

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra experimentální biologie rostlin

Studijní program:

Biologie

Studijní obor:

Experimentální biologie rostlin



Bc. Šárka Motylová

**Dynamika a mechanismus umlčování reportérového genu pro GFP
v závislosti na aktivitě RDR6 a způsobu indukce RNA interference
v buněčné linii tabáku BY-2**

The influence of RDR6 activity and mode of RNAi induction on dynamics and mechanism of silencing of the reporter GFP gene in tobacco cell line BY-2

Diplomová práce

Praha, 2015

Školitel:

RNDr. Lukáš Fischer, Ph.D.

Konzultant:

Mgr. Vojtěch Čermák

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne: 12. 8. 2015

Podpis:

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Lukáši Fischerovi, Ph.D. za jeho cenné rady, připomínky a vedení po celou dobu magisterského studia. Dále děkuji svému konzultantovi Mgr. Vojtěchovi Čermákovi za zaškolení do potřebných molekulárně biologických metod, za podělení se o cenné rady a zkušenosti. Chtěla bych poděkovat také celému výzkumnému týmu za jejich všeobecnou podporu a milé pracovní prostředí, zejména RNDr. Lence Sikorové, Ph.D. za zaškolení do některých metod.

Velký dík patří také doc. RNDr. Karlu Zvárovi, CSc. za jeho pomoc se statistickou analýzou značné části získaných dat.

V neposlední řadě děkuji svým rodičům za veškeré zázemí a psychickou podporu.

Abstrakt

RNA interference (RNAi) je proces, který se u rostlin prostřednictvím malých RNA (sRNA = small RNA) významně podílí na regulaci genové exprese. Rozmanité dráhy RNAi lze rozdělit na dva základní mechanismy, a to posttranskripční a transkripční umlčování (PTGS a TGS). Vznik sRNA je vždy závislý na přítomnosti dvouvláknové molekuly RNA (dsRNA), která je štěpena některým z DCL proteinů za vzniku sRNA obvykle o délce 21 – 24 nt a jedno z vláken sRNA je následně rozpoznáno proteinem AGO. V případě PTGS interaguje komplex AGO-sRNA na základě komplementarity sekvence sRNA s cílovou RNA, kterou rozštěpí nebo zablokuje její translaci. U TGS reaguje AGO s rostlinně specifickou RNA Pol V a jejími transkripty, se kterými opět páruje vlákno sRNA nesené proteinem AGO. Tato interakce umožní sestavení komplexu proteinů, které indukují metylaci DNA a posléze i histonů, jež působí inhibičně na transkripci RNA Pol II.

Způsobů, jakými může dsRNA vznikat, je celá řada. Velká část v buňce tvořených dsRNA je závislá na syntéze komplementárního vlákna do podoby dsRNA prostřednictvím RDR6 (RNA dependentní RNA polymeráza 6), která je zapojena i do procesu vzniku sekundárních sRNA. Význam RDR6 při PTGS byl zkoumán pomocí reportérového genu pro GFP, a to při samovolném umlčování a při umlčování vyvolaném třemi odlišnými způsoby vzniku dsRNA (tvorbou vlásenkové RNA z invertované repetice, syntézou antisense RNA a aberantní RNA bez polyadenylace). Hladina RDR6 byla zvýšena nebo snížena oproti divokému typu. Práce byla zároveň zaměřena na studium dynamiky PTGS, jehož průběh byl porovnán s průběhem TGS vyvolaném invertovanou repeticí ze sekvence promotoru pro *GFP*.

Jako rostlinný model byla pro práci použita tabáková buněčná linie BY-2, která díky vysoké homogenitě a rychlému dělení umožňuje snadnou analýzu vysokého počtu linií za využití makroskopických shluků buněk (tzv. kalusů) i analýzu na úrovni jednotlivých buněk suspenzních kultur.

Klíčová slova: umlčování, TGS, PTGS, metylace, GFP, RDR6, RNA interference, buněčná linie tabáku BY-2

Abstract

RNA interference (RNAi) is a process mediated by small RNAs (sRNA), which is significantly involved in the regulation of gene expression in plants. Diverse RNAi pathways can be divided into two basic mechanisms, which are post-transcriptional and transcriptional gene silencing (PTGS and TGS). Production of sRNAs is dependent on the presence of a double-stranded RNA molecule (dsRNA), which is cleaved by one of DCL proteins to produce sRNAs usually of 21-24 nt in length. One strand of the sRNA is subsequently loaded onto AGO protein. During PTGS, the AGO-sRNA complex interacts with the target RNA based on its sequence complementarity to the sRNA and cleaves it or blocks its translation. In the case of TGS, AGO interacts with plant-specific RNA Pol V and its transcripts, which are again complementary to the sRNA. This interaction allows assembling of a protein complex facilitating DNA and histone methylation inhibiting RNA Pol II transcription.

There are numerous ways the dsRNA can arise. A significant part of dsRNA cell production is dependent on synthesising the complementary strand of the dsRNA by RDR6 (RNA-dependent RNA polymerase 6). RDR6 is also involved in the process of the secondary sRNA formation. The significance of RDR6 during PTGS was examined using a *GFP* reporter gene either during spontaneous silencing or during silencing induced by three different ways of the dsRNA production (inverted repeat, antisense RNA and aberrant unpolyadenylated RNA). The protein level of RDR6 was increased or decreased compared to the wild type. The work was also focused on studying the dynamics of PTGS, whose course has been compared with the process of TGS induced by an inverted repeat from a promoter sequence driving *GFP* expression.

As the plant model for this work, tobacco cell line BY-2 was used because of its high homogeneity and rapid division rate, which allows for an easy analysis of a high number of lines using macroscopic clusters of cells (so-called *calli*) and also for analysis at the single cell level using cell suspension cultures.

Keywords: silencing, TGS, PTGS, methylation, GFP, RDR6, RNA interference, tobacco cell line BY-2

Obsah

Abstrakt.....	5
Abstract.....	6
Obsah	7
Seznam použitých zkratek	9
1 Úvod.....	12
1.1 Cíle.....	13
2 Literární přehled	14
2.1 Úvod k literárnímu přehledu.....	14
2.2 Klasifikace malých RNA	14
2.3 Proteiny biogeneze malých RNA.....	15
2.3.1 Rostlinné RNA-dependentní RNA polymerázy (RDR)	17
2.3.1.1 RDR1	17
2.3.1.2 RDR6	18
2.4 PTGS.....	19
2.5 Epigenetické modifikace chromatinu	21
2.5.1 TGS	22
2.5.1.1 Metylace DNA	22
2.5.1.2 Demetylace DNA.....	24
2.5.1.3 RdDM	25
2.5.1.4 Histonové modifikace související s RdDM.....	28
3 Metodika a materiál	32
3.1 Biologický materiál a jeho kultivace	32
3.1.1 <i>Escherichia coli</i>	32
3.1.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	33
3.1.3 Buněčná linie tabáku BY-2 (<i>Nicotiana tabacum</i> L., cv. „Bright Yellow 2“)	33
3.2 Transformace biologického materiálu	35
3.2.1 Příprava elektrokompetentních bakterií <i>E. coli</i>	35
3.2.2 Příprava elektrokompetentních bakterií <i>A. tumefaciens</i>	36
3.2.3 Transformace <i>E. coli</i> a <i>A. tumefaciens</i>	37
3.2.4 Transformace buněčné linie tabáku BY-2.....	38
3.3 Plazmidy	39
3.3.1 pDrive.....	39
3.3.2 pGreen 0029, 0129, pSoup	40
3.3.3 pER8.....	41
3.3.4 pCP60 RS-GFP.....	42
3.3.5 psmRS-GFP.....	42
3.4 Práce s DNA	43
3.4.1 Izolace plazmidové DNA z <i>E. coli</i>	43
3.4.2 PCR (Polymerase chain reaction).....	44
3.4.3 Agarózová gelová elektroforéza.....	46
3.4.4 Izolace DNA z agarózového gelu.....	47
3.4.5 Ligace	47
3.4.6 Odsolení ligační směsi.....	48
3.4.7 Restrikční štěpení	48
3.4.8 Sekvence DNA	50
3.5 Práce s RNA.....	50
3.5.1 Izolace RNA	50

3.5.2 Odstranění DNA.....	51
3.5.3 Semikvantitativní RT-PCR.....	51
3.6 Sledování změn fluorescence GFP a průběhu jeho umlčování.....	53
3.6.1 Snímání fluorescence kalusů BY-2	53
3.6.2 Analýza obrazových dat	54
3.6.3 Příprava buněčné linie BY-2 pro měření na průtokovém cytometru	54
3.6.4 Průtoková cytometrie	55
3.6.5 Analýza dat z průtokové cytometrie.....	56
3.7 Statistická analýza dat.....	56
4 Výsledky	57
4.1 Příprava linií BY-2 se sníženou a zvýšenou expresí <i>RDR6</i>	57
4.2 Samovolné umlčování <i>GFP</i> na třech různých genetických pozadích v kalusech BY-2.....	58
4.3 Indukce umlčování exprese <i>GFP</i> třemi různými konstrukty na třech různých genetických pozadích v kalusech BY-2	62
4.3.1 Absolutní intenzity fluorescence na kontrolním a indukčním médiu.....	64
4.3.2 Relativní míra fluorescence (%).....	69
4.3.3 Rychlost poklesu relativní míry fluorescence (%)	72
4.4 Indukce umlčování exprese <i>GFP</i> třemi různými inducibilními konstrukty na třech genetických pozadích ve vybraných liniích BY-2 pěstovaných formou suspenzních kultur.....	75
4.4.1 Absolutní intenzity fluorescence na kontrolním a indukčním médiu.....	75
4.4.2 Množství živých a „svítících“ buněk na kontrolním a indukčním médiu	75
4.4.3 Relativní míra fluorescence (%).....	76
4.4.4 Rychlost poklesu poměru fluorescence suspenzních linií, jejichž relativní míra fluorescence klesla pod 40 %	79
4.4.5 Poměr živých a „svítících“ buněk na indukčním a kontrolním médiu.....	79
4.4.6 Rychlost poklesu poměru živých „svítících“ buněk na indukčním a kontrolním médiu suspenzních linií, jejichž relativní míra fluorescence klesla pod 40 %	81
4.5 Obnovování exprese <i>GFP</i> na dvou genetických pozadích v suspenzních kulturách BY-2 po vysazení β -estradiolu	81
4.5.1 Relativní míra fluorescence (%).....	82
4.5.2 Rychlost vzestupu relativní míry fluorescence (%)	83
4.5.3 Poměry živých „svítících“ buněk BY-2	84
4.5.4 Rychlost vzestupu poměru živých „svítících“ buněk BY-2.....	84
4.6 Tvorba konstruktů <i>35S-IR</i> pro spuštění transkripčního umlčení	85
4.7 Indukce umlčování exprese <i>GFP</i> konstruktem v kalusech BY-2	86
5 Diskuze.....	92
5.1 Samovolné a indukované umlčování <i>GFP</i> při modulované hladině <i>RDR6</i> v kalusech ..	92
5.2 Indukované umlčování <i>GFP</i> při modulované hladině <i>RDR6</i> v suspenzních kulturách ..	98
5.3 Indukce transkripčního umlčování <i>GFP</i> prostřednictvím konstruktů <i>35S-IR</i>	99
6 Závěry	101
7 Seznam použité literatury	102

Seznam použitých zkratk

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
AGO	Argonaute
ANOVA	Analysis of variance
AtRDR6	konstrukt nesoucí gen/ produkt genu <i>RDR6</i> z <i>A. thaliana</i>
bp	base pairs
BY-2	Buněčná linie tabáku <i>Nicotiana tabacum</i> L., cv. „Bright Yellow“
CMT2, CMT3	Chromomethylase 2, Chromomethylase 3
DCL	Dicer-like
DDM1	Deficient in DNA methylation 1
DDR komplex	DMS3, DRD1, RDM1 komplex
dH ₂ O	destilovaná voda
DME	Demeter
DMS3	Defective in meristem silencing 3
DRD1	Defective in RNA-directed DNA methylation 1
DRM1/2	Domains rearranged methyltransferase 1/2
dsRNA	double-stranded RNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FRG1, FRG2	SNF2-RING-helicase-like 1; 2
GFP	Green Fluorescent Protein
GFP-AS	gen pro GFP v antisense orientaci
GFP-BT	gen pro GFP, který není následován terminátorem
GFP-IR	gen pro GFP tvořící invertovanou repetici
H3K4me3	Histone 3 lysine 4 trimethylation
H3K9me3	Histone 3 lysine 9 trimethylation
hc-siRNA	heterochromatic siRNA
HEN1	Hua enhancer 1
IBM1	Increase in Bonsai methylation 1
IDM1	Increased DNA methylation 1
IDN2	Involved in <i>de novo</i> 1
IR	invertovaná repetice
JMJ14	Jumonji 14

KTF1/SPT5-like	Kow domain-containing transcription factor 1/ Suppressor of Ty insertion 5-like
KYP	Kryptonite/ Suppressor of variegation 3-9 homolog protein 4
LDL1, LDL2	Lysine-specific Demethylase 1-Like 1; 2
MET1	Methyltransferase 1
miRNA	microRNA
MSPi	intron mangan stabilizujícího proteinu
nat-siRNA	natural <i>cis</i> -antisense transcript siRNA
NERD	Needed for RDR2-independent DNA methylation
NRPD1	Nuclear RNA polymerase D 1 (podjednotka Pol IV)
NRPD2/NRPE2	Nuclear RNA polymerase D 2/E 2 (podjednotka Pol IV a V)
NRPE1	Nuclear RNA polymerase E 1 (podjednotka Pol V)
nt	nukleotidy, nukleotidový/á
NtRDR6	gen/ produkt genu <i>RDR6</i> z <i>Nicotiana tabacum</i>
ORF	open reading frame
Pol II, IV, V	DNA-dependentní RNA polymeráza II, IV, V
PTGS	Post-transcriptional gene silencing
RdDM	RNA-directed DNA methylation
RDM1	RNA-directed DNA methylation 1
RDR	RNA-dependentní RNA polymeráza
RDR6-IR	konstrukt nesoucí invertovanou repetici proti <i>NtRDR6</i>
RFC	Relative Centrifugal Force
RISC	RNA-induced silencing complex
RNAi	RNA interference
ROS1	Repressor of silencing 1
rpm	Revolutions per minute (otáčky za minutu)
(RT)-PCR	(Reverse-Transcriptase) Polymerase Chain Reaction
SDE3	Silencing defective 3
SET doména	Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax domain
SGS3	Supressor of gene silencing 3
SHH1	Sawadee Homeodomain Homolog 1
siRNA	small interfering RNA
SRA doména	SET and RING finger associated domain
sRNA	small RNA

ssRNA	single-stranded RNA
STGLH	Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses
SUVH	SU(VAR)3-9 Homolog
SUVR	Su(var)3-9 related = Suppressor of variegation 3-9 related protein
ta-siRNA	<i>trans</i> -acting siRNA
TE	transponovateľné elementy
TGS	Transcriptional gene silencing
vsRNA	viral small RNA
WT	wild type

1 Úvod

Jevy spojené s RNA interferencí nalezneme napříč celou říší eukaryot. Podobné procesy byly dokonce objeveny u bakterií a archeí a jsou označovány jako CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) interference. V současné době je regulace genové exprese prostřednictvím malých RNA stále velmi hojně studovanou problematikou, především díky svému širokému významu a uplatnění. Mechanismy RNAi lze na jednu stranu poměrně snadno využít k negativní modulaci exprese endogenních genů, ale tyto procesy se mohou projevit také jako nežádoucí ve chvíli, kdy vedou ke snížení nebo zablokování exprese cíleně vkládaných genů. Ostatně právě druhý zmiňovaný fenomén popsany u genu pro chalkonsyntázu vnášeného do rostlin petúnie (Napoli et al. 1990) odstartoval vlnu výzkumu, která vyústila objevem malých RNA (Lee et al. 1993) a popsáním dráhy posttranskripčního umlčování u had'átka *Caenorhabditis elegans* (Fire et al. 1998), za kterou byla udělena Nobelova cena. Do té doby byla totiž RNAi, využívaná pro umlčení exprese pomocí antisenseRNA, mylně považována za pouhé mechanické zabránění translaci způsobené párováním dvou komplementárních molekul RNA.

Ukázalo se, že u rostlin jsou procesy RNAi ještě složitější než u živočichů, což zřejmě souvisí s jejich přisedlým způsobem života, který vyžaduje větší flexibilitu pramenící ze zvýšené variability. Právě často objemné rostlinné genomy bohaté na repetitivně sekvence, pseudogeny a transponovatelné elementy (TE) představují potřebný rezervoár variability, který mohou rostliny uplatnit v případě nutnosti. Na druhou stranu je také třeba v rámci života jedince udržovat tento potenciál ve stavu, který nemá negativní vliv na jeho životaschopnost, protože např. nekontrolovaná aktivita TE může vést k dezintegraci genomu. Tuto rovnováhu u rostlin pomáhá udržovat transkripční umlčování prostřednictvím metylace DNA a posttranslačních modifikací histonů, které jsou dostatečně dynamické na to, aby mohly reagovat na měnící se prostředí, ale zároveň mohou být stabilně předávány dceřiným buňkám. To zajisté souvisí se vznikem rostlinně specifických RNA polymeráz IV a V, které jsou schopné přepisovat heterochromatin. Malé RNA se vedle toho podílí také na regulaci ontogeneze (Peragine et al. 2004; Adenot et al. 2006) a zajišťují efektivní obranu proti virům a regulují genovou expresi při stresových podmínkách, jako jsou sucho, zvýšená teplota, zasolení nebo bakteriální patogeny (Katiyar-Agarwal et al. 2006; Borsani et al. 2005; Garcia-Ruiz et al. 2010).

Vzhledem k tomu, že rostliny tvoří základ ekosystémů, je pro nás důležité tyto vysoce komplexní dráhy lépe pochopit, třeba i proto abychom je dokázali využít v náš prospěch.

1.1 Cíle

Diplomová práce měla tři hlavní cíle:

1) Hodnotit vliv aktivity RDR6 na dynamiku a frekvenci posttranskripčního umlčování *GFP* na modelu buněčné tabákové linie BY-2 prostřednictvím linií se sníženou, zvýšenou nebo přirozenou expresí genu pro RDR6, ve kterých je umlčování *GFP* spouštěno samovolně či jedním ze tří umlčujících konstruktů.

- Připravit linie BY-2 se stabilní zvýšenou a sníženou expresí *RDR6* a supertransformovat je umlčujícími konstrukty a konstruktem pro konstitutivní expresi *GFP*.
- Sledovat změny fluorescence GFP po indukci exprese umlčujících konstruktů v liniích BY-2.

2) Hodnotit vliv aktivity RDR6 na frekvenci samovolného umlčení GFP v kalusech BY-2.

3) Analyzovat dynamiku a průběh indukce transkripčního umlčení *GFP* prostřednictvím vlásenky proti *35S* promotoru, pod kterým je *GFP* exprimováno, opět na modelu buněčné tabákové linie BY-2.

- Připravit konstrukt nesoucí vlásenku proti *35S* promotoru (*35S-IR*) a supertransformovat či kotransformovat jej do linií BY-2 s konstruktem pro konstitutivní expresi *GFP*.
- Sledovat změny fluorescence GFP po indukci exprese *35S-IR* v kalusech BY-2.

2 Literární přehled

2.1 Úvod k literárnímu přehledu

RNA interference je proces, při kterém dochází k transkripčnímu nebo post-transkripčnímu umlčení na základě komplementarity cílové sekvence a sekvence malé RNA, která byla odvozena z dvouvláknového prekurzoru (dsRNA). Přestože poprvé byla tato malá RNA objevena na živočišném modelu *Caenorhabditis elegans* (Lee et al. 1993), byly jevy spojené s RNAi pozorovány u rostlin již o několik let předtím (Napoli et al. 1990). Právě u rostlin, jak postupně zjišťujeme, jsou dráhy využívající RNAi výrazně komplikovanější a různorodější oproti těm živočišným, což ilustruje množství rostlinných paralogů pro proteiny drah RNAi.

Malé RNA se spolupodílejí na regulaci celé řady procesů nezbytných pro přežití. U rostlin se účastní na organogenezi, modulaci odpovědi na abiotické či biotické stresy, na obraně proti virům a transponovatelným elementům nebo na zachování kompaktnosti genomu (Boyko and Kovalchuk 2010; Garcia-Ruiz et al. 2010; Katiyar-Agarwal et al. 2006; Lippman et al. 2004; Vaucheret et al. 2004). Zdá se také, že malé RNA hrají roli i při opravách dvouvláknových zlomů DNA (Wei et al. 2012). V neposlední řadě mají také dopad na vědeckou práci jako takovou, protože jsou zodpovědné za umlčování exprese transgenů (Luo and Chen 2007; Napoli et al. 1990).

V případě rostlinných modelů je v současnosti systém drah RNAi popsán nejdetailněji na *Arabidopsis thaliana*. Z toho důvodu jsou poznatky uvedené v literárním přehledu získané z výzkumu téměř výlučně na této rostlině. Nicméně běžně jsou tyto informace zobecňovány a využívány i v případě jiných rostlinných druhů jako je kukuřice či rýže.

2.2 Klasifikace malých RNA

Malé RNA (sRNA) lze rozdělit do dvou hlavních skupin podle způsobu vzniku: na miRNA a siRNA (small interfering RNA). V případě miRNA dochází nejdříve k syntéze tzv. pri-miRNA z MIR genů prostřednictvím Pol II, které obsahují úseky s vnitřní komplementaritou (Lee et al. 2004; Reinhart et al. 2002). miRNA jsou převážně 21nt dlouhé a účastní se přímo či prostřednictvím ta-siRNA především regulace ontogeneze a stresové odpovědi (Jones-Rhoades & Bartel 2004; Allen et al. 2005).

Naproti tomu původ siRNA je mnohem pestřejší v závislosti na tom, v jaké regulační dráze vznikají. Jejich RNA prekurzory mohou být odvozeny ze sekvencí virů, transponovatelných

elementů (TE), genů a intergenových oblastí, případně také ze sekvencí transgenů. Ke vzniku dvouvláknových prekurzorů siRNA může docházet činností některé z rostlinných RNA-dependentních RNA polymeráz (RDR) nebo na základě inter- a intramolekulárního párování bází RNA.

u již zmiňovaných ta-siRNA musí nejprve dojít ke štěpení jejich TAS transkriptů kódovaných v genomu prostřednictvím dané miRNA asociované s AGO1. Toto štěpení indukuje doplnění TAS transkriptu do dsRNA aktivitou RDR6 a následné zpracování na převážně 21nt ta-siRNA proteinem DCL4 (viz kapitolu 2.3; Yoshikawa et al. 2005). Součástí dráhy bigeneze ta-siRNA je také SGS3 (SUPPRESSOR OF GENE SILENCING 3), který se účastní i při PTGS transgenů (Mourrain et al. 2000). Jedná se o RNA-vazebný protein, o kterém se předpokládá, že chrání RNA před degradací než je přepsána proteinem RDR6 do dsRNA (Yoshikawa et al. 2005). ta-siRNA se podobně jako miRNA zapojují převážně do vývojových regulací (Adenot et al. 2006). Poměrně málo prozkoumanou skupinu siRNA představují nat-siRNA (natural *cis*-antisense transcript siRNA), které vznikají z endogenních lokusů v „antisense“ orientaci a jejich produkce stoupá v reakci na biotické a abiotické stresy (Borsani et al. 2005; Zhang et al. 2012).

Nejrozsáhlejší skupinu siRNA tvoří siRNA odvozené z heterochromatinu a dalších metylovaných sekvencí (hc-siRNA = heterochromatic siRNA), především ze sekvencí TE, repetitivních sekvencí a nekódujících oblastí genomu. Přestože většina hc-siRNA je 24nt dlouhá, zahrnuje všechny velikostní třídy malých RNA (Xie et al. 2004; Zhang et al. 2007). Funkce a mechanismus vzniku hc-siRNA je podrobně popsán v podkapitole 2.5.1.3.

Další skupiny siRNA jako virové siRNA (vsRNA) odvozené ze sekvencí virů nebo siRNA ze sekvencí transgenů jsou zmíněny v podkapitolách 2.3.1.1 a 2.3.1.2.

2.3 Proteiny biogeneze malých RNA

Společnými proteiny biogeneze sRNA jsou HEN1 (HUA ENHANCER 1) a některý z DCL (DICER-LIKE) a AGO (ARGONAUTE) proteinů. Dvouvláknové RNA (dsRNA) prekurzory jsou nejprve prostřednictvím aktivity RNázy III DCL proteinu štěpeny na 21 – 24nt dlouhé dsRNA s 2nt přesahy na 3' koncích (Zhang et al. 2004). DCL1 a DCL4 dávají vzniknout především 21nt malým RNA, v případě DCL1 se jedná hlavně o miRNA (Kurihara & Watanabe 2004), DCL4 se účastní na tvorbě ta-siRNA a siRNA odvozených ze sekvencí virů (Garcia-Ruiz et al. 2010; Gascioli et al. 2005). DCL2 produkuje dsRNA duplexy o délce 22nt a podílí se převážně na antivirové obraně (Garcia-Ruiz et al. 2010). DCL3 štěpí primárně za vzniku 24nt siRNA, které jsou odvozeny ze sekvencí heterochromatinu nebo TE (Xie et al. 2004).

Po štěpení následuje metylace 2'OH skupiny na 3'konci RNA duplexu, který je katalyzován 2'-O-metyltransferázou HEN1. Tento krok je zásadní pro stabilizaci miRNA a siRNA duplexů (Yang et al. 2006).

Jedno z vláken RNA duplexu je následně asociováno s AGO proteinem a 2. vlákno je degradováno. Dosud není přesně známo, jakým způsobem je rozhodnuto, které ze dvou vláken duplexu bude asociováno s AGO proteinem, ale zřejmě je preferováno vlákno s nižší termodynamickou stabilitou své 5'koncové části. Navíc alespoň u většiny miRNA je v tomto procesu zapojen také DRB1 protein, podobnou roli zastává DRB4 v případě siRNA (Eamens et al. 2009).

Genom *Arabidopsis* obsahuje 10 genů kódujících AGO proteiny (Carmell et al. 2002). AGO proteiny obsahují tři hlavní funkční domény: PAZ, MID a PIWI. PAZ doména váže 3'konec sRNA, zatímco její 5'konec je vázán za součinnosti MID a PIWI domény na N-konci proteinu. PIWI doména je zároveň místem katalytické RNázové aktivity umožňující štěpit cílové molekuly RNA (Song et al. 2004).

O tom, s jakým AGO bude která sRNA interagovat, alespoň částečně rozhoduje její 5'koncový nukleotid. Přesný mechanismus nicméně není znám, ale s délkou sRNA zřejmě nesouvisí (Mi et al. 2008). Po vytvoření komplexu sRNA-AGO – označovaný také jako RISC (RNA-induced silencing complex) – dochází k navedení AGO proteinu k cílové RNA na základě komplementarity s sRNA. Cílová RNA je následně štěpena AGO proteinem, případně může docházet k zablokování translace (Baumberger & Baulcombe 2005; Brodersen et al. 2008).

AGO1, který váže primárně 21 – 22nt sRNA, zastává nejširší spektrum funkcí ze všech AGO. AGO1 má dominantní zastoupení v dráze miRNA, dále se významně podílí na regulacích zprostředkovaných ta-siRNA a v antivirové obraně (Morel et al. 2002; Baumberger and Baulcombe 2005; Qi, et al. 2005). Podílí se dokonce na TGS některých lokusů vazbou 24nt siRNA (Wang et al. 2011). Zdá se, že štěpení TAS transkriptů prostřednictvím 22nt miRNA v komplexu s AGO1 je schopné navodit syntézu komplementárního vlákna pomocí RDR6 (viz dále), na rozdíl od 21nt miRNA, které jsou také schopny indukovat štěpení TAS transkriptů, ale nespouštějí transkripci RDR6. Navíc to, zda budou vznikat 21nt či 22nt miRNA, je dáno přítomností jednoho nepárujícího nukleotidu v sekvenci prekurzoru miRNA, protože miRNA o obou délkách mohou vznikat činností DCL1. Po vytvoření syntetického miRNA prekurzoru s opraveným párováním docházelo ke vzniku 21nt miRNA namísto původních 22nt miRNA (Cuperus et al. 2010).

2.3.1 Rostlinné RNA-dependentní RNA polymerázy (RDR)

V případě, že nedochází k přímé produkci dsRNA prekurzoru pro vznik siRNA, jako je tomu např. u nat-siRNA, miRNA nebo některých virových RNA, je třeba 2. vlákno prekurzoru dosyntetizovat. K tomu slouží některá z rostlinných RNA-dependentních RNA polymeráz (RDR). Genom *Arabidopsis* obsahuje 6 genů odpovídajících RDR. Nicméně funkce byla prokázána pouze u tří z nich, a to RDR1, RDR2 a RDR6 (Zong et al. 2009).

O funkci RDR1 a RDR6 pojednávají následující kapitoly. Funkce RDR2 je blíže popsána v podkapitole 2.5.1.3 týkající se RdDM.

2.3.1.1 RDR1

Polymeráza RDR1 se společně s RDR6 podílí na antivirové obraně produkcí sekundárních virových siRNA (vsRNA), při které jsou jejich funkce z části zastupitelné, i když RDR1 hraje při obraně proti některým virům důležitější roli (Qi et al. 2009). dsRNA úseky virových RNA a dsRNA replikační intermediáty RNA virů jsou štěpeny především prostřednictvím DCL4 za vzniku 21nt vsRNA a dále DCL2 za vzniku méně početné skupiny 22nt vsRNA (Garcia-Ruiz et al. 2010). Tyto primární vsRNA asociují především s AGO1 nebo AGO2, které zprostředkují post-transkripční umlčení virové exprese (Morel et al. 2002; Garcia-Ruiz et al. 2015). Většina vsRNA je však tvořena sekundárními vsRNA díky amplifikaci dsRNA prekurzorů prostřednictvím některé ze dvou RDR.

Expres *AtRDR1* je ovlivněna zvýšenou hladinou kyseliny salicylové, abscisové a jasmonové, což jsou fytohormony účastníci se v boji s patogeny, což odpovídá jejímu zapojení do antivirové obrany. Vliv na expresi *RDR1* u *Arabidopsis* má ale také abiotický stres (Xu et al. 2013).

Před nedávnem bylo také popsáno zapojení RDR1 do dráhy umlčující expresi endogenních sekvencí. V tomto případě se RDR1 spolu s DCL4 a AGO2 účastní na produkci tzv. virem aktivovaných siRNA (vasiRNA). Tyto 21nt dlouhé siRNA jsou odvozeny ze sekvencí protein kódujících genů. Podle výsledků sekvenování může být tímto způsobem regulováno 1000 genů *Arabidopsis thaliana* a Northern blot potvrdil snížení hladiny transkriptů u všech vybraných genů. Přítomnost vasiRNA je však detekovatelná pouze u virů CMV (Cucumber mosaic virus) s inaktivovaným proteinem 2b, který funguje jako supresor umlčování (Cao et al. 2014).

V případě rýže byl prokázán vliv mutace v *OsRDR1* na zastoupení malých RNA, i když celková četnost malých RNA změněna nebyla. Jednalo se např. o pokles či nárůst exprese některých miRNA. Mutace *rdr1* u rýže také vedla ke změnám CHH metylace u některých genů a TE (Wang et al. 2014). Možnému zapojení RDR1 do dráhy RdDM nasvědčují také výsledky

z analýzy metylomu *Arabidopsis*, kde byl pozorován pokles metylace ve všech sekvenčních kontextech u mutantů *rdr1* i *rdr6* (Stroud et al. 2013).

Další příklad zapojení RDR1 do umlčování endogenních sekvencí poskytuje zjištění, že RDR1 se podílí na negativní post-transkripční regulaci produkce vosku při vývoji květních stonků (Lam et al. 2012).

