člověka tvoří vlastní geny necelá 2 % genomu. U rostlin jsou minimálně některé mezigenové oblasti přepisovány Pol V (popř. Pol IV, ale specifita její transkripce zatím přesně popsána nebyla; Kapranov et al. 2007; Wierzbicki et al. 2008). Varianta GFP-IR, která má vyšší účinnost umlčování, by se tak na rozdíl od ostatních variant mohla projevit i při těchto nízkých hladinách transkripce.

Pokud připustíme, že docházelo k transkripci i v absenci indukce, pak by tím bylo možné vysvětlit ještě jeden jev, který byl pozorován v průběhu samotného experimentu s umlčováním. Jak je vidět z grafu 4.9, který porovnává intenzitu fluorescence na médiu bez indukce mezi jednotlivými variantami, tak GFP-bT svítí více než antiGFP. Vzhledem k tomu, že první transgen, který řídí expresi GFP, je v obou případech identický (všemi třemi variantami byla transformována stejná linie) a druhý transgen (umlčující konstrukt) by neměl být exprimován (bez indukce exprese), není tak důvod pro to, aby zde byl rozdíl v intenzitě fluorescence mezi variantami. Dalo by se tedy uvažovat, podobně jako v případě GFP-IR, o tom, že k transkripci umlčujícího konstruktů dochází i v absenci indukce a že transkript z konstruktů GFP-bT je aspoň u některých liniích, kde mohl být začleněn před terminátor, translatován a zvyšuje tak množství GFP v buňce, a tím i konečnou intenzitu fluorescence. Jinak by byla totiž translace nepravděpodobná vzhledem k tomu, že pro export standardní mRNA z jádra, je kromě jiného, nezbytná i správná polyadenylace na 3' konci. V souladu s tímto předpokladem bylo pozorováno, že když je reportérový gen GUS transkribován bez použití terminátoru, tak exprese vlastního proteinu je téměř nulová (Zhao et al. 1999; Luo & Chen 2007). Maximální průměrná intenzita fluorescence kalusů varianty GFP-bT (IF = 25733; graf 4.4), které v průběhu měření dosáhnou, je obdobná jako u původní GFP linie (IF = 25982; graf 4.14). Z tohoto pohledu by tak bylo logičtější uvažovat o tom, že transkripci bez indukce je ovlivněna spíše varianta antiGFP, kde by také mohlo docházet k mírnému umlčování, což by snižovalo celkovou průměrnou intenzitu fluorescence.

Porovnáním údajů z grafů 4.1, 4.3 a 4.4 ukazuje, že průměrná intenzita u varianty antiGFP skutečně o něco poklesla mezi měřeními ještě před vlastním pokusem s umlčováním a 3. dnem na médiu bez indukce po začátku pokusu s umlčováním. U varianty GFP-bT takovýto pokles není a u varianty GFP-IR je naopak mírný nárůst. Přihlédneme-li pak k faktu, že u GFP-bT bylo více umlčených klonů v měření před započítáním pokusu s umlčováním, než u antiGFP (graf 4.2), pak rozdíl mezi těmito variantami nemusí být ani tak dán v míře umlčování, ale v čase, kdy k tomuto umlčení dojde. Rozdíl v průměrné intenzitě fluorescence mezi variantami antiGFP a GFP-bT během pokusu s umlčováním, tak může být pouhý artefakt vytvořený selekcí klonů použitých pro pokus. Pro jednoznačné posouzení, zda-li dochází k transkripci z indukibilního promotoru i v absenci induktoru, by tak bylo nezbytné zahrnout kontroly, které by toto zohledňovali – např. transformaci konstruktem, ze kterého bude tento promotor odstraněn.

Co se týče vlastní schopnosti umlčovat, tak ta je nejvyšší u varianty GFP-IR (viz Tab. 4.1 a grafy 4.6-4.8). U 36 % klonů varianty GFP-IR bylo dosaženo míry umlčení vyšší jak 30 %, u variant antiGFP a GFP-bT to bylo jen 16 % klonů. Tento výsledek je v souladu s předchozími pozorováními, která ukázala, že exprese konstruktů tvořícího vlásenku je neúčinnějším způsobem spouštění umlčování (Smith et al. 2000; Wang & Waterhouse 2000). Tato pozorování na druhou stranu ale také ukázala, že účinnost takového umlčování, obzvláště jsou-li obě ramena vlásenky rozdělena sestřížitelným intronem, může dosáhnout až 100 %. Jednou z možností, proč bylo dosaženo nižších účinností je, že nedocházelo k sestříhu vloženého intronu. Ačkoliv to, jestli je intron sestříhován nijak testováno nebylo, tak se jedná spíše o méně pravděpodobnou variantu. Intron pocházel z genu z lilku bramboru, kde byl funkční a zároveň nesl všechna standardní místa nezbytná pro sestříh (viz např. Shen et al. 2011). I kdyby k vystřížení nedocházelo, tak by bylo očekáváno alespoň 50 % klonů s úplným umlčením. Dalším možným vysvětlením je, že docházelo k umlčení buďto indukibilního promotoru a nebo estradiolového receptoru, a následně tedy nemohlo docházet ke spuštění transkripce z umlčujících konstruktů. Z literatury je známo, že použitý indukibilní systém je schopný exprimovat řadu transgenů velmi stabilně, na druhou stranu řada jím řízených transgenů je silně umlčována (Moore et al. 2006). Například Dohi et al. 2006, který expimoval s tímto systémem v linii BY-2 GFP protein fúzovaný s jistým virovým proteinem, dosáhl exprese v méně jak 50 % klonů, přičemž z těch, co daný protein expimovaly, tak skoro 80 % mělo expresi velmi nízkou (tj. pozitivních bylo méně jak 10 % buněk v suspenzi). Dalším faktorem, který mohl výsledek ovlivnit bylo to, že hned po transformaci byla řada klonů samovolně umlčena. Pro vlastní pokus tak mohly být použity linie se silným umlčením

inducibilního systému či linie, u nichž mohl být konstrukt s invertovanou repeticí rekombinován v agrobaktériu. Výsledek tak mohl být zkreslen. Vezmeme-li tyto úvahy v potaz, pak je možné, že u varianty GFP-IR dochází k umlčení ve 100 % případů všude tam, kde opravdu dochází k expresi umlčujícího konstruktů. Varianta antiGFP dosahuje nižší míry účinnosti umlčování. Tento údaj se opět shoduje s předchozími pokusy, které ukázaly, že tento způsob indukce umlčování patří k nejméně účinným (Wang & Waterhouse 2000; Yan et al. 2006). Varianta GFP-bT dosahuje obdobné míry umlčení jako varianta antiGFP. Schopnost umlčování se u bezterminátorových konstruktů v literatuře různí – Luo & Chen 2007 dosáhli 100% účinnosti, Nicholson & Srivastava 2009 se s účinností pohybovali kolem 60 % a Yan et al. 2006 s bezterminátorivým konstruktem umlčování nedosáhli. Zde získaný výsledek se tak pohybuje v rozmezí dříve získaných výsledků. Takto rozdílné výsledky mohou být například dány preferencí degradovat určité aberantní transkripty a zabránit jim tak vstupovat do procesů RNAi, jak již bylo zmíněno výše (Rymarquis et al. 2011).

Na finální míře umlčování se mohly podílet i jiné faktory. Wang & Waterhouse 2000 ukázali, že umlčování spouštěné transgenem v sense či antisense orientaci je velmi často spojeno s tvorbou tandemových, či invertovaných repetitivních T-DNA insercemi. Vzhledem k tomu, že nebyla kontrola, která by tento faktor eliminovala (např. transformace s GFP v sense orientaci, které je zakončené terminátorem) a nebyla ani provedena analýza toho, kolik T-DNA a kde v genomu je integrováno, pak nelze vyloučit možnost, že umlčování bylo ovlivněno i charakterem T-DNA insercí. Vzhledem k velkému počtu analyzovaných linií by však měl být vliv dalších faktorů na rozdíly mezi variantami minimální.

U varianty GFP-IR se umlčování na průměrné míře umlčení začínalo projevovat již třetí den měření, kdežto u variant antiGFP a GFP-bT až pátý den měření. Tento rozdíl je nejspíše dán celkově větší intenzitou umlčování u varianty GFP-IR, neboť, jak je patrné z grafů 4.6-4.8, tak už i u variant antiGFP a GFP-bT jsou ve třetí den měření klony s obdobnou mírou umlčení jako u varianty GFP-IR. Průměrná míra umlčení u variant antiGFP a GFP-bT roste přibližně do 12. dne měření a u varianty GFP-IR do 7. dne měření. Pokles míry umlčení v pozdějších časech měření je dán zastavením růstu/poklesem intenzity fluorescence na médiu bez indukce, což je způsobeno stářím kalusů, pravděpodobně v důsledku toho, že začínají odumírat starší buňky. Rozdíl v tom, kdy tento zlom nastal u GFP-IR oproti zbylým dvěma variantám, je jednak dán tím, že u GFP-IR na médiu bez indukce roste intenzita fluorescence o něco pomaleji (a posléze klesá rychleji, viz graf 4.9) a pak také tím, že na médiu s indukcí roste intenzita fluorescence o něco déle, než u variant antiGFP a GFP-bT (viz graf 4.10).

Menší nárůst na médiu bez indukce by mohl být dán stejnými důvody, jako pozorované umlčování u této varianty hned po transformaci (diskutováno výše).

V provedených experimentech se neprokázalo, že by schopnost umlčovat nějak souvisela s celkovou mírou intenzity fluorescence daných klonů. Něco takového by se dalo teoreticky očekávat například u varianty GFP-bT, kde by vyšší hladiny intenzity byly spojeny s větším množstvím transkriptu, což by vedlo i k vyšším hladinám běžně vznikajících aberantních transkriptů. Po spuštění exprese umlčujícího konstruktů, by pak bylo snazší překročit hladinu aberantních transkriptů, která je potřebná pro jeho rozpoznání pomocí RDR6 (viz kapitola 2.2.1).

Získané výsledky rovněž neprokázaly vliv některých dalších faktorů na míru umlčení (viz Tab. 4.2). Prvním z analyzovaných faktorů byla nehomogenita svítivosti kalusů. Tato nehomogenita může být dána tím, že ne všechny kalusy jsou skutečně geneticky uniformní. Druhou příčinou pak může být epigenetická variabilita v rámci kalusu (Nocarova & Fischer 2009). Dalším analyzovaným faktorem byla „narezlost“ (tj. mírné zabarvení dohněda) pozorované u některých kalusů. Příčinu, proč některé kalusy tento fenotyp vykazovaly se zjistit nepodařilo, nicméně tato vlastnost naměřené míry umlčení nijak neovlivňovala. Protože tyto faktory na vlastní umlčování vliv neměly, tak klony, kterých se toto týkalo, nebyly vyloučeny z analýz, které jsou popsány výše.

Pokus se sledováním umlčování na kalusech byl zopakován s šesti klony od každé varianty, které byly vybrány na základě toho, že při prvním pokusu umlčovaly dobře. U varianty antiGFP se podařilo dosáhnout téměř identické míry umlčení, kdežto u variant GFP-bT a GFP-IR bylo dosaženo zhruba jen poloviční hodnoty. Nedosažení stejných hodnot jako v prvním pokusu mělo zřejmě u každé varianty částečně jinou příčinu, jak je patrné z grafů 4.12 a 4.13. U varianty GFP-IR došlo oproti prvnímu měření k výraznému snížení intenzity fluorescence u kalusů pěstovaných bez indukce, a tak jakékoliv umlčování, které by bylo spuštěno indukcí transkripce umlčujících konstruktů, se mohlo projevit jen omezeně na výsledných hodnotách míry umlčení. Tento pokles intenzity fluorescence může mít stejné příčiny, jako nesvítivost řady klonů od této varianty hned po transformaci (diskutováno výše), jen s tím rozdílem, že u vybraných klonů došlo k útlumu exprese až po určité časové prodlevě. U varianty GFP-bT sice také na médiu bez indukce nedošlo k dosažení takových intenzit fluorescence jako v prvním pokusu, ale tento rozdíl nebyl tolik výrazný. Jak je patrné z tvaru křivky vývoje intenzity fluorescence na grafu 4.13, tak příčina rozdílu je zřejmě také v tom, že nebylo dosaženo takové účinnosti umlčování jako v prvním pokusu. Příčinou

takového výsledku by mohla být například vyšší citlivost tohoto způsobu umlčování k hladině transkriptu, který ji spouští. Úroveň fluorescence při opakování pokusu s umlčováním byla celkově nižší, to mohlo být dáno i celkově nižší aktivitou transkripce v buňce (viz níže), která mohla zapříčinit i nižší hladinu transkriptu z konstruktů spouštějícího umlčování. Na intenzitách fluorescence z druhého pokusu je také možné sledovat jisté odchylky od jejich průběhu v čase vzhledem k pokusu prvnímu. Maximální intenzity fluorescence je dosaženo později (16. den měření oproti 10.-12. dni měření v prvním pokusu) a růst je z počátku o něco pomalejší. Tento rozdíl je zřejmě dán tím, že mezi prvním a druhým pokusem nebyly zachovány všechny podmínky naprosto stejné, neboť se nepředpokládalo takové ovlivnění výsledku. Při prvním pokusu byly použity čerstvé kalusy (pokus následoval po transformaci hned v okamžiku, kdy kalusy dosáhly vhodné velikosti, tj. 12-16 dnů od přesazení z misek s transformacemi), kdežto při druhém pokusu bylo použito kalusů starších (vycházelo se z udržovaných kalusů, které měly subkultivační interval přibližně 4 týdny). Starší kalusy v druhém pokusu tak zřejmě potřebovaly delší čas na dosažení růstové aktivity kalusů z prvního pokusu, a tím i vyšší metabolické aktivity v podobě transkripce a translace, a tedy i exprese GFP.

Ve druhém pokusu při opakování indukce umlčování byly také odzkoušeny dvě další varianty ošetření. Přidání estradiolu na povrch kalusu na začátku experimentu nemělo na výsledek významný vliv. Použití pětinasobné koncentrace estradiolu vedlo překvapivě k nižší míře umlčení. Obdobný jev byl také vidět v některých případech na médiu s indukcí, ještě než se začne projevovat vlastní umlčování – třetí den měření pro antiGFP a GFP-bT v prvním pokusu s umlčováním (viz Tab. 4.1) a také na pokusech s indikátorovými liniemi (viz kapitola 4.2.2). Při pokusech s kalusy nebyl ke kontrole přidán DMSO (rozpuštědlo estradiolu). Dodatečné experimenty však neukázaly žádný vliv samotného DMSO či DMSO s estradiolem na expresi GFP (graf 4.16). Příčinu vyšší intenzity fluorescence ve vyšších koncentracích estradiolu (a tím i DMSO) zatím jasně určit nelze.