2.3.1.2 RDR6

Enzym RDR6 je zapojen do řady drah biogeneze malých RNA a je tudíž jedním z klíčových proteinů RNAi. RDR6 je zapojena do antivirové obrany (Wang et al. 2010; Mourrain et al. 2000), účastní se na biogenezi ta-siRNA (Allen et al. 2005; Vazquez et al. 2004; Rajeswaran et al. 2012) a některých nat-siRNA (Katiyar-Agarwal et al. 2006). RDR6 je také součástí dráhy RDR6-RdDM (viz podkapitolu 2.5.1.1 Methylace DNA), která vzájemně propojuje PTGS a TGS.

RDR6 se nachází jak v cytoplazmě, tak v jádře, kde se vyskytuje v nukleoplazmě, mimo jádérko (Hoffer et al. 2011). Bylo prokázáno, že *in vitro* je RDR6 schopná přepisovat ssRNA templát za využití 21 – 24nt primeru i bez něj. Je také schopná využít jako primer dsRNA úsek vytvořený na základě vnitřní komplementarity sekvence na 3' konci RNA. Tato schopnost by mohla souviset se skutečností, že substráty RDR6 mohou být aberantní transkripty bez polyadenylace, které mohou vytvářet 3' koncové vlásenkové struktury (Devert et al. 2015).

Význam RDR6 dokládá široké spektrum jejích cílů, které v poupatech *Arabidopsis* představují především transponovatelné elementy, řada mRNA, RNA z mezigenových oblastí (především centrometrické tandemové repeticce) a dokonce tRNA (Zheng et al. 2010).

Vedle biogeneze endogenních malých RNA se RDR6 podílí také na vzniku a sekundární amplifikaci siRNA pocházejících se sekvence transgenů. V případě indukce PTGS prostřednictvím invertované repeticce (IR) proti transgenu není aktivita RDR6 nezbytná, nicméně i v tomto případě se aktivita RDR6 podílí na zvýšení efektivity umlčování, pravděpodobně prostřednictvím sekundárních siRNA (Harmoko et al. 2013).

Substrátem RDR6 mohou být také aberantní transkripty bez 5' čepičky a polyadenylace na 3' konci, (Luo & Chen 2007), není ale stále jasné, jak tyto aberantní transkripty rozlišuje. Nyní se zdá, že to, zda se aberantní či jinak poškozené transkripty stanou substrátem pro RDR6 je určováno primárně prostřednictvím aparátu pro kontrolu kvality RNA (RNA quality control), který je lokalizován v P-tělískách (P-bodies), která přiléhají k siRNA-tělískům (siRNA-bodies) s RDR6. Poškozené mRNA jsou běžně degradovány uvnitř P-tělísek a teprve ve chvíli, kdy je jich nadměrné množství se mohou stát templátem pro RDR6 (Martinez de Alba et al. 2015).

Přesvědčivým argumentem je, že v mutantech pro proteiny, které jsou součástí odčepičkovacího (decapping) komplexu, se zvyšuje produkce siRNA prostřednictvím RDR6 z endogenních lokusů. Čepičku vážící proteiny (CBPs) tedy nemohou bránit RDR6 v syntéze komplementárního vlákna RNA (Martinez de Alba et al. 2015).

Na degradaci nadměrného množství aberantních RNA se zřejmě kromě RDR6 účastní do určité míry také jiná RNA-dependentní RNA polymeráza, nejpravděpodobněji RDR1 (Martinez de Alba et al. 2015).

RDR6 se také podílí na *de novo* metylaci sekvence transgenů, která je spouštěna při PTGS, v tomto případě však nedochází k transkripčnímu umlčení, neboť metylace promotoru v mutantech *rdr6* zůstává nezměněna (Mourrain et al. 2000; Elmayan et al. 1998). Na tuto metylaci nemá vliv mutace v genu *Pol IV* nebo *RDR2* (Jauvion et al. 2012). Nicméně i po zablokování dráhy PTGS zůstává část CG metylace zachována, což nasvědčuje zapojení DNA metyltransferázy MET1 (Jauvion et al. 2012).

2.4 PTGS

Při post-transkripčním umlčení dochází ke štěpení transkriptu nebo k blokaci jeho translace prostřednictvím komplementarity s malou RNA vázanou na některý z AGO proteinů, nejčastěji na AGO1. Stále není zcela jasné, co určuje, ke kterému z těchto dvou procesů bude docházet. Nedokonalé párování malé RNA s cílovou sekvencí podporuje represi translace oproti štěpení transkriptu, ale opačná implikace neplatí. Blokování translace prostřednictvím malých RNA u rostlin je tedy běžnější, než se původně předpokládalo (Brodersen et al. 2008). Prokazatelně byla účast v PTGS a schopnost štěpit transkripty doložena pro AGO1 a AGO7 (Montgomery et al. 2008; Qi, Denli, and Hannon 2005)

K PTGS může docházet také v jádře, kde se nachází DCL4 a RDR6 (Hoffer et al. 2011).

Uměle může být post-transkripční umlčení vyvoláno několika různými způsoby. Historicky prvním objeveným způsobem indukce umlčování endogenních genů i transgenů bylo využití antisense RNA párující s cílovou RNA za vzniku dsRNA prekurzoru. Rostlinný materiál byl transformován konstruktem nesoucí sekvenci genu zájmu v antisense orientaci, i když mechanismus degradace cílové RNA nebyl ještě přesně znám (Delauney et al. 1988; Napoli et al. 1990; Rothstein et al. 1987).

Jinou, ještě účinnější možností je tvorba dsRNA prekurzorů vytvářených prepisem invertované repetice (vlásenky) umlčovaného genu, kde jsou sense a antisense vlákna spojena tzv. spacer sekvencí. Nejvyšší míra umlčení (okolo 100%) byla dosažena použitím sekvence intronu jako

spaceru, který byl sestřihován (Smith et al. 2000). Účinnost PTGS je dána také orientací a vzdáleností sekvence spouštějící PTGS od 5' konce vlásenky (sense fragment blíže 5' konci má nižší efektivitu umlčení) a přítomností předvídaných ORF v sekvenci vlásenky. Množství siRNA vznikajících z jednotlivých úseků vlásenky je sekvencně specifické a překvapivě se zdá, že by mohlo souviset s výskytem málo častých kodonů v sekvenci vlásenky. Na základě těchto poznatků by tedy dalo uvažovat o určité kompetici mezi translačním aparátem a aparátem pro RNAi (Wroblewski et al. 2014).

Představa o průběhu RNAi proti transgenu není stále kompletní. V případě vlásenky indukující PTGS stojí zřejmě na začátku dráhy DCL1, který odstraní nekomplementující okrajové části vlásenky. V ostatních případech pravděpodobně dochází rovnou ke štěpení dsRNA prekurzoru především DCL4 za vzniku 21nt siRNA a DCL3 za vzniku 24nt siRNA. 21nt siRNA následně interagující primárně s AGO1, který zprostředkuje štěpení cílové molekuly RNA a PTGS (Dunoyer et al. 2007). Je překvapující, že v případě PTGS proti sense transgenu vede mutace *ago1* také ke ztrátě siRNA (Boutet et al. 2003). Na rozštěpené molekuly může nasedat RDR6 zajišťující syntézu komplementárního vlákna. Výsledná dsRNA může být zřejmě opět štěpena DCL2 nebo DCL4 za vzniku sekundárních siRNA podobně jako v případě TAS transkriptů (Yoshikawa et al. 2005).

Dále může být PTGS spuštěno sense transgenem bez terminátoru vedoucím k produkci transkriptů bez polyadenylace, které se stávají substrátem RDR6, nebo jeho zvýšenou expresí danou počtem kopií a silou promotoru (Luo and Chen 2007; Que et al. 1997). V případě sense transgenu je pro účinné PTGS vedle RDR6 potřebný také SDE3 protein (Dalmay et al., 2001), který obsahuje motiv RNA helikázy a GW motiv pro případnou vazbu na AGO protein (Garcia et al. 2012). Zajímavé je, že mutace *sde3* se projevuje pouze v systémech, kde indukce PTGS není příliš silná (Jauvion et al. 2010). Role SDE3 není stále uspokojivě osvětlena, ale bylo zjištěno, že funguje v dráze PTGS za RDR6 a interaguje s AGO1 a AGO2. Dále jeho mutace vede ke zvýšení exprese některých lokusů obsahujících TE spojené s poklesem metylace jejich DNA a zvýšením výskytu metylace H3K4 (Garcia et al. 2012). Podobný vliv má i mutace proteinu NERD, který je součástí dráhy RDR6-RdDM (viz podkapitolu 2.5.1.1) a je schopen vázat AGO2 a histon H3 (Pontier et al. 2012). SDE3 by tedy mohl být součástí dráhy RDR6-RdDM. Tým francouzských vědců Garcia et al. přišel s modelem, ve kterém SDE3 slouží k rozvolňování dsRNA prekurzorů vytvořených enzymem RDR6, čímž umožní jejich další amplifikaci a efektivnější tvorbu siRNA. Tento mechanismus by přispíval ke spolehlivému umlčení i u endogenních sekvencí (především transpozonů), ze kterých za běžných okolností

vzniká jen malé množství transkriptů a které nejsou regulovány prostřednictvím klasické RdDM (mutace *ago4* a *rdr2* na ně nemá vliv; Garcia et al., 2012).

Při PTGS může také docházet k metylaci sekvence transgenů, a to především ve středové a 3'koncové kódující oblasti transgenů, která ale může po opakovaných cyklech buněčného dělení přejít na metylaci v oblasti promotoru indukující transkripční umlčení (Elmayan et al. 1998; Fojtova et al. 2003).

2.5 Epigenetické modifikace chromatinu

Epigenetické modifikace chromatinu, zahrnující především metylaci DNA, kovalentní modifikace histonů a existenci různých histonových variant, se významně podílejí na modulaci genové exprese, která spolu s genetickou informací zakódovanou v sekvenci DNA určuje výsledný fenotyp a reakce organismu na vnější či vnitřní podněty (Baulcombe & Dean 2014). Epigenetické modifikace také hrají důležitou roli při organizaci struktury chromatinu v jádře, např. v oblasti centromer a telomer (Fojtová and Fajkus 2014; Zhang et al. 2008).

Základní stavební jednotkou chromatinu je nukleozom, jehož jádro tvoří oktamer histonů H3-H4 a H2A-H2B, okolo kterých je namotána DNA o délce 147 párů bází (Luger et al. 1997). Mezi jednotlivými nukleozomy se nachází tzv. linker DNA, jejíž délka se pohybuje v rozpětí několika desítek bází. V heterochromatinu se nachází také histon H1, který je zásadní pro ustanovení a udržení vyšších struktur chromatinu. Dále se podílí např. na specifické regulaci genové exprese (Cutter & Hayes 2015).

Chromatin lze rozdělit na transkripčně aktivní a více rozvolněný euchromatin a naopak transkripčně reprimovaný heterochromatin, vyskytující se především v pericentromerických oblastech (Beisel & Paro 2011), které se také mnohdy vyznačují zvýšeným výskytem transponovatelných elementů (TE; Lippman et al. 2004). Transkripčně aktivní chromatin je typický výskytem metylace lysinového zbytku na pozici 4 nebo 36 na histonu H3 (H3K4me, H3K36me), naopak metylace lysinu na pozici 9 nebo 27 na histonu H3 (H3K9me, H3K27me) je asociována především s transkripčně inaktivovanými oblastmi a heterochromatinem. V případě metylace histonů se může jednat o mono-, di- až trimetylaci a může k ní docházet také na argininových zbytcích (Pfluger & Wagner 2007).

Následující kapitoly jsou zaměřeny především na metylaci DNA a kovalentní modifikace histonů související s drahou RdDM.

2.5.1 TGS

Při transkripčním umlčení dochází k inhibici, nebo k částečnému zamezení transkripce prostřednictvím epigenetických modifikací. Na TGS se podílí celá řada regulačních drah, které jsou spolu provázány, vzájemně se doplňují a přispívají tak k celkovému stavu heterochromatinu v jádře. Jeden z mechanismů TGS je zajišťován tvorbou siRNA, které jsou odvozeny především z nekódujících, repetitivních oblastí, ze satelitní DNA a ze sekvencí transponovatelných elementů (Xie et al. 2004). siRNA, která jsou součástí dráhy RdDM (RNA-directed DNA methylation), se tedy podílejí jak na obraně proti invazivní a cizorodé DNA, tak na udržení kompaktní struktury heterochromatinu.

2.5.1.1 Metylase DNA

K metylaci DNA dochází u rostlin běžně ve třech sekvenčních kontextech: CG, CHG a CHH, kde H = A, C nebo T. Metylase ve všech sekvenčních kontextech se u *A. thaliana* nachází nejhojněji v pericentromerických oblastech chromozomů, které jsou charakteristické nejvyšší hustotou výskytu transponovatelných elementů a repetitivních sekvencí. Uvnitř genů je naopak typická přítomnost GC metylase (Lister et al. 2008; Cokus et al. 2008).

Lze rozlišit dva hlavní mechanismy účastníci se na udržování metylase DNA u rostlin. Většinu metylase zajišťují DNA metyltransferázy MET1, CMT3 a CMT2. Metyltransferáza MET1 je rostlinným homologem savčí Dnmt1 DNA metyltransferázy, která rozpoznává hemimetylovaná GC místa po replikaci (Law & Jacobsen 2010). CMT3 (CHROMOMETHYLASE 3) se spolupodílí na zajištění CHG metylase, a to prostřednictvím spolupráce s histonovou metyltransferázou KYP/SUHV4, která dimetyluje lysinové zbytky na pozici 9 histonu H3 (H3K9me2). Tuto histonovou modifikaci CMT3 rozpoznává, váže se na ni a přilehlé CHG sekvence metyluje. Podobně KYP je schopen rozpoznat CHG metylaci a v těchto místech modifikovat histony. Ustanovuje se tedy regulační smyčka, ve které jsou CHG metylase DNA a H3K9 dimetylase histonů na sobě závislé (Du et al. 2012; Chan et al. 2006; Jackson et al. 2004; Lindroth et al. 2001; Lindroth et al. 2004).

Podobným způsobem je zřejmě regulována také DNA metyltransferáza CMT2, která se podílí na metylaci většiny CHH sekvencí a jejíž role byla popsána poměrně nedávno (Zemach et al. 2013).

Všechny výše uvedené DNA metyltransferázy potřebují k zajištění své řádné činnosti chromatin remodelující faktor DDM1 (DEFICIENT IN DNA METHYLATION 1) z rodiny

SWI/SNF2-like proteinů, který jim umožňuje přístup ke kompaktnějšímu heterochromatinu obohacenému o histon H1 (Zemach et al. 2013).

Druhým mechanismem zajišťujícím udržování metylace DNA je dráha RdDM (RNA-directed DNA methylation), která zajišťuje především metylaci DNA transponovatelných elementů.

Protein SHH1 (SAWADEE HOMEODOMAIN HOMOLOG 1) váže mono- až trimetylované H3K9 histonové značky, prostřednictvím kterých navádí Pol IV na transkripčně inaktivované oblasti (Law et al. 2011; Zhang et al. 2013). Ta poté přepisuje metylovanou DNA, která je doplněna do podoby dvouvlákna enzymem RDR2. dsRNA je štěpena DCL3 do podoby 24nt dsRNA prekurzorů. Jedno ze dvou vláken malé RNA je pak asociováno s AGO4 (případně AGO6 nebo AGO9). Tento komplex následně interaguje s Pol V a jejími transkripty. Na komplex Pol V je díky tomu navedena také DNA metyltransferáza DRM1/2 (DOMAINS REARRANGED METHYLASE 1/2), která je zodpovědná za ustanovení *de novo* metylace DNA ve všech sekvenčních kontextech a také zajišťuje udržování metylace DNA především v kontextu CHH a CHG v oblastech bez histonu H1 (Cao et al. 2003; Chan et al. 2004; Zemach et al. 2013). Výhodou RdDM je její schopnost indukovat metylaci homologních sekvencí *in trans* prostřednictvím tvorby malých RNA, což je žádoucí např. V případě nově vložené kopie transponovatelného elementu do genomu.

Oba hlavní mechanismy metylace DNA se tedy společně podílejí na transkripčním umlčování TE a jejich místa působení se často překrývají. Obecně ale dráha RdDM operuje především na krátkých TE a na okrajích dlouhých, zatímco DNA metyltransferázy využívající DDM1 se účastní metylace středních úseků dlouhých TE (Zemach et al. 2013).

Z lokusů metylovaných CMT2 mohou vznikat také siRNA, ale pouze v případě lokusů metylovaných DRM1/2 je CHH metylace závislá na produkci těchto siRNA (Li et al. 2015).

Poměrně nedávno byla nezávisle několika vědeckými skupinami odhalena další cesta RdDM označovaná jako RDR6-RdDM, která nevyužívá Pol IV, RDR2, DCL3 ani AGO4 (Pontier et al. 2012; Nuthikattu et al. 2013). Podobně jako v případě PTGS tato dráha na základě aktivit RDR6, DCL2, DCL4 a AGO1 produkuje 21 – 22nt dlouhé malé RNA odvozené především z transkriptů TE a TAS genů přepisovaných Pol II (Mccue et al. 2014; Nuthikattu et al. 2013; Pontier et al. 2012; Wu et al. 2012). Tyto siRNA se zřejmě uplatňují také při *de novo* metylaci lokusu *FWA Arabidopsis* indukované virovým vektorem, která vede k časnějšímu kvetení (Bond & Baulcombe 2015). V případě 21 – 22nt siRNA odvozených z některých TAS a TE lokusů dochází k jejich asociaci s AGO6 a následné interakci s Pol V, což zajistí ustanovení metylace prostřednictvím DRM1/2 (Mccue et al. 2014). AGO6 se ovšem exprimuje především

v oblasti vzrostných vrcholů stonku a kořene (Havecker et al. 2010) a v květenství *Arabidopsis*. Zdá se tedy, že dráha RDR6-RdDM, určená hlavně k ochraně před reaktivovanými TE, je lokalizována především do oblasti květního meristému v době před či během gametogeneze (Mccue et al. 2014). Tento předpoklad potvrzuje i sekvenace populace molekul dsRNA z poupat *rdr6* mutantních rostlin *Arabidopsis*, z nichž přes 80 % stabilizovaných molekul tvořily právě sekvence TE a v naprosté většině z nich se jednalo o Gypsy-like retrotranspozony (Zheng et al. 2010). Právě retrotranspozony se svým RNA intermediátem představují největší hrozbu pro rostlinné genomy a dráha RDR6-RdDM vůči nim tedy představuje účinný obranný mechanismus. Otázkou zůstává, jaký AGO protein funguje v této dráze místo AGO6 v ostatních pletivech, i když v terminálně diferencovaných buňkách zřejmě tato dráha nehraje tak významnou roli, což je pravděpodobně i důvod, proč je obtížné ji blíže popsat. Nicméně na základě dvou prací (Pontier et al. 2012; Garcia et al. 2012), se zdá, že by tuto úlohu mohl zastávat AGO2, který interaguje s NERD proteinem, účastnícím se v této dráze a který je nutný pro akumulaci siRNA odvozených ze sekvencí některých TE (Pontier et al. 2012). Navíc možnost, že by AGO2 interagoval s Pol V nebo s jejími transkripty je uvažována i ve článku zabývajícím se rolí malých RNA v opravách zlomů na DNA (Wei et al. 2012).

Není však zcela jasné, jak je iniciováno rozpoznání transkriptů aktivovaných retrotranspozonů přepisovaných Pol II prostřednictvím RDR6. Výsledky výzkumu Creaseyho et al. naznačují, že alespoň v případě některých TE reaktivovaných v rámci gametogeneze pylových zrn by se mohlo jednat o podobný mechanismus, jakým je indukována tvorba ta-siRNA, tedy že transkripce RDR6 je indukována štěpením přes miRNA. Tým zjistil, že řada retroelementů obsahuje sekvenci rozpoznávanou miRNA. V případě, že byl uměle exprimován retroelement, který obsahoval domnělé místo rozpoznávané miRNA, docházelo ke vzniku 21nt siRNA ze sekvence retroelementu specificky v místě exprese dané miRNA (tedy v pylovém znu), ale v případě, kdy tato část sekvence byla změněna, ke vzniku siRNA nedocházelo a mRNA retroelementu štěpena nebyla (Creasey et al. 2014).

Vedle RDR6 by se na této dráze metylace DNA mohla podílet i RDR1 zapojená také do produkce 21nt siRNA, jak naznačuje ztráta metylace DNA na některých lokusech v *rdr1* mutantech, která se značně překrývala se ztrátou metylace v *rdr6* mutantech (Pontier et al. 2012; Stroud et al. 2013).

2.5.1.2 Demethylace DNA

ROS1 slouží jako negativní regulátor metylace DNA, proto se často využívá screening *ros1* mutantů pro nalezení nových genů účastnících se v dráze RdDM. Zároveň exprese samotného

ROS1 je pozitivně regulována pomocí RdDM. Jeho promotor totiž obsahuje sekvenci transponovatelného elementu ze skupiny Helitronů, která, pokud je exprimována v důsledku poklesu metylace DNA, blokuje transkripci *ROS1*. Naopak dostatečná metylace TE v promotoru *ROS1* a přilehlé 5' oblasti inhibuje TE a umožňuje expresi *ROS1*. Zároveň *ROS1* sám negativně ovlivňuje úroveň metylace v této oblasti (Lei et al. 2015). Tento způsob regulace tedy umožňuje vzájemné vyvažování aktivit drah metylace a demethylace DNA. V souvislosti s tím je zajímavé, že v *met1* mutantech není detekovatelná exprese *ROS1*, což opět ukazuje na propojenost RdDM a MET1 (Mathieu et al. 2007).

2.5.1.3 RdDM

Jak již bylo zmíněno, dráha RdDM zajišťuje TGS prostřednictvím siRNA odvozených především z oblastí heterochromatinu (hc-siRNA). Pro tuto dráhu je typická účast dvou specificky rostlinných DNA-dependentních RNA polymeráz IV a V. Pol IV produkuje transkripty, které jsou činností RDR2 přeměněny na dsRNA prekurzory. To dokládá skutečnost, že RDR2 je schopna samostatné syntézy RNA na ssRNA templátu *in vitro* za použití 21 – 24nt primeru i bez přidání primeru (Devert et al. 2015). Její aktivita by tedy nemusela být závislá na přítomnosti Pol IV, jak ukazovala předchozí studie (Haag et al. 2012). dsRNA jsou následně štěpeny enzymem DCL3 na převážně 24nt prekurzory (Xie et al. 2004). *In vitro* DCL3 preferuje převážně kratší dsRNA jako substráty (30 – 50 nt), které mají 1 – 2 nt 3'koncový přesah. Vzdálenost, ve které bude štěpit je určována od 5' konce dsRNA (Nagano et al. 2013). Jedno z vláken siRNA následně asociuje s AGO4 proteinem, který navádí na transkripty Pol V. AGO4 může být v závislosti na lokalizaci v rostlině nahrazen příbuznými proteiny AGO6 nebo AGO9 (Havecker et al. 2010).

Rostlinně specifické komplexy DNA-dependentní RNA polymerázy IV (Pol IV) a V (Pol V) byly v průběhu evoluce odvozeny z genů pro podjednotky RNA polymerázy II (Pol II) a řadu jejich podjednotek s ní sdílejí (Luo and Hall 2007; Ream et al. 2009). Nejvýznamnější rozdíly ve stavbě oproti Pol II se vyskytují u dvou největších podjednotek rostlinných RNA polymeráz, které spoluutvářejí katalytické centrum a jeho okolí (Cramer et al., 2001; Haag et al., 2009). Právě tyto odlišnosti odrážejí jejich odlišné funkce ve srovnání s Pol II, především schopnost přepisovat heterochromatin a nepřítomnost promotorové sekvence při zahajování transkripce. Zároveň Pol IV a V sdílejí svoji druhou největší podjednotku (NRPD2/NRPE2), ale liší se v největší podjednotce (NRPD1 a NRPE1; Pontier et al. 2005).

Ukazuje se, že rostlinné Pol IV a Pol V jsou z evolučního hlediska starší, než se předpokládalo. Původně převládalo názor, že Pol V se vyskytuje pouze u krytosemenných rostlin (Luo and Hall

2007). Nyní se na základě prokázání přítomnosti 24nt siRNA u několika druhů nahosemenných (Nystedt et al. 2013; Wan et al. 2012) spolu s novou fylogenetickou studií zdá, že funkční Pol IV i Pol V byly přítomné již u starobylých druhů kryto- i nahosemenných rostlin (Huang et al. 2015). Podjednotky NRPD1 a NRPE1 byly identifikovány také u mechu, kapradiny nebo plavuně (Huang et al. 2015; Matzke et al. 2014).

Přestože spolu RDR2 a Pol IV v jádře přesně nekolokalizují (RDR2 se kromě nukleoplazmy vyskytuje také uvnitř jáderka a v jeho okolí, kde se nachází centrum zpracovávající siRNA), pravděpodobně spolu blízce interagují. Produkce transkriptů Pol IV vyžaduje účast RDR2, což bylo prokázáno jak transkripce *in vitro*, tak analýzou transkriptů několikanásobných mutantů *Arabidopsis* (Haag et al. 2012; Li et al. 2015). Drtivá většina transkriptů Pol IV pochází z mezigenových oblastí, ze sekvencí TE a repetice (Li et al. 2015). Pol IV pro svoji účinnou transkripce vedle RDR2 vyžaduje zřejmě RNA primer (Haag et al. 2012); její většinou 100 – 500 nt dlouhé transkripty nejsou polyadenylovány a jejich transkripce je iniciovaná z oblastí obohacených o AT páry a naopak s nižším výskytem nukleozomů. Oproti transkriptům Pol II vznikají tyto RNA transkripce z obou vláken DNA, procesivita transkripce Pol IV *in vitro* je však oproti Pol II výrazně nižší (Haag et al. 2012; Li et al. 2015).

S Pol IV dále interagují chromatin remodelující faktor CLASSY1 (CLSY1) s SNF2 a helikázovou doménou a protein SHH1 (SAWADEE HOMEODOMAIN HOMOLOG1), který je schopen vázat metylované H3K9 zbytky (Law et al. 2011; Smith et al. 2007). Předpokládá se tedy, že SHH1 spolu s CLSY1 by mohl rekrutovat Pol IV na příslušné lokusy přes vazbu na metylované H3K9 a zprostředkovat tak udržování RdDM.

Většina produkce 24-nt hc-siRNA je závislá jen na Pol IV (lokusy typu II). Jedná se především o siRNA odvozené z unikátních nebo málo četných endogenních sekvencí a ze sekvencí LTR retrotranspozónů. Naproti tomu u tzv. lokusů typu I dochází k produkci siRNA závislých i na fungování Pol V, zřejmě se jedná o sekundárních siRNA vznikající z transkriptů Pol V. V případě těchto lokusů jde většinou o krátké a vysoce repetitivní sekvence nebo o sekvence transpozónů (Lee et al. 2012; Mosher et al. 2008; Pontier et al. 2005).

Pol V podobně jako Pol IV vyžaduje pro transkripce *in vitro* RNA primer, její transkripty nejsou polyadenylovány a jsou 200 či více nukleotidů dlouhé. Oproti Pol IV, u které se zdá, že na 5'konci jejích transkriptů by mohl být monofosfát, transkripty Pol V mají na 5'konci trifosfát, nebo 7-metylguanosinovou čepičku (Li et al. 2015; Wierzbicki et al., 2008).

AGO4 v komplexu s siRNA interaguje přímo s Pol V prostřednictvím WG/GW motivů na C-terminální doméně největší podjednotky Pol V (NRPE1; El-Shami et al. 2007). Dále také AGO4 interaguje s jejími transkripty, které jej navádějí do daných oblastí chromatinu

(Wierzbicki et al. 2009). Předpokládá se, že tato interakce je zprostředkována přes navázanou malou RNA komplementární k sekvenci transkriptu Pol V, i když tato možnost nebyla doposud prokázána.

S Pol V nebo s komplexem Pol V - AGO4 interaguje celá řada proteinů, které umožňují transkripci Pol V nebo vazbu DRM1/2. Pro správnou tvorbu transkriptů Pol V je zapotřebí účasti proteinů DMS3, DRD1 a RDM1, které dohromady tvoří tzv. DDR komplex. DMS3 a RDM1 se váží na DNA (Law et al. 2010; Wierzbicki et al. 2009); DRD1 zřejmě slouží jako chromatin remodelující faktor (Kanno et al. 2004).

Dalšími proteiny, které jsou nutné pro rekrutování Pol V jsou SUVH2 a SUVH9. Proteiny ze skupiny SUVH obsahují SRA doménu vážící metylovanou DNA a SET doménu pro metylaci histonových aminokyselinových zbytků (Johnson et al. 2007; Rea et al. 2000). Do této skupiny spadá i již zmiňovaná histonová metyltransferáza KYP/SUVH4. SET doména SUVH2/9 je však nefunkční (Johnson et al. 2008). Namísto funkce histonových metyltransferáz tedy zajišťují navedení Pol V na chromatin prostřednictvím jejich vazby na metylovanou DNA. Tomu odpovídá i ztráta výskytu Pol V z lokusů, na kterých se běžně nachází, v mutantech *met1*. Zdá se, že funkce SUVH2 a SUVH9 jsou redundantní, i když mutace *svh2* má o něco silnější vliv na ztrátu metylace DNA než *svh9*. Samotná přítomnost SUVH2 fúzovaného se specifickou zink-finger doménou vážící *FWA* lokus je dostačující k indukci metylace DNA a výskytu Pol V na původně nemetylovaném *FWA* lokusu (Johnson et al. 2014). Zdá se tedy, že již existující metylace DNA zajišťuje navedení Pol V na příslušné lokusy přes SUVH2/9, čímž se metylace DNA stále cyklicky udržuje, podobně jako je tomu v případě metylace DNA a H3K9 metylace zprostředkované KYP/SUVH4 (Johnson et al. 2014). Otázkou stále zůstává, jak je zajišťováno rozpoznání cílů RdDM dráhy při *de novo* metylaci, resp. jak je na tato místa navedena Pol V, pokud zde není pre-existující metylace. Jedním z možných vysvětlení by byla účast Pol II při iniciaci RdDM.

Podle výsledků kvasinkového dvouhybridního testu SUVH2 i SUVH9 interagují s proteinem DMS3 (Liu et al. 2014), který obsahuje SMC doménu typickou pro proteiny zajišťující organizaci chromatinu do struktur vyšších řádů (Kanno et al. 2008), vedle toho SUVH2 interaguje také s DRD1 (Liu et al. 2014; Johnson et al. 2014). Zároveň v mutantech *svh2 svh9* je DMS3 delokalizován z lokusů, na kterých operuje RdDM (Liu et al. 2014). Zdá se tedy, že SUVH2/9 rekrutuje Pol V nepřímo prostřednictvím DDR komplexu.

SUVH2/9 interaguje také s proteiny z rodiny MORC, konkrétně s MORC1, MORC2 a MORC6 přes svoji SET doménu (Liu et al. 2014). MORC proteiny se účastní na remodelaci chromatinu a obsahují GHKL (gyrase, HSP90, histidíne kinase, MutL) ATPázovou doménu. Bylo

zdokumentováno, že MORC6 váže také protein DMS3, který stimuluje jeho ATPázovou aktivitu. Vzhledem k tomu, že některé proteiny účastníci se oprav DNA obsahují SMC doménu společně s GHKL ATPázovou doménou, lze se domnívat, že proteiny MORC6 a DMS3 by spolu mohly tvořit funkční komplex (Lorković et al. 2012; Matzke et al. 2014). Také mutanty *morc1* a *morc2* mají sníženou odolnost vůči poškození DNA (Langen et al. 2014).

Dále MORC6 asociuje s podjednotkou chromatin remodelujícího komplexu typu SWI/SNF (Liu et al. 2014), se kterým interaguje i protein IDN2 (INVOLVED IN DE NOVO 1) vážící se na transkripty Pol V (Zhu et al. 2013). Přes dimer IDN2 asociující s dalšími příbuznými proteiny IDNL1 a IDNL2 (IDN2-like 1 a 2) tedy zřejmě dochází k navedení chromatin remodelujícího komplexu do míst transkripce Pol v (Zhu et al. 2013).

S AGO4 a zároveň s transkripty Pol V interaguje také protein KTF1/SPT5-like podobající se transkripčnímu faktoru Pol II (He et al. 2009). Předpokládá se, že spolu s AGO4 tvoří vazebnou plochu pro DNA metyltransferázu a další proteiny modifikující chromatin (Rowley et al. 2011).

2.5.1.4 Histonové modifikace související s RdDM

Schopnost některých proteinů katalyzovat přenos metylové skupiny na lysinový zbytek histonu je zajišťována funkcí evolučně konzervované SET domény (Rea et al. 2000), jejíž označení je odvozeno z názvu tří proteinů popsanych u *Drosophily melanogaster*: SUPPRESSOR OF VARIATION 3-9 [SU(VAR)3-9], ENHANCER OF ZESTE [E(Z)] and TRITHORAX (TRX), které se prostřednictvím metylace histonů podílejí na regulaci jejího vývoje (Jones and Gelbart 1990; Katsani et al. 2001; Schotta et al. 2002).

Genom *Arabidopsis* obsahuje několik desítek genů kódujících proteiny podobajících se některému ze tří zmíněných proteinů *Drosophily*, u řady z nichž byla zdokumentována jejich role v RdDM (Baumbusch et al. 2001). To se týká především skupiny SUVH (SU(VAR)3-9 HOMOLOG) proteinů pojmenovaných podle podobnosti se SU(VAR)3-9 H3K9 metyltransferázou *Drosophily*. Předpokládá se tedy, že SUVH proteiny (resp. ty s funkční SET doménou) zajišťují H3K9 metylaci, i když H3K9 metyltransferázová aktivita byla zatím doložena jen u některých z nich. SUVH proteiny obsahují také SRA doménu, která slouží k vazbě na metylované cytosiny, což ukazuje na propojenost histonových modifikací a metylace DNA. Dobře popsáním příkladem je již zmiňovaná SUVH4/KYP (KRYPTONITE), která se váže především na metylované CHH a CHG sekvence, čímž zde udržuje úroveň H3K9me2 (Johnson et al. 2007; Jackson et al. 2002). Stejná schopnost byla prokázána také u SUVH6 (Johnson et al. 2007; Jackson et al. 2004). Methyltransferázová aktivita byla naopak vyloučena

u SUVH2 a SUVH9, u kterých lze vliv na hladinu metylace DNA a H3K9me2 přiřítat jejich úloze při navádění Pol V na cílové lokusy (Johnson et al. 2014; Johnson et al. 2008).

Další skupinou předpokládaných H3K9 metyltransferáz představují SUVR (SU(VAR)3-9 RELATED) proteiny, které postrádají SRA doménu, ale naproti tomu byla u SUVR1, SUVR2 a SUVR4 popsána N-koncová doména WIYLD, která *in vitro* váže ubikvitin (Rahman et al. 2014). V případě SUVR4 bylo navíc zjištěno, že přes WIYLD doménu dokáže interagovat i s monoubikvitinovaným histonem H2B *in vitro* a vazba ubikvitinu zvýšila její H3K9 metyltransferázovou aktivitu (Veiseth et al. 2011). Role SUVR proteinů sice stále není zcela jasná, ale v souvislosti s RdDM byla zjištěna úloha proteinu SUVR2, jehož mutace má patrný vliv na metylaci DNA, ale u kterého nebyla potvrzena metyltransferázová aktivita *in vitro* (Stroud et al. 2013; Thorstensen et al. 2006). SUVR2 fyzicky interaguje s FRG1 (SNF2-RING-HELICASE-LIKE1), který patří do stejné rodiny proteinů jako CLASSY1 a DRD1, tedy je příbuzný helikáze podobným SWI2/SNF2 ATP-dependentním chromatin remodelujícím proteinům, a spolu s redundantním FRG2 je zřejmě zapojen do té části dráhy RdDM, kde se účastní Pol V a kde dochází k metylaci DNA, protože dvojití mutanti *frg1frg2* mají negativní vliv na metylaci DNA a produkci 24nt siRNA z klastrů, u kterých je produkce siRNA z části závislá i na Pol V (Groth et al. 2014). FRG proteiny také obsahují RING doménu typickou pro E3 ubikvitin ligázy. Groth et al. tedy spekulují, že by se mohlo jednat o ubikvitin ligázu. Na druhou stranu ale ubikvitinace H2B podporuje navození H3K4 metylace, která je spojena s transkripčně aktivním chromatinem a působí proti H3K9 metylaci. V souladu s tím je i zjištění, že deubikvitináza UBP26 je potřebná pro udržení H3K9me2 a transkripčního umlčení zprostředkovaného RdDM na TE (Sridhar et al. 2007). Interakce mezi H3K9 metylací a ubikvitinací bude tedy zřejmě složitější, než se doposud předpokládalo.

Antagonisticky vůči aktivitě histonových metyltransferáz působí histonové demetylázy. Rozsáhlou skupinu těchto demetyláz tvoří tzv. JumonjiC (JmjC) proteiny popsané u řady eukaryot obsahující JumonjiC doménu nutnou pro oxidativní demetylacii a vyžadující jako kofaktor Fe(II) a α -ketoglutarát (Tsukada et al. 2006). Jen u *Arabidopsis* bylo nalezeno 21 aktivně přepisovaných genů kódujících proteiny s touto doménou (Lu et al. 2008).

Mezi JmjC proteiny patří také JMJ14 (JUMONJI 14), H3K4 demetyláza, která zajišťuje především demetylacii H3K4me3 a jejíž mutace vede k poklesu metylace DNA na lokusech retrotranspozonů podobné jako u mutace Pol IV. Zajímavé je, že hladiny endogenních siRNA nejsou v mutantech *jmj14* ovlivněny, ale dochází k poklesu siRNA ze sekvence transgenu, což naznačuje odlišný systém regulace tvorby siRNA z transgenních lokusů (Searle et al. 2010). Mutace *jmj14* má negativní vliv na metylaci DNA zajišťovanou DRM2/1, ale zdá se, že JMJ14

se účastní pouze jejího udržení, protože mutace *jmj14* nevede k derepresi *FWA* lokusu jako u jiných mutantů dráhy RdDM (Deleris et al. 2010). Zajímavý je také vliv JMJ14 na PTGS transgenu. Mutace *jmj14* v tomto případě způsobuje potlačení PTGS vlivem snížení exprese transgenu, která je zřejmě důsledkem poklesu acetylace a vzrůstu metylace DNA v oblasti promotru v těchto mutantech. Je zarážející, že mutace v demetyláze H3K4 nevyvolává přesně opačný efekt, a dokonce vede k poklesu H3K4me3 v oblasti promotoru transgenu, přestože u endogenních lokusů má mutace *jmj14* očekávaný efekt nárůstu H3K4me2 a H3K4me3 (Le Masson et al. 2012). Na tomto příkladu se opět ukazuje odlišnost regulace umlčování endogenních a transgenních lokusů, na jejichž regulaci se zřejmě účastní více histonových demetyláz v závislosti na dalších epigenetických modifikacích.

Spolu s JMJ14 operují další částečně redundantní H3K4 demetylázy LDL1 a LDL2 (LYSINE-SPECIFIC DEMETHYLASE 1-LIKE). Teprve na základě dat získaných z trojných mutantů v těchto proteinech bylo zjištěno, že tyto demetylázy jsou zapojeny do dráhy RdDM jen na určitých lokusech, kde mají vliv na metylaci DNA a produkci siRNA. Tato místa se nacházejí většinou blíže oblastem kódujícím proteiny. Zdá se tedy, že úlohou těchto demetyláz je udržovat RdDM v místech, která jsou v blízkosti transkripčně aktivních oblastí charakteristických právě H3K4 metylací. SHH1 nejenže se váže na metylované H3K9, ale tato interakce je blokována H3K4 metylací, JMJ14 spolu s LDL1/2 by tedy mohly umožňovat vazbu SHH1 a přes něj rekrutování Pol IV (Greenberg et al. 2013).

Další histonovou demetylázou z rodiny JmjC proteinů je H3K9 demetyláza IBM1 (Miura et al. 2009). Exprese funkčního proteinu IBM1 je závislá na CG a CHG metylaci v oblasti neobvykle dlouhého intronu, jehož absence je nutná pro správnou funkci JmjC domény. CG metylace je v tomto případě zajišťována MET1 a CHG prostřednictvím CMT3 v návaznosti na KYP/SUVH4. Pokud dojde k poklesu nebo ztrátě metylace DNA v této oblasti, dojde k výraznému poklesu množství funkčního transkriptu *IBM1* (Rigal et al. 2012). V mutantech *met1*, kteří jsou mimo jiné charakterističtí ztrátou H3K9 metylace z oblastí heterochromatinu a naopak její relokací do oblastí uvnitř genů (Tariq et al. 2003; Soppe et al. 2002; Mathieu et al. 2007), tedy dochází k této ektopické lokalizaci H3K9 metylace zřejmě právě v důsledku nedostatečné exprese funkčního IBM1 (Rigal et al. 2012). Tomu odpovídá i zjištění, že mutace *ibm1* vede ke vzrůstu H3K9 metylace a CHG metylace podobně jako mutace *met1*. IBM1 reguluje hladiny H3K9 metylace především v genových oblastech, nikoliv v sekvencích TE (Rigal et al. 2012; Inagaki et al. 2010). Mimo jiné se podílí na regulaci exprese DNA demetyláz *ROS1* a *DME (DEMETER)*, jejichž exprese je také ztracena v *met1* mutantech (Rigal et al. 2012; Mathieu et al. 2007). Potvrzuje se tedy představa, že CG metylace do určité míry řídí

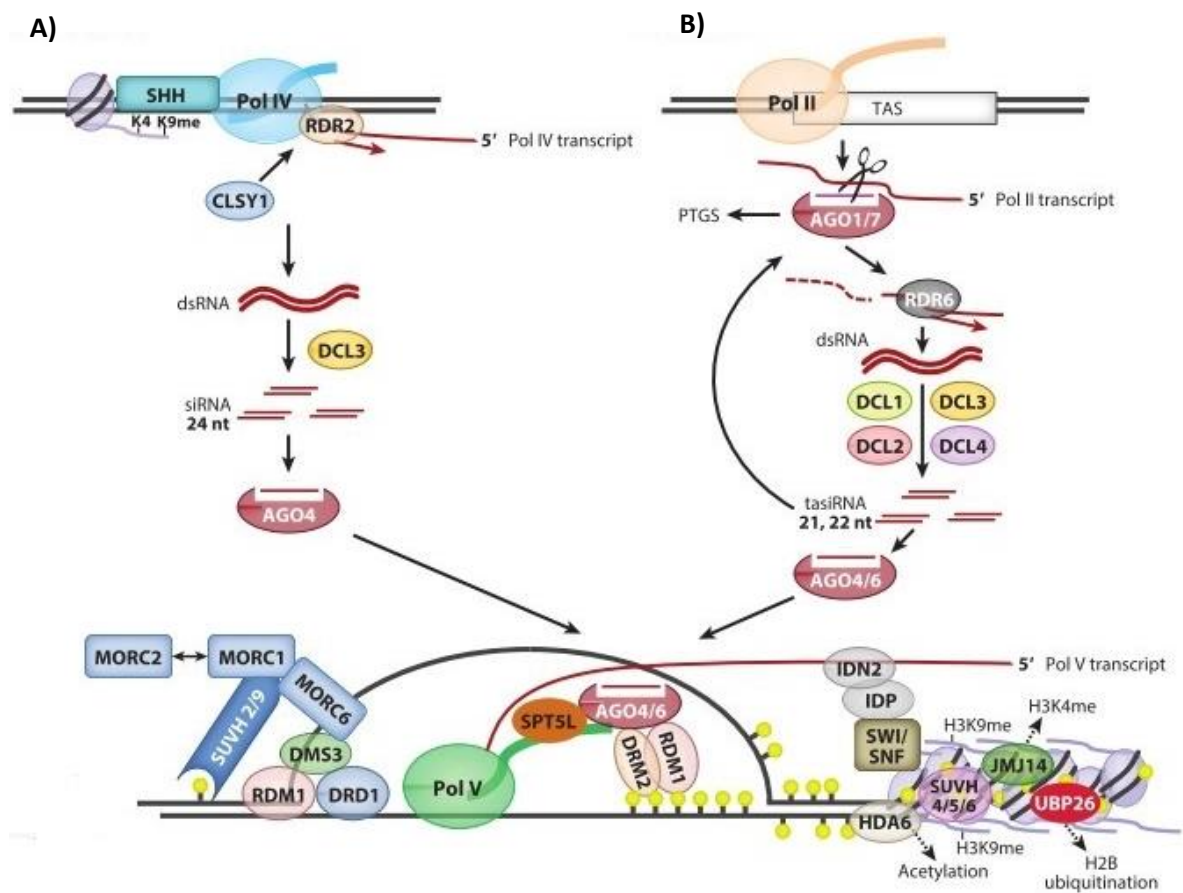
celkovou míru a distribuci metylace DNA a modifikací histonů přes regulaci exprese DNA demethyláz a H3K9 metylace na řadě míst genomu *Arabidopsis thaliana* (Rigal et al. 2012). IBM1 také pozitivně ovlivňuje expresi *DCL3* a *RDR2*, čímž se může nepřímo podílet naopak na umlčování některých lokusů přes dráhu RdDM (Fan et al. 2012).

Obr. 2.1: Schéma drah RdDM; převzato z Matzke, Kanno, and Matzke 2014.

A) Klasická dráha biogeneze hc-siRNA závislá na Pol IV.

B) Dráha RDR6-RdDM, kde siRNA vznikají z transkriptů Pol II (transkripty některých TAS genů nebo reaktivovaných/ nově vložených transpozonů).

HDA6 = histone deacetylase 6 (histonová deacetyláza přispívající k vytvoření heterochromatinu); IDP = IDN2 paralog (tvoří komplex s IDN2); ostatní proteiny jsou popsány výše v textu.



3 Metodika a materiál

3.1 Biologický materiál a jeho kultivace

3.1.1 *Escherichia coli*

Ke klonování plazmidů byl použit bakteriální kmen *Escherichia coli* JM109.

Kultivace *E. coli* např. po vysetí po elektroporaci probíhala na pevném LB médiu (cca 20 – 25 ml na 1 Petriho misku o průměru 9 cm) s přidavkem příslušného antibiotika při 37°C do druhého dne.

Kultivace *E. coli* většinou za účelem izolace plazmidu probíhala aerobně za stálého třepání (180 rpm, vyhřívaná třepačka Ceromat® H Biotech International) v tekutém LB médiu (3 ml na zkumavku) s přidavkem příslušného antibiotika při 37°C přes noc (cca 16 – 18 hod.).

Vybrané bakteriální klony byly pro dlouhodobé skladování zmrazeny v tekutém dusíku po přidavku 200 µl 50% sterilního glycerolu k 800 µl bakteriální suspenze. Následně byly skladovány v - 80 °C.

Tabulka 3.1: LB médium

Médium bylo sterilizováno klávoáním.

složky	g/l
pepton (tripepton)	10
kvasničný extrakt	5
NaCl	10
agar (pro pevné LB médium)	17,5
destilovaná voda	doplnění do 1 l

Tabulka 3.2: Použitá antibiotika pro selekci bakterií

Antibiotika	Koncentrace zásobního roztoku [mg/ml]	Koncentrace v médiu [mg/l]	Teplota skladování; rozpouštědlo
kanamycin	50	50	4 °C; dH ₂ O
spektrinomycin	100	100	-20 °C; dH ₂ O
rifampicin	10	100	-20 °C; metanol

Zásobní roztoky kanamycinu a spektrinomycinu byly sterilizovány filtrací přes 0,22 µm sterilními filtry Nalgene.

3.1.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Bakteriální kmen *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 Rif^R byl používán k transformaci buněčné linie tabáku BY-2. Pro bližší charakteristiku tohoto bakteriálního kmene viz Deblaere et al. 1985.

Kultivace *A. tumefaciens* např. po vysetí po elektroporaci probíhala na pevném LB médiu (cca 20 – 25 ml na Petriho misku o průměru 9 cm) vždy s přidavkem rifampicinu a příslušného antibiotika při 28 °C po dobu 3 dnů.

Kultivace *A. tumefaciens* za účelem pomnožení pro následnou kokultivaci s BY-2 probíhala aerobně za stálého třepání (180 rpm, vyhřívaná třepačka Ceromat® H Biotech International) v tekutém YEB médiu (10 ml na Erlenmayerovu baňku) s přidavkem rifampicinu a příslušného antibiotika při 28 °C přes noc (cca 18 - 20 hod.).

Vybrané bakteriální klony byly pro dlouhodobé skladování zmrazeny v tekutém dusíku po přidavku 200 µl 50% sterilního glycerolu k 800 µl bakteriální suspenze. Následně byly skladovány v - 80 °C.

Tabulka 3.3: YEB médium (tekuté)

složky	g/l
pepton (tripepton)	10
kvasničný extrakt	1
sacharóza	5
MgSO ₄	0,5

Médium bylo sterilizováno klávováním. Roztok MgSO₄ byl klávován samostatně (kvůli zabránění vzniku sraženiny) a před použitím byl do YEB média doplněn v takovém objemu, aby se dosáhlo požadované koncentrace.

3.1.3 Buněčná linie tabáku BY-2 (*Nicotiana tabacum* L., cv. „Bright Yellow 2“)

Buněčná linie tabáku BY-2 (dále jen BY-2) sloužila jako hlavní rostlinný studijní materiál. Jedná se o *in vitro* pěstovanou rostlinnou buněčnou kulturu, která byla odvozena ze semenáčků kultivaru *Nicotiana tabacum* L., cv. „Bright Yellow 2“. Bližší informace o této buněčné linii jsou obsaženy v práci Nagata et al. 1992.

Pro experimentální účely byla kultura BY-2 pěstována ve formě suspenzí v tekutém médiu nebo ve formě tzv. kalusů (makroskopické shluky řetízků buněk pěstovaných na pevném médiu). V obou případech probíhala kultivace při 26 °C ve tmě a za sterilních podmínek na MS médiu (Murashige and Skoog 1962; viz tabulka 3.4)

Kalusy byly pěstovány v plastových Petriho miskách o průměru 6 cm s 10 – 15 ml pevného MS média a případným přidavkem příslušných antibiotik (viz tabulku 3.5) většinou po 7 kalusech na misku. Malé Petriho misky byly vždy vloženy do větší skleněné misky, aby se snížil výpar. Subkultivační interval se pohyboval kolem 4 týdnů, po kterých byla vždy malá část starého kalusu přenesena na misku s novým médiem. Veškeré přesazování kalusů probíhalo v laminárním flow-boxu.

Suspenzní kultury byly kultivovány ve 100ml Erlenmayerových baňkách s 30 ml tekutého MS média překrytých dvěma vrstvami alobalu za stálého třepání na orbitálních třepáčkách IKA KS501 (frekvence přibližně 110 rpm). Subkultivační interval trval většinou 7 dnů, s výjimkou kultivace suspenzí za účelem měření poklesu fluorescence pomocí průtokové cytometrie, v tom případě se pohyboval v rozmezí 4-5 dní. Čerstvé médium bylo zaočkováno 1 ml týdenní suspenzní kultury. Výjimku opět činily suspenze kultivované za účelem měření fluorescence na průtokovém cytomeru, kdy se inokulum pohybovalo mezi 1,5 až 3 ml.

Suspenzní kultury byly odvozeny z kalusů. Mladý kalus byl přenesen do baňky s tekutým MS médiem a v něm rozvolněn na jednotlivé buňky či menší shluky buněk pomocí 10ml pipety s ustřiženou špičkou.

Tabulka 3.4: MS médium

složky	koncentrace
MS soli - komerční směs (Sigma-Aldrich)	4,33 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l
myo-inositol	0,1 g/l
sacharóza	30 g/l
zásobní roztok 2,4-D (2 mg/ml)	0,1 ml/l
zásobní roztok vitamínu B1 (10 mg/ml)	0,1 ml/l
agar (pevné)	8 g/l

2,4-D byla rozpouštěna v 1M KOH a následně doplněna horkou vodou na požadovanou koncentraci. Zásobní roztoky 2,4-D a vitamínu B1 (thyamin-hydrochlorid) byly skladovány při 4 °C.

Před přidáním agarů (pokud se přidával) bylo pH upraveno pomocí KOH na 5,8.

Po přidání agarů bylo médium povařeno, dokud se agar nerozpustil.

Výsledný roztok byl sterilizován klávováním.

Tabulka 3.5: Použitá antibiotika pro selekci BY-2

antibiotikum	Koncentrace zásob. roztoku [mg/ml]	Koncentrace v médiu [mg/l]	Teplota skladování
kanamycin	50	50	4 °C
hygromycin	25	25	-20 °C
taxcef (klaforan)	100	100	-20 °C

3.2 Transformace biologického materiálu

3.2.1 Příprava elektrokompetentních bakterií *E. coli*

Bakterie *E. coli* (JM109) byly rozčárkovány na plotny s LB médiem (bez antibiotik) a kultivovány při 37 °C do druhého dne. Následně byly zaočkovány 1-3 samostatné kolonie do 50 ml tekutého LB média ve dvou sterilních Erlenmayerových baňkách a kultivovány přes noc při 37 °C na třepačce. Asi 10 ml narostlé suspenze bylo zaočkováno do 400 ml tekutého LB média ve 2l Erlenmayerově baňce a kultivováno opět na třepačce při 37 °C do optické denzity 0,4 při $\lambda = 600$ nm. Po dosažení požadované OD byla baňka s bakteriemi přenesena okamžitě na led na 15 – 30 min. za občasného míchání. Bakteriální suspenze byla rozlita do vychlazených centrifugačních zkumavek (50 ml typ Falcon) a centrifugována při 4 °C při 4000 rpm 10 min. (centrifuga Universal 32 R Hettich).

Supernatant byl slit a resuspendován 10ml pipetou s ustríženou špičkou v 6 ml sterilní vychlazené destilované vody. Následně byl přenesen do nové centrifugační zkumavky a uschováván na ledu. Zbytek bakteriální suspenze byl opět centrifugován za stejných podmínek, supernatant byl slit a sediment opět resuspendován. Poté bylo do každé zkumavky přidáno 34 ml sterilní vychlazené dH₂O a 6 ml zahuštěné bakteriální suspenze z předešlého kroku. Celkový objem 40 ml v každé zkumavce byl opět centrifugován, supernatant odstraněn

a sediment resuspendován ve 25 ml vychlazeného sterilního 10% glycerolu. Po opětovné centrifugaci byl supernatant odstraněn a sediment resuspendován v 1 ml sterilního 10% glycerolu a soustředěn do 1 zkumavky, která byla centrifugována a supernatant pečlivě odstraněn pomocí vývěvy. Pelet byl pak resuspendován v 800 μ l sterilního vychlazeného GYT média (tabulka). Z výsledné suspenze bylo odpipetováno 10 μ l do 1 ml (100x zředěná suspenze) a změřena její OD při 600 nm. Poté byla bakteriální suspenze naředěna na základě změřené OD tak, aby se její koncentrace pohybovala mezi 2×10^{10} a 3×10^{10} buněk/ml podle předpokladu, že 1,0 OD₆₀₀ odpovídá $2,5 \cdot 10^8$ buněk/ml. Nakonec byla chlazená suspenze rozpipetována po 40 μ l do sterilních 1,5ml mikrozkuvek, které byly ihned zmrazeny v tekutém dusíku a uchovávány při -80 °C.

Tabulka 3.6: GYT médium

složka	Množství pro výsledný objem 10 ml
glycerol	1 ml
kvasničný extrakt	12,5 mg
trypton (pepton)	25 mg
dH ₂ O	doplněna do 10 ml

GYT médium bylo následně sterilizováno přes 0,22 μ m filtr Nalgene, skladováno při 4 °C po 2,5 ml

3.2.2 Příprava elektrokompetentních bakterií *A. tumefaciens*

Příprava elektrokompetentních bakterií *A. tumefaciens* probíhala obdobně jako u *E. coli*. Bakterie *A. tumefaciens* byly rozčárkovány na plotny s LB médiem a rifampicinem a kultivovány při 28 °C 3 dny. Následně byly zaočkovány 1-3 samostatné kolonie do 10 ml tekutého LB média ve dvou sterilních Erlenmayerových baňkách a kultivovány přes noc při 28 °C na třepačce. Asi 4 ml narostlé suspenze bylo zaočkováno do 200 ml tekutého LB média v 1l Erlenmayerově baňce a kultivováno na třepačce při 28 °C do optické denzity 0,6 při $\lambda = 600$ nm. Po dosažení požadované OD byla baňka s bakteriemi přenesena okamžitě na led na 15 – 30 min. za občasného míchání. Bakteriální suspenze byla rozlita do vychlazených centrifugačních zkumavek (50 ml typ Falcon) a centrifugována při 4 °C při 4000 rpm 10 min. (centrifuga Universal 32 R Hettich). Supernatant byl vylit a sediment resuspendován v 25 ml

sterilní vychlazené destilované vody vždy 10 ml pipetou s ustřiženou špičkou a opět centrifugován za stejných podmínek. Supernatant byl opět odstraněn a peleta resuspendována v cca 10 ml dH₂O. Obsah vždy dvou zkumavek byl slit a doplněn dH₂O do 25 ml. Následovala opět centrifugace, po které byl supernatant odpipetován a sediment doplněn 2 ml 10% sterilního vychlazeného glycerolu, ve kterém byl resuspendován. Poté byl obsah všech zkumavek slit do jedné a centrifugován. Suspenze byla resuspendována v 1 ml 10% glycerolu a na ledu rozpipetována po 100 µl do sterilních 1,5ml mikrozkušavek, které byly ihned zmrazeny v tekutém dusíku a uchovávány při –80 °C.

3.2.3 Transformace *E. coli* a *A. tumefaciens*

k elektrokompetentním buňkám na ledu v 1,5ml mikrozkušavce bylo přidáno 1 -3 µl plazmidové DNA. Po uplynutí 1 minuty byl obsah mikrozkušavky přenesen do vychlazené elektroporační kyvety. Ta byla ihned vložena do elektroporátoru (Bio-Rad Gene Pulser Apparatus), který byl nastaven na hodnoty 2500 v pro *E. coli* (resp. 2000 v pro *A. tumefaciens*), 25 µF, a 200 Ω. Po aplikaci pulzu byl do kyvety okamžitě přidán 1 ml SOC média pro *E. coli* (resp. YEB recovery média pro *A. tumefaciens*). Bakterie byly následně kultivovány ve zkumavce na třepačce u *E. coli* při 37 °C 1 hod. (u *A. tumefaciens* při 28 °C 3 hod.). Poté byly bakterie *E. coli* za sterilních podmínek rozetřeny bakteriologickou hokejkou vždy po 50 µl a 950 µl (ty byly nejdříve zakoncentrovány centrifugací 5000 g 30 s a resuspendovány ve 100 µl média) na 2 Petriho misky s LB médiem a příslušnými antibiotiky. V případě *A. tumefaciens* byl vyset objem 100 µl bakteriální suspenze a na druhou Petriho misku jen rozetřeny zbytky suspenze, která utkvěla na hokejce z roztěru na předchozí misku. Na pevném médiu byla *E. coli* kultivována při 37 °C do druhého dne, *A. tumefaciens* při 28 °C 3 dny.

Tabulka 3.7: SOC médium

složky	g/100 ml
pepton	2
kvasničný extrakt	0,5
glukóza	0,36
MgSO ₄	0,12
MgCl ₂	0,95
KCl	0,019
NaCl	0,058
dH ₂ O	doplněna do 100 ml

Tabulka 3.8: YEB recovery médium

složky	g/100 ml
pepton	1
kvasničný extrakt	0,1
sacharóza	0,5
MgSO ₄	0,05
MgCl ₂	0,095
KCl	0,019
NaCl	0,058
dH ₂ O	doplněna do 100 ml

SOC médium a YEB recovery médium a byla sterilizována jednorázovými 0,22 µm filtry Nalgene a skladována při 4 °C nebo pro dlouhodobé skladování při -20 °C.

3.2.4 Transformace buněčné linie tabáku BY-2

Veškerá práce probíhala sterilně v laminárním flow-boxu. Tři dny stará buněčná suspenze BY-2 (30 ml buněčné suspenze na 1 variantu) byla přefiltrována vyklávaným filtračním zařízením Nalgene (11 µm) a přenesena do 30 ml nového MS média a resuspendována v něm zamícháním. K suspenzi bylo přidáno 30 µl acetosyringonu (20 mM zásobní roztok, skladován v -20 °C). Buňky BY-2 byly následně poraněny několikanásobným protažením 10ml pipetou s neustříženou špičkou. 2 x 1,5 ml suspenze BY-2 bylo odpipetováno do plastové Petriho misky (průměr 6 cm) jako negativní kontrola. Ke zbylé suspenzi byly následně přidány 3 ml suspenze *A. tumefaciens* transformovaným požadovaným plazmidem, která byla zaočkována předchozího dne do YEB média s příslušnými antibiotiky (viz tabulku 3.2). V případě kotransformace, kdy byly do BY-2 vnášeny dva konstrukty najednou, bylo přidáno vždy 1,5 ml bakteriální suspenze od každé varianty. Poté byla směsná suspenze opět několikrát protažena pipetou s neustříženou špičkou a rozpipetována po 1,5 ml do plastových Petriho misek (průměr 6 cm), které byly umístěny do velké skleněné Petriho misky vysterilizované etanolem spolu s kouskem sterilní navlhčené gázy.

Následovala tzv. kokultivace buněk BY-2 s *A. tumefaciens* po dobu 3 dnů za tmy v 26 °C.