Kromě koncentrace estradiolu a DMSO byl také sledován vliv velikosti přesazeného kalusu, neboť během experimentů se některé kalusy svojí velikostí navzájem lišily. Žádný vliv velikosti přesazeného kalusu na intenzitu fluorescence pozorován nebyl. Hlavním faktorem, který tak zřejmě intenzitu fluorescence ovlivňuje (pomineme-li genetické a epigenetické vlastnosti), je nejspíš stáří kalusu, které vzhledem k systému pěstování určuje dostupnost živin pro daný kalus. I při tomto kontrolním pokusu byly kalusy o něco starší než při prvním pokusu s umlčováním, a tak bylo maxima intenzity fluorescence dosaženo o něco později.

5.2 Indikátorové linie

Vlastní konstrukty pro indukci umlčování byly připraveny především se záměrem spouštění umlčování v indikátorových liniích. Tyto linie jsou systémem, který má umožnit snadnou vizualizaci jednotlivých kroků přechodu PTGS na TGS. Základem těchto linií je gen *GFP* pod *35S* promotorem, jehož umlčování má být sledováno. Posttranskripční umlčování tohoto genu je tak doprovázeno zhasnutím zelené fluorescence. Kromě toho expresní kazeta také nese gen *mCherry*, který by měl v závislosti na uspořádání daného konstruktů svým zhasnutím odpovídat buďto na metylaci kódující sekvence *GFP*, anebo na metylaci promotoru, který expresi *GFP* řídí. Základní uspořádání konstruktů v podobě *P35S::RS-GFP::NosT*, vychází z konstruktů používaném na zdejšími pracovišti, u kterého bylo běžně pozorováno spontánní spouštění posttranskripčního umlčování, jež následně pravidelně přecházelo na umlčování transkripční (Nocarova et al. 2010, Fischer, osobní sdělení).

Jednotlivé konstrukty byly úspěšně připraveny jako součást plazmidu pGreen. Pro detekci metylace transkribované sekvence byl připraven konstrukt pGreen-IL-DP. Tento konstrukt využívá dvou různých promotorů před vlastním *GFP*. V důsledku toho by měla být sekvence druhého promotoru také transkribována a v momentě, kdy dojde ke spuštění posttranskripčního umlčování (tím dojde ke zhasnutí zelené fluorescence), bude tento transkript pomocí sRNA také štěpen. Rozštěpená RNA se může stát templátem pro RDR6, která ji přepíše na dsRNA, ta dá vznik sekundárním siRNA, které by měly mimo jiné iniciovat metylaci příslušných sekvencí – tedy vlastního *GFP* a promotoru *P35S*, který se nachází jak před *GFP*, tak před *mCherry*, což povede k transkripčnímu umlčení obou genů a tím zhasnutí červené fluorescence. Tento systém vychází z několika předpokladů. Prvním předpokladem je, že rozštěpení cílového transkriptu spustí vznik sekundárních siRNA (popsáno v kapitole 2.2.2). Jak ukázala řada studií, tak tento jev je celkem běžný a mohou při něm vznikat sekundární siRNA v celé délce transkriptu (Moissiard et al. 2007; Voinnet 2008). Někteří autoři zaznamenali šíření sekundárních siRNA jen jedním směrem od místa štěpení, takováto překážka by se dala řešit například změnou uspořádání daného konstruktů (Oka et al. 2008). Každopádně vzhledem k tomu, že budou testovány tři různé konstrukty pro indukci umlčování, tak je více než pravděpodobné, že alespoň u jednoho z nich budou vznikat sekundární siRNA i proti *P35S* promotoru. Druhým předpokladem je, že sekundární siRNA budou schopny navodit metylaci komplementárních sekvencí, tento jev byl pozorován již v předchozích experimentech (Vaistij et al. 2002; Molnar et al. 2010). Opět použití více různých způsobů indukce zvyšuje pravděpodobnost, že alespoň v jednom z případů bude

k tomuto jevu docházet. Další faktorem, který bude třeba vzít v úvahu, je také výrazně větší síla transkripce řízené *P35S* promotorem oproti *Pnos* promotoru (Sanders et al. 1987). Kvůli těmto a dalším faktorům bude třeba zahrnout vhodné kontroly v podobě například detekce metylace DNA, detekce sRNA, případně přímé stanovení hladin transkriptů genu *GFP*.

Pro detekci metylace promotoru byl připraven konstrukt pGreen-IL-SP. Tento konstrukt využívá toho, že před oběma geny je identický promotor. To má za následek, že pokud dojde k pročení se Pol IV do oblasti promotoru a vzniku komplementárních siRNA (jak je popsáno v kapitole 2.3.2.1.1), tak tyto siRNA budou moci řídit metylaci i promotoru před *mCherry*, a bude tak možné, aby jej umlčely na transkripční úrovni (což bude doprovázeno zhasnutím červené fluorescence). To, že na Pol IV závislé siRNA mohou řídit metylaci *in trans*, potvrdila již řada předchozích studií, například: Mlotshwa et al. 2010; Khaitová et al. 2011.

Jako modelový organismus pro studium těchto procesů byla vybrána tabáková buněčná linie BY-2. Kromě toho, že je zavedeným modelovým organismem na zdejšími pracovišti, tak skýtá pro tyto pokusy řadu výhod – lze s ní snadno pracovat s využitím mikrobiologických metod, což umožňuje vyhodnocení velkého množství nezávislých klonů a jednotlivé procesy lze na ní sledovat za přesně daných podmínek (týká se především suspenzních kultur) a také dlouhodobě u výhradně mitoticky se dělících buněk – jak známo pohlavní rozmnožování má významný vliv na řadu epigenetických procesů (Lunerová-Bedřichová et al. 2008; Slotkin et al. 2009). BY-2 však není celistvá rostlina, a tak je třeba poznamenat, že u buněčných kultur byly často pozorovány některé epigenetické změny například v rozložení metylace v genomu, které by mohly mít na zde získané výsledky vliv (Neelakandan & Wang 2011).

V úvodním experimentu byly konstrukty pro indikátorové linie kotransformovány spolu s pER8-GFP-IR do buněk BY-2. Vlášenska byla pro otestování indikátorových linií vybrána pro svoji nejvyšší efektivitu. Kotransformace by měla být účinným nástrojem, jak buňku transformovat dvěma odlišnými konstrukty s použitím jen jednoho selekčního genu. Jak bylo ukázáno, tak transformace pomocí dvou různých klonů *Agrobacteria*, kdy každý nese jiný konstrukt avšak se stejnou resistencí, může mít účinnost kolem 25 %. Takovýto podíl klonů, které nesou oba konstrukty, výrazně přesahuje dílo náhody a je pravděpodobně dán různou kompetencí buněk k tomu aby byly transformovány (Chang et al. 2002). U varianty SP byla kotransformace s GFP-IR potvrzena pomocí PCR u čtyř klonů z osmi otestovaných. Klony pro otestování byly vybrány na základě poklesu intenzity fluorescence na médiu s estradiolem. To že byla kotransformace potvrzena pouze u čtyř z osmi klonů, může být dáno tím, že nižší intenzita fluorescence na médiu bez indukce byla dána jen náhodou, mohlo to být

také dáno nepřesností detekce pomocí PCR a vyloučit nelze ani chyby při izolaci DNA. Vlastní účinnost kotransformace se odhadnout nedá, klony, které byly testovány PCR, nebyly vybrány náhodně. Nicméně to, že zhruba 12 % klonů dosáhlo míry umlčení 30 % a více, což je třetinový podíl klonů, které dosáhly takovéto míry umlčení při testování vlásenky umlčováním v linii stabilně exprimující GFP (viz kapitola 4.1.2), by mohlo přibližně odpovídat účinnosti kotransformace 25 %. Tato dvě čísla se alespoň velmi povrchně srovnávat dají, neboť v obou případech byly klony pro sledování indukce umlčování vybírány na základě stejných kritérií – dostatečné intenzity fluorescence. U varianty DP se žádné kotransformované klony pomocí PCR nalézt nepodařilo, a to ani po prověření 20 různých klonů. Příčina tohoto problému by zřejmě mohla být v chybě v transformaci – ačkoliv byly obě transformace prováděny současně, tak od varianty DP bylo získáno výrazně méně kalusů. Pro vysokou hustotu kalusů u varianty SP po transformaci se přesné údaje špatně určují, ale odhadem bylo získaných kalusů od varianty DP alespoň o řád méně (viz Obr. 4.18). Selekcí kotransformovaných klonů také zřejmě ztížil fakt, že klony této varianty dosahovaly mnohem nižších intenzit fluorescence, a tak bylo těžší určit, jestli na médiu s indukcí k umlčování dochází a nebo ne. Nižší intenzita fluorescence varianty DP byla neočekávaným pozorováním. Vzhledem k tomu, že plazmid pGreen-IL-DP vychází z plazmidu pGreen-IL-SP, tak jsou oblasti jak *P35S* promotoru, tak kódující oblast *GFP* identické (což bylo ověřeno i sekvenací). Pokud by tedy byla příčina ve vlastních konstruktech, pak by musela být v přítomnosti promotoru *Pnos*. Tento promotor by však na expresi vliv mít neměl, jak ve své diplomové práci ukázal kolega Dimitrij Tyč, který právě takovýto konstrukt (*Pnos::P35S::RS-GFP::NosT*) testoval na to, jestli by u něj nemohlo docházet k vyšší míře transkripčního umlčování právě v důsledku snadného vzniku sekundárních siRNA z transkriptů vytvářených promotorem *Pnos*. Žádný rozdíl oproti variantě, kde je pouze promotor *P35S* ale nalezen nebyl. Vysvětlení rozdílu v intenzitách fluorescence tak zřejmě bude ležet někde v průběhu transformace a bude mít stejnou příčinu jako to, že kalusů od varianty DP bylo získáno méně. Už jen fakt, že těchto kalusů bylo méně musel vést k tomu, že byl mnohem menší výběr pro otestování schopnosti umlčovat expresi GFP, neboť tak klesla pravděpodobnost, že se v tak malém vzorku vyskytne klon s dobrou expresí GFP. Čili alespoň za část tohoto rozdílu může artefakt vytvořený výběrem nejlépe svítících kalusů pro testování umlčování. Pro to, aby se dalo určit, do jaké míry tento faktor výsledek ovlivnil, by bylo třeba znát konkrétní poměry kotransformovaných klonů, které dobře experimentují GFP, jež byly získány po transformaci. Tento údaj zjišťován nebyl, neboť nebyl cílem experimentu, tím bylo získat kotransformované klony schopné v důsledku indukce umlčet expresi GFP.

Dalším faktorem, který by mohl mít vliv, je působení nějakého stresu (který by tak byl i příčinou horšího výtěžku transformace). Některé složky RNAi reagují na různorodé stresy, obzvláště pak RDR6, která je overexprimována například působením teplotního stresu (Willmann et al. 2011). Vzhledem k tomu, že právě RDR6 hraje významnou roli ve spontánním umlčování transgenů (Luo & Chen 2007), tak je možné uvažovat o tom, že by její dočasné zvýšení exprese během transformace mohlo zvýšit poměr umlčených klonů, které jsou po transformaci získány.

Analýza čtyř kotransformovaných klonů od varianty SP ukázala, že pro sledování přechodu posttranskripčního umlčování na transkripční bude třeba získat větší množství kotransformovaných klonů. Získané klony totiž měly relativně nízkou úroveň fluorescence či nehomogenní fluorescenci v buňkách suspenzních kultur, případně spouštění umlčování nefungovalo optimálně. To že u některých z nich nedocházelo k umlčování v suspenzní kultuře i přes to, že při pokusu na kalusech byl potenciál pro umlčení exprese GFP pozorován, může být dáno například umlčením inducibilního systému (jak je diskutováno v kapitole 5.1). Jedním možným řešením pro takovéto klony je také klonování. Jedná se o metodu, kdy je z jedné buňky vypěstována nová buněčná linie. Tento přístup by mohl vyřešit problém s mozaikovitostí některých suspenzí, tedy tím, že je suspenze směsí svítících i nesvítících buněk. Tento rozdíl je dán převážně epigenetickým stavem daného transgenů, který se většinou ustavuje hned po transformaci. Tato metoda by tak umožnila alespoň u některých klonů získat populaci s homogenní fluorescencí (Nocarova & Fischer 2009). Za účelem snazšího získávání kotransformovaných klonů byl také připraven účinnější způsob jejich selekce. Pro přímou selekci při kotransformaci není možné využít více antibiotik, neboť ta budou následně potřeba k selekci při supertransformaci těchto klonů dalším konstruktem (viz kapitola 5.3). K selekci je však také možné využít fenotypu kotransformovaných klonů. Pokud umlčující konstrukt ponese resistenci pro hygromycin a konstrukt pro indikátorovou linii žádnou resistenci k tomuto antibiotiku mít nebude, pak všechny klony získané po vyšetření transformovaných buněk na médium s hygromycinem, by měly nést umlčující konstrukt. Ty klony, které budou zároveň i kotransformovány konstruktem pro indikátorové linie, pak již půjdou snadno rozeznat díky své zelené fluorescenci. Byly tak úspěšně připraveny plazmidy vycházející pGreen-IL-SP a pGreen-IL-SD, ze kterých byl odstraněn gen pro hygromycinovou resistenci. Použitím těchto konstruktů by tak v budoucnu mělo umožnit snáze získat větší množství kotransformovaných klonů a zvýšit tak pravděpodobnost, že mezi nimi budou nalezeny klony vhodné pro sledování přechodu posttranskripčního umlčování na umlčování transkripční.

5.3 Pokračování experimentální práce do budoucna

V navazující práci je plánováno výše zmíněné experimenty zopakovat a ověřit tak zde popsané výsledky, a to hlavně se zapojením dostatečných kontrol, tak aby mohlo být ověřeno, jestli inducibilní promotor spouští transkripci v absenci indukce a také, aby byl jasně určen vliv DMSO/estradiolu na získané intenzity fluorescence. Dále pak využití připravených konstruktů pro indikátorové linie, jenž mají usnadňovat selekci kotransformovaných klonů, k získání takových klonů, na kterých bude možné ověřit funkčnost indikátorových linií a následně pak případně sledovat průběh přechodu posttranskripčního umlčování na umlčování transkripční. Tedy popsat, jak častý je tento jev, jaké je časování jednotlivých kroků a také vliv některých dalších faktorů – přinejmenším změn v hladině aktivity RDR6 (v rámci této práce také byla úspěšně vyizolována genomová sekvence RNA dependetní RNA polymerázy 6 z *Arabidopsis thaliana* a z BY-2 a byly na jejím základě připraveny konstrukty pro zvýšení a snížení exprese RDR6). Cílem další práce bude ověřit roli RDR6 v řadě procesů, které zde připravený systém umožní sledovat. Jak bylo ukázáno, tak RDR6 hraje důležitou úlohu v umlčování spouštěném aberantními RNA, co však přesně není známo je, které složky jsou pro tento proces limitující, zvýšené umlčování v důsledku overexprese RDR6 by tak ukázalo, že je to hladina exprese RDR6, co tento proces reguluje z pozice RNAi (Luo & Chen 2007). RDR6 také může hrát roli v amplifikaci umlčování tím, že má možnost vytvářet sekundární siRNA, a může tak ovlivňovat míru umlčování i v případech, kde je spuštění umlčování na RDR6 nezávislé. Takovou roli by mohla hrát například při umlčování spouštěném antisense RNA, precedentem k tomuto je její role v produkci některých nat-siRNA (Katiyar-Agarwal et al. 2007).