Po uplynutí této doby byly narostlé buňky resuspendovány v cca 8 -10 ml vyklávané 3% sacharózy a přeneseny do filtračního zařízení Nalgene, kde byly promyty 2 x 150 ml 3% sacharózy a 100 ml tekutého MS média s přidáním klaforanem (100 mg/l) pro odfiltrování

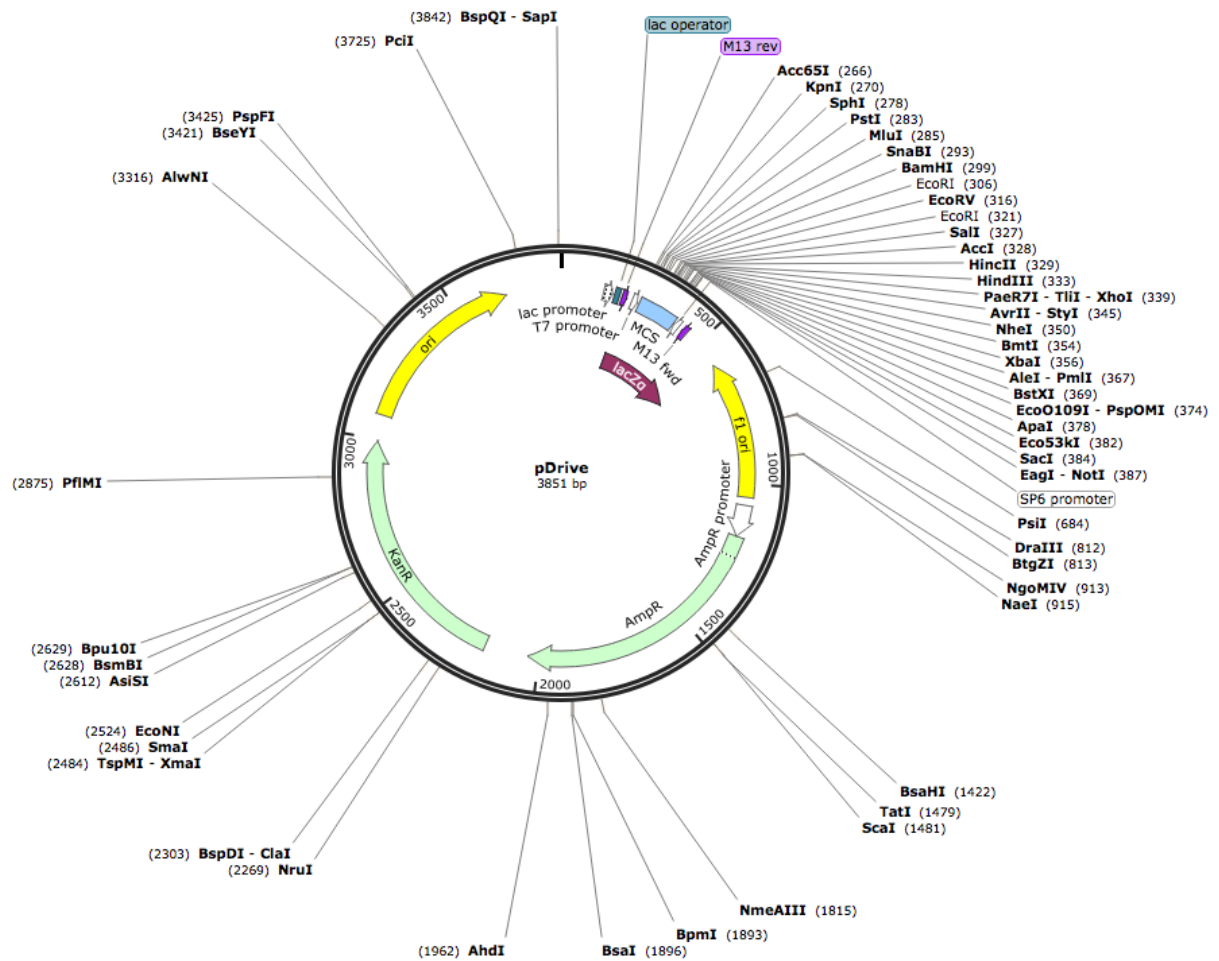
A. tumefaciens. Buňky BY-2 byly dále přeneseny do malé Petriho misky a opatrně resuspendovány ve 2 – 3 ml MS média s klaforanem. Následně byla hutná suspenze rozpipetována po 600 - 800 μ l na malé Petriho misky s 10 – 15 ml pevného MS média obsahujícím klaforan a příslušná selekční antibiotika (tabulka 3.5). Negativní kontrola nebyla promývána vůbec, pouze byla resuspendována v malém objemu MS média a rozlita na dvě Petriho misky s pevným MS médiem a antibiotiky.

Malé Petriho misky byly vloženy do velké skleněné Petriho misky s kouskem sterilní gázy polité sterilní destilovanou vodou a kultivovány přibližně 3-4 týdny při teplotě 26 °C dokud se neregenerovaly mladé kalusy, které byly po dosažení velikosti přibližně 2 – 8 mm přesazeny na nové MS médium se stejnými antibiotiky.

3.3 Plazmidy

3.3.1 *pDrive*

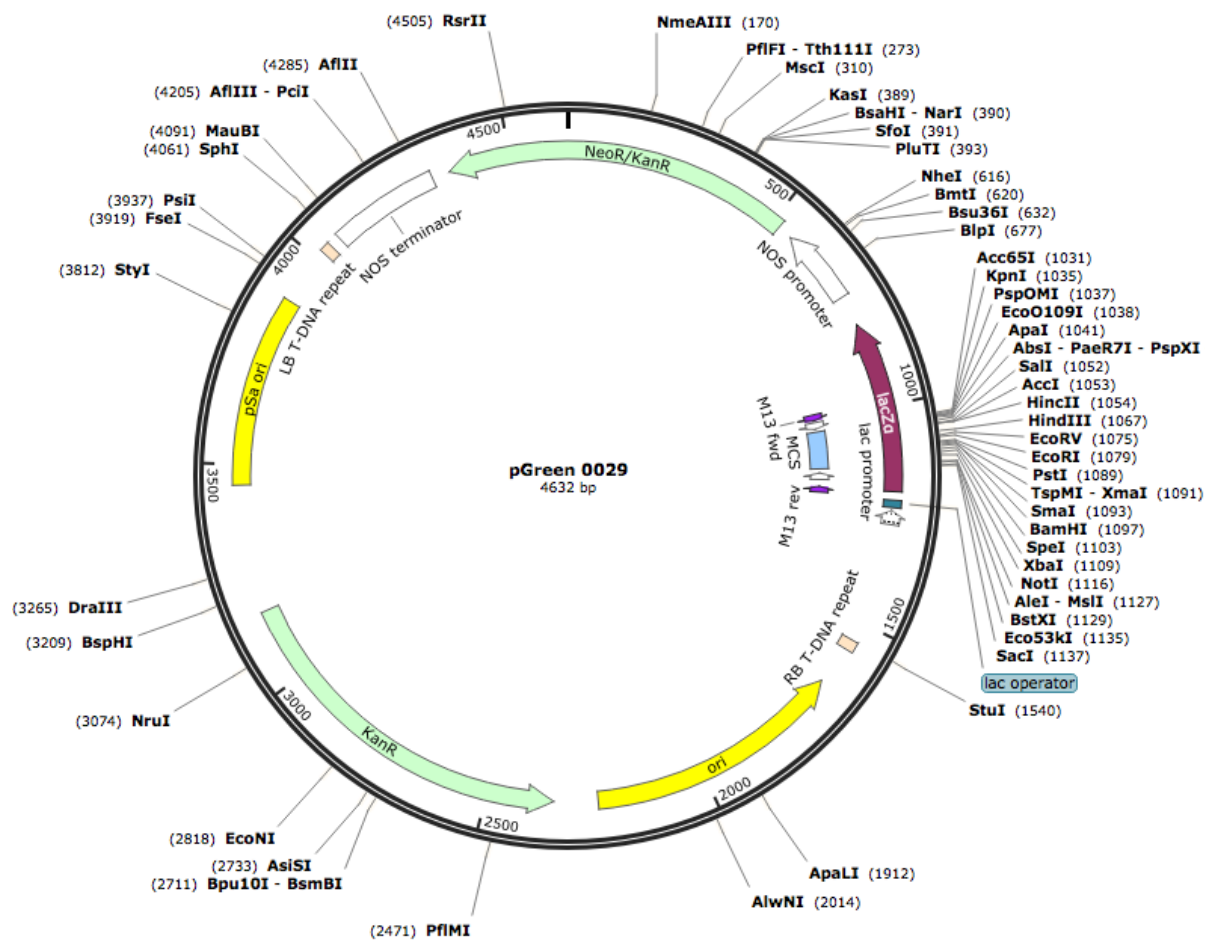
Plazmid *pDrive* (3 851 bp) byl použit pro TA-klonování PCR fragmentů (QIAGEN PCR cloning kit), pro jejich amplifikaci v bakteriích a další práci s nimi při tvorbě *35S-IR* konstruktů. *pDrive* obsahuje mnohočetné klonovací místo (MCS), které je součástí reportérového genu *LacZ α* . Dále vektor *pDrive* obsahuje geny kanamycinové a ampicilinové rezistence (*KanR* a *AmpR*) pro selekci bakterií. Na okraje MCS nasedají primery M13 (viz tabulku 3.12), které byly využity pro sekvenaci.



Obr. 3.1: Mapa plazmidu *pDrive*, zdroj: www.snapgene.com

3.3.2 *pGreen 0029, 0129, pSoup*

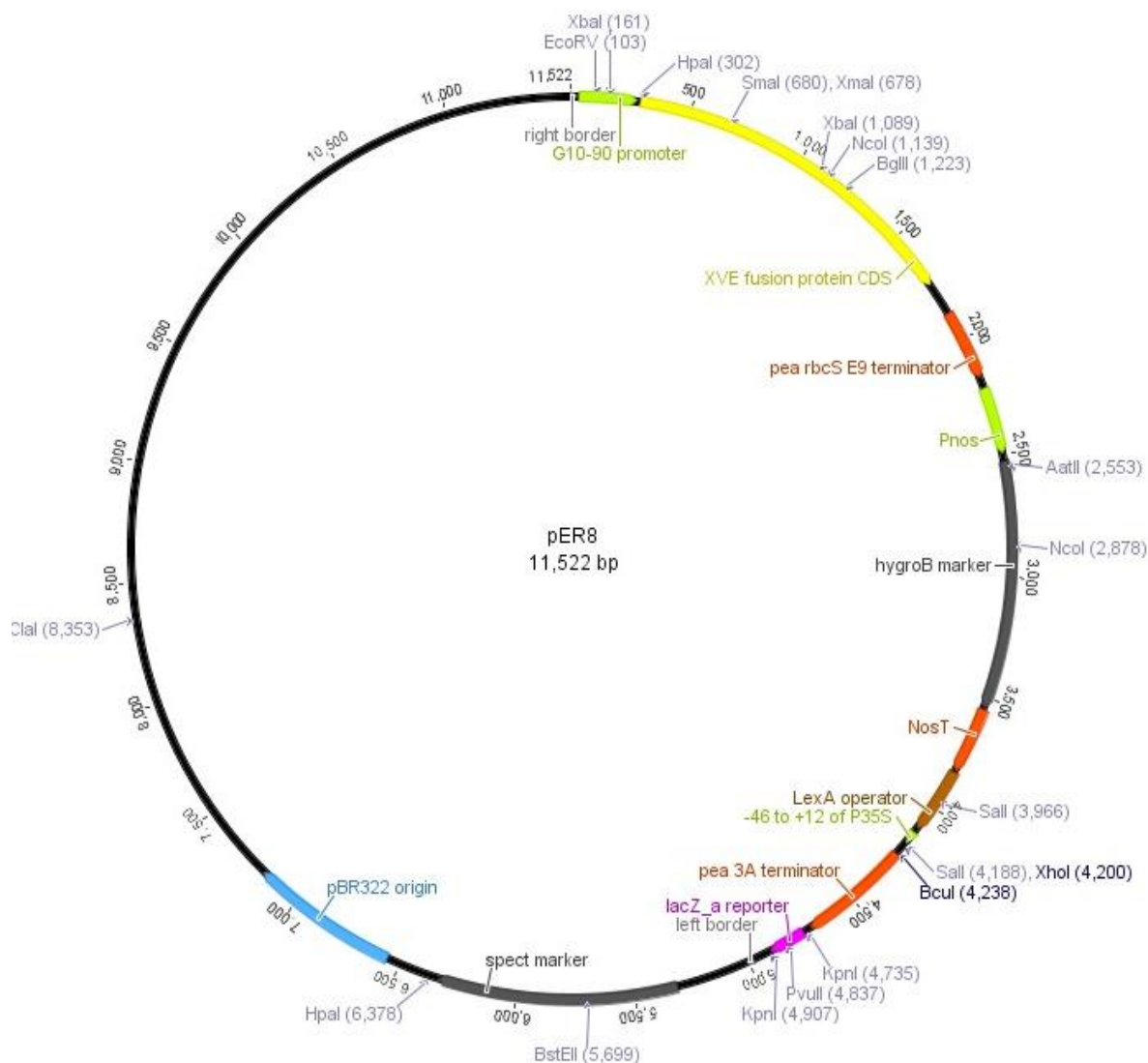
Plazmidy *pGreen* jsou binární Ti vektory, které umožňují pomnožení v *E. coli* i ve druhích *Agrobacterium*. Pro jeho replikaci v *Agrobacteriu* je však nezbytný pomocný vektor *pSoup* kódující funkce nutné pro jeho replikaci (gen pro replikázu; Hellens et al. 2000). Plazmid nese gen pro kanamycinovou rezistenci (*KanR*) pro selekci v bakteriích a kanamycinovou (*pGreen0029*) nebo hygromycinovou rezistenci (*pGreen0129*) pro selekci v rostlinách. V bakteriích je možná také tzv. modro-bílá selekce díky produktu *lacZ α* genu, do kterého je vloženo mnohočetné klonovací místo (MCS). Na obrázku 3.2 zkratka LB značí levou (left border) a RB pravou hraniční oblast (right border) T-DNA přenášené *Agrobacteriem* do rostlinného genomu. *pSa ori* je místo začátku replikace pro *Agrobacterium*.



Obr. 3.2: Mapa plazmidu *pGreen 0029*, zdroj: www.snapgene.com

3.3.3 *pER8*

Plazmid *pER8* je binární vektor, který obsahuje gen spektromycinové rezistence pro selekci v bakteriích (*E. coli*, *Agrobacterium*) a gen hygromycinové rezistence (*HygroB*) pro selekci v rostlinách. Sekvence zájmu je exprimována pod fúzním promotorem tvořeným 8 kopiemi *LexA* operátoru a minimálním -46 35S promotorem. Tento fúzní promotor je inducibilní; jeho exprese je aktivována prostřednictvím chimérického aktivátoru transkripce XVE, který je konstitutivně exprimován pod *G10-90* promotorem a jehož částí je regulační oblast lidského estrogenového receptoru. K aktivaci exprese cílové sekvence tedy dojde pouze v přítomnosti β -estrogenu, který se naváže na XVE fúzní protein (Zuo et al. 2000).



Obr. 3.3: Mapa plazmidu *pER8*. Vytvořeno v programu Geneious Mgr. Vojtěchem Čermákem.

3.3.4 *pCP60 RS-GFP*

Binární vektor *pCP60 RS-GFP* byl odvozen z plazmidů *pCP60* a *psmRS-GFP* (Nocarova & Fischer 2009) a pro účely této práce byl poskytnut Mgr. Dimitrijem Tyčem jako zdroj *35S:GFP*, sloužící jako reportérový protein. Podobně jako jiné Ti vektory obsahuje MCS, levou a pravou hraniční oblast (left border, right border) pro přenos prostřednictvím *A. tumefaciens*. Dále obsahuje geny kanamycinové rezistence v bakteriích (*NPT III*) i rostlinách (*NPT II*).

3.3.5 *psmRS-GFP*

Vektor *psmRS-GFP* je malý plazmid nesoucí *35S:RS-GFP* a gen kanamycinové rezistence. Selektce je možná také prostřednictvím *LacZa*. Tento plazmid byl použit pouze jako zdroj

sekvence 35S promotoru pro tvorbu konstruktů 35S-IR. Je také původním zdrojem genu *RS-GFP* nacházejícího se v ostatních zde použitých plazmidech (Davis & Vierstra 1998).

Tabulka 3.9: Přehled použitých konstruktů

název	konečný vektor	bakteriální rezistence	rostlinná rezistence	popis
<i>AtRDR6</i>	<i>pGreen</i>	kanamycinová	kanamycinová	Gen <i>AtRDR6</i> , 35S promotor
<i>RDR6-IR</i>	<i>pGreen</i>	kanamycinová	kanamycinová	Vlásenka proti <i>NtRDR6</i> , 35S promotor
<i>GFP-AS</i>	<i>pER8</i>	spektrinomycinová	hygromycinová	<i>RS-GFP</i> v antisense orientaci, inducibilní promotor
<i>GFP-BT</i>	<i>pER8</i>	spektrinomycinová	hygromycinová	Gen <i>RS-GFP</i> bez sekvence terminátoru, inducibilní promotor
<i>GFP-IR</i>	<i>pER8</i>	spektrinomycinová	hygromycinová	Vlásenka proti <i>GFP</i> , inducibilní promotor
<i>35S-IR</i>	<i>pER8</i>	spektrinomycinová	hygromycinová	Vlásenka proti 35S promotoru, inducibilní promotor
<i>GFP-mCherryH⁺</i>	<i>pGreen</i>	kanamycinová	hygromycinová	Geny <i>RS-GFP</i> a <i>mCherry</i> , 35S promotor
<i>GFP-mCherryH</i>	<i>pGreen</i>	kanamycinová	-	Geny <i>RS-GFP</i> a <i>mCherry</i> , 35S promotor
<i>GFP</i>	<i>pCP60</i>	kanamycinová	kanamycinová	Gen <i>RS-GFP</i> , 35S promotor

Konstrukty *GFP-mCherryH⁺* a *GFP-mCherryH* byly použity pouze za účelem detekce fluorescence GFP, nikoliv červeného fluorescenčního proteinu mCherry.

3.4 Práce s DNA

3.4.1 Izolace plazmidové DNA z *E. coli*

Plazmidová DNA byla izolována z bakteriální suspenze narostlé přes noc ve 3 ml tekutého LB média s příslušnými antibiotiky. Izolace byla prováděna komerčním kitem Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System firmy Promega nebo kitem High-Speed Plasmid Mini Kit PD100/PD300 od firmy Geneaid. Postup byl vždy totožný s protokolem výrobce.

3.4.2 PCR (*Polymerase chain reaction*)

Polymerázová řetězová reakce (*Polymerase chain reaction*, PCR) je metoda amplifikace úseků DNA založená na využití termostabilní DNA-dependentní DNA polymerázy a DNA primerů, což jsou krátké úseky DNA komplementární s okrajovými úseky sekvence DNA, která má být amplifikována. Díky střídání cyklů teplot pro denaturaci DNA molekul, nasedání primerů a pro elongaci DNA molekul od místa nasednutí primerů odchází k (ideálně) exponenciálnímu vzrůstu množství požadovaných molekul DNA.

Tabulka 3.10: Složení PCR reakční směsi

složka	Objem [μ l] na 50 μ l reakční směsi
templátová DNA *	1
10 μ M primery F (forward) + R (reverse)	1 + 1
10 \times PCR pufr	5
25 mM MgCl ₂	3
10 mM dNTPs	1
Taq polymeráza (5 u/ μ l)	1
dH ₂ O	doplněna do 50 μ l

*) v případě plazmidové DNA se koncentrace pohybovala mezi 5-10 ng/ μ l, u cDNA řádově mezi 10^{-4} až 10^{-5} ng/ μ l reakční směsi.

Tabulka 3.11: Parametry PCR

kroky	teplota [$^{\circ}$ C]	trvání	počet cyklů
počáteční denaturace	94	3 min.	1
denaturace	94	30 s	20 - 31
annealing	$T_m - 5$	30 s	
elongace	72	1 min/ 1kb	
finální extenze	72	10 min.	1

Teplota nasedání primerů (annealing) je o 5 °C nižší než jejich teplota tání (T_m). Teplota tání byla stanovena přibližně sečtením bází primeru podle vzorce: $T_m = 2(A + T) + 4(C + G)$, kde A, T, C, G jsou zkratky bází DNA, nebo pomocí online nástroje simgene.com/Primer3. V některých případech bylo třeba teplotu annealingu optimalizovat experimentálně.

Jako termostabilní DNA polymeráza byla používána v naprosté většině případů Taq polymeráza (Fermentas). Pro amplifikaci fragmentů za účelem následného zaklonování do pDrive plazmidu byla používána Dream-Taq polymeráza, která je schopna přidat dATP na 3' konci DNA, tzv. TA-klonování.

Reakce probíhaly v termocycleru MJ Research, typ PTC-200 nebo T100TM BIORAD.

Tabulka 3.12: Seznam použitých primerů

název	cílová sekvence	Použitá teplota annealingu [°C]	F/R*	sekvence
AtRDR6F-kontrola	AtRDR6	53	F	CAT TTT GCC ACA TTC TTG TC
AtRDR6-S3	AtRDR6	53	R	CTT TCT CCC AGA AGA CCT AC
NtRDR6F-kontrola	NtRDR6	60	F	CCT CAT TGG GTT GCT AGA TCAC
NtRDR6 R	NtRDR6	60	R	TCT AGA CTT GCA GCC AAA GAG TTG ATG
EF1aF	EF1a	57	F	TAC TGC ACT GTG ATT GAT GCC
EF1aR	EF1a	57	R	AGC AAA TCA TTT GCT TGA CAC C
antiGFP F	RS-GFP	57	F	CTC GAG TTA TTT GTA TAG TTC ATC CAT GCC
antiGFP R	RS-GFP	57	R	ACT AGT ATG AGT AAA GGA GAA GAA CTT TTC
MSPi_F	MSP	53	F	CTC TG CCC TTG TTG TC TCA
MSPi_R	MSP	53	R	GAA CTC CTT CAG CAT TAG CT
35S-IR1 F	35S promotor	55	F	CTC GAG CGT CAG TGG AGA TAT CAC ATC
35S-IR1 R	35S promotor	55	R	AAG CTT AGT CTC TTA CGA CTC AAT GAC
35S-IR2 F	35S promotor	55	F	GGA TCC AGT CTC TTA CGA CTC AAT GAC
35S-IR2 R	35S promotor	55	R	CTG CAG TCT AGA CGT CAG TGG AGA TAT CAC ATC
M13 fwd	-	50	F	GTA AA ACG ACGG CCA GT
M13 rev	-	50	R	AAC AGC TAT GAC CAT G

*) F/ R značí forward nebo reverse primer

3.4.3 Agarózová gelová elektroforéza

Agarózová gelová elektroforéza byla použita pro separaci molekul DNA o různých délkách nebo také pro vizualizaci množství DNA (např. U semikvantitativní RT-PCR). Tato metoda využívá skutečnosti, že molekuly DNA nesou záporný náboj, díky kterému se mohou pohybovat ve stejnosměrném elektrickém poli, ale jejich schopnost pohybu závisí na jejich délce, konformaci a hustotě zesíťování agarózového polymeru.

Používán byl 1,2% agarózový gel, který byl tvořen 1,2% agarózy v 0,5 x TAE pufru, kterému bylo po rozvaření přidáno vizualizační barvivo GelRedTM od firmy Biotium v koncentraci 10 µl/ 100 ml agarózového gelu. Po částečném schladnutí (asi na 60 °C) byl tekutý gel nalit do formy s plastovým hřebenem o požadované šířce zubů. Po utužení byl z formy vyjmut a vložen do elektroforetické vany s 0,5 x TAE pufrům. Vzorky s DNA byly před nanesením do jamek smíchány s roztokem bromfenolové modři (0,025% bromfenolová modř, 30% glycerol v 10mM Tris, pH 7,8) v poměru 5:1. Velikost napětí byla nastavena na 3 – 5V/ cm. K určení délky jednotlivých fragmentů (případně jejich koncentrace na gelu) byl použit 1kb marker GeneRulerTM (firma Fermentas).

Tabulka 3.13: Složení 50x TAE pufru pro elektroforézu

složka	množství na 1 l pufru
Tris	242 g
kyselina octová (ledová)	57,1 ml
0,5M EDTA (pH 8,0)	100 ml
dH ₂ O	doplněno do 1 l

DNA v gelech byla vizualizována prostřednictvím zařízení G:BOX s UV transluminátorem od firmy Syngene v programu GeneSnap 7.09 také od firmy Syngene. Nasnímaný obraz byl uložen jako TIF soubor. V případě potřeby stanovení koncentrace DNA z gelu byl použit program GeneTools 4.01 od firmy Syngene, který přiřadil koncentraci DNA ve vzorcích na základě jejich jasů po kalibraci pomocí markeru (standardu), u kterého byla koncentrace DNA známa. Intenzita jasů odpovídá množství DNA, protože GelRedTM, která je excitovatelná UV zářením, se interkaluje mezi báze DNA.

3.4.4 Izolace DNA z agarózového gelu

Izolace DNA z agarózového gelu byla prováděna za použití komerčního kitu QIAEX® II Gel Extraction kit podle návodu s několika rozdíly.

Z agarózového gelu byla vyříznuta co nejpřesněji část obsahující požadovaný fragment, která byla vložena do již zvážené mikrozkušavky, která byla spolu s částí gelu opět zvážená, pro stanovení přesné hmotnosti části gelu. To je nutné z důvodu následného přidání pufru QX1 (v kitu) v trojnásobném objemu (pro fragmenty v rozmezí 100 bp – 4 kbp (pro delší fragmenty se ještě přidává dvojnásobný objem dH₂O)). Následovalo přidání QIAEX II křemičitých mikrokuliček (v kitu) v množství 10 µl (při množství do 2 µg DNA), které byly předtím vortexovány 30 s. Po přidání bylo opět provedeno protřepání. Vzorek byl inkubován za stálého mírného třepání při 50 °C 10 min. Poté byl zvortexován a centrifugován 1 min. při 13 000 rpm. Supernatant byl vylit a ke vzorku přidáno 500 µl pufru QX1, ve kterém byl sediment důkladně resuspendován. Následuje další centrifugace 1 min. při 13 000 rpm a vylití supernatantu. Vzorek byl ještě 2x promyt stejným způsobem, tentokrát PE pufrem (v kitu; před prvním použitím nutno doplnit etanol). Dále byl supernatant důkladně odpipetován a sediment byl nechán přibližně 10 min, aby vyschnul, dokud pelet nezbělal. Poté bylo ke vzorku přidáno 10 µl 1mM Tris-Cl a sediment byl resuspendován vortexováním, po kterém byl inkubován 5 min. při 50 °C. Závěrem byl vzorek centrifugován 1 min. při 13 000 rpm a supernatant byl přenesen do nové mikrozkušavky. K sedimentu bylo přidáno dalších 5 - 10 µl 1mM Tris-Cl, se kterými je postup zopakován. Takto vyizolovaných 15 - 20 µl vzorku DNA bylo skladováno při -20 °C.

3.4.5 Ligace

Každé ligaci předcházela izolace DNA z agarózového gelu, čímž byla zaručena její purifikace. Ligace slouží ke spojování lineárních fragmentů DNA prostřednictvím enzymu DNA ligáza. Obvykle se přidává vektor a fragment v poměru 1:3 (případně vyšším, 1:3 – 10). Při výpočtu potřebného množství DNA (v ng) musí být zohledněna rozdílná délka ligovaných molekul DNA.

Obecný vzorec pro výpočet množství fragmentu vstupujícího do reakce:

$$\text{fragment [ng]} = \text{množství vektoru [ng]} \times \text{velikost fragmentu (bp)} \times \text{poměr F:V} / \text{velikost vektoru (bp)}$$

K ligování byla používána T4 ligáza a T4 ligační pufr od firmy Fermentas, a to i k TA-klonování do *pDriveru* z důvodu nízkého vyizolovaného množství DNA.

Tabulka 3.14: Složky ligační reakce

složka	objem [μl / 10 μl reakční směsi]
T4 ligáza (konc. 5 u/ μl)	0,5
T4 pufr	1
vektor	Ve stechiometrickém poměru 1:5-7, tak, aby celkové množství DNA dosáhlo max. 100 ng
fragment	
dH ₂ O	doplněna do 10 μl (pokud bylo třeba)

Po namíchání ligační směsi probíhala vlastní enzymatická reakce 3 hod. za inkubace při 15 °C, dále byl enzym inaktivován při 70 °C 10 min. Reakce probíhaly v termocycleru MJ Research, typ PTC-200 nebo T100TM BIORAD.

3.4.6 Odsolení ligační směsi

Ligační směs byla odsolena za použití odsolovací kolonky, která byla vytvořena rozvařením 1% agarózy ve 100mM glukóze. Tento roztok byl rozpipetován po 1,3 ml do 1,5ml mikrozkuvek, které byly přelepeny lepicí páskou, do které byla zapíchnuta 200 μl špička. Po ztuhnutí agarózy byly špičky opatrně vyjmuty, mikrozkuvky ovázány parafilmem a skladovány při 4 °C.

Při vlastním odsolování byla ligační směs napipetována do jamky v odsolovací kolonce, kde byla ponechána při 4 °C po dobu min. 1,5 hod.

3.4.7 Restrikční štěpení

Pro vyštěpení požadovaných fragmentů DNA z plazmidů, linearizaci plazmidů či pro ověření průběhu a správnosti klonování byly používány restrikční enzymy a odpovídající restrikční pufrы od firmy Fermentas. Příprava reakční směsi se řídila pokyny výrobce. Jako příklad zde uvádím dvě restrikčního štěpení, která byla použita pro vyštěpení vlásenky proti promotoru 35S z plazmidu *pDrive* za účelem jejího vložení do plazmidu *pER8*.

Tabulka 3.15: Složení restrikční směsi pro vyštěpení celé vlásenky proti 35S promotoru (35S-IR) z pDrive plazmidu

složka	objem [μl / 20 μl reakční směsi]
Pufř Tango Yellow 2x	4
Xho I (konc. 10 u/ μl)	1
Xba I (konc. 10 u/ μl)	1
vzorek (pDrive; konc. 40 ng/ μl)	10
dH ₂ O	4 (doplnění do 20 μl)

Tabulka 3.16: Složení restrikční směsi pro naštěpení pER8 plazmidu za účelem ligace s vlásenkou proti 35S promotoru (35S-IR).

složka	objem [μl / 10 μl reakční směsi]
Pufř zelený (G)	1
Xho I (konc. 10 u/ μl)	0,1
Bcu I (konc. 10 u/ μl)	0,1
vzorek (pER8; konc. 20 ng/ μl)	5,22
dH ₂ O	3,58 (doplnění do 10 μl)

V obou uvedených případech po namíchání restrikční směsi probíhaly vlastní enzymatické reakce 1 hod. za inkubace při 37 °C, dále byl enzym inaktivován při 65 °C 20 min. Reakce probíhaly v termocyleru MJ Research, typ PTC-200 nebo T100TM BIORAD.

Množství použitého restrikčního enzymu je přímo úměrné počtu restrikčních míst ve štěpeném plazmidu a jeho množství. Množství použitého enzymu naopak klesá s jeho rostoucí aktivitou (přepočteno podle počtu restrikčních míst v λ fágovi). Oproti vypočtenému množství byl enzym do reakce přidán vždy dvojnásobek. Množství enzymu nikdy nepřesáhlo 10 % celkového objemu reakce.

Pokud po restrikci měla následovat ligace, bylo množství plazmidu použitého do restrikce zvoleno tak, aby činilo přibližně 100 ng. Koncentrace plazmidů byly stanoveny z agarózového gelu (viz kapitolu 3.4.3).

3.4.8 Sekvenace DNA

Sekvenace byly prováděny laboratoří sekvenace DNA PřF UK. Vzorky byly pro sekvenaci připraveny tak, aby celkový objem sekvenovaného vzorku činil 14 μ l. Vzorek tedy obsahoval 0,24 μ mol příslušného primeru a 100-200 ng plazmidové DNA, zbývající objem byl doplněn dH₂O. Výsledky byly zpracovány pomocí programu Chromas 2.1 a Geneious 7.1.

3.5 Práce s RNA

Při práci s RNA bylo vždy dbáno na to, aby byla udržována na ledu a manipulace s ní probíhala rychle a minimalizovala se tak její degradace. Pracovní materiál, který přišel do styku s RNA, byl předtím sterilizován klávováním. Se vzorky RNA bylo manipulováno v latexových rukavicích.

3.5.1 Izolace RNA

Na izolaci RNA byl používán komerčně dostupný RNeasy® Plant Mini Kit od firmy QUIAGEN.

Před vlastní izolací bylo naváženo na analytických vahách požadované množství rostlinného materiálu pro každý vzorek. Rostlinným materiálem pro izolaci RNA byly buď mladé kalusy BY-2, nebo 3 dny staré suspenze BY-2. Hmotnost vzorků se pohybovala mezi 70 – 100 mg. Po zvážení byly okamžitě zabaleny do alobalu a zmrazeny v tekutém dusíku.

Vzorky byly rozdrceny na prášek tloučkem ve třecí misce, která byla předtím důkladně vymrazena tekutým dusíkem. Poté bylo k prášku okamžitě přidáno 450 μ l RLT pufru smíchaného s β -merkaptoetanolem (10 μ l β -merkaptoetanolu na 1 ml RLT pufru) a společně pořádně promícháno a rozdrceno. Rozpuštěný vzorek v třecí misce byl následně přenesen do fialové kolonky (QIAshredder spin column) ve 2 ml sběrné zkumavce a centrifugován 2 min. při maximální rychlosti (13 000 rpm). Supernatant byl ze sběrné zkumavky přepipetován do nové centrifugační mikrozukavky. K supernatantu byl přidán 0,5 násobek objemu čistého 96% etanolu a hned promícháno pipetováním. Celý objem mikrozukavky byl přenesen do růžové kolonky (Rneasy mini column) v 2 ml sběrné zkumavce a centrifugován 15 s při 10 000 rpm. Roztok proteklý do sběrné zkumavky byl vylit a do kolonky bylo přidáno 700 μ l RW1 pufru. Následovala centrifugace po 15 s při 10 000 rpm. Proteklý roztok byl odstraněn i se sběrnou zkumavkou, která byla nahrazena novou. Do kolonky bylo připipetováno 500 μ l RPE

pufru (před prvním použitím nutno doplnit etanolem) a centrifugováno 15 s při 10 000 rpm. Proteklý roztok byl vyhozen i se sběrnou zkumavkou. Růžová kolonka byla umístěna do nové mikrozkušavky a centrifugována při maximální rychlosti 1 min. pro vysušení membrány kolonky. Kolonka byla přenesena do 1,5 ml mikrozkušavky a bylo do ní napipetováno 30 μ l sterilní dH₂O. Po tomto kroku byla provedena okamžitá centrifugace po dobu 1 min. při maximální rychlosti a následně byly mikrozkušavky s vyizolovanou RNA umístěny na led. Vzorke RNA byly skladovány při -20 °C.

Koncentrace RNA byla určena prostřednictvím Nanodropu 2000, případně spektrofotometricky (spektrofotometr Thermo Spectronics – BioMate 5) při $\lambda=260$ podle vzorce:

$$c [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = 40 \times \text{hodnota absorbance } (A_{260}) \times \text{ředění } (150\text{x}) / 1000$$

3.5.2 Odstranění DNA

Pro odstranění DNA bylo odebráno tolik μ l vzorku s izolovanou RNA, aby obsahovalo 1 μ g RNA a bylo doplněno dH₂O do 7,5 μ l. Ke směsi byl přidán 1 μ l 10x pufru DNase i s obsahem MgCl₂ (od firmy Fermentas), 0,5 μ l inhibitoru RNáz RiboLock RI (Fermentas) a 1 μ l DNázy i (Fermentas). Vzorke byly následně inkubovány při 37 °C po dobu 30 minut. Poté byl ke každému vzorku přidán 1 μ l 25mM EDTA a byl inkubován 10 minut při 65 °C pro inaktivaci enzymu. Inkubace probíhala v termocycleru (T100TM BIORAD).

3.5.3 Semikvantitativní RT-PCR

Do RT-PCR bylo použito 5 μ l směsi po inaktivaci DNázy I. Ke každému vzorku bylo přidáno 6,5 μ l dH₂O a 1 μ l oligo-dT₂₃ reverse primeru. Směs byla vložena do termocycleru (T100TM BIORAD) na 5 minut při 70 °C. Poté byl vzorek urychleně přenesen na led a k němu byly přidány 4 μ l 5x koncentrovaného RT pufru pro reverzní transkriptázu (Fermentas), 2 μ l 10mM dNTP a 0,5 μ l inhibitoru RNáz (RiboLock RI). Následovala inkubace v termocycleru 5 minut při 41 °C. Pro vlastní reverzní transkripci bylo přidáno 0,7 μ l RNA-dependentní DNA polymerázy RevertAidTM M-MuLV (Fermentas) s následnou inkubací při 42 °C po 1 hod. a dále při 70 °C po 10 min. pro ukončení reakce. Získaná cDNA byla skladována při -20 °C.

cDNA byla následně amplifikovaná běžnou PCR (viz kapitolu 3.4.2) při celkovém objemu 20 μ l reakční směsi. Paralelně s primery *ntRDR6* nebo *atRDR6* byly vzorke cDNA amplifikovány v nezávislé PCR s použitím primerů pro elongační faktor *EF1a*, jehož množství sloužilo ke

kvantifikaci exprese nebo genů *AtRDR6* a *NtRDR6*.

Tabulka 3.17: Složení PCR směsi pro amplifikaci cDNA.

složka	objem [μ l]
templátová DNA *	1 (příp. 0,4 μ l)
10 μ M primery F + R	0,4 + 0,4
10 \times PCR pufr	2
25 mM MgCl ₂	1,2
10 mM dNTPs	0,4
dH ₂ O	14,4 (příp. 15 μ l)
Taq polymeráza (5 u/ μ l)	0,2
výsledný objem reakční směsi 1 vzorku	20

*) Koncentrace cDNA vstupující do PCR reakce se pohybovala řádově mezi 10^{-4} až 10^{-5} ng/ μ l.

Tabulka 3.18: Parametry PCR pro amplifikaci cDNA.

parametry PCR	AtRDR6 primery	NtRDR primery	EF1a primery
počáteční denaturace	94 °C, 3 min	94 °C, 3 min	94 °C, 3 min
denaturace	94 °C, 30 s	94 °C, 30 s	94 °C, 30 s
annealing	53°C, 35 s	60 °C, 30 s	57 °C, 35 s
elongace	72 °C, 30 s	72 °C, 30 s	72 °C, 30 s
počet cyklů	25	30 - 31	20 - 25

Tučné hodnoty se ukázaly jako optimální.

Míra exprese nativního genu *NtRDR6* a míra exprese vneseného *AtRDR6* byla zjišťována z koncentrace amplifikovaných úseků DNA a pomocí experimentálně stanovené efektivity PCR. Z těchto hodnot byla zjištěna výchozí koncentrace DNA vzorků *AtRDR6*, *NtRDR6* a *EF1a*. Byl vypočítán poměr koncentrací *AtRDR6*/ *EF1a* a *NtRDR6*/*EF1a*, který byl v případě *NtRDR6*/*EF1a* porovnán s poměrem u divoké formy. Koncentrace amplifikované DNA byla změřena pomocí G:boxu a softwaru GeneSnap 7.09 (viz kapitola 3.4.3).

3.6 Sledování změn fluorescence GFP a průběhu jeho umlčování

Změny ve fluorescenci RS-GFP (ve všech případech byl používán RS-GFP, proto bude pro zjednodušení dále označován jen jako GFP) byly sledovány na kalusech rostoucích na pevném MS médiu i v suspenzních kulturách pěstovaných v tekutém MS médiu (podmínky pěstování viz kapitolu 3.1.3). Expres umlčujících konstruktů byla spouštěna z indukovatelného promotoru na plazmidu *pER8* pomocí β -estradiolu od firmy SIGMA (Cat. No. E2758). Koncentrace β -estradiolu v médiu byla 2 μ M. β -estradiol byl skladován jako zásobní roztok o koncentraci 20 mM rozpuštěný v DMSO při -20 °C a do média byl ředěn 10 000krát. Jako kontrolní médium bylo použito vždy pevné nebo tekuté MS médium s přidavkem DMSO.

Tři až čtyři týdny po transformaci byla poprvé zjišťována intenzita fluorescence kalusů. Ve většině případů (kromě sledování samovolného umlčování) byly pro indukci umlčování exprese *GFP* vybrány ty kalusy, které měly po transformaci fluorescenci vyšší než nesvítící negativní kontrola. Tyto kalusy byly přesazeny na nové selekční MS médium, kdy byly ponechány přibližně 10 dní, dokud byly dost velké na to, aby mohly být rozpůleny. Půlka kalusu byla následně přenesena na indukční MS médium s estradiolem a druhá polovina na kontrolní MS médium s DMSO. Měření poklesu fluorescence po indukci exprese umlčujících konstruktů bylo prováděno každý 2. den (případně každý 3. den, pokud by měření jinak vycházelo na víkend) po dobu 14 dnů, a to jak pro kalusy, tak suspenzní kultury. V případě varianty transformované vlásenkou proti *35S* promotoru, pod kterým bylo exprimován *GFP*, probíhalo měření pouze na kalusech, a to po dobu jednoho měsíce, během kterého došlo jednou k přesazení na čerstvé médium.

3.6.1 Snímání fluorescence kalusů *BY-2*

Fluorescence kalusů byla snímána zařízením G:BOX od firmy SynGene. Pořizování snímků probíhalo vždy za následujícího nastavení: Excitace GFP bylo dosaženo modrou LED diodou s maximem záření při 465 nm; emisní filtr FILTSP – 495-600 nm a doba expozice 1,2 s.

Digitální výstup z tohoto zařízení byl vizualizován programem GeneSnap 7.09 a byl uložen v podobě obrázku jako 16-bit TIF soubor.

Najednou bylo snímáno vždy sedm kalusů, které rostly společně v jedné Petriho misce (průměr 6 cm). Výjimkou byl pokus zaměřený na zhodnocení míry samovolného umlčování, při kterém bylo vysazeno kolem 40 kalusů na misku. Tyto kalusy byly snímány hned poté, co byly přesazeny na nové selekční MS médium po jejich regeneraci (přibližně měsíc po transformaci),

byly tedy velmi malé.

Negativní i pozitivní kontroly byly pěstovány dohromady a byly snímány spolu s umlčovanými kalusy. V rámci jednoho měření byly podmínky snímání vždy shodné. Při manipulaci s kalusy v miskách se dbalo na zachování co nejčistšího pracovního prostředí.

3.6.2 Analýza obrazových dat

Následně byly nasnímané obrázky analyzovány v programu NIS-Elements 3.10 (build 637) firmy Laboratory Imaging. Průměrná intenzita fluorescence každého kalusu byla stanovena jako průměrná úroveň jasu. Hodnoty jasu vycházejí z 16-bit barevné hloubky obrázků, kde nejtmavší (černá) odpovídá 0 a nejsvětlejší (bílá) 65 535. Číselné hodnoty fluorescence byly ze snímků získány nástrojem „Rastrový ROI editor,“ pomocí kterého byla přesně ohraničena plocha každého kalusu. Většinou šlo o „autodetekci.“ Jestliže se kalusy dotýkaly, byly od sebe odděleny v programu Zoner Photostudio 16 společnosti ZONER software, a.s. nástrojem „štetec“). Po vyznačení plochy každého kalusu, byla průměrná intenzita každého kalusu změřena nástrojem „Měřit pole a ROI“. Získaná data byla uložena a dále zpracována v tabulkovém editoru Microsoft® Excel® z kancelářského balíku Microsoft® Office 2007 a 2013.

3.6.3 Příprava buněčné linie BY-2 pro měření na průtokovém cytometru

Ze suspenzí kultury BY-2 staré 2 – 5 dnů byly odebrány 2 – 4 ml (v závislosti na hustotě buněčné suspenze) do 2ml mikrozkušavky (případně do dvou mikrozkušavek). Mikrozkušavky byly centrifugovány při 200 RCF (centrifuga Universal 32 R Hettich) 5 min. Médium bylo důkladně odsáto a k sedimentu buněk bylo přidáno 1,5 ml roztoku enzymů (viz tabulku 3.19) a jemně promícháno otočením mikrozkušavky. Buňky v roztoku byly přeneseny do 6ti jamkových kultivačních destiček a inkubovány 3 hod. při 26 °C za mírného třepání (100 otáček/min., třepačka Grant-bio POS 300). Buňky byly poté přeneseny zpět do mikrozkušavek a centrifugovány při 200 RCF 5 min. Supernatant obsahující enzymy byl slit (přefiltrován a zamrazen pro opakované použití) a k sedimentu buněk byl přidán 1 ml MS média obsahující 0,4 M sacharózy. Sediment byl promíchán převrácením zkušavky a centrifugován při 200 RCF 5 min bez brzdění rotoru centrifugy. Protoplasty, které zůstaly na hladině, byly 1 ml pipetou s ušříženou špičkou přeneseny do 96-jamkové kultivační destičky a použity pro měření na průtokovém cytometru.

Tabulka 3.19: Roztok enzymů pro protoplastování

složka	g/40 ml
0,45 M D-manitol	3,279
celuláza	0,4
pektolyáza	0,04
dH ₂ O	doplněna do 40 ml

Roztok byl uchováván při -20 °C.

3.6.4 Průtoková cytometrie

Metody průtokové cytometrie bylo využito pro měření změn fluorescence u suspenzních kultur BY - 2. Její výhodou je vysoká přesnost a možnost analyzovat obrovské množství buněk ve velmi krátkém čase. Všechna měření byla prováděna na průtokovém cytometru BDTM LSR II za použití jednotky BDTM HTS (High Throughput Sampler). Výstup byl zpracován programem BD FACSDiva software a následně uložen jako soubor FSC 3.0. Obsluha přístroje probíhala podle manuálu výrobce. K excitaci fluorescence GFP byl použit modrý laser, $\lambda = 488$ nm a pro detekci emise GFP byl zapojen GFP filtr (525/50). Měření vzorků probíhala do dosažení 30 000 událostí, tj. 30 000 detekovaných buněk.

Tabulka 3.20: Nastavení parametrů pro HTS

Sample flow rate (rychlost průtoku vzorku)	2 μ l/ sek
Sample volume (objem nasátého vzorku)	200 μ l
Mixing volume (promíchávaný objem)	100 μ l
Mixing speed (rychlost promíchávání)	200 μ l/ sek
Number of mixes (počet míchání)	2
Wash volume (objem promývací tekutiny)	400 μ l

3.6.5 Analýza dat z průtokové cytometrie

Analýza dat z průtokové cytometrie probíhala ve volně dostupném programu Flowing software 2.5 (www.flowingsoftware.com). Populace živých buněk BY-2 byla vyznačena na základě experimentálního stanovení provedeného Mrg. Vojtěchem Čermákem pomocí barvení buněk modrou fluorescenční barvou DAPI, která snáze proniká do jader mrtvých buněk (Dimmick 2011). Intenzita fluorescence populace živých buněk transformovaných *GFP* byla srovnána s naměřenou intenzitou fluorescence buněk negativní kontroly neobsahující gen pro GFP (buněk divokého typu). Živé buňky exprimující *GFP*, jejichž intenzita fluorescence byla vyšší než u negativní kontroly, jsou dále označovány jako „svítící“.

3.7 Statistická analýza dat

Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí volně dostupného programu R 3.1.0 (www.r-project.org). Normální rozložení dat bylo ověřeno pomocí distribuce residuí zobrazených na kvantilově-kvantilovém grafu (quantile-quantile plot). Pokud rozložení residuí neodpovídalo normálnímu, byla data normalizována odmocněním, umocněním nebo zlogaritmováním. Pro porovnávání rozdílů mezi různými variantami byly použity testy ANOVA, ANOVA s pevnými efekty, Tukeyho test a metoda Simultaneous tests for general linear hypotheses (STGLH; Hothorn et al. 2008). Použitá statistická metoda je vždy uvedena u příslušného výsledku v závorce. Pro porovnání intenzit fluorescence buněk BY-2 na kontrolním a indukčním médiu v týž den měření u jedné varianty byl použit párový t-test. Homogenita distribucí kalusů v kategoriích relativního poklesu fluorescence byla posouzena Pearsonovým chí-kvadrát testem. Všechny statistické testy byly prováděny na hladině spolehlivosti 0,05.

4 Výsledky

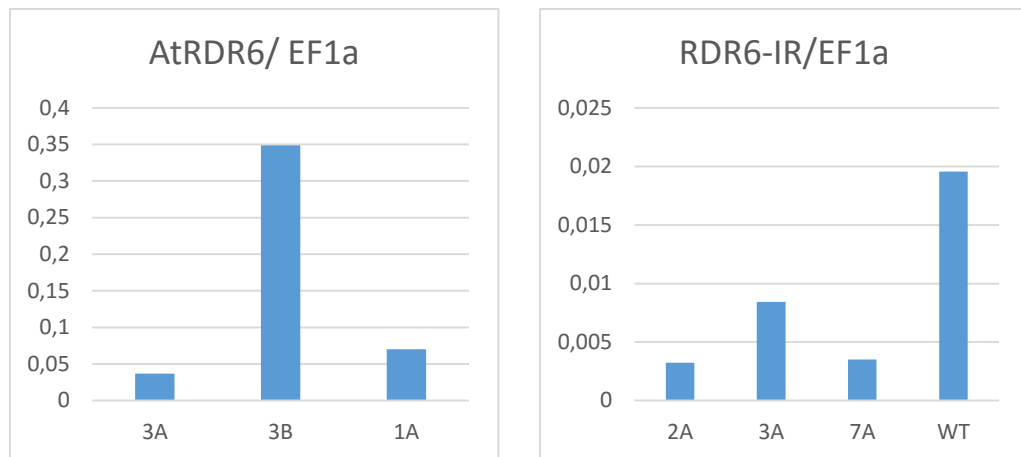
4.1 Příprava linií BY-2 se sníženou a zvýšenou expresí *RDR6*

Snížení či zvýšení exprese *RDR6* v buněčné linii BY-2 bylo dosaženo vnesením konstruktů *AtRDR6* a *RDR6-IR* zaklonovaných v plazmidech pGreen s kanamycinovou rezistencí (viz tabulku 3.12) Oba tyto konstrukty byly vytvořeny Mgr. Vojtěchem Čermákem. V případě konstruktů *AtRDR6* se jedná o sekvenci genu *RDR6* z *Arabidopsis thaliana* (kultivar *Columbia*) exprimovanou pod 35S promotorem. Tím by měla být zajištěna přítomnost vysokého množství proteinu RDR6 a zároveň použití sekvence exogenního genu *RDR6* snižuje možnost regulace a tím rizika negativní zpětné vazby prostřednictvím malých RNA.

Konstrukt *RDR6-IR* nese část sekvence genu *RDR6* z buněčné linie tabáku BY-2 (*Nicotiana tabacum*) vložené ve formě invertované repetice oddělené sekvencí intronu z genu pro mangan stabilizující protein (MSP) z lilku bramboru (*Solanum tuberosum*). Na základě intramolekulárního párování, kterému napomáhá vystřížení intronu, dochází k vytvoření dvouvláknové RNA vzniklé transkripcí tohoto konstruktů. Ta by měla vyvolat PTGS (viz kapitolu 2.4) endogenní *RDR6* a snížení množství vznikajícího proteinu RDR6 v buňce.

Buňky BY-2 byly transformovány konstrukty *AtRDR6* a *RDR6-IR* prostřednictvím *A. tumefaciens* u zregenerovaných náhodně vybraných kalusů byla následně zjištěna přibližná míra exprese prostřednictvím RT-PCR (viz kapitolu 3.5.3) na základě které bylo vybrána několik klonů s nejvyšší expresí *AtRDR6* nebo se sníženou expresí endogenní *NtRDR6* oproti divoké formě. Tyto klony byly převedeny do formy suspenzních kultur, u kterých byla opět stanovena míra exprese příslušných genů (viz graf 4.1). Pro další práci byly použity dva klony (2A, 7A) se sníženou expresí *NtRDR6*, protože v případě snížení exprese pomocí *RDR6-IR* nebyl efekt dostatečně stabilní u varianty *RDR6-IR* + *GFP-IR* (viz kapitolu 4.3) a u pozorování samovolného umlčování na genetickém pozadí *RDR6-IR* (viz kapitolu 4.2) byl použit pro transformaci klon 2A, u ostatních variant *RDR6-IR* klon 7A. Hladina exprese *NtRDR6*, resp. *AtRDR6* byla u těchto tří linií ověřována RT-PCR před každou transformací.

Graf 4.1: Poměr koncentrací úseků DNA *AtRDR6*, *NtRDR6* k vnitřnímu standardu *EF1a* tří vzorků *AtRDR6* a *RDR6-IR* stanovené prostřednictvím RT-PCR. Pro další práci byly vybrány linie 3B (*AtRDR6*), 2A a 7A (*RDR6-IR*).



4.2 Samovolné umlčování *GFP* na třech různých genetických pozadích v kalusech BY-2

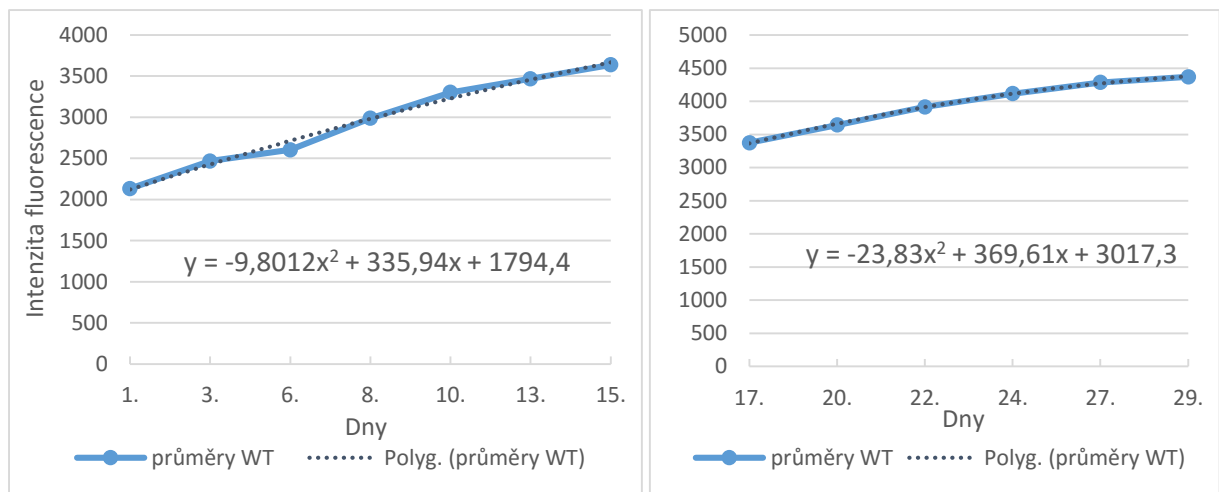
Buňky BY-2 divokého typu (*WT*), linie se sníženou expresí *NtRDR6* (*RDR6-IR*) a linie se zvýšenou expresí *RDR6* (*AtRDR6*) byly transformovány konstruktem obsahujícím *GFP* a rezistenci proti hygromycinu (plasmid *pGreen-GFP-mCherryH⁺* vytvořený Mgr. Vojtěchem Čermákem). Po transformaci byly malé kalusy od každé varianty vybrány náhodně a přesazeny na nové selekční médium s obsahem kanamycinu, hygromycinu a klaforanu v počtu 20 - 40 kalusů na Petriho misku. Bylo vytvořeno 6 misek pro variantu *WT*, 10 misek pro variantu *AtRDR6* a 9 misek pro *RDR6-IR*. Po přesazení byly kalusy vyfoceny v G-boxu za excitace fluorescence *GFP*. Po uplynutí 14 dnů byly opět vyfoceny a jejich fluorescence porovnány. Protože se stářím kalusů neroste jejich fluorescence lineárně, byla pro posouzení případného relativního poklesu fluorescence během 14 dnů použita jako referenční fluorescence kalusů s dlouhodobě vysokou stabilní fluorescencí *GFP*.

Kalusy, jejichž intenzita fluorescence již v 1. den měření byla nižší než intenzita pozadí (netransformované kontroly) zvětšená o 500 jednotek (odpovídající 13,6 - 23,6 % celkové hodnoty fluorescence pozadí), byly označeny jako „nesvítící“ a nebyly použity pro stanovení množství samovolně umlčujících kalusů. Jako hraniční byla zvolena intenzita fluorescence o 500 jednotek vyšší než má pozadí z důvodu možného vlivu vysoké intenzity fluorescence sousedního kalusu na výslednou fluorescenci kalusu s intenzitou nízkou, a také z důvodu určité variability fluorescence i u netransformované kontroly. Tímto výběrem by mělo být zajištěno,

že fluorescence použitých kalusů byla dostatečně nad úroveň pozadí, takže její případný pokles mohl být spolehlivě stanoven.

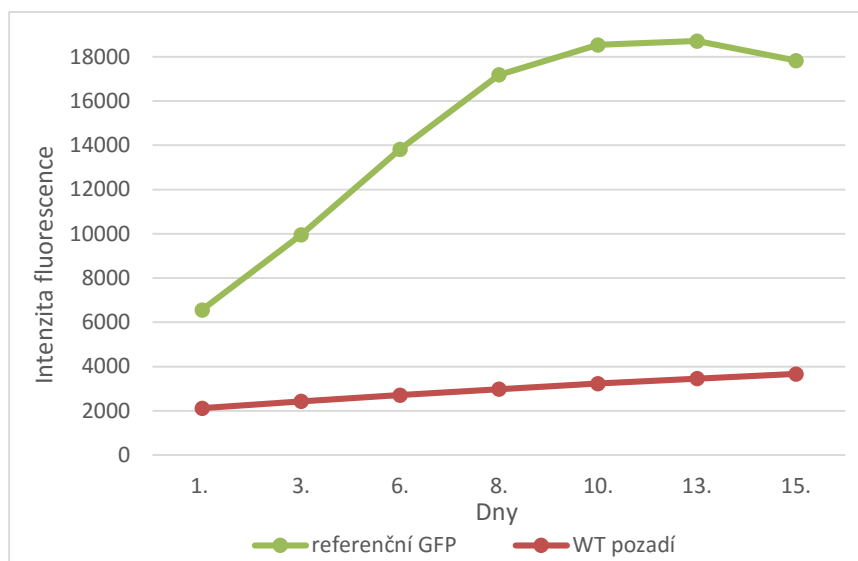
Protože průběh intenzity fluorescence pozadí nebyl zcela hladký, byl graf jejich průměrných hodnot proložen polynomicou funkcí, a z ní byly hodnoty pro jednotlivé dny měření dopočítány (graf 4.2). V případě sledování TGS pomocí *35S-IR* (viz kapitolu 4.7) se jedná o dvě nezávislé polynomicke funkce vypočítané pro 1. – 15. den a pro 17. – 29. den z důvodu nutnosti přesadit kalusy po uplynutí 14 dnů na nové médium, které se projevilo poklesem fluorescence po pasáži. Tyto funkce byly použity pro výpočet hodnot pro odečet pozadí u kalusů transformovaných *GFP*. Tyto hodnoty byly použity i pro účely jiných pokusů.

Graf 4.2: Průměrné intenzity fluorescence netransformovaných kontrolních kalusů označovaných jako pozadí (průměry *WT*) a z nich aproximované funkce.

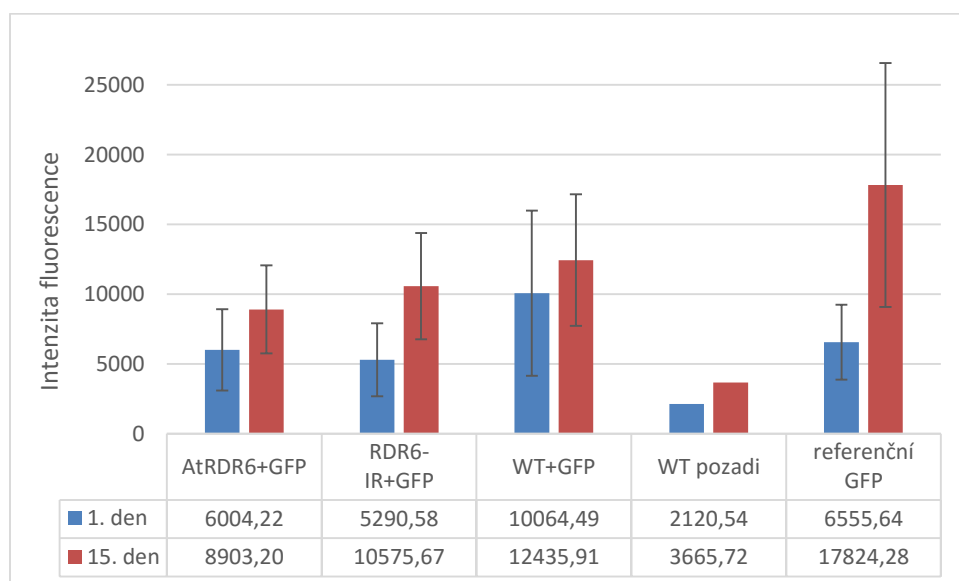


Již v první den měření je jasně průkazný vliv genetického pozadí na intenzitu fluorescence (ANOVA, p -hodnota $< 2 \times 10^{-16}$). Fluorescence kalusů s *WT* pozadím je výrazně vyšší než u zbylých dvou (Tukeyho test, obě p -hodnoty $< 1 \times 10^{-7}$). O 14 dní později se situace změnila; *AtRDR6* se významně liší od *RDR6-IR* i *WT* pozadí (Tukeyho test, obě p -hodnoty $< 1 \times 10^{-7}$). Celková významnost vlivu genetického pozadí zůstává nezměněna (ANOVA, p -hodnota $< 2 \times 10^{-16}$).

Graf č. 4.3: Průměrné hodnoty fluorescence referenčních kalusů se stabilní vysokou hodnotou fluorescence (zeleně) a hodnoty fluorescence pozadí (červeně). Pro výpočet relativní změny fluorescence kalusů byly použity jen hodnoty z 1. a 15. dne.



Graf č. 4.4: Průměrné hodnoty intenzity fluorescence v 1. a 15. den pro jednotlivá genetická pozadí, referenční kalusy a netransformované nesvítící kalusy použité pro odečet pozadí (aproximované hodnoty, proto zde není uvedena směrodatná odchylka). Chybové úsečky značí směrodatné odchylky.



Za účelem zjištění, u kolika kalusů od každé varianty došlo k samovolnému umlčení *GFP*, byl zjištěn rozdíl průměru a směrodatné odchylky poměru intenzit fluorescence referenčních kalusů v 15. a 1. dni měření. Od počtu kalusů ve všech souborech, jejichž poměr intenzity fluorescence byl nižší než toto číslo, bylo odečteno 15,8 % z celkového počtu kalusů daného souboru (bez kalusů, které „nesvítily“ již v 1. dni). Zbylé kalusy byly označeny jako samovolně umlčující. 15,8 % představuje přibližně procento kalusů, u nichž lze očekávat poměr intenzity

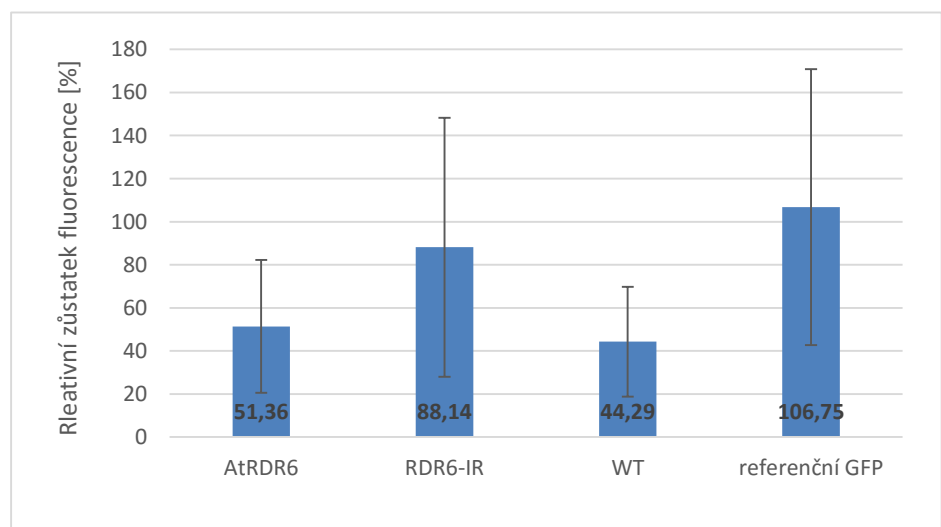
fluorescence nižší než průměr zmenšený o jednu směrodatnou odchylku v důsledku přirozené variability (za předpokladu normálního rozdělení hodnot; cs.wikipedia.org/wiki/Směrodatná_odchylka). S použitím takto získaných hodnot (tabulka 4.1) bylo statisticky prokázáno, že četnost samovolně umlčených kalusů závisí na typu genetického pozadí (χ^2 test, p-hodnota $< 2,2 \times 10^{-16}$).

Tabulka 4.1: Počty kalusů vysazených na selekční médium (celkem); počet kalusů, které byly označeny jako „nesvítící“ (v závorce procenta z celku); počet samovolně umlčujících kalusů (v závorce procenta z celku po odečtení „nesvítících“ kalusů z 1. dne).