6 Závěry

- 1) Byly připraveny 3 konstrukty (přes celkem 7 mezikroků) umožňující řízeně spustit posttranskripční umlčování *GFP*: *GFP* v antisense orientaci, *GFP* bez terminátoru a *GFP* v invertované repetici. Spouštění exprese bylo řízeno inducibilním promotorem. Transformací těchto konstruktů do linie BY-2 stabilně exprimující *GFP* tak byly získány tři sety linií se schopností umlčovat expresi *GFP*. Na relativně velkém množství klonů od každého typu konstruktů (kolem 100) byl na kalusech pozorován průběh umlčování spouštěný těmito konstrukty. Jako nejúčinnější se ve spouštění umlčování ukázalo *GFP* v invertované repetici. *GFP* v antisense orientaci a *GFP* bez terminátoru pak vykazovaly nižší míry umlčení, které byly u obou obdobné. U *GFP* v invertované repetici bylo také pozorováno velmi silné umlčování ještě před spuštěním transkripce z umlčujícího konstruktů, tento výsledek ale mohl být dán selháním použitého inducibilního promotoru. U *GFP* bez terminátoru pak byly pozorovány vyšší intenzity fluorescence, tento výsledek však může být artefaktem. Při pokusech v suspenzních kulturách se ukázalo, že vybrané klony nesoucí *GFP* v invertované repetici jsou schopny umlčet expresi *GFP* velmi rychle a ve 100 % buněk.
- 2) Byly připraveny 2 konstrukty pro indikátorové linie tak, aby umožňovaly pomocí fluorescenčního proteinu mCherry vizualizovat vybrané kroky přechodu posttranskripčního umlčování *GFP* na umlčování transkripční. Těmito kroky je metylace transkribované sekvence a metylace promotoru. Tyto konstrukty byly kotransformovány spolu s umlčujícím konstruktem (*GFP* v invertované repetici) do linie BY-2. Podařilo se získat celkem čtyři kotransformované klony s konstruktem pro detekci metylace promotoru. U konstruktů pro detekci metylace kódující sekvence pak byla pozorována nižší intenzita fluorescence, tento jev však může být artefaktem. Byl navržen způsob jak usnadnit selekci kotransformovaných klonů a na základě toho byly připraveny další dva konstrukty, které to mají umožnit.
- 3) Úspěšně byly izolovány genomové sekvence RNA-dependentní RNA polymerázy 6 (*RDR6*) z tabákové linie BY-2 a z *Arabidopsis thaliana*. Na základě těchto sekvencí byly připraveny dva konstrukty pro modulaci aktivity RDR6.

7 Seznam použité literatury

- Aceituno, F.F., Moseyko, N., Rhee, S.Y. & Gutiérrez, R.A., 2008. The rules of gene expression in plants: Organ identity and gene body methylation are key factors for regulation of gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, 9(1), p.438.
- Adenot, X., Elmayan, T., Laussergues, D., Boutet, S., Bouché, N., Gascioli, V. & Vaucheret, H., 2006. DRB4-Dependent TAS3 trans-Acting siRNAs Control Leaf Morphology through AGO7. *Current Biology*, 16(9), pp.927–932.
- Ameres, S.L., Martinez, J. & Schroeder, R., 2007. Molecular Basis for Target RNA Recognition and Cleavage by Human RISC. *Cell*, 130(1), pp.101–112.
- 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), pp.6832–6841.
- Ausin, I., Greenberg, M.V.C., Simanshu, D.K., Hale, C.J., Vashisht, A.A., Simon, S.A., Lee, T., Feng, S., Españaola, S.D., Meyers, B.C., et al., 2012. INVOLVED IN DE NOVO 2-containing complex involved in RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(22), pp.8374–8381.
- Ausin, I., Mockler, T.C., Chory, J. & Jacobsen, S.E., 2009. IDN1 and IDN2 are required for de novo DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(12), pp.1325–1327.
- Axtell, M.J., Jan, C., Rajagopalan, R. & Bartel, D.P., 2006. A Two-Hit Trigger for siRNA Biogenesis in Plants. *Cell*, 127(3), pp.565–577.
- Baev, V., Naydenov, M., Apostolova, E., Ivanova, D., Doncheva, S., Minkov, I. & Yahubyan, G., 2010. Identification of RNA-dependent DNA-methylation regulated promoters in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(6), pp.393–400.
- Baulcombe, D., 1996. Mechanisms of Pathogen-Derived Resistance to Viruses in Transgenic Plants. *The Plant Cell*, 8(10), pp.1833–1844.
- 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*, 102(33), pp.11928–11933.
- Bernatavichute, Y.V., Zhang, X., Cokus, S., Pellegrini, M. & Jacobsen, S.E., 2008. Genome-Wide Association of Histone H3 Lysine Nine Methylation with CHG DNA Methylation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*, 3(9), p.e3156.
- Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M. & Benning, C., 1998. AGO1 defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. *The EMBO Journal*, 17(1), pp.170–180.
- Bologna, N.G., Mateos, J.L., Bresso, E.G. & Palatnik, J.F., 2009. A loop-to-base processing

mechanism underlies the biogenesis of plant microRNAs miR319 and miR159. *The EMBO Journal*, 28(23), pp.3646–3656.

- 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), pp.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), pp.1185–1190.
- Brosnan, C.A., Mitter, N., Christie, M., Smith, N.A., Waterhouse, P.M. & Carroll, B.J., 2007. Nuclear gene silencing directs reception of long-distance mRNA silencing in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(37), pp.14741–14746.
- Cao, X., Aufsatz, W., Zilberman, D., Mette, M.F., Huang, M.S., Matzke, M. & Jacobsen, S.E., 2003. Role of the DRM and CMT3 Methyltransferases in RNA-Directed DNA Methylation. *Current Biology*, 13(24), pp.2212–2217.
- Cerutti, H. & Casas-Mollano, J., 2006. On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Current Genetics*, 50(2), pp.81–99.
- Cokus, S.J., Feng, S., Zhang, X., Chen, Z., Merriman, B., Haudenschild, C.D., Pradhan, S., Nelson, S.F., Pellegrini, M. & Jacobsen, S.E., 2008. Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. *Nature*, 452(7184), pp.215–219.
- Cuperus, J.T., Carbonell, A., Fahlgren, N., Garcia-Ruiz, H., Burke, R.T., Takeda, A., Sullivan, C.M., Gilbert, S.D., Montgomery, T.A. & Carrington, J.C., 2010. Unique Functionality of 22 nt miRNAs in Triggering RDR6-Dependent siRNA Biogenesis from Target Transcripts in Arabidopsis. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(8), pp.997–1003.
- Curaba, J. & Chen, X., 2008. Biochemical Activities of Arabidopsis RNA-dependent RNA Polymerase 6. *Journal of Biological Chemistry*, 283(6), pp.3059–3066.
- Curtin, S.J., Watson, J.M., Smith, N.A., Eamens, A.L., Blanchard, C.L. & Waterhouse, P.M., 2008. The roles of plant dsRNA-binding proteins in RNAi-like pathways. *FEBS Letters*, 582(18), pp.2753–2760.
- Davis, S.J. & Vierstra, R.D., 1998. Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. *Plant Molecular Biology*, 36(4), pp.521–528.
- Daxinger, L., Kanno, T., Bucher, E., van der Winden, J., Naumann, U., Matzke, A.J.M. & Matzke, M., 2009. A stepwise pathway for biogenesis of 24-nt secondary siRNAs and spreading of DNA methylation. *The EMBO Journal*, 28(1), pp.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), pp.4777–4788.

- Deleris, A., Gallego-Bartolome, J., Bao, J., Kasschau, K.D., Carrington, J.C. & Voinnet, O., 2006. Hierarchical Action and Inhibition of Plant Dicer-Like Proteins in Antiviral Defense. *Science*, 313(5783), pp.68–71.
- Deleris, A., Greenberg, M.V.C., Ausin, I., Law, R.W.Y., Moissiard, G., Schubert, D. & Jacobsen, S.E., 2010. Involvement of a Jumonji-C domain-containing histone demethylase in DRM2-mediated maintenance of DNA methylation. *EMBO Reports*, 11(12), pp.950–955.
- Diaz-Pendon, J.A., Li, F., Li, W.-X. & Ding, S.-W., 2007. Suppression of Antiviral Silencing by Cucumber Mosaic Virus 2b Protein in Arabidopsis Is Associated with Drastically Reduced Accumulation of Three Classes of Viral Small Interfering RNAs. *Plant Cell*, 19(6), pp.2053–2063.
- Ding, S.-W. & Voinnet, O., 2007. Antiviral Immunity Directed by Small RNAs. *Cell*, 130(3), pp.413–426.
- Dohi, K., Nishikiori, M., Tamai, A., Ishikawa, M., Meshi, T. & Mori, M., 2006. Inducible virus-mediated expression of a foreign protein in suspension-cultured plant cells. *Archives of Virology*, 151(6), pp.1075–1084.
- Drinnenberg, I.A., Weinberg, D.E., Xie, K.T., Mower, J.P., Wolfe, K.H., Fink, G.R. & Bartel, D.P., 2009. RNAi in Budding Yeast. *Science*, 326(5952), pp.544–550.
- Dunoyer, P., Brosnan, C.A., Schott, G., Wang, Y., Jay, F., Alioua, A., Himber, C. & Voinnet, O., 2010. An endogenous, systemic RNAi pathway in plants. *The EMBO Journal*, 29(10), pp.1699–1712.
- Eamens, A.L., Smith, N.A., Curtin, S.J., Wang, M.-B. & Waterhouse, P.M., 2009. The Arabidopsis thaliana double-stranded RNA binding protein DRB1 directs guide strand selection from microRNA duplexes. *RNA*, 15(12), pp.2219–2235.
- Elmayan, T., Adenot, X., Gissot, L., Laussergues, D., Gy, I. & Vaucheret, H., 2009. A neomorphic sgs3 allele stabilizing miRNA cleavage products reveals that SGS3 acts as a homodimer. *FEBS Journal*, 276(3), pp.835–844.
- El-Shami, M., Pontier, D., Lahmy, S., Braun, L., Picart, C., Vega, D., Hakimi, M.-A., Jacobsen, S.E., Cooke, R. & Lagrange, T., 2007. Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes & Development*, 21(20), pp.2539–2544.
- Eun, C., Lorkovic, Z.J., Naumann, U., Long, Q., Havecker, E.R., Simon, S.A., Meyers, B.C., Matzke, A.J.M. & Matzke, M., 2011. AGO6 Functions in RNA-Mediated Transcriptional Gene Silencing in Shoot and Root Meristems in Arabidopsis thaliana. *PLoS ONE*, 6(10), p.e25730.
- Fang, Y. & Spector, D.L., 2007. Identification of Nuclear Dicing Bodies Containing Proteins for MicroRNA Biogenesis in Living Arabidopsis Plants. *Current Biology*, 17(9), pp.818–823.
- Felippes, F.F. de, Ott, F. & Weigel, D., 2010. Comparative analysis of non-autonomous effects of tasiRNAs and miRNAs in Arabidopsis thaliana. *Nucleic Acids Research*.

- 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), pp.806–811.
- Fischer, U., Kuhlmann, M., Pecinka, A., Schmidt, R. & Mette, M.F., 2008. Local DNA features affect RNA-directed transcriptional gene silencing and DNA methylation. *The Plant Journal*, 53(1), pp.1–10.
- Fojtová, M., Houdt, H.V., Depicker, A. & Kovařík, A., 2003. Epigenetic Switch from Posttranscriptional to Transcriptional Silencing Is Correlated with Promoter Hypermethylation. *Plant Physiology*, 133(3), pp.1240–1250.
- Fujioka, Y., Utsumi, M., Ohba, Y. & Watanabe, Y., 2007. Location of a Possible miRNA Processing Site in SmD3/SmB Nuclear Bodies in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 48(9), pp.1243–1253.
- Fukunaga, R. & Doudna, J.A., 2009. dsRNA with 5' overhangs contributes to endogenous and antiviral RNA silencing pathways in plants. *The EMBO Journal*, 28(5), pp.545–555.
- Gao, Z., Liu, H.-L., Daxinger, L., Pontes, O., He, X., Qian, W., Lin, H., Xie, M., Lorkovic, Z.J., Zhang, S., et al., 2010. An RNA polymerase II- and AGO4-associated protein acts in RNA-directed DNA methylation. *Nature*, 465(7294), pp.106–109.
- Gascioli, V., Mallory, A.C., Bartel, D.P. & Vaucheret, H., 2005. Partially Redundant Functions of Arabidopsis DICER-like Enzymes and a Role for DCL4 in Producing trans-Acting siRNAs. *Current Biology*, 15(16), pp.1494–1500.
- Gazzani, S., Lawrenson, T., Woodward, C., Headon, D. & Sablowski, R., 2004. A Link Between mRNA Turnover and RNA Interference in Arabidopsis. *Science*, 306(5698), pp.1046–1048.
- Gehring, M., Bubb, K.L. & Henikoff, S., 2009. Extensive Demethylation of Repetitive Elements During Seed Development Underlies Gene Imprinting. *Science*, 324(5933), pp.1447–1451.
- Gehring, M., Huh, J.H., Hsieh, T.-F., Penterman, J., Choi, Y., Harada, J.J., Goldberg, R.B. & Fischer, R.L., 2006. DEMETER DNA Glycosylase Establishes MEDEA Polycomb Gene Self-Imprinting by Allele-Specific Demethylation. *Cell*, 124(3), pp.495–506.
- Haag, J.R. & Pikaard, C.S., 2011. Multisubunit RNA polymerases IV and V: purveyors of non-coding RNA for plant gene silencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(8), pp.483–492.
- Haag, J.R., Pontes, O. & Pikaard, C.S., 2009. Metal A and Metal B Sites of Nuclear RNA Polymerases Pol IV and Pol V Are Required for siRNA-Dependent DNA Methylation and Gene Silencing. *PLoS ONE*, 4(1), p.e4110.
- Harvey, J.J.W., Lewsey, M.G., Patel, K., Westwood, J., Heimstädt, S., Carr, J.P. & Baulcombe, D.C., 2011. An Antiviral Defense Role of AGO2 in Plants. *PLoS ONE*, 6(1), p.e14639.
- Havecker, E.R., Wallbridge, L.M., Hardcastle, T.J., Bush, M.S., Kelly, K.A., Dunn, R.M., Schwach, F., Doonan, J.H. & Baulcombe, D.C., 2010. The Arabidopsis RNA-Directed