	<i>AtRDR6</i>	<i>RDR6-IR</i>	<i>WT</i>
celkem	329	207	223
nesvítící	8 (2,43 %)	16 (7,73 %)	0 (0 %)
umlčující	162 (50,47 %)	23 (12,04%)	133(59,64 %)

Od fluorescence každého kalusu (F) byla odečtena hodnota pozadí (P; tzn. netransformovaných *WT* kalusů) a vydělena průměrnou hodnotou fluorescence referenčních kalusů (R) v daný den měření, od níž bylo také odečteno pozadí (P), tedy (F-P)/ (R-P). Takto získané hodnoty pro 1. a 15. den byly následně dány do poměru a vynásobeny 100, čímž byl zjištěn relativní zůstatek fluorescence v procentech, tedy do jaké míry docházelo k samovolnému umlčení (graf 4.5). i zde je vliv genetického pozadí významný (ANOVA, p-hodnota $< 2 \times 10^{-16}$). V tomto případě se jedná o signifikantně menší pokles fluorescence na genetickém pozadí *RDR6-IR* oproti *WT* a *AtRDR6* (Tukeyho test, obě p-hodnoty $< 1 \times 10^{-7}$).

Graf 4.5: Průměrný relativní zůstatek fluorescence jednotlivých variant v procentech. Chybové úsečky značí směrodatnou odchylku.



4.3 Indukce umlčování exprese *GFP* třemi různými konstrukty na třech různých genetických pozadích v kalusech BY-2

Pro sledování vlivu změn exprese *RDR6* na průběh PTGS bylo využito systému, který se již osvědčil v případě experimentů Mgr. Vojtěcha Čermáka v rámci jeho diplomové práce (Čermák 2012). Jako reportérový protein, jehož exprese měla být umlčována prostřednictvím RNAi, byl použit RS-GFP (ve všech případech byl používán RS-GFP, dále bude tedy uváděn jen jako GFP), protože umožňuje snadné sledování změny jeho exprese jako změny v intenzitě fluorescence. PTGS namířené proti GFP bylo zajištěno třemi různými konstrukty, které byly vytvořeny Mgr. Vojtěchem Čermákem na základě poznatků o mechanismech RNAi. Jedná se o tři deriváty plazmidu *pER8*, do kterého byl vložen gen pro GFP v antisense orientaci (dále jen *GFP-AS*), gen pro GFP vložený do plazmidu bez terminátoru (dále jen *GFP-BT*) a *GFP* ve formě invertované repetice s intronem, vytvořené podobně jako v případě *ntRDR6-IR* (dále jen *GFP-IR*). Plazmid *pER8* obsahuje systém, který umožňuje časované spouštění exprese díky inducibilnímu promotoru, který je aktivován až v přítomnosti estradiolu. Díky tomu je zajištěno, že umlčování *GFP* je zahájeno až po přidání estradiolu do živného média pro BY-2. Do vytipovaných BY-2 linií *AtRDR6* a *RDR6-IR* byly postupně supertransformovány jednotlivé konstrukty spouštějící umlčování (inducibilní konstrukty) společně s plazmidem *pGreen* nesoucím gen pro GFP pod *35S* promotorem (*pGreen-GFP-mCherryH* vytvořený Mgr. V. Čermákem; viz tabulku 3.9). Dále byly tyto inducibilní konstrukty kotransformovány spolu s *pGreen-GFP-mCherryH* do divoké formy (WT). Celkem bylo tedy vytvořeno devět variant lišících se mírou exprese *RDR6* a způsobem indukce PTGS. Transformace byly prováděny standardním postupem uvedeným v kapitole 3.2.4. Selektce kalusů probíhala prostřednictvím antibiotik v médiu (kanamycin v případě *AtRDR6*, resp. *RDR6-IR* a hygromycin v případě inducibilních konstruktů). Z důvodu nedostatku dalšího vhodného antibiotika byla selektce na přítomnost *35S:GFP* prováděna měřením fluorescence. Z narostlých kalusů na médiu s antibiotiky, byly od každé varianty vybrány ty s nejsilnějším signálem GFP. Přesto tato selektce byla jen přibližná z důvodu většinou velmi hustě vedle sebe narostlých a malých kalusů po transformaci. Tyto vybrané kalusy byly přesazeny na nové médium s antibiotiky v počtu asi 20 kalusů na misku. Přibližně po týdně byly stále mladé, ale již jasně vymezené a dostatečně narostlé kalusy vybrány k přesazení na indukční médium s estradiolem opět podle intenzity fluorescence. Vybrány byly jen ty kalusy, které svítily více než netransformovaná kontrola. Tyto kalusy byly rozpuřeny na dvě přibližně stejné části. Zřetel byl brán i na často nehomogenní rozložení fluorescence v rámci jednoho kalusu; takové kalusy byly rozděleny tak, aby si

poloviny co nejvíce odpovídaly nejen velikostí, ale i plochou bez fluorescence. Jedna polovina byla umístěna na médium s estradiolem (indukční) a druhá na kontrolní médium s přídavkem DMSO (estradiol byl rozpuštěn v DMSO). Do indukčního i do kontrolního média byl také přidáván klaforan. Na každou misku bylo vysazeno 7 kalusů. Od každé varianty vzniklo 8 až 13 dvojic misek po sedmi kalusech. Rozdíly v množství vysazených kalusů na variantu byly dány především odlišnou intenzitou fluorescence kalusů již v době po transformaci, ještě před vysazením na indukci. Celkem bylo na indukční médium vysazeno 600 kalusů. V každém experimentu byly navíc zařazeny 2-3 dvojice misek s kontrolními kalusy, tedy s kalusy netransformovanými a kalusy exprimujícími stabilně jen GFP vysazenými také na kontrolní a indukční médium sloužící jako negativní, resp. pozitivní kontrola.

Hned po rozpůlení a přesazení kalusů na kontrolní a indukční médium, byla změřena jejich fluorescence. Měření fluorescence následovalo pravidelně každé dva až tři dny po dobu 15 dnů.

Tabulka 4.2: Počty kalusů přesazených na indukční médium pro jednotlivé varianty.

konstrukt	genetické pozadí		
	<i>AtRDR6</i>	<i>RDR6-IR</i>	<i>WT</i>
<i>GFP-AS</i>	89	68	76
<i>GFP-BT</i>	63	69	76
<i>GFP-IR</i>	57	50	52

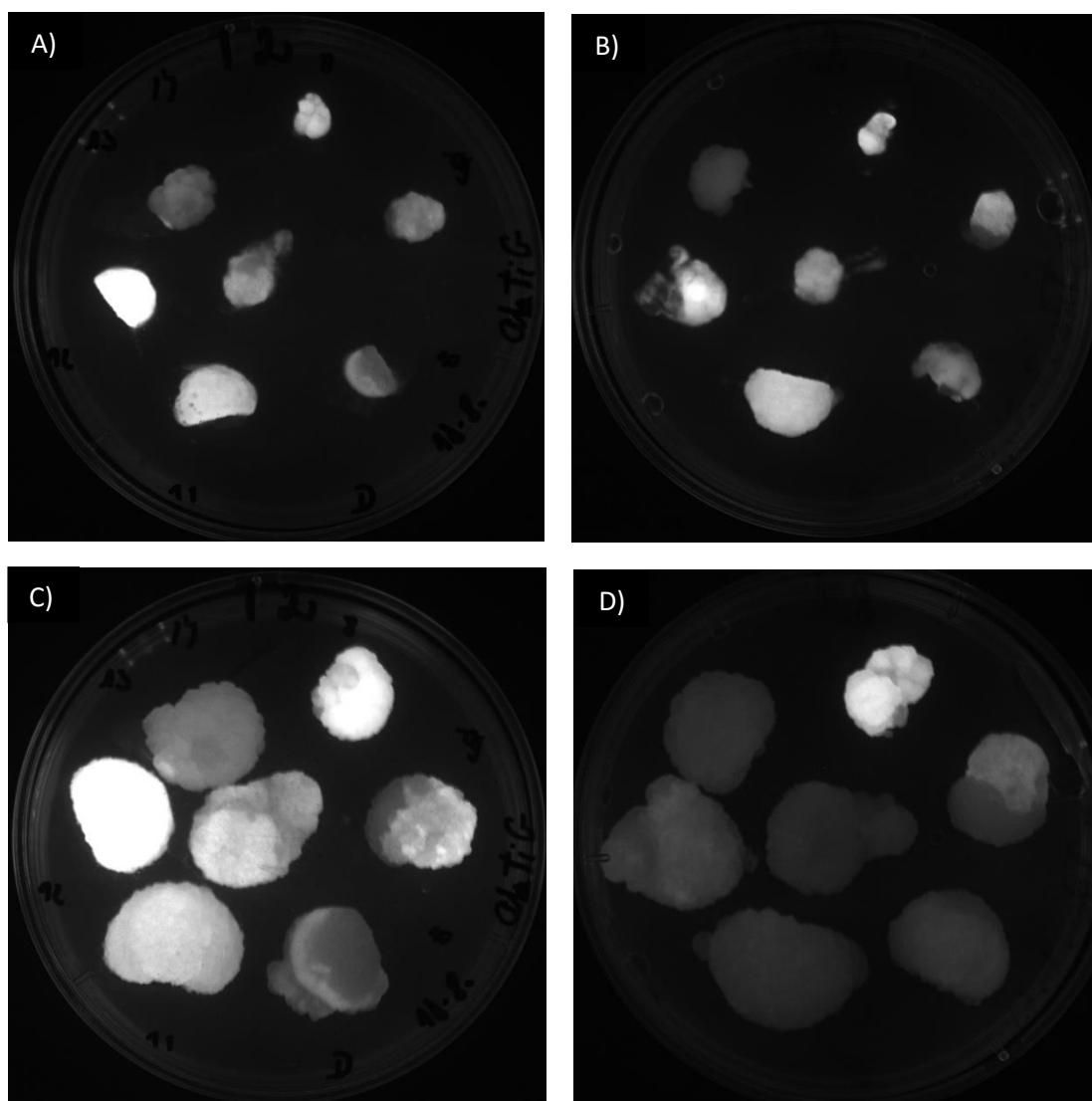
Tabulka 4.3: Pro výslednou statistickou analýzu a zpracování výsledků byl použit následující počet kalusů:

konstrukt	genetické pozadí		
	<i>AtRDR6</i>	<i>RDR6-IR</i>	<i>WT</i>
<i>GFP-AS</i>	87	68	76
<i>GFP-BT</i>	36	52	75
<i>GFP-IR</i>	34	50	52

Pro statistickou analýzu byly vybrány jen ty kalusy, u kterých intenzita fluorescence na kontrolním médiu ve všech dnech měření byla alespoň o 500 jednotek vyšší (odpovídající 13,6 - 23,6 % celkové hodnoty fluorescence pozadí) než intenzita fluorescence pozadí (negativní kontroly).

Z důvodu nevysvětlené vysoké variability dat v prvním dni měření (hned po přesazení), která je způsobena zčásti nepřesnostmi při půlení kalusů, jejich nehomogenní fluorescencí, zbytky původního média a zřejmě ještě další neobjasněnou příčinou, nebyly výsledky z prvního měření zahrnuty do vyhodnocení výsledků a jejich statistického zpracování.

Obr. 4.1: Ilustrační snímky varianty *WT+GFP-AS*. Dvojice misek na kontrolním a indukčním médiu, ze kterých byla stanovována fluorescence jednotlivých kalusů. A) 3 dny staré kalusy na kontrolním médiu; B) 3 dny staré kalusy na indukčním médiu; C) 15 dní staré kalusy na kontrolním médiu; D) 15 dní staré kalusy na indukčním médiu.



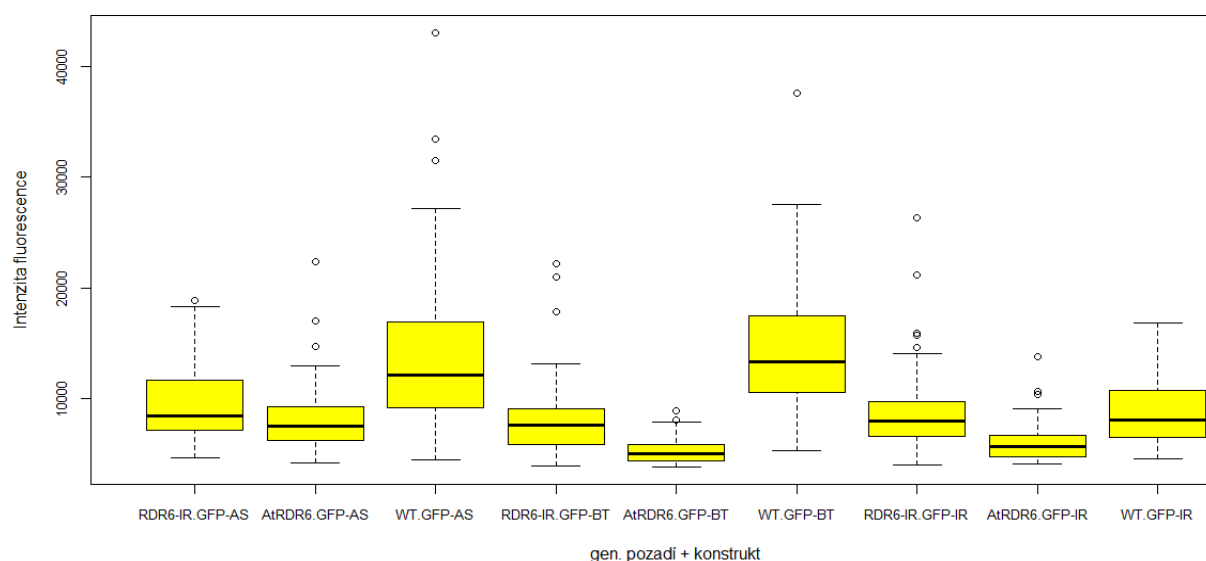
4.3.1 Absolutní intenzity fluorescence na kontrolním a indukčním médiu

Přestože byly ke sledování umlčování fluorescence GFP vybírány cíleně kalusy s nejlepší fluorescencí pro danou variantu, byla celková průměrná intenzita fluorescence kalusů na

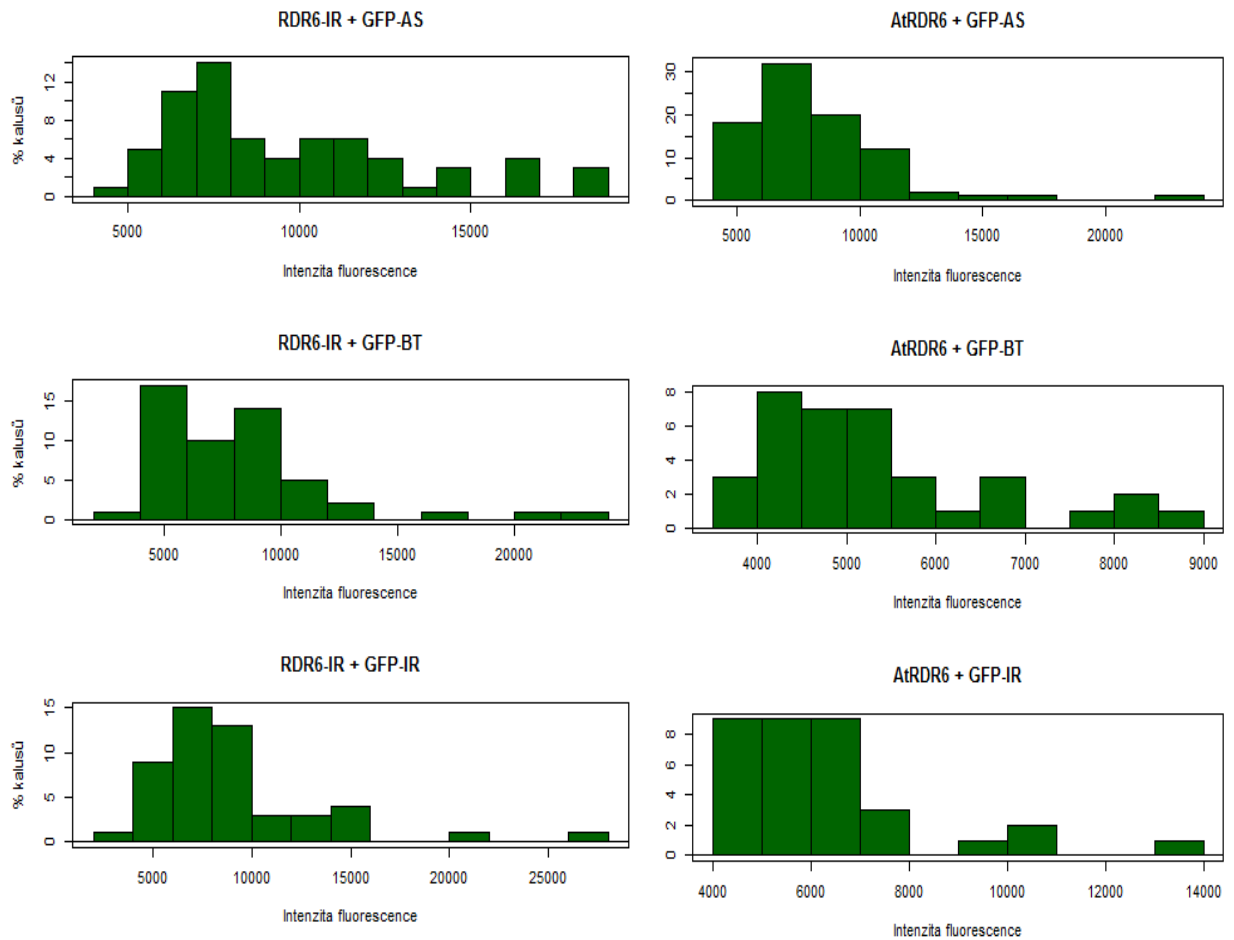
kontrolní médium s DMSO u různých variant odlišná, což je vidět na grafu 4.6. Významnou roli zde má genetické pozadí i typ inducibilního konstruktů (ANOVA s pevnými efekty, p-hodnoty = $1,7 \times 10^{-11}$ a $0,0027$). Statisticky významná je ovšem i interakce genetického pozadí a inducibilního konstruktů (ANOVA s pevnými efekty, p-hodnota = $0,0049$). Signifikantně se od sebe liší všechny tři typy genetického pozadí navzájem, tedy *WT* od *AtRDR6* (Tukeyho test, p-hodnota $< 1 \times 10^{-7}$), *WT* od *RDR6-IR* (Tukeyho test, p-hodnota = 3×10^{-6}) i *AtRDR6* a *RDR6-IR* (Tukeyho test, p-hodnota = $0,012$). V případě konstruktů je průkazný rozdíl v intenzitě fluorescence pouze mezi *GFP-IR* a *GFP-AS* (Tukeyho test, p-hodnota = $0,0014$). Z grafu 4.6 je patrné, že varianty s genetickým pozadím *WT* u daného konstruktů mají nejvyšší intenzitu fluorescence, varianty s genetickým pozadím *AtRDR6* naopak nejnižší.

U genetického pozadí *WT* má varianta *WT+GFP-IR* signifikantně nižší průměrnou fluorescenci na DMSO než zbylé dvě *WT+GFP-AS* a *WT+GFP-BT* (STGLH, p-hodnoty = $0,0011$ a $0,0033$). Naopak v případě porovnávání variant se shodným konstruktem má varianta *WT+GFP-BT* významně vyšší fluorescenci v porovnání s *AtRDR6+GFP-BT* a s *RDR6-IR+GFP-BT* (STGLH, obě p-hodnoty $< 10^{-4}$). Průkazná je také vyšší intenzita fluorescence na kontrolním médiu u varianty *WT+GFP-AS* oproti *RDR6-IR+GFP-AS* a *AtRDR6+GFP-AS* (STGLH, p-hodnoty = $0,0038$ a $< 10^{-4}$).

Graf 4.6: Krabicové diagramy znázorňující průměrné intenzity fluorescence kalusů ze všech dnů měření u jednotlivých variant na kontrolním médiu (bez indukce). Černá čára značí střední hodnotu, úsečky představují horní a dolní kvartil, prázdná kolečka odlehlá pozorování.

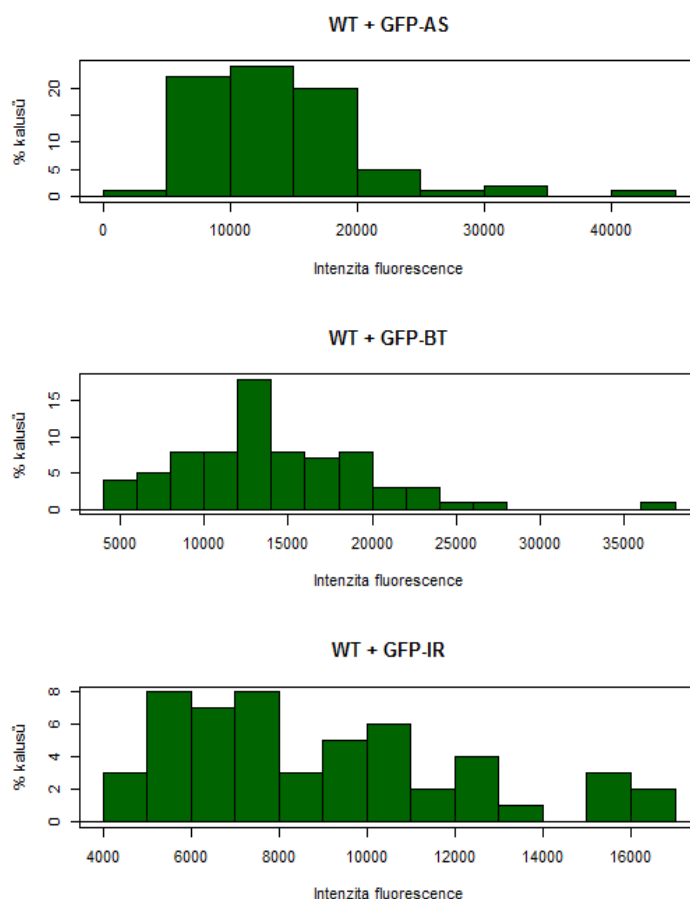


Graf 4.7: Histogramy znázorňující četnosti (%) průměrné intenzity fluorescence kalusů na kontrolním médiu v průběhu měření pro genetická pozadí *RDR6-IR* a *AtRDR6*.

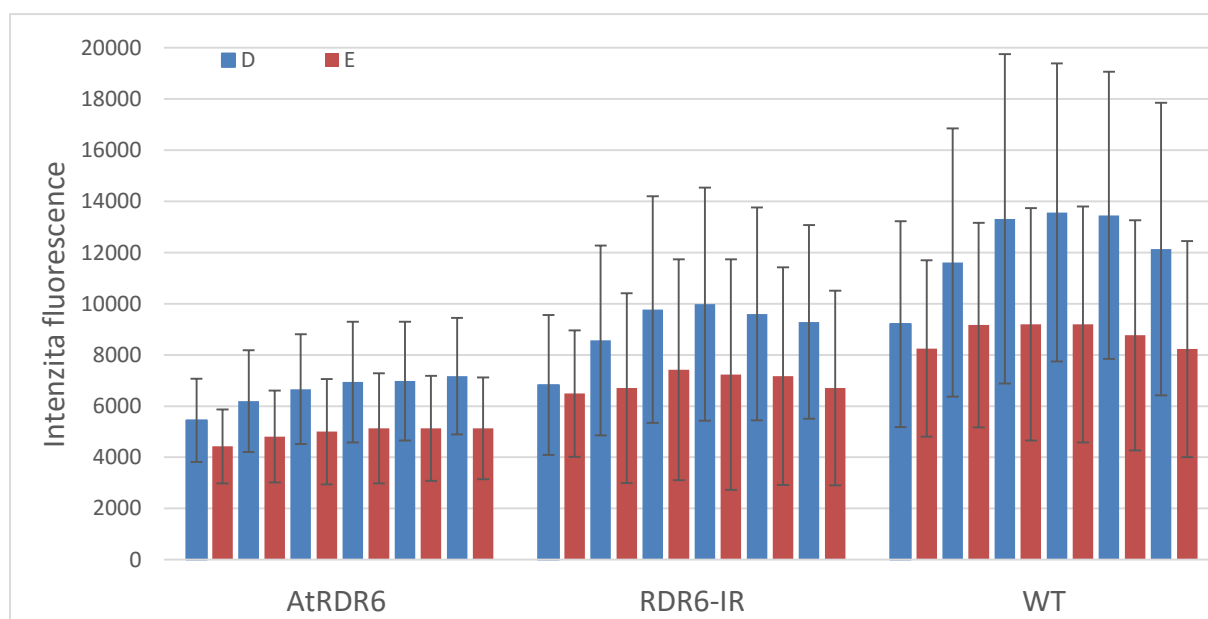


Pokles intenzity fluorescence u kalusů na indukčním médiu oproti kalusům na kontrolním médiu v jednotlivé dny byl signifikantní od prvního po poslední měření pro všechny varianty (párové t-testy) kromě variant *GFP-BT*, kde u *AtRDR6+GFP-BT* byl rozdíl intenzit fluorescence na médiu s DMSO a estradiolem průkazný až 13. a 15. den (p-hodnoty = 0,025 a 0,0034); u *RDR6-IR+GFP-BT* byl rozdíl významný až poslední den měření (p-hodnota = 0,0012) a v případě *WT+GFP-BT* byl rozdíl intenzit fluorescence prokazatelný až od 8. dne (p-hodnota = 0,018). U ostatních variant ve všech dnech měření byly p-hodnoty nižší než $4,5 \times 10^{-8}$ s výjimkou variant *RDR6-IR+GFP-AS* a *RDR6-IR+GFP-IR* ve 3. den měření, kdy v obou případech p-hodnoty činily 0,007.

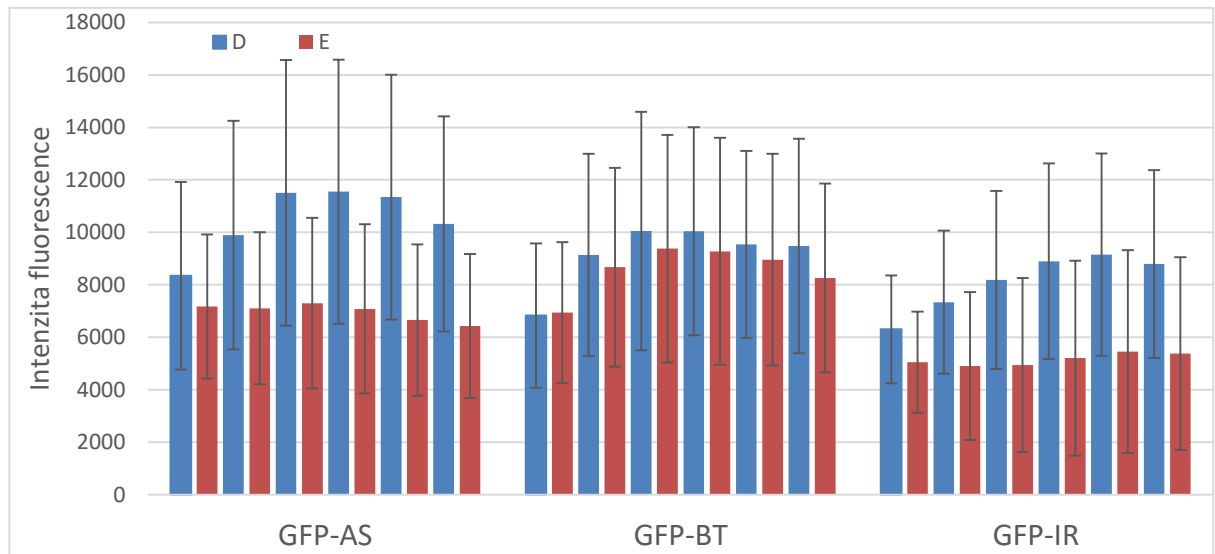
Graf 4.8: Histogramy znázorňující četnosti (%) průměrné intenzity fluorescence kalusů na kontrolním médiu v průběhu měření pro genetické pozadí *WT*.



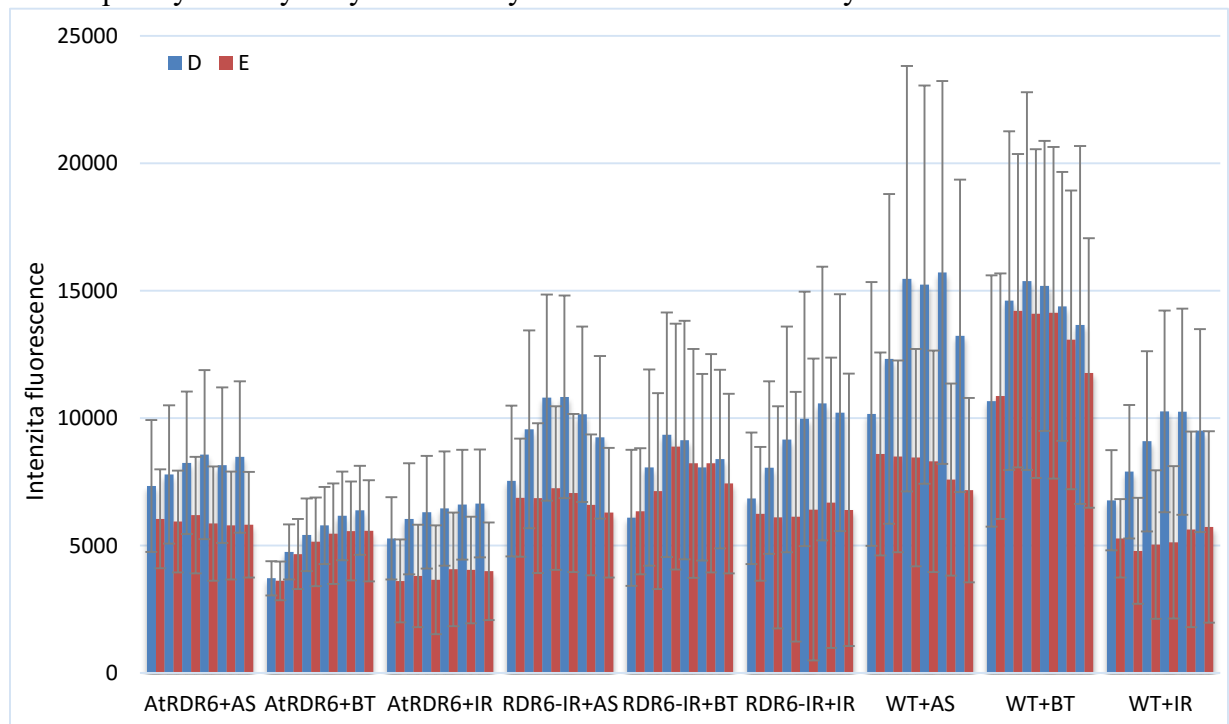
Graf 4.9: Průběh průměrných intenzit fluorescence kalusů na kontrolním médiu s DMSO a indukčním médiu s estradiolem ve všech dnech měření pro jednotlivá genetická pozadí. Dvojice modrých a červených sloupečků představují vždy průměrnou intenzitu fluorescence na kontrolním (legenda: D) a indukčním (legenda: E) médiu v daný den. Mezi jednotlivými měřeními je rozestup vždy 2-3 dny. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku.



Graf 4.10: Průběh průměrných intenzit fluorescence kalusů na kontrolním médiu s DMSO a indukčním médiu s estradiolem ve všech dnech měření pro jednotlivé konstrukty. Dvojice modrých a červených sloupečků představují vždy průměrnou intenzitu fluorescence na kontrolním (legenda: D) a indukčním (legenda: E) médiu v daný den. Mezi jednotlivými měřeními je rozestup vždy 2-3 dny. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku.



Graf 4.11: Souhrnný graf průměrných intenzit fluorescence kalusů všech variant na kontrolním médiu s DMSO a indukčním médiu s estradiolem ve všech dnech měření. Dvojice modrých a červených sloupečků představují vždy průměrnou intenzitu fluorescence na kontrolním (legenda: D) a indukčním (legenda: E) médiu v daný den. Mezi jednotlivými měřeními je rozestup vždy 2-3 dny. Chybové úsečky značí směrodatnou odchylku.