- DNA Methylation Argonautes Functionally Diverge Based on Their Expression and Interaction with Target Loci. *The Plant Cell Online*, 22(2), pp.321–334.
- He, X.-J., Hsu, Y.-F., Zhu, S., Liu, H.-L., Pontes, O., Zhu, J., Cui, X., Wang, C.-S. & Zhu, J.-K., 2009a. A conserved transcriptional regulator is required for RNA-directed DNA methylation and plant development. *Genes & Development*, 23(23), pp.2717–2722.
- He, X.-J., Hsu, Y.-F., Zhu, S., Wierzbicki, A.T., Pontes, O., Pikaard, C.S., Liu, H.-L., Wang, C.-S., Jin, H. & Zhu, J.-K., 2009b. An Effector of RNA-Directed DNA Methylation in Arabidopsis Is an ARGONAUTE 4- and RNA-Binding Protein. *Cell*, 137(3), pp.498–508.
- Hellens, R.P., Edwards, E.A., Leyland, N.R., Bean, S. & Mullineaux, P.M., 2000. pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Molecular Biology*, 42(6), pp.819–832.
- Henderson, I.R., Deleris, A., Wong, W., Zhong, X., Chin, H.G., Horwitz, G.A., Kelly, K.A., Pradhan, S. & Jacobsen, S.E., 2010. The De Novo Cytosine Methyltransferase DRM2 Requires Intact UBA Domains and a Catalytically Mutated Paralog DRM3 during RNA-Directed DNA Methylation in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genetics*, 6(10), p.e1001182.
- Herr, A.J., Molnár, A., Jones, A. & Baulcombe, D.C., 2006. Defective RNA processing enhances RNA silencing and influences flowering of Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(41), pp.14994–15001.
- Hiraguri, A., Itoh, R., Kondo, N., Nomura, Y., Aizawa, D., Murai, Y., Koiwa, H., Seki, M., Shinozaki, K. & Fukuhara, T., 2005. Specific interactions between Dicer-like proteins and HYL1/DRB- family dsRNA-binding proteins in Arabidopsis thaliana. *Plant Molecular Biology*, 57(2), pp.173–188.
- Hoffer, P., Ivashuta, S., Pontes, O., Vitins, A., Pikaard, C., Mroczka, A., Wagner, N. & Voelker, T., 2011. Posttranscriptional gene silencing in nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(1), pp.409–414.
- Huettel, B., Kanno, T., Daxinger, L., Aufsatz, W., Matzke, A.J. & Matzke, M., 2006. Endogenous targets of RNA-directed DNA methylation and Pol IV in Arabidopsis. *The EMBO Journal*, 25(12), pp.2828–2836.
- Chang, M.-M., Culley, D., Choi, J.J. & Hadwiger, L.A., 2002. Agrobacterium-mediated co-transformation of a pea β -1,3-glucanase and chitinase genes in potato (*Solanum tuberosum* L. c.v. Russet Burbank) using a single selectable marker. *Plant Science*, 163(1), pp.83–89.
- Chapman, E.J. & Carrington, J.C., 2007. Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nature Reviews. Genetics*, 8(11), pp.884–896.
- Chodavarapu, R.K., Feng, S., Bernatavichute, Y.V., Chen, P.-Y., Stroud, H., Yu, Y., Hetzel, J.A., Kuo, F., Kim, J., Cokus, S.J., et al., 2010. Relationship between nucleosome positioning and DNA methylation. *Nature*, 466(7304), pp.388–392.
- Jacob, F. & Monod, J., 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins.

- Jacob, Y., Feng, S., LeBlanc, C.A., Bernatavichute, Y.V., Stroud, H., Cokus, S., Johnson, L.M., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E. & Michaels, S.D., 2009. ATXR5 and ATXR6 are H3K27 monomethyltransferases required for chromatin structure and gene silencing. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(7), pp.763–768.
- Jauvion, V., Elmayan, T. & Vaucheret, H., 2010. The Conserved RNA Trafficking Proteins HPR1 and TEX1 Are Involved in the Production of Endogenous and Exogenous Small Interfering RNA in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, 22(8), pp.2697–2709.
- Jeddeloh, J.A., Stokes, T.L. & Richards, E.J., 1999. Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. *Nature Genetics*, 22(1), pp.94–97.
- Jin, H., Vacic, V., Girke, T., Lonardi, S. & Zhu, J.-K., 2008. Small RNAs and the regulation of cis-natural antisense transcripts in Arabidopsis. *BMC Molecular Biology*, 9(1), p.6.
- Johnson, L.M., Bostick, M., Zhang, X., Kraft, E., Henderson, I., Callis, J. & Jacobsen, S.E., 2007. The SRA Methyl-Cytosine-Binding Domain Links DNA and Histone Methylation. *Current Biology*, 17(4), pp.379–384.
- Johnson, L.M., Law, J.A., Khattar, A., Henderson, I.R. & Jacobsen, S.E., 2008. SRA-Domain Proteins Required for DRM2-Mediated De Novo DNA Methylation. *PLoS Genetics*, 4(11), p.e1000280.
- Kanazawa, A., O'Dell, M. & Hellens, R.P., 2007. The binding of nuclear factors to the as-1 element in the CaMV 35S promoter is affected by cytosine methylation in vitro. *Plant biology (Stuttgart, Germany)*, 9(3), pp.435–441.
- Kang, C.-Y., Lian, H.-L., Wang, F.-F., Huang, J.-R. & Yang, H.-Q., 2009. Cryptochromes, Phytochromes, and COP1 Regulate Light-Controlled Stomatal Development in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, 21(9), pp.2624–2641.
- Kankel, M.W., Ramsey, D.E., Stokes, T.L., Flowers, S.K., Haag, J.R., Jeddeloh, J.A., Riddle, N.C., Verbsky, M.L. & Richards, E.J., 2003. Arabidopsis MET1 Cytosine Methyltransferase Mutants. *Genetics*, 163(3), pp.1109–1122.
- Kanno, T., Bucher, E., Daxinger, L., Huettel, B., Bohmdorfer, G., Gregor, W., Kreil, D.P., Matzke, M. & Matzke, A.J.M., 2008. A structural-maintenance-of-chromosomes hinge domain-containing protein is required for RNA-directed DNA methylation. *Nature Genetics*, 40(5), pp.670–675.
- Kanno, T., Bucher, E., Daxinger, L., Huettel, B., Kreil, D.P., Breinig, F., Lind, M., Schmitt, M.J., Simon, S.A., Gurazada, S.G.R., et al., 2010. RNA-directed DNA methylation and plant development require an IWR1-type transcription factor. *EMBO Reports*, 11(1), pp.65–71.
- Kanno, T., Mette, M.F., Kreil, D.P., Aufsatz, W., Matzke, M. & Matzke, A.J.M., 2004. Involvement of putative SNF2 chromatin remodeling protein DRD1 in RNA-directed DNA methylation. *Current Biology*, 14(9), pp.801–805.
- Kapranov, P., Willingham, A.T. & Gingeras, T.R., 2007. Genome-wide transcription and the

- implications for genomic organization. *Nature Reviews Genetics*, 8(6), pp.413–423.
- Karlowski, W.M., Zielezinski, A., Carrère, J., Pontier, D., Lagrange, T. & Cooke, R., 2010. Genome-wide computational identification of WG/GW Argonaute-binding proteins in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research*, 38(13), pp.4231–4245.
- 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), p.e57.
- Katiyar-Agarwal, S., Gao, S., Vivian-Smith, A. & Jin, H., 2007. A novel class of bacteria-induced small RNAs in Arabidopsis. *Genes & Development*, 21(23), pp.3123–3134.
- Khaitová, L.C., Fojtová, M., Křížová, K., Lunerová, J., Fulnecek, J., Depicker, A. & Kovařík, A., 2011. Paramutation of tobacco transgenes by small RNA-mediated transcriptional gene silencing. *Epigenetics*, 6(5), pp.650–660.
- Kim, Y.J., Zheng, B., Yu, Y., Won, S.Y., Mo, B. & Chen, X., 2011. The role of Mediator in small and long noncoding RNA production in Arabidopsis thaliana. *The EMBO Journal*, 30(5), pp.814–822.
- Kumakura, N., Takeda, A., Fujioka, Y., Motose, H., Takano, R. & Watanabe, Y., 2009. SGS3 and RDR6 interact and colocalize in cytoplasmic SGS3/RDR6-bodies. *FEBS Letters*, 583(8), pp.1261–1266.
- Law, J.A., Ausin, I., Johnson, L.M., Vashisht, A.A., Zhu, J.-K., Wohlschlegel, J.A. & Jacobsen, S.E., 2010. A Protein Complex Required for Polymerase V Transcripts and RNA-Directed DNA Methylation in Arabidopsis. *Current Biology*, 20(10), pp.951–956.
- Law, J.A. & Jacobsen, S.E., 2010. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics*, 11(3), pp.204–220.
- Law, J.A., Vashisht, A.A., Wohlschlegel, J.A. & Jacobsen, S.E., 2011. SHH1, a homeodomain protein required for DNA methylation, as well as RDR2, RDM4, and chromatin remodeling factors, associate with RNA polymerase IV. *PLoS Genetics*, 7(7), p.e1002195.
- Lee, J.-Y., Lee, H.-S., Wi, S.-J., Park, K.Y., Schmit, A.-C. & Pai, H.-S., 2009. Dual functions of Nicotiana benthamiana Rael in interphase and mitosis. *The Plant Journal*, 59(2), pp.278–291.
- Lee, T., Gurazada, S.G.R., Zhai, J., Li, S., Simon, S.A., Matzke, M.A., Chen, X. & Meyers, B.C., 2012. RNA polymerase V-dependent small RNAs in Arabidopsis originate from small, intergenic loci including most SINE repeats. *Epigenetics*, 7(7), pp.781–795.
- Li, J., Yang, Z., Yu, B., Liu, J. & Chen, X., 2005. Methylation Protects miRNAs and siRNAs from a 3'-End Uridylation Activity in Arabidopsis. *Current Biology*, 15(16), pp.1501–1507.
- Lister, R., O'Malley, R.C., Tonti-Filippini, J., Gregory, B.D., Berry, C.C., Millar, A.H. & Ecker, J.R., 2008. Highly Integrated Single-Base Resolution Maps of the Epigenome

in Arabidopsis. *Cell*, 133(3), pp.523–536.

- Liu, C., Lu, F., Cui, X. & Cao, X., 2010. Histone Methylation in Higher Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), pp.395–420.
- Liu, X., Yu, C.-W., Duan, J., Luo, M., Wang, K., Tian, G., Cui, Y. & Wu, K., 2012. HDA6 Directly Interacts with DNA Methyltransferase MET1 and Maintains Transposable Element Silencing in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 158(1), pp.119–129.
- Lorković, Z.J., Naumann, U., Matzke, A.J.M. & Matzke, M., 2012. Involvement of a GHKL ATPase in RNA-Directed DNA Methylation in Arabidopsis thaliana. *Current Biology*, 22(10), pp.933–938.
- Lunerová-Bedřichová, J., Bleys, A., Fojtová, M., Khaitová, L., Depicker, A. & Kovařík, A., 2008. Trans-generation inheritance of methylation patterns in a tobacco transgene following a post-transcriptional silencing event. *Plant Journal*, 54(6), pp.1049–1062.
- Luo, J. & Hall, B., 2007. A Multistep Process Gave Rise to RNA Polymerase IV of Land Plants. *Journal of Molecular Evolution*, 64(1), pp.101–112.
- Luo, Z. & Chen, Z., 2007. Improperly terminated, unpolyadenylated mRNA of sense transgenes is targeted by RDR6-mediated RNA silencing in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 19(3), pp.943–958.
- MacRae, I.J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A.N., Cande, W.Z., Adams, P.D. & Doudna, J.A., 2006. Structural Basis for Double-Stranded RNA Processing by Dicer. *Science*, 311(5758), pp.195–198.
- Maida, Y., Yasukawa, M., Furuuchi, M., Lassmann, T., Possemato, R., Okamoto, N., Kasim, V., Hayashizaki, Y., Hahn, W.C. & Masutomi, K., 2009. An RNA-dependent RNA polymerase formed by TERT and the RMRP RNA. *Nature*, 461(7261), pp.230–235.
- Makeyev, E.V. & Bamford, D.H., 2002. Cellular RNA-Dependent RNA Polymerase Involved in Posttranscriptional Gene Silencing Has Two Distinct Activity Modes. *Molecular Cell*, 10(6), pp.1417–1427.
- Mallory, A.C. & Vaucheret, H., 2009. ARGONAUTE 1 homeostasis invokes the coordinate action of the microRNA and siRNA pathways. *EMBO Reports*, 10(5), pp.521–526.
- Manavella, P.A., Koenig, D. & Weigel, D., 2012. Plant Secondary siRNA Production Determined by microRNA-Duplex Structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(7), pp.2461–2466.
- Margis, R., Fusaro, A.F., Smith, N.A., Curtin, S.J., Watson, J.M., Finnegan, E.J. & Waterhouse, P.M., 2006. The evolution and diversification of Dicers in plants. *FEBS Letters*, 580(10), pp.2442–2450.
- Meyers, B.C., Axtell, M.J., Bartel, B., Bartel, D.P., Baulcombe, D., Bowman, J.L., Cao, X., Carrington, J.C., Chen, X., Green, P.J., et al., 2008. Criteria for Annotation of Plant MicroRNAs. *Plant Cell*, 20(12), pp.3186–3190.
- Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., Wu, L., Li, S., Zhou, H., Long, C., et al.,

2008. Sorting of Small RNAs into Arabidopsis Argonaute Complexes Is Directed by the 5' Terminal Nucleotide. *Cell*, 133(1), pp.116–127.
- Mlotshwa, S., Pruss, G.J., Gao, Z., Mgutshini, N.L., Li, J., Chen, X., Bowman, L.H. & Vance, V., 2010. Transcriptional silencing induced by Arabidopsis T-DNA mutants is associated with 35S promoter siRNAs and requires genes involved in siRNA-mediated chromatin silencing. *The Plant Journal*, 64(4), pp.699–704.
- Mlotshwa, S., Pruss, G.J., Peragine, A., Endres, M.W., Li, J., Chen, X., Poethig, R.S., Bowman, L.H. & Vance, V., 2008. DICER-LIKE2 plays a primary role in transitive silencing of transgenes in Arabidopsis. *PLoS ONE*, 3(3), p.e1755.
- Moissiard, G., Parizotto, E.A., Himber, C. & Voinnet, O., 2007. Transitivity in Arabidopsis can be primed, requires the redundant action of the antiviral Dicer-like 4 and Dicer-like 2, and is compromised by viral-encoded suppressor proteins. *RNA*, 13(8), pp.1268–1278.
- Molnar, A., Melnyk, C.W., Bassett, A., Hardcastle, T.J., Dunn, R. & Baulcombe, D.C., 2010. Small Silencing RNAs in Plants Are Mobile and Direct Epigenetic Modification in Recipient Cells. *Science*, 328(5980), pp.872–875.
- Montgomery, T.A., Howell, M.D., Cuperus, J.T., Li, D., Hansen, J.E., Alexander, A.L., Chapman, E.J., Fahlgren, N., Allen, E. & Carrington, J.C., 2008. Specificity of ARGONAUTE7-miR390 Interaction and Dual Functionality in TAS3 Trans-Acting siRNA Formation. *Cell*, 133(1), pp.128–141.
- Moore, I., Samalova, M. & Kurup, S., 2006. Transactivated and chemically inducible gene expression in plants. *The Plant Journal*, 45(4), pp.651–683.
- Mosher, R.A., Melnyk, C.W., Kelly, K.A., Dunn, R.M., Studholme, D.J. & Baulcombe, D.C., 2009. Uniparental expression of PolIV-dependent siRNAs in developing endosperm of Arabidopsis. *Nature*, 460(7252), pp.283–286.
- Mosher, R.A., Schwach, F., Studholme, D. & Baulcombe, D.C., 2008. PolIVb influences RNA-directed DNA methylation independently of its role in siRNA biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(8), pp.3145–3150.
- Murashige, T. & Skoog, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), pp.473–497.
- Nagata, T., Nemoto, Y. & Hasezawa, S., 1992. Tobacco BY-2 cell line as the “HeLa” cell in the cell biology of higher plants. *International Review of Cytology*, 132, pp.1–30.
- Neelakandan, A. & Wang, K., 2011. Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. *Plant Cell Reports*, pp.1–24.
- Nicholson, S.J. & Srivastava, V., 2009. Transgene constructs lacking transcription termination signal induce efficient silencing of endogenous targets in Arabidopsis. *Molecular Genetics and Genomics*, 282(3), pp.319–328.
- 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, p.44.

- Nocarova, E., Opatrny, 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), pp.565–572.
- Oka, S., Hirai, S., Choi, K. & Kodama, H., 2008. Preferential spreading of RNA silencing into the 3' downstream region of the transgene in tobacco. *Journal of Plant Biology*, 51(3), pp.227–232.
- Okano, Y., Miki, D. & Shimamoto, K., 2008. Small interfering RNA (siRNA) targeting of endogenous promoters induces DNA methylation, but not necessarily gene silencing, in rice. *The Plant Journal*, 53(1), pp.65–77.
- 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), pp.613–622.
- Penterman, J., Zilberman, D., Huh, J.H., Ballinger, T., Henikoff, S. & Fischer, R.L., 2007. DNA demethylation in the Arabidopsis genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(16), pp.6752–6757.
- Pontes, O., Li, C.F., Nunes, P.C., Haag, J., Ream, T., Vitins, A., Jacobsen, S.E. & Pikaard, C.S., 2006. The Arabidopsis Chromatin-Modifying Nuclear siRNA Pathway Involves a Nucleolar RNA Processing Center. *Cell*, 126(1), pp.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), pp.2030–2040.
- Qi, Y., He, X., Wang, X.-J., Kohany, O., Jurka, J. & Hannon, G.J., 2006. Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature*, 443(7114), pp.1008–1012.
- Qin, H., Chen, F., Huan, X., Machida, S., Song, J. & Yuan, Y.A., 2010. Structure of the Arabidopsis thaliana DCL4 DUF283 domain reveals a noncanonical double-stranded RNA-binding fold for protein–protein interaction. *RNA*, 16(3), pp.474–481.
- Rajagopalan, R., Vaucheret, H., Trejo, J. & Bartel, D.P., 2006. A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in Arabidopsis thaliana. *Genes & Development*, 20(24), pp.3407–3425.
- Rajakumara, E., Law, J.A., Simanshu, D.K., Voigt, P., Johnson, L.M., Reinberg, D., Patel, D.J. & Jacobsen, S.E., 2011. A dual flip-out mechanism for 5mC recognition by the Arabidopsis SUVH5 SRA domain and its impact on DNA methylation and H3K9 dimethylation in vivo. *Genes & Development*, 25(2), pp.137–152.
- Rajeswaran, R., Aregger, M., Zvereva, A.S., Borah, B.K., Gubaeva, E.G. & Pooggin, M.M., 2012. Sequencing of RDR6-Dependent Double-Stranded RNAs Reveals Novel Features of Plant siRNA Biogenesis. *Nucleic Acids Research*.

- Rajeswaran, R. & Pooggin, M.M., 2011. RDR6-mediated synthesis of complementary RNA is terminated by miRNA stably bound to template RNA. *Nucleic Acids Research*.
- Ream, T.S., Haag, J.R., Wierzbicki, A.T., Nicora, C.D., Norbeck, A.D., Zhu, J.-K., Hagen, G., Guilfoyle, T.J., Pasa-Tolic, 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), pp.192–203.
- Ron, M., Alandete Saez, M., Eshed Williams, L., Fletcher, J.C. & McCormick, S., 2010. Proper Regulation of a Sperm-Specific Cis-Nat-siRNA Is Essential for Double Fertilization in Arabidopsis. *Genes & Development*, 24(10), pp.1010–1021.
- Ronemus, M., Vaughn, M.W. & Martienssen, R.A., 2006. MicroRNA-Targeted and Small Interfering RNA-Mediated mRNA Degradation Is Regulated by Argonaute, Dicer, and RNA-Dependent RNA Polymerase in Arabidopsis. *Plant Cell*, 18(7), pp.1559–1574.
- 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. *PLoS Genetics*, 7(6), p.e1002120.
- Rubio-Somoza, I. & Weigel, D., 2011. MicroRNA networks and developmental plasticity in plants. *Trends in Plant Science*, 16(5), pp.258–264.
- Rutherford, G., Tanurdzic, M., Hasebe, M. & Banks, J.A., 2004. A systemic gene silencing method suitable for high throughput, reverse genetic analyses of gene function in fern gametophytes. *BMC Plant Biology*, 4(1), p.6.
- Rymarquis, L.A., Souret, F.F. & Green, P.J., 2011. Evidence That XRN4, an Arabidopsis Homolog of Exoribonuclease XRN1, Preferentially Impacts Transcripts with Certain Sequences or in Particular Functional Categories. *RNA*, 17(3), pp.501–511.
- Sanders, P.R., Winter, J.A., Barnason, A.R., Rogers, S.G. & Fraley, R.T., 1987. Comparison of cauliflower mosaic virus 35S and nopaline synthase promoters in transgenic plants. *Nucleic Acids Research*, 15(4), pp.1543–1558.
- Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N.G., Palmer, A.E. & Tsien, R.Y., 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 22(12), pp.1567–1572.
- Shen, D., Ye, W., Dong, S., Wang, Y. & Dou, D., 2011. Characterization of intronic structures and alternative splicing in *Phytophthora sojae* by comparative analysis of expressed sequence tags and genomic sequences. *Canadian Journal of Microbiology*, 57(2), pp.84–90.
- Shure, M., Wessler, S. & Fedoroff, N., 1983. Molecular identification and isolation of the Waxy locus in maize. *Cell*, 35(1), pp.225–233.
- Sidorenko, L., Dorweiler, J.E., Cigan, A.M., Arteaga-Vazquez, M., Vyas, M., Kermicle, J., Jurcin, D., Brzeski, J., Cai, Y. & Chandler, V.L., 2009. A Dominant Mutation in mediator of paramutation2, One of Three Second-Largest Subunits of a Plant-Specific RNA Polymerase, Disrupts Multiple siRNA Silencing Processes. *PLoS Genetics*,

5(11), p.e1000725.

- Sijen, T., Vijn, I., Rebocho, A., van Blokland, R., Roelofs, D., Mol, J.N.M. & Kooter, J.M., 2001. Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. *Current Biology*, 11(6), pp.436–440.
- Slotkin, R.K., Vaughn, M., Borges, F., Tanurdzic, M., Becker, J.D., Feijó, J.A. & Martienssen, R.A., 2009. Epigenetic Reprogramming and Small RNA Silencing of Transposable Elements in Pollen. *Cell*, 136(3), pp.461–472.
- Smith, N.A., Singh, S.P., Wang, M.-B., Stoutjesdijk, P.A., Green, A.G. & Waterhouse, P.M., 2000. Gene expression: Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature*, 407(6802), pp.319–320.
- Sridhar, V.V., Kapoor, A., Zhang, K., Zhu, J., Zhou, T., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. & Zhu, J.-K., 2007. Control of DNA methylation and heterochromatic silencing by histone H2B deubiquitination. *Nature*, 447(7145), pp.735–738.
- Tahbaz, N., Kolb, F.A., Zhang, H., Jaronczyk, K., Filipowicz, W. & Hobman, T.C., 2004. Characterization of the interactions between mammalian PAZ PIWI domain proteins and Dicer. *EMBO reports*, 5(2), pp.189–194.
- Takeda, A., Iwasaki, S., Watanabe, T., Utsumi, M. & Watanabe, Y., 2008. The Mechanism Selecting the Guide Strand from Small RNA Duplexes is Different Among Argonaute Proteins. *Plant Cell Physiology*, 49(4), pp.493–500.
- Tang, G., Reinhart, B.J., Bartel, D.P. & Zamore, P.D., 2003. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes & Development*, 17(1), pp.49–63.
- Terns, M.P. & Terns, R.M., 2011. CRISPR-based adaptive immune systems. *Current Opinion in Microbiology*, 14(3), pp.321–327.
- Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N. & Zamore, P.D., 2004. A Protein Sensor for siRNA Asymmetry. *Science*, 306(5700), pp.1377–1380.
- Vaistij, F.E., Jones, L. & Baulcombe, D.C., 2002. Spreading of RNA Targeting and DNA Methylation in RNA Silencing Requires Transcription of the Target Gene and a Putative RNA-Dependent RNA Polymerase. *The Plant Cell Online*, 14(4), pp.857–867.
- Vaucheret, H., 2008. Plant ARGONAUTES. *Trends in Plant Science*, 13(7), pp.350–358.
- Vazquez, F., Blevins, T., Ailhas, J., Boller, T. & Meins, F., 2008. Evolution of Arabidopsis MIR genes generates novel microRNA classes. *Nucleic Acids Research*, 36(20), pp.6429–6438.
- Vazquez, F., Legrand, S. & Windels, D., 2010. The biosynthetic pathways and biological scopes of plant small RNAs. *Trends in Plant Science*, 15(6), pp.337–345.
- Vlot, A.C., Liu, P.-P., Cameron, R.K., Park, S.-W., Yang, Y., Kumar, D., Zhou, F., Padukkavidana, T., Gustafsson, C., Pichersky, E., et al., 2008. Identification of likely orthologs of tobacco salicylic acid-binding protein 2 and their role in systemic

- acquired resistance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 56(3), pp.445–456.
- Voinnet, O., 2009. Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs. *Cell*, 136(4), pp.669–687.
- Voinnet, O., 2008. Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. *Trends in Plant Science*, 13(7), pp.317–328.
- Wang, M.-B. & Waterhouse, P.M., 2000. High-efficiency silencing of a β -glucuronidase gene in rice is correlated with repetitive transgene structure but is independent of DNA methylation. *Plant Molecular Biology*, 43(1), pp.67–82.
- Wang, X., Laurie, J.D., Liu, T., Wentz, J. & Liu, X.S., 2011. Computational dissection of *Arabidopsis* smRNAome leads to discovery of novel microRNAs and short interfering RNAs associated with transcription start sites. *Genomics*, 97(4), pp.235–243.
- Waterhouse, P.M., Graham, M.W. & Wang, M.-B., 1998. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(23), pp.13959–13964.
- 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), pp.635–648.
- Wierzbicki, A.T., Ream, T.S., Haag, J.R. & Pikaard, C.S., 2009. RNA polymerase V transcription guides ARGONAUTE4 to chromatin. *Nature Genetics*, 41(5), pp.630–634.
- Willmann, M.R., Endres, M.W., Cook, R.T. & Gregory, B.D., 2011. The Functions of RNA-Dependent RNA Polymerases in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 9.
- Wu, L., Zhou, H., Zhang, Q., Zhang, J., Ni, F., Liu, C. & Qi, Y., 2010. DNA Methylation Mediated by a MicroRNA Pathway. *Molecular Cell*, 38(3), pp.465–475.
- Xie, M., Ren, G., Costa-Nunes, P., Pontes, O. & Yu, B., 2012. A subgroup of SGS3-like proteins act redundantly in RNA-directed DNA methylation. *Nucleic Acids Research*, 40(10), pp.4422–4431.
- Yan, H., Chretien, R., Ye, J. & Rommens, C.M., 2006. New Construct Approaches for Efficient Gene Silencing in Plants. *Plant Physiology*, 141(4), pp.1508–1518.
- Yoshikawa, M., Peragine, A., Park, M.Y. & Poethig, R.S., 2005. A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes & Development*, 19(18), pp.2164–2175.
- Yuan, Y.-R., Pei, Y., Ma, J.-B., Kuryavyi, V., Zhadina, M., Meister, G., Chen, H.-Y., Dauter, Z., Tuschl, T. & Patel, D.J., 2005. Crystal Structure of *A. aeolicus* Argonaute, a Site-Specific DNA-Guided Endoribonuclease, Provides Insights into RISC-Mediated mRNA Cleavage. *Molecular Cell*, 19(3), pp.405–419.
- Zhang, C., Ng, D.W.-K., Lu, J. & Chen, Z.J., 2012. Roles of target site location and sequence complementarity in trans-acting siRNA formation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*,

69(2), pp.217–226.