4.3.2 Relativní míra fluorescence (%)

Efektivita, s jakou byla každá varianta schopna indukovat PTGS u *GFP*, je vyjádřena jako poměr fluorescence kalusu na médiu indukčním (E) a kontrolním (D) s odečteným pozadím nesvítící negativní kontroly (P) pro dané měření v procentech, tedy: $(E-P)/(D-P) \times 100$. Tento poměr udává relativní zůstatek fluorescence (relativní míru fluorescence), odrážející „míru posttranskripčního umlčení,“ kde 100 % značí bez umlčování a 0 % kompletní umlčení.

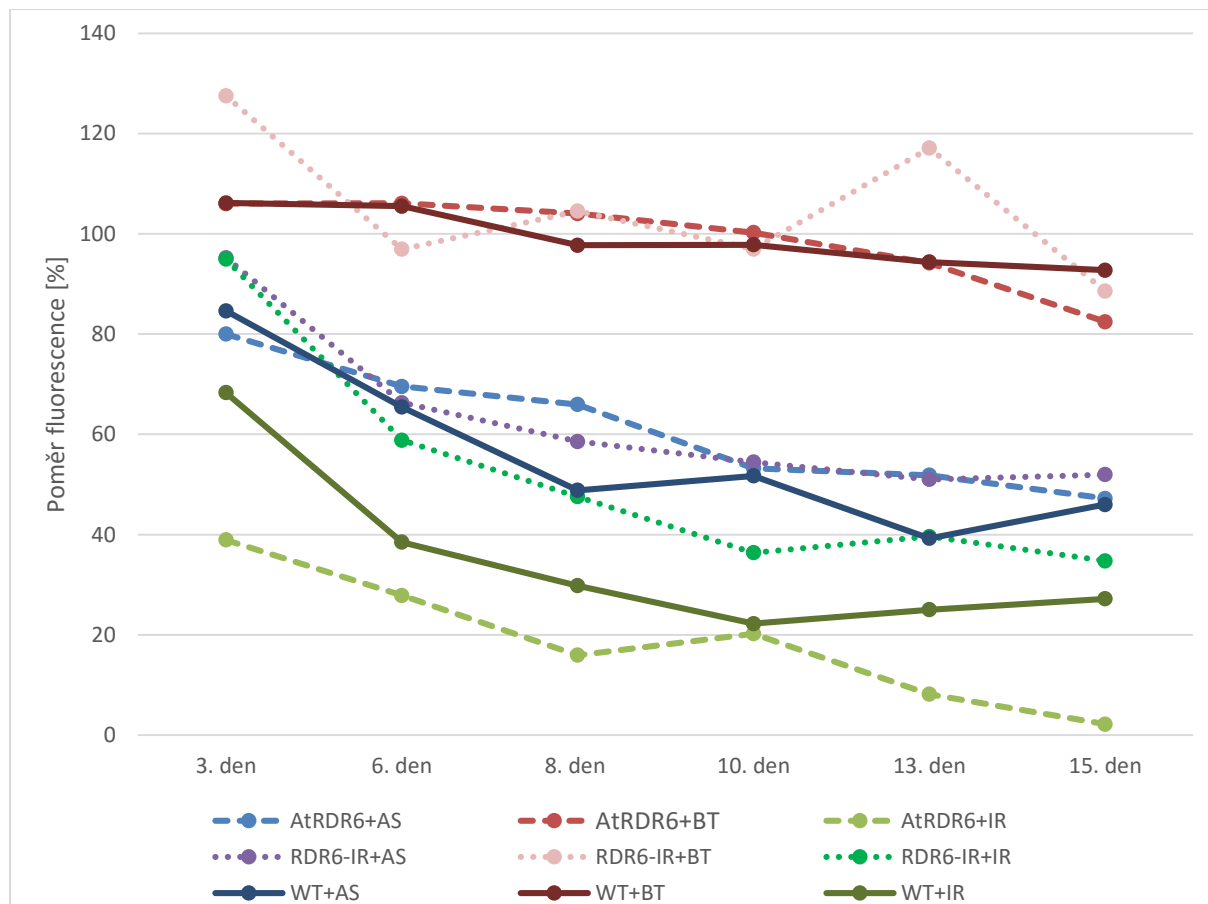
Již ve 3. den od přesazení kalusů na indukční a kontrolní médium je jasně patrný vliv typu genetického pozadí i inducibilního konstruktů na míru umlčení (ANOVA s pevnými efekty, p-hodnoty 4×10^{-5} a 4×10^{-9} ; viz graf 4.12). Významně se liší genetické pozadí *RDR6-IR* od *AtRDR6* a *WT* (Tukeyho test, p-hodnoty = $1,8 \times 10^{-4}$ a 0,035). Vzájemná rozdílnost poměrů fluorescence je prokazatelná u všech kombinací: *GFP-AS* oproti *GFP-IR* (Tukeyho test, p-hodnota = 0,028), *GFP-IR* proti *GFP-BT* (Tukeyho test, p-hodnota = 1×10^{-7}) a *GFP-AS* oproti *GFP-BT* (Tukeyho test, p-hodnota = 4×10^{-4}). V případě porovnávání inducibilních konstruktů v rámci genetického pozadí *RDR6-IR* byl poměr *RDR6-IR+GFP-BT* průkazně vyšší oproti *RDR6-IR+GFP-AS* a *RDR6-IR+GFP-IR* (STGLH, p-hodnoty = 0,01 a 0,02). Celkově nejnižší poměr fluorescence měla v tento den varianta *AtRDR6-IR*, která dosáhla výraznějšího umlčení oproti *AtRDR6+GFP-AS* a *AtRDR6+GFP-BT* (STGLH, p-hodnoty = 0,002 a 1×10^{-4}). U variant s genetickým pozadím *WT* byl signifikantní pokles poměru fluorescence pouze u *WT+GFP-IR* vůči *WT+GFP-BT* (STGLH, p-hodnota = $1,5 \times 10^{-3}$). Pokud byl srovnáván vždy stejný inducibilní konstrukt na různých genetických pozadích, byl nalezen významně větší pokles poměru fluorescence *AtRDR6+GFP-IR* oproti *RDR6-IR+GFP-IR* (STGLH, p-hodnota = 1×10^{-4}).

V 6. den měření má signifikantní vliv na míru umlčení už jen typ inducibilního konstruktů (ANOVA s pevnými efekty, p-hodnota = 2×10^{-12}). Celkově má *GFP-BT* vyšší poměr fluorescence oproti *GFP-AS* a *GFP-IR* (Tukeyho test, p-hodnoty = 4×10^{-6} a $< 1 \times 10^{-7}$). *GFP-IR* má celkově nejlepší efektivitu umlčení a signifikantně se liší od *GFP-AS* (Tukeyho test, p-hodnota = 0,004).

Konkrétně se jedná opět o rozdíl mezi *RDR6-IR+GFP-IR* a *RDR6-IR+GFP-BT* (STGLH, p-hodnota = 0,016). U genetického pozadí *AtRDR6* byly významné rozdíly u všech tří možných kombinací inducibilních konstruktů, tedy varianta *AtRDR6+GFP-IR* měla výrazně nižší poměr fluorescence v porovnání s *AtRDR6+GFP-AS* (STGLH, p-hodnota = 0,008) i s *AtRDR6+GFP-BT* (STGLH, p-hodnota $< 1 \times 10^{-4}$). Zároveň *AtRDR6+GFP-AS* měla vyšší pokles fluorescence než *AtRDR6+GFP-BT* (STGLH, p-hodnota = 0,023). Na genetickém pozadí *WT* byl poměr

fluorescence *WT+GFP-BT* výrazně vyšší oproti *WT+GFP-AS* a *WT+GFP-IR* (STGLH, p-hodnoty = $8,3 \times 10^{-4}$ a $< 1 \times 10^{-4}$).

Graf 4.12: Průměrné poměry intenzit fluorescence (%) kalusů BY-2 pro jednotlivé varianty.



Tabulka 4.4: Směrodatné odchylky míry umlčení vztahující se ke svrchnímu grafu

varianta	3. den	6. den	8. den	10. den	13. den	15. den
<i>AtRDR6+AS</i>	36,98	41,18	41,81	38,35	43,25	42,25
<i>AtRDR6+BT</i>	72,95	65,99	79,93	76,58	84,95	82,60
<i>AtRDR6+IR</i>	29,43	28,79	35,75	38,51	35,31	43,04
<i>RDR6-IR+AS</i>	34,82	34,91	31,36	34,50	37,46	43,88
<i>RDR6-IR+BT</i>	72,85	73,18	67,26	69,89	85,29	89,07
<i>RDR6-IR+IR</i>	43,75	39,55	45,65	55,48	52,46	57,07
<i>WT+AS</i>	28,77	31,21	32,13	41,76	33,52	46,37
<i>WT+BT</i>	32,69	42,41	42,67	43,45	40,64	44,05
<i>WT+IR</i>	25,06	28,44	32,64	29,81	32,62	37,04

V 8. den je stále výrazný vliv inducibilního konstruktů (ANOVA s pevnými efekty, p-hodnoty = 1×10^{-14}) a rozdíly jsou průkazné pro všechny tři navzájem: *GFP-IR* oproti *GFP-AS* a *GFP-BT* (Tukeyho test, p-hodnoty = 0,0045 a $< 1 \times 10^{-7}$), *GFP-AS* oproti *GFP-BT* (Tukeyho test, p-hodnota = 1×10^{-7}). Významně vyšší poměr fluorescence měla varianta *RDR6-IR+GFP-BT* oproti *RDR6-IR+GFP-AS* a *RDR6-IR+GFP-IR* (STGLH, p-hodnoty = 0,001 a 1×10^{-4}). U genetického pozadí *AtRDR6* se od sebe liší všechny tři varianty navzájem: *AtRDR6+GFP-IR* s nejefektivnějším umlčením vůči *AtRDR6+GFP-AS* a *AtRDR6+GFP-BT* (STGLH, p-hodnoty = 0,001 a $< 1 \times 10^{-4}$) a také *AtRDR6+GFP-AS* vůči *AtRDR6+GFP-BT*, která umlčuje nejhůře (STGLH, p-hodnota = 0,021). Na genetickém pozadí *WT* byl poměr fluorescence *WT+GFP-BT* opět výrazně vyšší oproti *WT+GFP-AS* a *WT+GFP-IR* (STGLH, obě p-hodnoty $< 1 \times 10^{-4}$).

V 10. den je stále výrazný vliv inducibilního konstruktů (ANOVA s pevnými efekty, p-hodnoty = $1,2 \times 10^{-13}$). Stále je nejvýraznější rozdíl *GFP-BT* vůči *GFP-AS* a *GFP-IR* (Tukeyho test, p-hodnoty = 2×10^{-7} a $< 1 \times 10^{-7}$). Průkazný je i vyšší relativní pokles fluorescence *GFP-IR* oproti *GFP-AS* (Tukeyho test, p-hodnota = 0,0046). Při srovnání konkrétních variant významně nejméně umlčela varianta *RDR6-IR+GFP-BT* oproti *RDR6-IR+GFP-AS* a *RDR6-IR+GFP-IR* (STGLH, p-hodnoty = 0,008 a $1,7 \times 10^{-3}$). U genetického pozadí *AtRDR6* se významně liší *AtRDR6+GFP-BT* od *AtRDR6+GFP-AS* a *AtRDR6+GFP-IR* (STGLH, p-hodnoty = 0,006 a $< 1 \times 10^{-4}$). Na genetickém pozadí *WT* byl poměr fluorescence *WT+GFP-BT* opět výrazně vyšší oproti *WT+GFP-AS* a *WT+GFP-IR* (STGLH, p-hodnoty 6×10^{-4} a $< 1 \times 10^{-4}$).

Ve 13. den je stále výrazný pouze vliv inducibilního konstruktů (ANOVA s pevnými efekty, p-hodnoty = $4,7 \times 10^{-15}$), což je dáno zřetelným rozdílem v efektivitě umlčení u *GFP-BT* v porovnání s *GFP-AS* a *GFP-IR* (Tukeyho test, p-hodnoty = 2×10^{-7} a $< 1 \times 10^{-7}$). Při porovnávání jednotlivých variant významně nejméně umlčela varianta *RDR6-IR+GFP-BT* oproti *RDR6-IR+GFP-AS* a *RDR6-IR+GFP-IR* (STGLH, obě p-hodnoty $< 1 \times 10^{-4}$). U genetického pozadí *AtRDR6* se od sebe liší všechny tři varianty navzájem: *AtRDR6+GFP-IR* s nejefektivnějším umlčením vůči *AtRDR6+GFP-AS* a *AtRDR6+GFP-BT* (STGLH, p-hodnoty = 0,02 a $< 1 \times 10^{-4}$) a také *AtRDR6+GFP-AS* vůči *AtRDR6+GFP-BT* (STGLH, p-hodnota = 0,021). Na genetickém pozadí *WT* byl poměr fluorescence *WT+GFP-BT* opět výrazně vyšší oproti *WT+GFP-AS* a *WT+GFP-IR* (STGLH, obě p-hodnoty $< 1 \times 10^{-4}$).

V 15. den je stále výrazný pouze vliv inducibilního konstruktů (ANOVA s pevnými efekty, p-hodnoty = 6×10^{-11}), opět díky rozdílu mezi *GFP-BT* a *GFP-AS* s *GFP-IR* (Tukeyho test, p-hodnoty = $4,4 \times 10^{-5}$ a $< 1 \times 10^{-7}$). Významně méně umlčela varianta *RDR6-IR+GFP-BT* oproti *RDR6-IR+GFP-IR* (STGLH, p-hodnota = 0,003). U genetického pozadí *AtRDR6* se liší

AtRDR6+GFP-IR od *AtRDR6+GFP-AS* a *AtRDR6+GFP-BT* (STGLH, p-hodnoty = 0,022 a 1×10^{-4}). Na genetickém pozadí *WT* byl poměr fluorescence *WT+GFP-BT* opět výrazně vyšší oproti *WT+GFP-AS* a *WT+GFP-IR* (STGLH, p-hodnoty 0,001 a $< 1 \times 10^{-4}$).

4.3.3 Rychlost poklesu relativní míry fluorescence (%)

Rychlost poklesu fluorescence jednotlivých variant byla hodnocena prostřednictvím rozdílu poměrů fluorescence mezi různými dny měření.

V případě porovnávání rozdílu mezi poměrem 3. dne a průměrem poměrů 8. a 10. dne má na rychlost poklesu fluorescence vliv jak typ genetického pozadí, tak typ inducibilního konstruktů (ANOVA s pevnými efekty, p-hodnoty = 6×10^{-4} a 3×10^{-5}). Konkrétně se jedná o nižší rychlost poklesu fluorescence u *WT+GFP-BT* oproti *WT+GFP-AS* a *WT+GFP-IR* (STGLH, p-hodnoty 0,02 a 0,003). Na hranici významnosti se pohybuje také rozdíl mezi strmostí poklesu u *AtRDR6+GFP-IR* a *RDR6-IR+GFP-IR* (STGLH, p-hodnota 0,045).

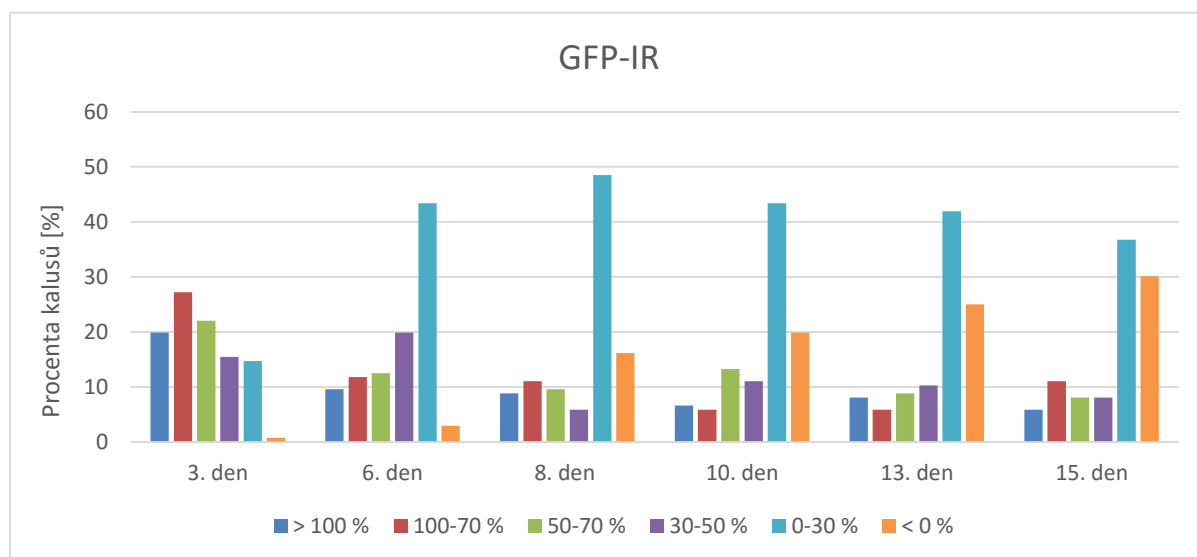
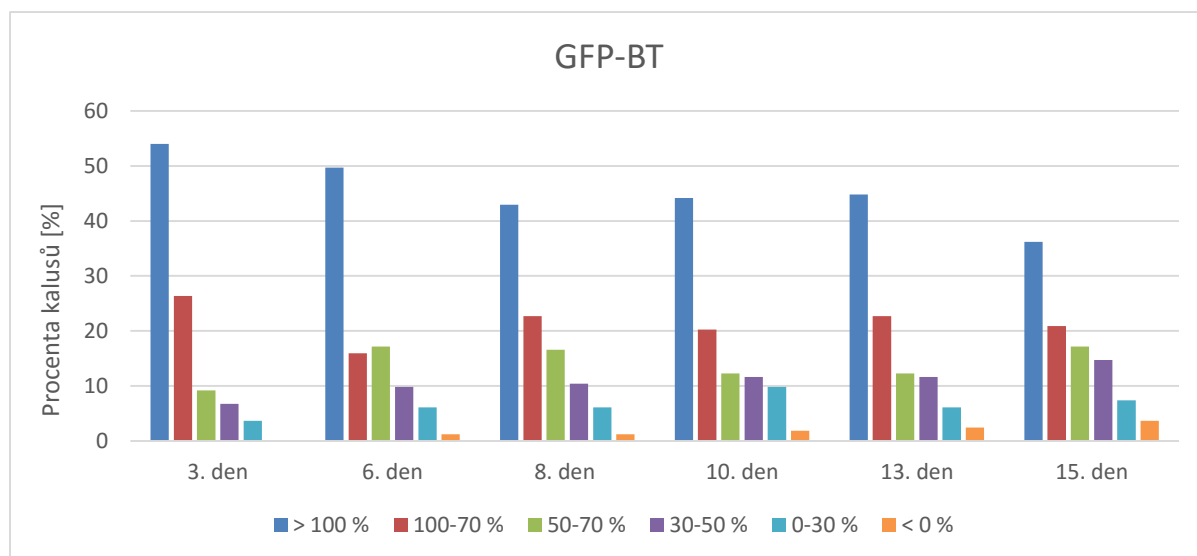
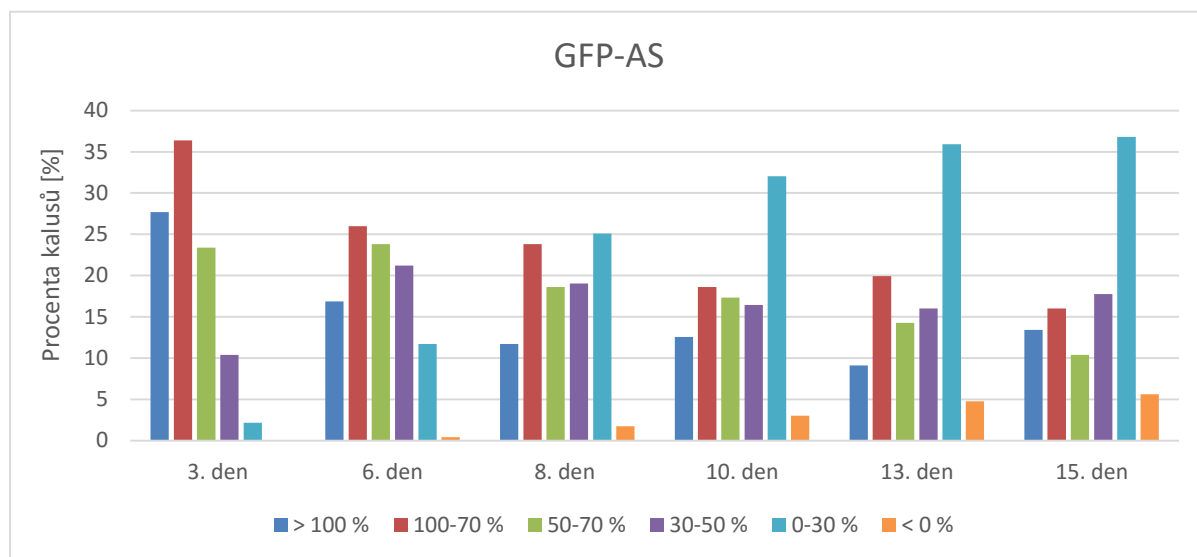
V případě porovnávání rozdílu mezi poměrem 3. dne a průměrem poměrů 13. a 15. dne má na rychlost poklesu fluorescence vliv pouze typ inducibilního konstruktů (ANOVA s pevnými efekty, p-hodnota = 2×10^{-4}). Konkrétně se jedná o nižší rychlost poklesu fluorescence u *WT+GFP-BT* oproti *WT+GFP-AS* (STGLH, p-hodnota 0,03).

V případě porovnávání rozdílu mezi průměrem poměrů 3. a 6. dne a průměrem poměrů 13 a 15. dne, má na rychlost poklesu fluorescence vliv pouze typ inducibilního konstruktů (ANOVA s pevnými efekty, p-hodnota = 0,001). Konkrétně se jedná o nižší rychlost poklesu fluorescence u *RDR6-IR+GFP-BT* oproti *RDR6-IR+GFP-IR* (STGLH, p-hodnota 0,02).

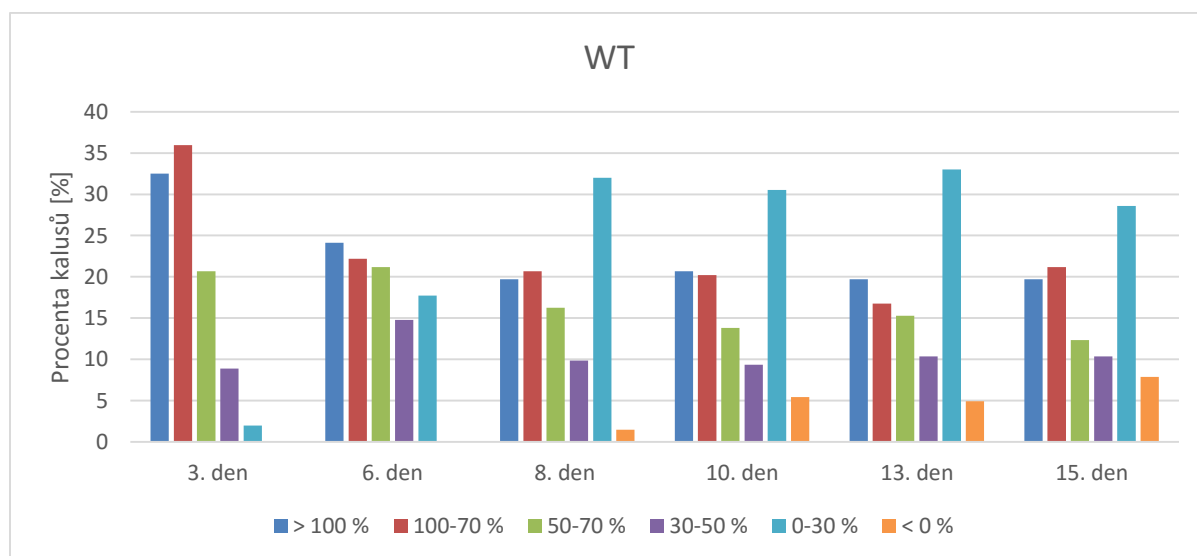
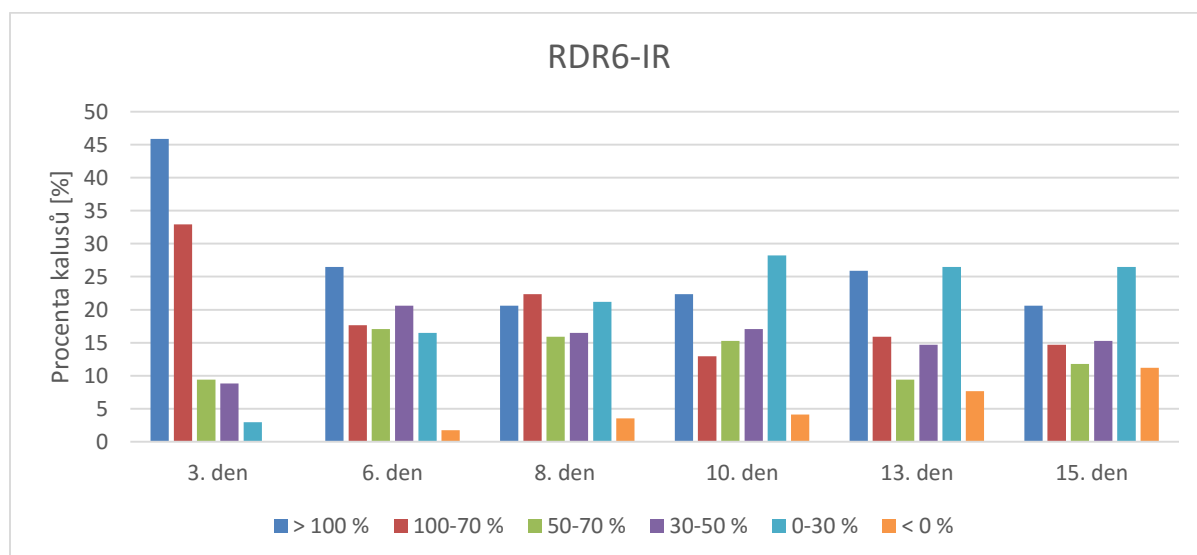
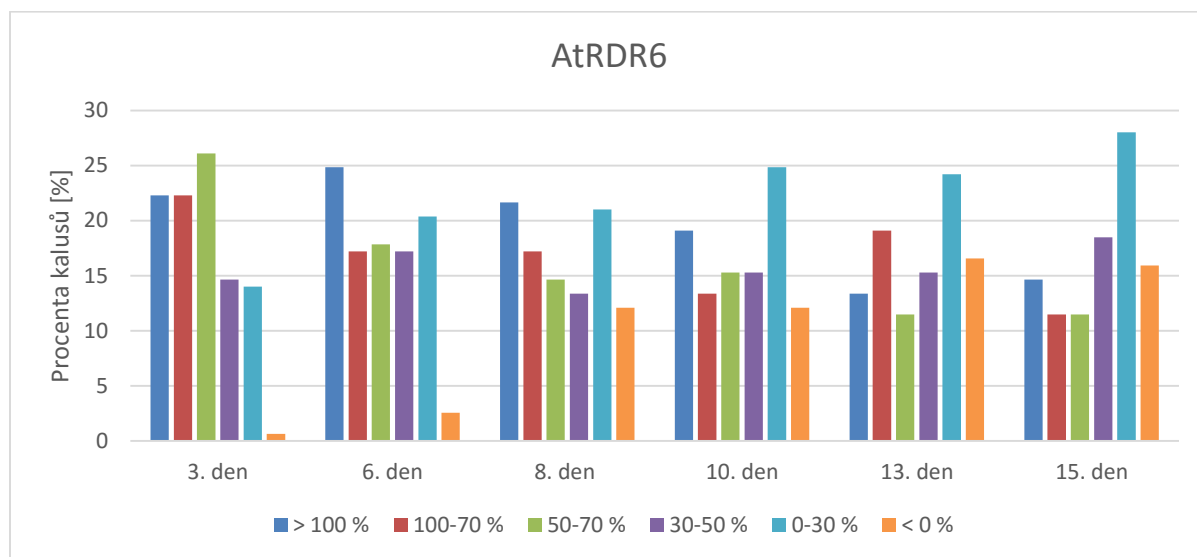
V případě porovnávání rozdílu mezi průměrem poměrů 6. a 8. dne a průměrem poměrů 13. a 15. dne již není průkazný rozdíl mezi rychlostí poklesu fluorescence u žádné z variant (STGLH), ani celkový vliv typu inducibilního konstruktů či genetického pozadí (ANOVA s pevnými efekty).

Při rozdělení kalusů podle relativního poklesu fluorescence (%) do 6 kategorií: do 0 %; 0,001 až 30 %; 30,001 až 50 %; 50,001 až 70 %, 70,001 až 100 % a od 100,001 % výše, se distribuce u jednotlivých variant prokazatelně liší ve všech dnech měření (Pearsonův χ^2 test, všechny p-hodnoty $< 2 \times 10^{-16}$).

Grafy 4.13: Procentuální zastoupení kalusů rozdělených do 6 kategorií podle relativního poklesu fluorescence (%) pro jednotlivé inducibilní konstrukty.



Grafy 4.14: Procentuální zastoupení kalusů rozdělených do 6 kategorií podle relativního poklesu fluorescence (%) pro jednotlivá genetická pozadí.



4.4 Indukce umlčování exprese GFP třemi různými inducibilními konstrukty na třech genetických pozadích ve vybraných liniích BY-2 pěstovaných formou suspenzních kultur

Po ukončení sledování fluorescence kalusů bylo od každé varianty vybráno 10 – 20 kalusů, které po 15 dnech na indukci dosáhly nejvýraznějšího umlčení a zároveň v průběhu celého měření jejich fluorescence stabilně klesala, nebo se alespoň tomuto trendu nejvíce blížila. Klony těchto kalusů na médiu s DMSO byly přesazeny na nové médium pouze s přidavkem klaforanu. U variant obsahujících *RDR6-IR* bylo nejdříve provedeno ověření hladiny exprese endogenní *RDR6* v kalusech prostřednictvím RT-PCR.

Vybrané kalusy byly převedeny do formy suspenzí, u nichž byla opět ověřena hladina exprese tentokrát u *NtRDR6* i *AtRDR6* pomocí RT-PCR, na základě které byly vybrány 2 až 4 klony od každé varianty pro sledování změn fluorescence po indukci estradiolem na průtokovém cytometru. V případě variant s genetickým pozadím divoké formy (*WT*) RT-PCR prováděna nebyla a vybrané klony byly rovnou použity k dalšímu měření fluorescence.

U takto vybraných klonů byla po dobu 15 dní měřena intenzita fluorescence na průtokovém cytometru. Měření bylo prováděno každé 2 – 3 dny, vždy střídavě na dva/ tři a čtyři/ pět dnů starých buňkách. Jako „svítící“ byly označeny buňky, jejichž intenzita fluorescence byla vyšší, než intenzita fluorescence netransformované negativní kontroly.