- Zhang, X., Bernatavichute, Y.V., Cokus, S., Pellegrini, M. & Jacobsen, S.E., 2009. Genome-wide analysis of mono-, di- and trimethylation of histone H3 lysine 4 in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biology*, 10(6), p.R62.
- Zhang, X., Clarenz, O., Cokus, S., Bernatavichute, Y.V., Pellegrini, M., Goodrich, J. & Jacobsen, S.E., 2007. Whole-Genome Analysis of Histone H3 Lysine 27 Trimethylation in *Arabidopsis*. *PLoS Biology*, 5(5), p.e129.
- Zhao, J., Hyman, L. & Moore, C., 1999. Formation of mRNA 3' Ends in Eukaryotes: Mechanism, Regulation, and Interrelationships with Other Steps in mRNA Synthesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(2), pp.405–445.
- Zheng, B., Wang, Z., Li, S., Yu, B., Liu, J.-Y. & Chen, X., 2009. Intergenic transcription by RNA Polymerase II coordinates Pol IV and Pol V in siRNA-directed transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *Genes & Development*, 23(24), pp.2850–2860.
- Zheng, Q., Ryvkin, P., Li, F., Dragomir, I., Valladares, O., Yang, J., Cao, K., Wang, L.-S. & Gregory, B.D., 2010. Genome-wide double-stranded RNA sequencing reveals the functional significance of base-paired RNAs in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics*, 6(9).
- Zheng, X., Pontes, O., Zhu, J., Miki, D., Zhang, F., Li, W.-X., Iida, K., Kapoor, A., Pikaard, C.S. & Zhu, J.-K., 2008. ROS3 is an RNA-binding protein required for DNA demethylation in *Arabidopsis*. *Nature*, 455(7217), pp.1259–1262.
- Zilberman, D., Coleman-Derr, D., Ballinger, T. & Henikoff, S., 2008. Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks. *Nature*, 456(7218), pp.125–129.
- Zilberman, D., Gehring, M., Tran, R.K., Ballinger, T. & Henikoff, S., 2007. Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nature Genetics*, 39(1), pp.61–69.
- Zong, J., Yao, X., Yin, J., Zhang, D. & Ma, H., 2009. Evolution of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) genes: Duplications and possible losses before and after the divergence of major eukaryotic groups. *Gene*, 447(1), pp.29–39.
- Zuo, J., Niu, Q. & Chua, N., 2000. An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *The Plant Journal*, 24(2), pp.265–273.
- Aceituno, F.F., Moseyko, N., Rhee, S.Y. & Gutiérrez, R.A., 2008. The rules of gene expression in plants: Organ identity and gene body methylation are key factors for regulation of gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, 9(1), p.438.
- Adenot, X., Elmayan, T., Lauressergues, D., Boutet, S., Bouché, N., Gascioli, V. & Vaucheret, H., 2006. DRB4-Dependent TAS3 trans-Acting siRNAs Control Leaf Morphology through AGO7. *Current Biology*, 16(9), pp.927–932.
- Ameres, S.L., Martinez, J. & Schroeder, R., 2007. Molecular Basis for Target RNA Recognition and Cleavage by Human RISC. *Cell*, 130(1), pp.101–112.

- 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), pp.6832–6841.
- Ausin, I., Greenberg, M.V.C., Simanshu, D.K., Hale, C.J., Vashisht, A.A., Simon, S.A., Lee, T., Feng, S., Española, S.D., Meyers, B.C., et al., 2012. INVOLVED IN DE NOVO 2-containing complex involved in RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(22), pp.8374–8381.
- Ausin, I., Mockler, T.C., Chory, J. & Jacobsen, S.E., 2009. IDN1 and IDN2 are required for de novo DNA methylation in Arabidopsis thaliana. *Nat Struct Mol Biol*, 16(12), pp.1325–1327.
- Axtell, M.J., Jan, C., Rajagopalan, R. & Bartel, D.P., 2006. A Two-Hit Trigger for siRNA Biogenesis in Plants. *Cell*, 127(3), pp.565–577.
- Baev, V., Naydenov, M., Apostolova, E., Ivanova, D., Doncheva, S., Minkov, I. & Yahubyan, G., 2010. Identification of RNA-dependent DNA-methylation regulated promoters in Arabidopsis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(6), pp.393–400.
- Baulcombe, D., 1996. Mechanisms of Pathogen-Derived Resistance to Viruses in Transgenic Plants. *The Plant Cell*, 8(10), pp.1833–1844.
- 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), pp.11928–11933.
- Bernatavichute, Y.V., Zhang, X., Cokus, S., Pellegrini, M. & Jacobsen, S.E., 2008. Genome-Wide Association of Histone H3 Lysine Nine Methylation with CHG DNA Methylation in Arabidopsis thaliana. *PLoS ONE*, 3(9), p.e3156.
- Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M. & Benning, C., 1998. AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *The EMBO Journal*, 17(1), pp.170–180.
- Bologna, N.G., Mateos, J.L., Bresso, E.G. & Palatnik, J.F., 2009. A loop-to-base processing mechanism underlies the biogenesis of plant microRNAs miR319 and miR159. *The EMBO Journal*, 28(23), pp.3646–3656.
- 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), pp.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), pp.1185–1190.
- Brosnan, C.A., Mitter, N., Christie, M., Smith, N.A., Waterhouse, P.M. & Carroll, B.J., 2007. Nuclear gene silencing directs reception of long-distance mRNA silencing in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(37), pp.14741–14746.

- Cao, X., Aufsatz, W., Zilberman, D., Mette, M.F., Huang, M.S., Matzke, M. & Jacobsen, S.E., 2003. Role of the DRM and CMT3 Methyltransferases in RNA-Directed DNA Methylation. *Current Biology*, 13(24), pp.2212–2217.
- Cerutti, H. & Casas-Mollano, J., 2006. On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Current Genetics*, 50(2), pp.81–99.
- Cokus, S.J., Feng, S., Zhang, X., Chen, Z., Merriman, B., Haudenschild, C.D., Pradhan, S., Nelson, S.F., Pellegrini, M. & Jacobsen, S.E., 2008. Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. *Nature*, 452(7184), pp.215–219.
- Cuperus, J.T., Carbonell, A., Fahlgren, N., Garcia-Ruiz, H., Burke, R.T., Takeda, A., Sullivan, C.M., Gilbert, S.D., Montgomery, T.A. & Carrington, J.C., 2010. Unique Functionality of 22 nt miRNAs in Triggering RDR6-Dependent siRNA Biogenesis from Target Transcripts in Arabidopsis. *Nature structural & molecular biology*, 17(8), pp.997–1003.
- Curaba, J. & Chen, X., 2008. Biochemical Activities of Arabidopsis RNA-dependent RNA Polymerase 6. *Journal of Biological Chemistry*, 283(6), pp.3059–3066.
- Curtin, S.J., Watson, J.M., Smith, N.A., Eamens, A.L., Blanchard, C.L. & Waterhouse, P.M., 2008. The roles of plant dsRNA-binding proteins in RNAi-like pathways. *FEBS Letters*, 582(18), pp.2753–2760.
- Davis, S.J. & Vierstra, R.D., 1998. Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. *Plant Molecular Biology*, 36(4), pp.521–528.
- Daxinger, L., Kanno, T., Bucher, E., van der Winden, J., Naumann, U., Matzke, A.J.M. & Matzke, M., 2009. A stepwise pathway for biogenesis of 24-nt secondary siRNAs and spreading of DNA methylation. *The EMBO Journal*, 28(1), pp.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), pp.4777–4788.
- Deleris, A., Gallego-Bartolome, J., Bao, J., Kasschau, K.D., Carrington, J.C. & Voinnet, O., 2006. Hierarchical Action and Inhibition of Plant Dicer-Like Proteins in Antiviral Defense. *Science*, 313(5783), pp.68–71.
- Deleris, A., Greenberg, M.V.C., Ausin, I., Law, R.W.Y., Moissiard, G., Schubert, D. & Jacobsen, S.E., 2010. Involvement of a Jumonji-C domain-containing histone demethylase in DRM2-mediated maintenance of DNA methylation. *EMBO Rep*, 11(12), pp.950–955.
- Diaz-Pendon, J.A., Li, F., Li, W.-X. & Ding, S.-W., 2007. Suppression of Antiviral Silencing by Cucumber Mosaic Virus 2b Protein in Arabidopsis Is Associated with Drastically Reduced Accumulation of Three Classes of Viral Small Interfering RNAs. *Plant Cell*, 19(6), pp.2053–2063.
- Ding, S.-W. & Voinnet, O., 2007. Antiviral Immunity Directed by Small RNAs. *Cell*, 130(3), pp.413–426.

- Dohi, K., Nishikiori, M., Tamai, A., Ishikawa, M., Meshi, T. & Mori, M., 2006. Inducible virus-mediated expression of a foreign protein in suspension-cultured plant cells. *Archives of Virology*, 151(6), pp.1075–1084.
- Drinnenberg, I.A., Weinberg, D.E., Xie, K.T., Mower, J.P., Wolfe, K.H., Fink, G.R. & Bartel, D.P., 2009. RNAi in Budding Yeast. *Science*, 326(5952), pp.544–550.
- Dunoyer, P., Brosnan, C.A., Schott, G., Wang, Y., Jay, F., Alioua, A., Himber, C. & Voinnet, O., 2010. An endogenous, systemic RNAi pathway in plants. *The EMBO Journal*, 29(10), pp.1699–1712.
- Eamens, A.L., Smith, N.A., Curtin, S.J., Wang, M.-B. & Waterhouse, P.M., 2009. The *Arabidopsis thaliana* double-stranded RNA binding protein DRB1 directs guide strand selection from microRNA duplexes. *RNA*, 15(12), pp.2219–2235.
- Elmayan, T., Adenot, X., Gissot, L., Lauressergues, D., Gy, I. & Vaucheret, H., 2009. A neomorphic *sgs3* allele stabilizing miRNA cleavage products reveals that SGS3 acts as a homodimer. *FEBS Journal*, 276(3), pp.835–844.
- El-Shami, M., Pontier, D., Lahmy, S., Braun, L., Picart, C., Vega, D., Hakimi, M.-A., Jacobsen, S.E., Cooke, R. & Lagrange, T., 2007. Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes & Development*, 21(20), pp.2539–2544.
- Eun, C., Lorkovic, Z.J., Naumann, U., Long, Q., Havecker, E.R., Simon, S.A., Meyers, B.C., Matzke, A.J.M. & Matzke, M., 2011. AGO6 Functions in RNA-Mediated Transcriptional Gene Silencing in Shoot and Root Meristems in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*, 6(10), p.e25730.
- Fang, Y. & Spector, D.L., 2007. Identification of Nuclear Dicing Bodies Containing Proteins for MicroRNA Biogenesis in Living *Arabidopsis* Plants. *Current Biology*, 17(9), pp.818–823.
- Felippes, F.F. de, Ott, F. & Weigel, D., 2010. Comparative analysis of non-autonomous effects of tasiRNAs and miRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research*.
- 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), pp.806–811.
- Fischer, U., Kuhlmann, M., Pecinka, A., Schmidt, R. & Mette, M.F., 2008. Local DNA features affect RNA-directed transcriptional gene silencing and DNA methylation. *The Plant Journal*, 53(1), pp.1–10.
- Fojtová, M., Houdt, H.V., Depicker, A. & Kovařík, A., 2003. Epigenetic Switch from Posttranscriptional to Transcriptional Silencing Is Correlated with Promoter Hypermethylation. *Plant Physiology*, 133(3), pp.1240–1250.
- Fujioka, Y., Utsumi, M., Ohba, Y. & Watanabe, Y., 2007. Location of a Possible miRNA Processing Site in SmD3/SmB Nuclear Bodies in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 48(9), pp.1243–1253.

- Fukunaga, R. & Doudna, J.A., 2009. dsRNA with 5' overhangs contributes to endogenous and antiviral RNA silencing pathways in plants. *The EMBO Journal*, 28(5), pp.545–555.
- Gao, Z., Liu, H.-L., Daxinger, L., Pontes, O., He, X., Qian, W., Lin, H., Xie, M., Lorkovic, Z.J., Zhang, S., et al., 2010. An RNA polymerase II- and AGO4-associated protein acts in RNA-directed DNA methylation. *Nature*, 465(7294), pp.106–109.
- Gascioli, V., Mallory, A.C., Bartel, D.P. & Vaucheret, H., 2005. Partially Redundant Functions of Arabidopsis DICER-like Enzymes and a Role for DCL4 in Producing trans-Acting siRNAs. *Current Biology*, 15(16), pp.1494–1500.
- Gazzani, S., Lawrenson, T., Woodward, C., Headon, D. & Sablowski, R., 2004. A Link Between mRNA Turnover and RNA Interference in Arabidopsis. *Science*, 306(5698), pp.1046–1048.
- Gehring, M., Bubb, K.L. & Henikoff, S., 2009. Extensive Demethylation of Repetitive Elements During Seed Development Underlies Gene Imprinting. *Science*, 324(5933), pp.1447–1451.
- Gehring, M., Huh, J.H., Hsieh, T.-F., Penterman, J., Choi, Y., Harada, J.J., Goldberg, R.B. & Fischer, R.L., 2006. DEMETER DNA Glycosylase Establishes MEDEA Polycomb Gene Self-Imprinting by Allele-Specific Demethylation. *Cell*, 124(3), pp.495–506.
- Haag, J.R. & Pikaard, C.S., 2011. Multisubunit RNA polymerases IV and V: purveyors of non-coding RNA for plant gene silencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(8), pp.483–492.
- Haag, J.R., Pontes, O. & Pikaard, C.S., 2009. Metal A and Metal B Sites of Nuclear RNA Polymerases Pol IV and Pol V Are Required for siRNA-Dependent DNA Methylation and Gene Silencing. *PLoS ONE*, 4(1), p.e4110.
- Harvey, J.J.W., Lewsey, M.G., Patel, K., Westwood, J., Heimstädt, S., Carr, J.P. & Baulcombe, D.C., 2011. An Antiviral Defense Role of AGO2 in Plants. *PLoS ONE*, 6(1), p.e14639.
- Havecker, E.R., Wallbridge, L.M., Hardcastle, T.J., Bush, M.S., Kelly, K.A., Dunn, R.M., Schwach, F., Doonan, J.H. & Baulcombe, D.C., 2010. The Arabidopsis RNA-Directed DNA Methylation Argonautes Functionally Diverge Based on Their Expression and Interaction with Target Loci. *The Plant Cell Online*, 22(2), pp.321–334.
- He, X.-J., Hsu, Y.-F., Zhu, S., Liu, H.-L., Pontes, O., Zhu, J., Cui, X., Wang, C.-S. & Zhu, J.-K., 2009a. A conserved transcriptional regulator is required for RNA-directed DNA methylation and plant development. *Genes & Development*, 23(23), pp.2717–2722.
- He, X.-J., Hsu, Y.-F., Zhu, S., Wierzbicki, A.T., Pontes, O., Pikaard, C.S., Liu, H.-L., Wang, C.-S., Jin, H. & Zhu, J.-K., 2009b. An Effector of RNA-Directed DNA Methylation in Arabidopsis Is an ARGONAUTE 4- and RNA-Binding Protein. *Cell*, 137(3), pp.498–508.
- Hellens, R.P., Edwards, E.A., Leyland, N.R., Bean, S. & Mullineaux, P.M., 2000. pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Molecular Biology*, 42(6), pp.819–832.

- Henderson, I.R., Deleris, A., Wong, W., Zhong, X., Chin, H.G., Horwitz, G.A., Kelly, K.A., Pradhan, S. & Jacobsen, S.E., 2010. The De Novo Cytosine Methyltransferase DRM2 Requires Intact UBA Domains and a Catalytically Mutated Paralog DRM3 during RNA-Directed DNA Methylation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics*, 6(10), p.e1001182.
- Herr, A.J., Molnár, A., Jones, A. & Baulcombe, D.C., 2006. Defective RNA processing enhances RNA silencing and influences flowering of *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(41), pp.14994–15001.
- Hiraguri, A., Itoh, R., Kondo, N., Nomura, Y., Aizawa, D., Murai, Y., Koiwa, H., Seki, M., Shinozaki, K. & Fukuhara, T., 2005. Specific interactions between Dicer-like proteins and HYL1/DRB- family dsRNA-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 57(2), pp.173–188.
- Hoffer, P., Ivashuta, S., Pontes, O., Vitins, A., Pikaard, C., Mroczka, A., Wagner, N. & Voelker, T., 2011. Posttranscriptional gene silencing in nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(1), pp.409–414.
- Huettel, B., Kanno, T., Daxinger, L., Aufsatz, W., Matzke, A.J. & Matzke, M., 2006. Endogenous targets of RNA-directed DNA methylation and Pol IV in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal*, 25(12), pp.2828–2836.
- Chang, M.-M., Culley, D., Choi, J.J. & Hadwiger, L.A., 2002. Agrobacterium-mediated co-transformation of a pea β -1,3-glucanase and chitinase genes in potato (*Solanum tuberosum* L. c.v. Russet Burbank) using a single selectable marker. *Plant Science*, 163(1), pp.83–89.
- Chapman, E.J. & Carrington, J.C., 2007. Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nature Reviews. Genetics*, 8(11), pp.884–896.
- Chodavarapu, R.K., Feng, S., Bernatavichute, Y.V., Chen, P.-Y., Stroud, H., Yu, Y., Hetzel, J.A., Kuo, F., Kim, J., Cokus, S.J., et al., 2010. Relationship between nucleosome positioning and DNA methylation. *Nature*, 466(7304), pp.388–392.
- Jacob, F. & Monod, J., 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology*, 3, pp.318–356.
- Jacob, Y., Feng, S., LeBlanc, C.A., Bernatavichute, Y.V., Stroud, H., Cokus, S., Johnson, L.M., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E. & Michaels, S.D., 2009. ATXR5 and ATXR6 are H3K27 monomethyltransferases required for chromatin structure and gene silencing. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(7), pp.763–768.
- Jauvion, V., Elmayan, T. & Vaucheret, H., 2010. The Conserved RNA Trafficking Proteins HPR1 and TEX1 Are Involved in the Production of Endogenous and Exogenous Small Interfering RNA in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, 22(8), pp.2697–2709.
- Jeddeloh, J.A., Stokes, T.L. & Richards, E.J., 1999. Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. *Nature Genetics*, 22(1), pp.94–97.
- Jin, H., Vacic, V., Girke, T., Lonardi, S. & Zhu, J.-K., 2008. Small RNAs and the regulation of cis-natural antisense transcripts in *Arabidopsis*. *BMC Molecular Biology*, 9(1), p.6.

- Johnson, L.M., Bostick, M., Zhang, X., Kraft, E., Henderson, I., Callis, J. & Jacobsen, S.E., 2007. The SRA Methyl-Cytosine-Binding Domain Links DNA and Histone Methylation. *Current Biology*, 17(4), pp.379–384.
- Johnson, L.M., Law, J.A., Khattar, A., Henderson, I.R. & Jacobsen, S.E., 2008. SRA-Domain Proteins Required for DRM2-Mediated De Novo DNA Methylation. *PLoS Genet*, 4(11), p.e1000280.
- Kanazawa, A., O'Dell, M. & Hellens, R.P., 2007. The binding of nuclear factors to the as-1 element in the CaMV 35S promoter is affected by cytosine methylation in vitro. *Plant biology (Stuttgart, Germany)*, 9(3), pp.435–441.
- Kang, C.-Y., Lian, H.-L., Wang, F.-F., Huang, J.-R. & Yang, H.-Q., 2009. Cryptochromes, Phytochromes, and COP1 Regulate Light-Controlled Stomatal Development in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, 21(9), pp.2624–2641.
- Kankel, M.W., Ramsey, D.E., Stokes, T.L., Flowers, S.K., Haag, J.R., Jeddeloh, J.A., Riddle, N.C., Verbsky, M.L. & Richards, E.J., 2003. Arabidopsis MET1 Cytosine Methyltransferase Mutants. *Genetics*, 163(3), pp.1109–1122.
- Kanno, T., Bucher, E., Daxinger, L., Huettel, B., Bohmdorfer, G., Gregor, W., Kreil, D.P., Matzke, M. & Matzke, A.J.M., 2008. A structural-maintenance-of-chromosomes hinge domain-containing protein is required for RNA-directed DNA methylation. *Nature Genetics*, 40(5), pp.670–675.
- Kanno, T., Bucher, E., Daxinger, L., Huettel, B., Kreil, D.P., Breinig, F., Lind, M., Schmitt, M.J., Simon, S.A., Gurazada, S.G.R., et al., 2010. RNA-directed DNA methylation and plant development require an IWR1-type transcription factor. *EMBO Reports*, 11(1), pp.65–71.
- Kanno, T., Mette, M.F., Kreil, D.P., Aufsatz, W., Matzke, M. & Matzke, A.J.M., 2004. Involvement of putative SNF2 chromatin remodeling protein DRD1 in RNA-directed DNA methylation. *Current Biology*, 14(9), pp.801–805.
- Kapranov, P., Willingham, A.T. & Gingeras, T.R., 2007. Genome-wide transcription and the implications for genomic organization. *Nature Reviews Genetics*, 8(6), pp.413–423.
- Karlowski, W.M., Zieleszinski, A., Carrère, J., Pontier, D., Lagrange, T. & Cooke, R., 2010. Genome-wide computational identification of WG/GW Argonaute-binding proteins in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research*, 38(13), pp.4231–4245.
- 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), p.e57.
- Katiyar-Agarwal, S., Gao, S., Vivian-Smith, A. & Jin, H., 2007. A novel class of bacteria-induced small RNAs in Arabidopsis. *Genes & Development*, 21(23), pp.3123–3134.
- Khaitová, L.C., Fojtová, M., Křížová, K., Lunerová, J., Fulnecek, J., Depicker, A. & Kovařík, A., 2011. Paramutation of tobacco transgenes by small RNA-mediated transcriptional gene silencing. *Epigenetics*, 6(5), pp.650–660.

- Kim, Y.J., Zheng, B., Yu, Y., Won, S.Y., Mo, B. & Chen, X., 2011. The role of Mediator in small and long noncoding RNA production in *Arabidopsis thaliana*. *The EMBO Journal*, 30(5), pp.814–822.
- Kumakura, N., Takeda, A., Fujioka, Y., Motose, H., Takano, R. & Watanabe, Y., 2009. SGS3 and RDR6 interact and colocalize in cytoplasmic SGS3/RDR6-bodies. *FEBS Letters*, 583(8), pp.1261–1266.
- Law, J.A., Ausin, I., Johnson, L.M., Vashisht, A.A., Zhu, J.-K., Wohlschlegel, J.A. & Jacobsen, S.E., 2010. A Protein Complex Required for Polymerase V Transcripts and RNA-Directed DNA Methylation in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 20(10), pp.951–956.
- Law, J.A. & Jacobsen, S.E., 2010. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics*, 11(3), pp.204–220.
- Law, J.A., Vashisht, A.A., Wohlschlegel, J.A. & Jacobsen, S.E., 2011. SHH1, a homeodomain protein required for DNA methylation, as well as RDR2, RDM4, and chromatin remodeling factors, associate with RNA polymerase IV. *PLoS Genetics*, 7(7), p.e1002195.
- Lee, J.-Y., Lee, H.-S., Wi, S.-J., Park, K.Y., Schmit, A.-C. & Pai, H.-S., 2009. Dual functions of *Nicotiana benthamiana* Rae1 in interphase and mitosis. *The Plant Journal*, 59(2), pp.278–291.
- Lee, T., Gurazada, S.G.R., Zhai, J., Li, S., Simon, S.A., Matzke, M.A., Chen, X. & Meyers, B.C., 2012. RNA polymerase V-dependent small RNAs in *Arabidopsis* originate from small, intergenic loci including most SINE repeats. *Epigenetics*, 7(7), pp.781–795.
- Li, J., Yang, Z., Yu, B., Liu, J. & Chen, X., 2005. Methylation Protects miRNAs and siRNAs from a 3'-End Uridylation Activity in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 15(16), pp.1501–1507.
- Lister, R., O'Malley, R.C., Tonti-Filippini, J., Gregory, B.D., Berry, C.C., Millar, A.H. & Ecker, J.R., 2008. Highly Integrated Single-Base Resolution Maps of the Epigenome in *Arabidopsis*. *Cell*, 133(3), pp.523–536.
- Liu, C., Lu, F., Cui, X. & Cao, X., 2010. Histone Methylation in Higher Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), pp.395–420.
- Liu, X., Yu, C.-W., Duan, J., Luo, M., Wang, K., Tian, G., Cui, Y. & Wu, K., 2012. HDA6 Directly Interacts with DNA Methyltransferase MET1 and Maintains Transposable Element Silencing in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 158(1), pp.119–129.
- Lorković, Z.J., Naumann, U., Matzke, A.J.M. & Matzke, M., 2012. Involvement of a GHKL ATPase in RNA-Directed DNA Methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology*, 22(10), pp.933–938.
- Lunerová-Bedřichová, J., Bleys, A., Fojtová, M., Khaitová, L., Depicker, A. & Kovařík, A., 2008. Trans-generation inheritance of methylation patterns in a tobacco transgene following a post-transcriptional silencing event. *Plant Journal*, 54(6), pp.1049–1062.

- Luo, J. & Hall, B., 2007. A Multistep Process Gave Rise to RNA Polymerase IV of Land Plants. *Journal of Molecular Evolution*, 64(1), pp.101–112.
- Luo, Z. & Chen, Z., 2007. Improperly terminated, unpolyadenylated mRNA of sense transgenes is targeted by RDR6-mediated RNA silencing in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 19(3), pp.943–958.
- MacRae, I.J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A.N., Cande, W.Z., Adams, P.D. & Doudna, J.A., 2006. Structural Basis for Double-Stranded RNA Processing by Dicer. *Science*, 311(5758), pp.195–198.
- Maida, Y., Yasukawa, M., Furuuchi, M., Lassmann, T., Possemato, R., Okamoto, N., Kasim, V., Hayashizaki, Y., Hahn, W.C. & Masutomi, K., 2009. An RNA-dependent RNA polymerase formed by TERT and the RMRP RNA. *Nature*, 461(7261), pp.230–235.
- Makeyev, E.V. & Bamford, D.H., 2002. Cellular RNA-Dependent RNA Polymerase Involved in Posttranscriptional Gene Silencing Has Two Distinct Activity Modes. *Molecular Cell*, 10(6), pp.1417–1427.
- Mallory, A.C. & Vaucheret, H., 2009. ARGONAUTE 1 homeostasis invokes the coordinate action of the microRNA and siRNA pathways. *EMBO Reports*, 10(5), pp.521–526.
- Manavella, P.A., Koenig, D. & Weigel, D., 2012. Plant Secondary siRNA Production Determined by microRNA-Duplex Structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(7), pp.2461–2466.
- Margis, R., Fusaro, A.F., Smith, N.A., Curtin, S.J., Watson, J.M., Finnegan, E.J. & Waterhouse, P.M., 2006. The evolution and diversification of Dicers in plants. *FEBS Letters*, 580(10), pp.2442–2450.
- Meyers, B.C., Axtell, M.J., Bartel, B., Bartel, D.P., Baulcombe, D., Bowman, J.L., Cao, X., Carrington, J.C., Chen, X., Green, P.J., et al., 2008. Criteria for Annotation of Plant MicroRNAs. *Plant Cell*, 20(12), pp.3186–3190.
- Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., Wu, L., Li, S., Zhou, H., Long, C., et al., 2008. Sorting of Small RNAs into Arabidopsis Argonaute Complexes Is Directed by the 5' Terminal Nucleotide. *Cell*, 133(1), pp.116–127.
- Mlotshwa, S., Pruss, G.J., Gao, Z., Mgutshini, N.L., Li, J., Chen, X., Bowman, L.H. & Vance, V., 2010. Transcriptional silencing induced by Arabidopsis T-DNA mutants is associated with 35S promoter siRNAs and requires genes involved in siRNA-mediated chromatin silencing. *The Plant Journal*, 64(4), pp.699–704.
- Mlotshwa, S., Pruss, G.J., Peragine, A., Endres, M.W., Li, J., Chen, X., Poethig, R.S., Bowman, L.H. & Vance, V., 2008. DICER-LIKE2 plays a primary role in transitive silencing of transgenes in Arabidopsis. *PLoS ONE*, 3(3), p.e1755.
- Moissiard, G., Parizotto, E.A., Humber, C. & Voinnet, O., 2007. Transitivity in Arabidopsis can be primed, requires the redundant action of the antiviral Dicer-like 4 and Dicer-like 2, and is compromised by viral-encoded suppressor proteins. *RNA*, 13(8), pp.1268–1278.

- Molnar, A., Melnyk, C.W., Bassett, A., Hardcastle, T.J., Dunn, R. & Baulcombe, D.C., 2010. Small Silencing RNAs in Plants Are Mobile and Direct Epigenetic Modification in Recipient Cells. *Science*, 328(5980), pp.872–875.
- Montgomery, T.A., Howell, M.D., Cuperus, J.T., Li, D., Hansen, J.E., Alexander, A.L., Chapman, E.J., Fahlgren, N., Allen, E. & Carrington, J.C., 2008. Specificity of ARGONAUTE7-miR390 Interaction and Dual Functionality in TAS3 Trans-Acting siRNA Formation. *Cell*, 133(1), pp.128–141.
- Moore, I., Samalova, M. & Kurup, S., 2006. Transactivated and chemically inducible gene expression in plants. *The Plant Journal*, 45(4), pp.651–683.
- Mosher, R.A., Melnyk, C.W., Kelly, K.A., Dunn, R.M., Studholme, D.J. & Baulcombe, D.C., 2009. Uniparental expression of PolIV-dependent siRNAs in developing endosperm of Arabidopsis. *Nature*, 460(7252), pp.283–286.
- Mosher, R.A., Schwach, F., Studholme, D. & Baulcombe, D.C., 2008. PolIVb influences RNA-directed DNA methylation independently of its role in siRNA biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(8), pp.3145–3150.
- Murashige, T. & Skoog, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), pp.473–497.
- Nagata, T., Nemoto, Y. & Hasezawa, S., 1992. Tobacco BY-2 cell line as the “HeLa” cell in the cell biology of higher plants. *International Review of Cytology*, 132, pp.1–30.
- Neelakandan, A. & Wang, K., 2011. Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. *Plant Cell Reports*, pp.1–24.
- Nicholson, S.J. & Srivastava, V., 2009. Transgene constructs lacking transcription termination signal induce efficient silencing of endogenous targets in Arabidopsis. *Molecular Genetics and Genomics*, 282(3), pp.319–328.
- 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, p.44.
- Nocarova, E., Opatrny, 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), pp.565–572.
- Oka, S., Hirai, S., Choi, K. & Kodama, H., 2008. Preferential spreading of RNA silencing into the 3' downstream region of the transgene in tobacco. *Journal of Plant Biology*, 51(3), pp.227–232.
- Okano, Y., Miki, D. & Shimamoto, K., 2008. Small interfering RNA (siRNA) targeting of endogenous promoters induces DNA methylation, but not necessarily gene silencing, in rice. *The Plant Journal*, 53(1), pp.65–77.
- 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), pp.613–622.

- Penterman, J., Zilberman, D., Huh, J.H., Ballinger, T., Henikoff, S. & Fischer, R.L., 2007. DNA demethylation in the Arabidopsis genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(16), pp.6752–6757.
- Pontes, O., Li, C.F., Nunes, P.C., Haag, J., Ream, T., Vitins, A., Jacobsen, S.E. & Pikaard, C.S., 2006. The Arabidopsis Chromatin-Modifying Nuclear siRNA Pathway Involves a Nucleolar RNA Processing Center. *Cell*, 126(1), pp.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), pp.2030–2040.
- Qi, Y., He, X., Wang, X.-J., Kohany, O., Jurka, J. & Hannon, G.J., 2006. Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature*, 443(7114), pp.1008–1012.
- Qin, H., Chen, F., Huan, X., Machida, S., Song, J. & Yuan, Y.A., 2010. Structure of the Arabidopsis thaliana DCL4 DUF283 domain reveals a noncanonical double-stranded RNA-binding fold for protein–protein interaction. *RNA*, 16(3), pp.474–481.
- Rajagopalan, R., Vaucheret, H., Trejo, J. & Bartel, D.P., 2006. A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in Arabidopsis thaliana. *Genes & Development*, 20(24), pp.3407–3425.
- Rajakumara, E., Law, J.A., Simanshu, D.K., Voigt, P., Johnson, L.M., Reinberg, D., Patel, D.J. & Jacobsen, S.E., 2011. A dual flip-out mechanism for 5mC recognition by the Arabidopsis SUVH5 SRA domain and its impact on DNA methylation and H3K9 dimethylation in vivo. *Genes & Development*, 25(2), pp.137–152.
- Rajeswaran, R., Aregger, M., Zvereva, A.S., Borah, B.K., Gubaeva, E.G. & Pooggin, M.M., 2012. Sequencing of RDR6-Dependent Double-Stranded RNAs Reveals Novel Features of Plant siRNA Biogenesis. *Nucleic Acids Research*.
- Rajeswaran, R. & Pooggin, M.M., 2011. RDR6-mediated synthesis of complementary RNA is terminated by miRNA stably bound to template RNA. *Nucleic Acids Research*.
- Ream, T.S., Haag, J.R., Wierzbicki, A.T., Nicora, C.D., Norbeck, A.D., Zhu, J.-K., Hagen, G., Guilfoyle, T.J., Pasa-Tolic, 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), pp.192–203.
- Ron, M., Alandete Saez, M., Eshed Williams, L., Fletcher, J.C. & McCormick, S., 2010. Proper Regulation of a Sperm-Specific Cis-Nat-siRNA Is Essential for Double Fertilization in Arabidopsis. *Genes & Development*, 24(10), pp.1010–1021.
- Ronemus, M., Vaughn, M.W. & Martienssen, R.A., 2006. MicroRNA-Targeted and Small Interfering RNA-Mediated mRNA Degradation Is Regulated by Argonaute, Dicer, and RNA-Dependent RNA Polymerase in Arabidopsis. *Plant Cell*, 18(7), pp.1559–1574.

- 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. *PLoS Genetics*, 7(6), p.e1002120.
- Rubio-Somoza, I. & Weigel, D., 2011. MicroRNA networks and developmental plasticity in plants. *Trends in Plant Science*, 16(5), pp.258–264.
- Rutherford, G., Tanurdzic, M., Hasebe, M. & Banks, J.A., 2004. A systemic gene silencing method suitable for high throughput, reverse genetic analyses of gene function in fern gametophytes. *BMC Plant Biology*, 4(1), p.6.
- Rymarquis, L.A., Souret, F.F. & Green, P.J., 2011. Evidence That XRN4, an Arabidopsis Homolog of Exoribonuclease XRN1, Preferentially Impacts Transcripts with Certain Sequences or in Particular Functional Categories. *RNA*, 17(3), pp.501–511.
- Sanders, P.R., Winter, J.A., Barnason, A.R., Rogers, S.G. & Fraley, R.T., 1987. Comparison of cauliflower mosaic virus 35S and nopaline synthase promoters in transgenic plants. *Nucleic Acids Research*, 15(4), pp.1543–1558.
- Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N.G., Palmer, A.E. & Tsien, R.Y., 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 22(12), pp.1567–1572.
- Shen, D., Ye, W., Dong, S., Wang, Y. & Dou, D., 2011. Characterization of intronic structures and alternative splicing in *Phytophthora sojae* by comparative analysis of expressed sequence tags and genomic sequences. *Canadian Journal of Microbiology*, 57(2), pp.84–90.
- Shure, M., Wessler, S. & Fedoroff, N., 1983. Molecular identification and isolation of the Waxy locus in maize. *Cell*, 35(1), pp.225–233.
- Sidorenko, L., Dorweiler, J.E., Cigan, A.M., Arteaga-Vazquez, M., Vyas, M., Kermicle, J., Jurcin, D., Brzeski, J., Cai, Y. & Chandler, V.L., 2009. A Dominant Mutation in mediator of paramutation2, One of Three Second-Largest Subunits of a Plant-Specific RNA Polymerase, Disrupts Multiple siRNA Silencing Processes. *PLoS Genetics*, 5(11), p.e1000725.
- Sijen, T., Vijn, I., Rebocho, A., van Blokland, R., Roelofs, D., Mol, J.N.M. & Kooter, J.M., 2001. Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. *Current Biology*, 11(6), pp.436–440.
- Slotkin, R.K., Vaughn, M., Borges, F., Tanurdzic, M., Becker, J.D., Feijó, J.A. & Martienssen, R.A., 2009. Epigenetic Reprogramming and Small RNA Silencing of Transposable Elements in Pollen. *Cell*, 136(3), pp.461–472.
- Smith, N.A., Singh, S.P., Wang, M.-B., Stoutjesdijk, P.A., Green, A.G. & Waterhouse, P.M., 2000. Gene expression: Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature*, 407(6802), pp.319–320.
- Sridhar, V.V., Kapoor, A., Zhang, K., Zhu, J., Zhou, T., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. & Zhu, J.-K., 2007. Control of DNA methylation and heterochromatic silencing by histone

- H2B deubiquitination. *Nature*, 447(7145), pp.735–738.
- Tahbaz, N., Kolb, F.A., Zhang, H., Jaronczyk, K., Filipowicz, W. & Hobman, T.C., 2004. Characterization of the interactions between mammalian PAZ PIWI domain proteins and Dicer. *EMBO reports*, 5(2), pp.189–194.
- Takeda, A., Iwasaki, S., Watanabe, T., Utsumi, M. & Watanabe, Y., 2008. The Mechanism Selecting the Guide Strand from Small RNA Duplexes is Different Among Argonaute Proteins. *Plant Cell Physiology*, 49(4), pp.493–500.
- Tang, G., Reinhart, B.J., Bartel, D.P. & Zamore, P.D., 2003. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes & Development*, 17(1), pp.49–63.
- Terns, M.P. & Terns, R.M., 2011. CRISPR-based adaptive immune systems. *Current Opinion in Microbiology*, 14(3), pp.321–327.
- Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N. & Zamore, P.D., 2004. A Protein Sensor for siRNA Asymmetry. *Science*, 306(5700), pp.1377–1380.
- Vaistij, F.E., Jones, L. & Baulcombe, D.C., 2002. Spreading of RNA Targeting and DNA Methylation in RNA Silencing Requires Transcription of the Target Gene and a Putative RNA-Dependent RNA Polymerase. *The Plant Cell Online*, 14(4), pp.857–867.
- Vaucheret, H., 2008. Plant ARGONAUTES. *Trends in Plant Science*, 13(7), pp.350–358.
- Vazquez, F., Blevins, T., Ailhas, J., Boller, T. & Meins, F., 2008. Evolution of Arabidopsis MIR genes generates novel microRNA classes. *Nucleic Acids Research*, 36(20), pp.6429–6438.
- Vazquez, F., Legrand, S. & Windels, D., 2010. The biosynthetic pathways and biological scopes of plant small RNAs. *Trends in Plant Science*, 15(6), pp.337–345.
- Vlot, A.C., Liu, P.-P., Cameron, R.K., Park, S.-W., Yang, Y., Kumar, D., Zhou, F., Padukkavidana, T., Gustafsson, C., Pichersky, E., et al., 2008. Identification of likely orthologs of tobacco salicylic acid-binding protein 2 and their role in systemic acquired resistance in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, 56(3), pp.445–456.
- Voinnet, O., 2009. Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs. *Cell*, 136(4), pp.669–687.
- Voinnet, O., 2008. Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. *Trends in Plant Science*, 13(7), pp.317–328.
- Wang, M.-B. & Waterhouse, P.M., 2000. High-efficiency silencing of a β -glucuronidase gene in rice is correlated with repetitive transgene structure but is independent of DNA methylation. *Plant Molecular Biology*, 43(1), pp.67–82.
- Wang, X., Laurie, J.D., Liu, T., Wentz, J. & Liu, X.S., 2011. Computational dissection of Arabidopsis smRNAome leads to discovery of novel microRNAs and short interfering RNAs associated with transcription start sites. *Genomics*, 97(4), pp.235–243.

- Waterhouse, P.M., Graham, M.W. & Wang, M.-B., 1998. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(23), pp.13959–13964.
- 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), pp.635–648.
- Wierzbicki, A.T., Ream, T.S., Haag, J.R. & Pikaard, C.S., 2009. RNA polymerase V transcription guides ARGONAUTE4 to chromatin. *Nature Genetics*, 41(5), pp.630–634.
- Willmann, M.R., Endres, M.W., Cook, R.T. & Gregory, B.D., 2011. The Functions of RNA-Dependent RNA Polymerases in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 9.
- Wu, L., Zhou, H., Zhang, Q., Zhang, J., Ni, F., Liu, C. & Qi, Y., 2010. DNA Methylation Mediated by a MicroRNA Pathway. *Molecular Cell*, 38(3), pp.465–475.
- Xie, M., Ren, G., Costa-Nunes, P., Pontes, O. & Yu, B., 2012. A subgroup of SGS3-like proteins act redundantly in RNA-directed DNA methylation. *Nucleic Acids Research*, 40(10), pp.4422–4431.
- Yan, H., Chretien, R., Ye, J. & Rommens, C.M., 2006. New Construct Approaches for Efficient Gene Silencing in Plants. *Plant Physiology*, 141(4), pp.1508–1518.
- Yoshikawa, M., Peragine, A., Park, M.Y. & Poethig, R.S., 2005. A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes & Development*, 19(18), pp.2164–2175.
- Yuan, Y.-R., Pei, Y., Ma, J.-B., Kuryavyi, V., Zhadina, M., Meister, G., Chen, H.-Y., Dauter, Z., Tuschl, T. & Patel, D.J., 2005. Crystal Structure of *A. aeolicus* Argonaute, a Site-Specific DNA-Guided Endoribonuclease, Provides Insights into RISC-Mediated mRNA Cleavage. *Molecular Cell*, 19(3), pp.405–419.
- Zhang, C., Ng, D.W.-K., Lu, J. & Chen, Z.J., 2012. Roles of target site location and sequence complementarity in trans-acting siRNA formation in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 69(2), pp.217–226.
- Zhang, X., Bernatavichute, Y.V., Cokus, S., Pellegrini, M. & Jacobsen, S.E., 2009. Genome-wide analysis of mono-, di- and trimethylation of histone H3 lysine 4 in Arabidopsis thaliana. *Genome Biology*, 10(6), p.R62.
- Zhang, X., Clarenz, O., Cokus, S., Bernatavichute, Y.V., Pellegrini, M., Goodrich, J. & Jacobsen, S.E., 2007. Whole-Genome Analysis of Histone H3 Lysine 27 Trimethylation in Arabidopsis. *PLoS Biol*, 5(5), p.e129.
- Zhao, J., Hyman, L. & Moore, C., 1999. Formation of mRNA 3' Ends in Eukaryotes: Mechanism, Regulation, and Interrelationships with Other Steps in mRNA Synthesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(2), pp.405–445.
- Zheng, B., Wang, Z., Li, S., Yu, B., Liu, J.-Y. & Chen, X., 2009. Intergenic transcription by RNA Polymerase II coordinates Pol IV and Pol V in siRNA-directed transcriptional

gene silencing in Arabidopsis. *Genes & Development*, 23(24), pp.2850–2860.

Zheng, Q., Ryzkin, P., Li, F., Dragomir, I., Valladares, O., Yang, J., Cao, K., Wang, L.-S. & Gregory, B.D., 2010. Genome-wide double-stranded RNA sequencing reveals the functional significance of base-paired RNAs in Arabidopsis. *PLoS Genetics*, 6(9).

Zheng, X., Pontes, O., Zhu, J., Miki, D., Zhang, F., Li, W.-X., Iida, K., Kapoor, A., Pikaard, C.S. & Zhu, J.-K., 2008. ROS3 is an RNA-binding protein required for DNA demethylation in Arabidopsis. *Nature*, 455(7217), pp.1259–1262.

Zilberman, D., Coleman-Derr, D., Ballinger, T. & Henikoff, S., 2008. Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks. *Nature*, 456(7218), pp.125–129.

Zilberman, D., Gehring, M., Tran, R.K., Ballinger, T. & Henikoff, S., 2007. Genome-wide analysis of Arabidopsis thaliana DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nature Genetics*, 39(1), pp.61–69.

Zong, J., Yao, X., Yin, J., Zhang, D. & Ma, H., 2009. Evolution of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) genes: Duplications and possible losses before and after the divergence of major eukaryotic groups. *Gene*, 447(1), pp.29–39.

Zuo, J., Niu, Q. & Chua, N., 2000. An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *The Plant Journal*, 24(2), pp.265–273.

Seznam internetových odkazů:

ApE software: <http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>

Chromas lite software: http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html

NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

pGreen website: http://www.pgreen.ac.uk/a_pls_fr.htm

TAIR: <http://www.arabidopsis.org/>