4.4.1 Absolutní intenzity fluorescence na kontrolním a indukčním médiu

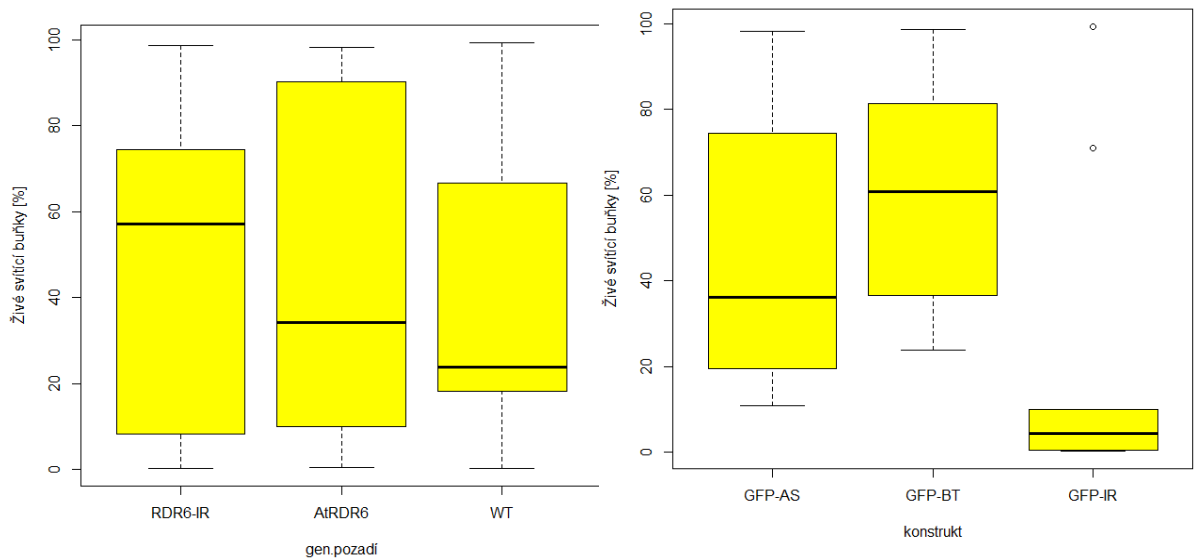
Byla porovnána celková průměrná intenzita fluorescence všech živých buněk každé linie BY-2 na kontrolním médiu s DMSO v celém průběhu měření. Žádný rozdíl není statisticky průkazný. Podobně, ani rozdíly mezi intenzitou fluorescence živých buněk na indukčním médiu zprůměrované za všechny dny měření nejsou statisticky významné.

4.4.2 Množství živých a „svítících“ buněk na kontrolním a indukčním médiu

Průměrná množství „svítících“ živých buněk v kontrolním médiu vyjádřená v procentech pro každou linii BY-2 se mezi žádnou z variant významně nelišila a ani vliv typu inducibilního konstruktu či genetického pozadí nebyl průkazný. Naproti tomu v případě množství živých „svítících“ buněk v indukčním médiu, je průkazný vliv konstruktu (ANOVA, p-hodnota =

0,041). Konkrétně je signifikantní nižší množství svítících buněk u *GFP-IR* oproti *GFP-BT* (Tukeyho test, p-hodnota = 0,035).

Graf 4.15: Krabicové diagramy znázorňující celkové průměrné množství „svítících“ živých buněk v indukčním médiu u jednotlivých genetických pozadí a inducibilních konstruktů za všechny dny měření. Černá čára značí střední hodnotu, úsečky představují horní a dolní kvartil, prázdná kolečka odlehlá pozorování.



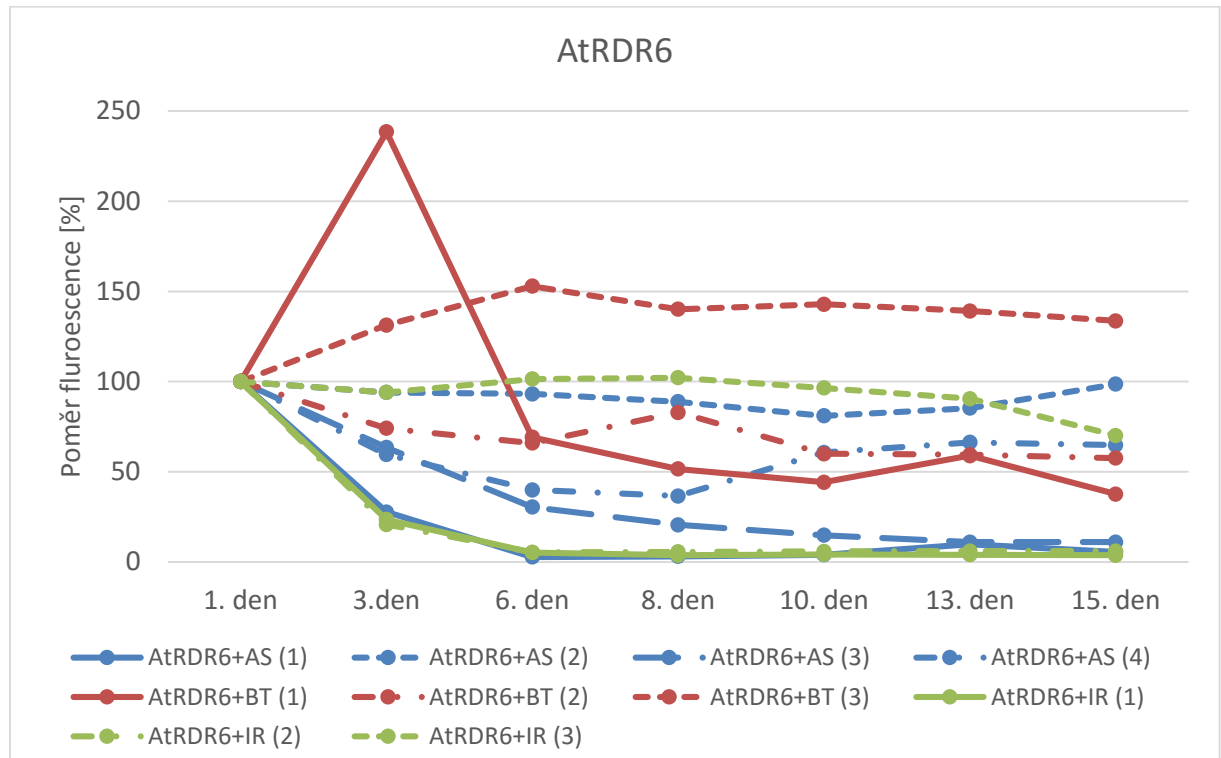
4.4.3 Relativní míra fluorescence (%)

Míra PTGS GFP byla obdobně jako v případě kalusů BY-2 stanovena u jednotlivých suspenzních linií BY-2 jako poměr průměrů intenzit fluorescence všech živých buněk v indukčním médiu s estradiolem (E) a v kontrolním médiu s DMSO (D) vynásobený 100 v každém dni měření, tedy $E/D \times 100$. Tento poměr udává relativní zůstatek fluorescence (relativní míru fluorescence), odrážející „míru posttranskripčního umlčení,“ kde 100 % značí bez umlčování a 0 % kompletní umlčení.

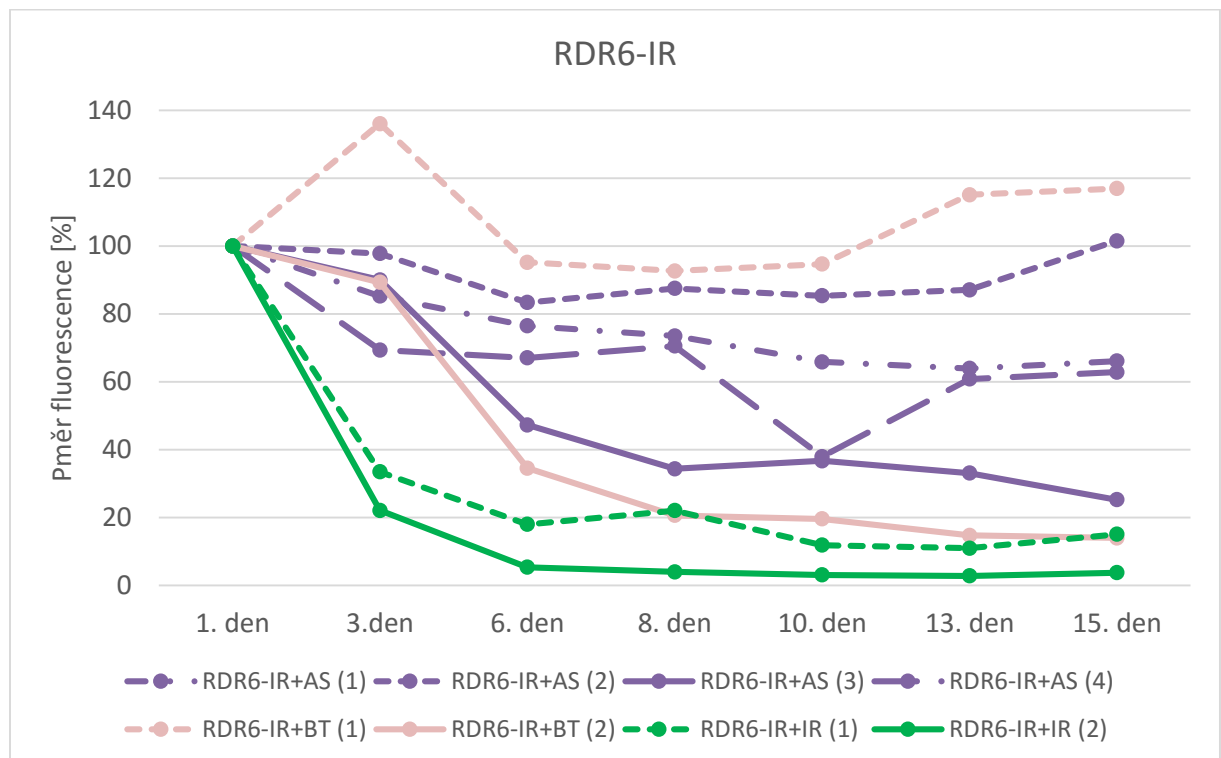
Ve 3. den má na míru umlčení vliv typ inducibilního konstruktů (ANOVA, p-hodnota = 0,0015), což dokumentuje i signifikantně vyšší poměr intenzit fluorescence u *GFP-BT* proti *GFP-IR* a *GFP-AS* (Tukeyho test, p-hodnoty = 0,0016 a 0,012). Při srovnání jednotlivých variant mezi sebou platí, že u *AtRDR6+GFP-BT* je poměr intenzit fluorescence vyšší než u *AtRDR6+GFP-IR* (STGLH, p-hodnota = 0,029).

Následující dny měření již není průkazný žádný rozdíl v míře umlčení mezi jednotlivými variantami, ani vliv typu inducibilního konstruktů nebo genetického pozadí.

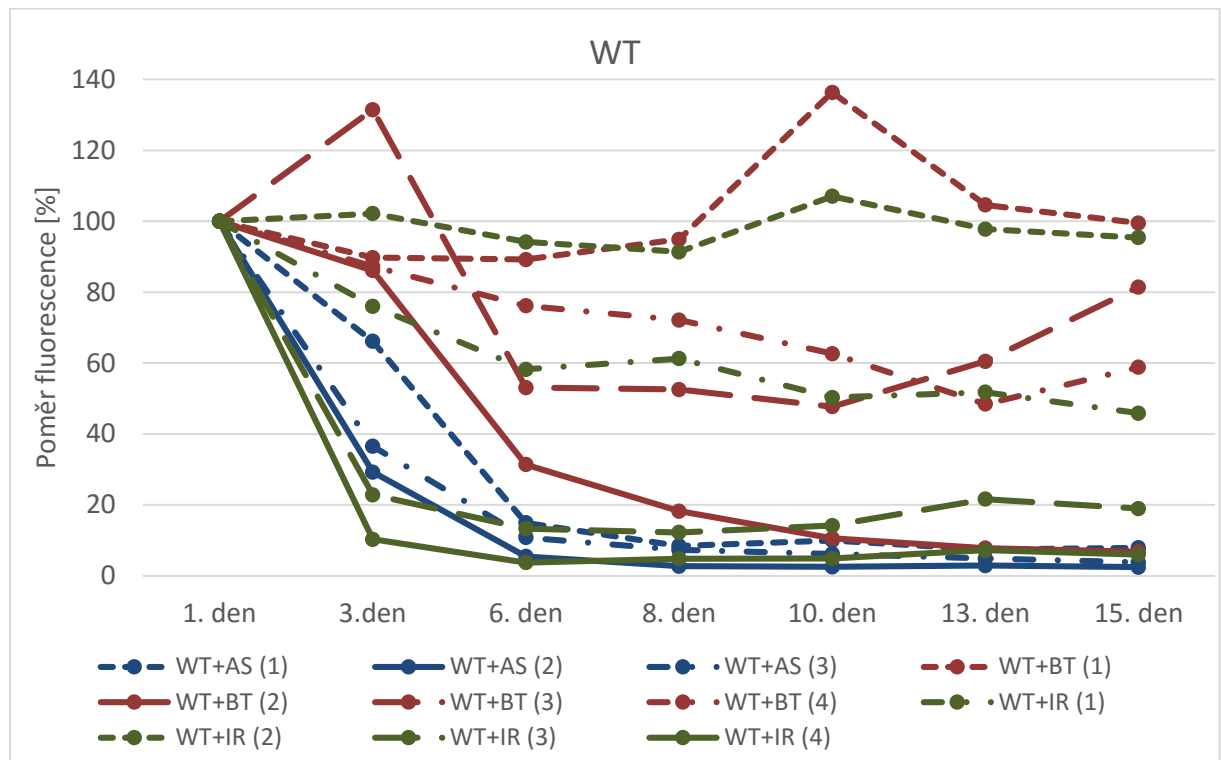
Graf 4.16: Poměr intenzit fluorescence (%) jednotlivých klonů suspenzních kultur BY-2 pro varianty s genetickým pozadím *AtRDR6* v jednotlivé dny měření.



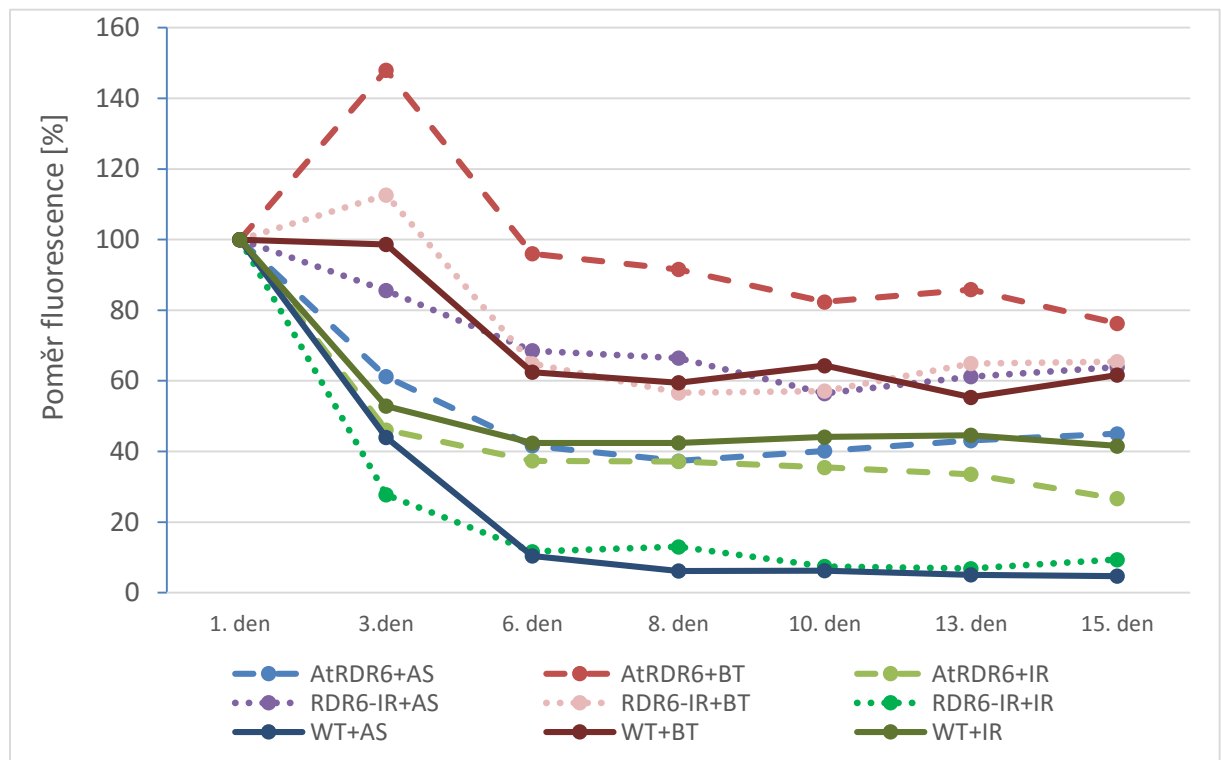
Graf 4.17: Poměr intenzit fluorescence (%) jednotlivých klonů suspenzních kultur BY-2 pro varianty s genetickým pozadím *RDR6-IR* v jednotlivé dny měření.



Graf 4.18: Poměr intenzit fluorescence (%) jednotlivých klonů suspenzních kultur BY-2 pro varianty s genetickým pozadím WT v jednotlivé dny měření.



Graf 4.19: Průměrné poměry intenzit fluorescence (%) všech variant u suspenzních kultur BY-2 v jednotlivé dny měření.



4.4.4 Rychlost poklesu poměru fluorescence suspenzních linií, jejichž relativní míra fluorescence klesla pod 40 %

Cílem sledování dynamicky PTGS na suspenzních liniích, bylo mj. zhodnocení rychlosti nástupu umlčování u nejlépe umlčujících klonů, proto byly vybrány suspenzní linie, u kterých došlo k poklesu relativní fluorescence na méně než 40 % v poslední den, a na tomto souboru byla provedena statistická analýza.

Rychlost postupu PTGS u těchto suspenzních linií byla posuzována prostřednictvím porovnávání rozdílů mezi poměry míry fluorescence v 1. a 3. dni, v 1. a 6. dni. Dále byl porovnán rozdíl mezi poměrem fluorescence v 1. dni a průměrem poměrů 13. a 15. dne.

V případě rozdílu mezi 1. a 3. dnem je významný vliv typu konstruktů i genetického pozadí (ANOVA, p-hodnoty = $1,6 \times 10^{-4}$ a 0,04). Signifikantní jsou rozdíly mezi všemi konstrukty navzájem; *GFP-IR* průkazně umlčel nejrychleji v porovnání s *GFP-AS* a *GFP-BT* (Tukeyho test, p-hodnoty = 0,028 a $1,3 \times 10^{-4}$) a *GFP-AS* umlčel rychleji než *GFP-BT* (Tukeyho test, p-hodnota = $8,2 \times 10^{-4}$). Významný je také rozdíl mezi pozadími *WT* a *AtRDR6*, kdy o trochu lépe umlčuje pozadí *WT* (Tukeyho test, p-hodnota = 0,034).

Rozdílná rychlost poklesu mezi 1. a 6. dnem je průkazně dána typem konstruktů (ANOVA, p-hodnota = $5,1 \times 10^{-3}$). Jedná se o signifikantně pomalejší umlčování *GFP-BT* oproti *GFP-AS* a *GFP-IR* (Tukeyho test, p-hodnoty = 0,028 a $4,1 \times 10^{-3}$). V případě rozdílu mezi 1. a průměrem 13. a 15. dne, který popisuje schopnost daných linií umlčet expresi *GFP*, je situace stejná, pouze p-hodnoty jsou vyšší (ANOVA, p-hodnota = 0,02).

4.4.5 Poměr živých a „svítících“ buněk na indukčním a kontrolním médiu

V případě hodnocení poměrů množství živých „svítících“ buněk v indukčním a kontrolním médiu u jednotlivých variant je ve 3. dni statisticky významný rozdíl mezi *AtRDR6+GFP-BT* a *AtRDR6+GFP-IR* (STGLH, p-hodnota = 0,031); celkově je tedy průkazný vliv konstruktů (ANOVA, p-hodnota = 0,0081). Tukeyho test potvrdil tento trend mezi variantami s *GFP-BT* a *GFP-IR* obecně (p-hodnota = 0,0066).

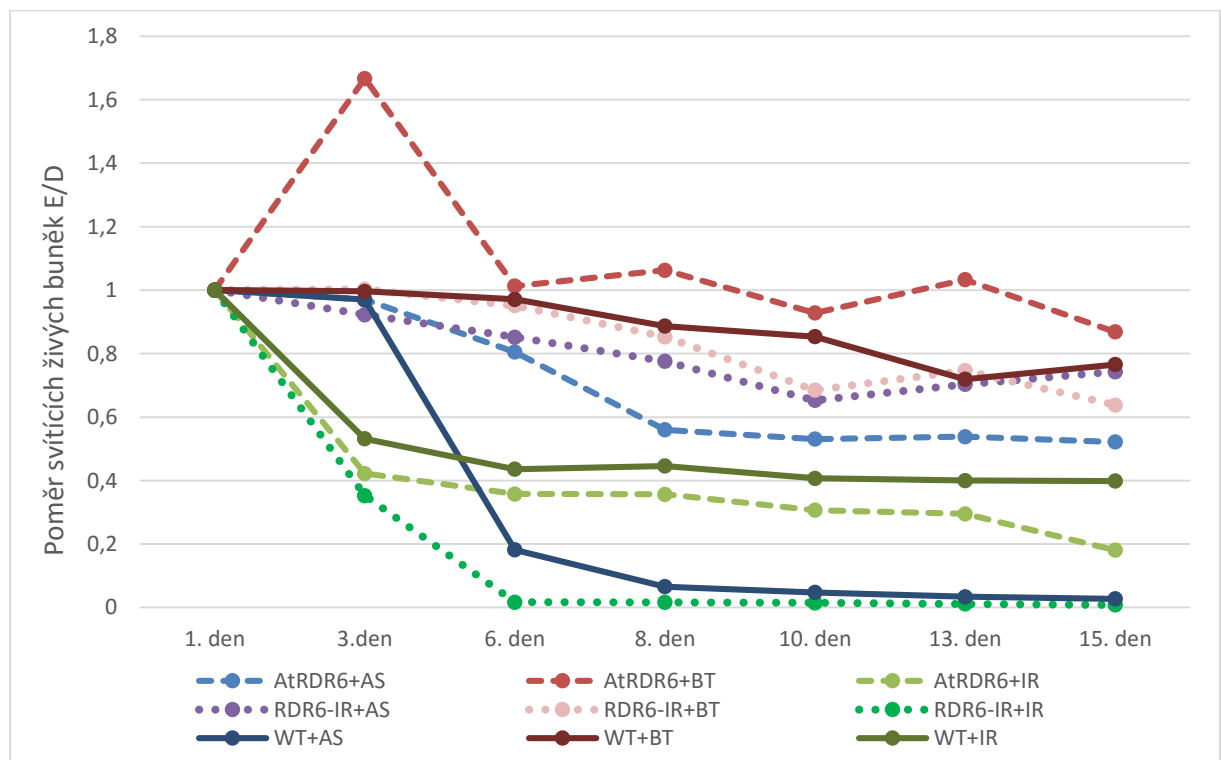
V 6. den má na poměr živých „svítících“ buněk typ konstruktů stále vliv (ANOVA, p-hodnota = $6,1 \times 10^{-4}$). Obecně je významný vyšší poměr počtu živých „svítících“ buněk u *GFP-BT* oproti *GFP-AS* a *GFP-IR* (Tukeyho test, p-hodnoty = 0,045 a $4,1 \times 10^{-4}$). Při srovnání konkrétních variant vychází jako signifikantní nižší poměr množství živých „svítících“ buněk u *RDR6-IR+GFP-IR* oproti *RDR6-IR+GFP-AS* a *RDR6-IR+GFP-BT* (STGLH, p-hodnoty = 0,034).

a 0,0027). Dále je průkazný rozdíl mezi *WT+GFP-AS* a *WT+GFP-BT* (STGLH, p-hodnoty = 0,021).

V 8. den má na poměr živých „svítících“ buněk typ konstruktů stále vliv (ANOVA, p-hodnota = 0,0026). Obecně je významný vyšší poměr počtu živých „svítících“ buněk u *GFP-BT* oproti *GFP-AS* a *GFP-IR* (Tukeyho test, p-hodnoty = 0,02 a 0,0027). Při srovnání konkrétních variant vychází jako signifikantní rozdíl mezi *WT+GFP-AS* a *WT+GFP-BT* (STGLH, p-hodnoty = 0,036).

V 10. den má na poměr živých „svítících“ buněk typ konstruktů stále vliv (ANOVA, p-hodnota = 0,018). Obecně je významný vyšší poměr počtu živých „svítících“ buněk u *GFP-BT* oproti *GFP-IR* (Tukeyho test, p-hodnota = 0,018). Významné rozdíly mezi jednotlivými variantami nebyly nalezeny. Pro 13. a 15. den je situace stejná, p-hodnoty se oproti 10. dni liší až od 3. desetinného místa.

Graf 4.20: Průměrné poměry procentuálního množství živých „svítících“ buněk BY-2 u jednotlivých variant v indukčním (E) a kontrolním médiu (D) v jednotlivé dny měření.



4.4.6 Rychlost poklesu poměru živých „svítících“ buněk na indukčním a kontrolním médiu suspenzních linií, jejichž relativní míra fluorescence klesla pod 40 %

Rychlost postupu PTGS u vybraných suspenzních linií prostřednictvím porovnávání rozdílů mezi poměry množství „svítících“ buněk v různé dny byla hodnocena jako rozdíl mezi poměrem 1. dne a 3. dne, mezi poměrem 1. dne a 6. dne a dále mezi poměrem 1. dne a průměry poměrů 13. a 15. dne.

V případě rozdílu mezi 1. a 3. dnem je významný vliv typu konstruktů (ANOVA, p-hodnota = $4,8 \times 10^{-5}$). Signifikantní jsou rozdíly mezi všemi konstrukty navzájem; *GFP-IR* průkazně umlčelo nejrychleji v porovnání s *GFP-AS* a *GFP-BT* (Tukeyho test, p-hodnoty = $2,7 \times 10^{-4}$ a $5,7 \times 10^{-5}$) a *GFP-AS* umlčel rychleji než *GFP-BT* (Tukeyho test, p-hodnota = 0,01).

Rozdílná rychlost poklesu mezi 1. a 6. dnem je průkazně dána typem konstruktů (ANOVA, p-hodnota = 3×10^{-4}). Jedná se o signifikantně rychlejší umlčování *GFP-IR* oproti *GFP-AS* a *GFP-BT* (Tukeyho test, p-hodnoty = $8,3 \times 10^{-4}$ a $5,2 \times 10^{-4}$). V případě rozdílu mezi 1. a průměrem 13. a 15. dne se na rozdílech významně podílí vliv konstruktů (ANOVA, p-hodnota = $7,5 \times 10^{-4}$). Stále platí, že nejlépe umlčely varianty *GFP-IR* v porovnání s *GFP-AS* a *GFP-BT* (Tukeyho test, p-hodnoty = $8,9 \times 10^{-3}$ a $6,8 \times 10^{-4}$). *GFP-BT* umlčely méně než *GFP-AS* (Tukeyho test, p-hodnota = 0,021).

4.5 Obnovování exprese GFP na dvou genetických pozadích v suspenzních kulturách BY-2 po vysazení β -estradiolu

Suspenzní linie s genetickým pozadím *WT* a *AtRDR6* byly po ukončení experimentu s indukcí umlčování v 15. den zpasážovány do nových MS médií bez přídavku β -estradiolu nebo DMSO. Následující dny (od 20. dne) byla měřena rychlost obnovování fluorescence stejným způsobem jako v případě indukce umlčování, s tím rozdílem, že měření probíhalo jen jednou týdně vždy na 4 dny starých kulturách. Do tohoto experimentu nebyla použita linie *WT+IR(2)*, protože na indukci estradiolem přestala reagovat.

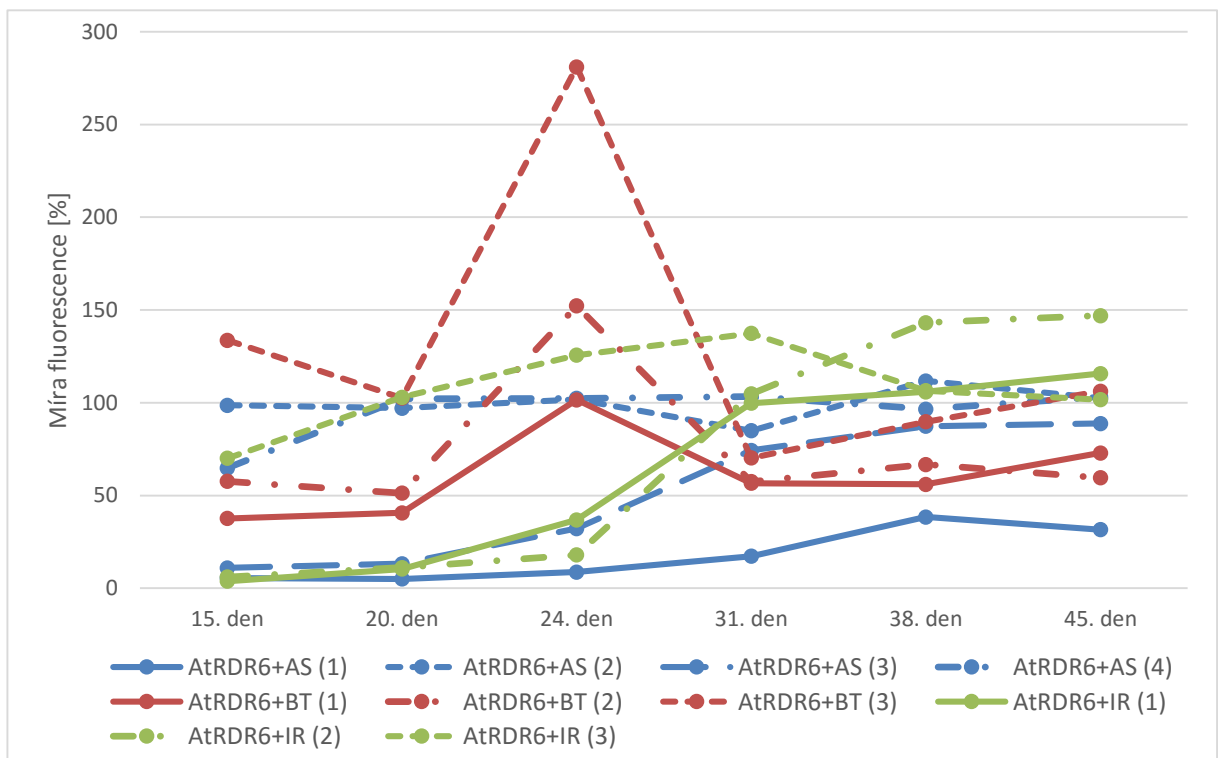
Při obnovování exprese *GFP* by účast *RDR6* neměla být potřebná. Vzhledem k tomuto předpokladu nebylo do tohoto experimentu genetické pozadí *RDR6-IR* použito, protože by se zřejmě chovalo podobně jako genetické pozadí *WT*. Genetické pozadí *AtRDR6* bylo vybráno pro případ, že by vysoká hladina *RDR6* měla na obnovování exprese negativní vliv. Navíc za předpokladu, že by genetické pozadí *RDR6-IR* mělo umlčovat nejhůře, nemuselo by být obnovení fluorescence jasně patrné.

4.5.1 Relativní míra fluorescence (%)

Hodnocení výsledků probíhalo podobně jako v případě experimentu s indukcí umlčování. Opět byla stanovena míra fluorescence GFP (%) u jednotlivých suspenzních linií BY-2 jako poměr průměrů intenzit fluorescence všech živých buněk, které se dříve nacházely v indukčním médiu (E) a v kontrolním médiu (D) vynásobený 100 v každém dni měření, tedy $E/D \times 100$.

20. a 24. den stále nejsou průkazné žádné rozdíly mezi procentuálními poměry fluorescence. 31. den měření je patrný vliv typu konstruktů (ANOVA, p-hodnota = 0,017), a to konkrétně mezi *GFP-IR* a *GFP-AS* (Tukeyho test, p-hodnota = 0,015). Při srovnání jednotlivých variant má *WT+GFP-IR* prokazatelně vyšší relativní fluorescenci oproti *WT+GFP-AS* (Tukeyho test, p-hodnota = 0,035). 38. den zůstává situace stejná, pouze se došlo k mírnému zvýšení p-hodnot. 45. den je vliv konstruktů ještě na hranici významnosti (ANOVA, p-hodnota = 0,047), ale jiné rozdíly již signifikantní nejsou.

Graf 4.21 Poměry intenzit fluorescence (%) jednotlivých suspenzních linií s genetickým pozadím *AtRDR6* po vysazení estradiolu v jednotlivé dny měření. 15. den je posledním dnem kultivace buněk BY-2 v indukčním médiu.



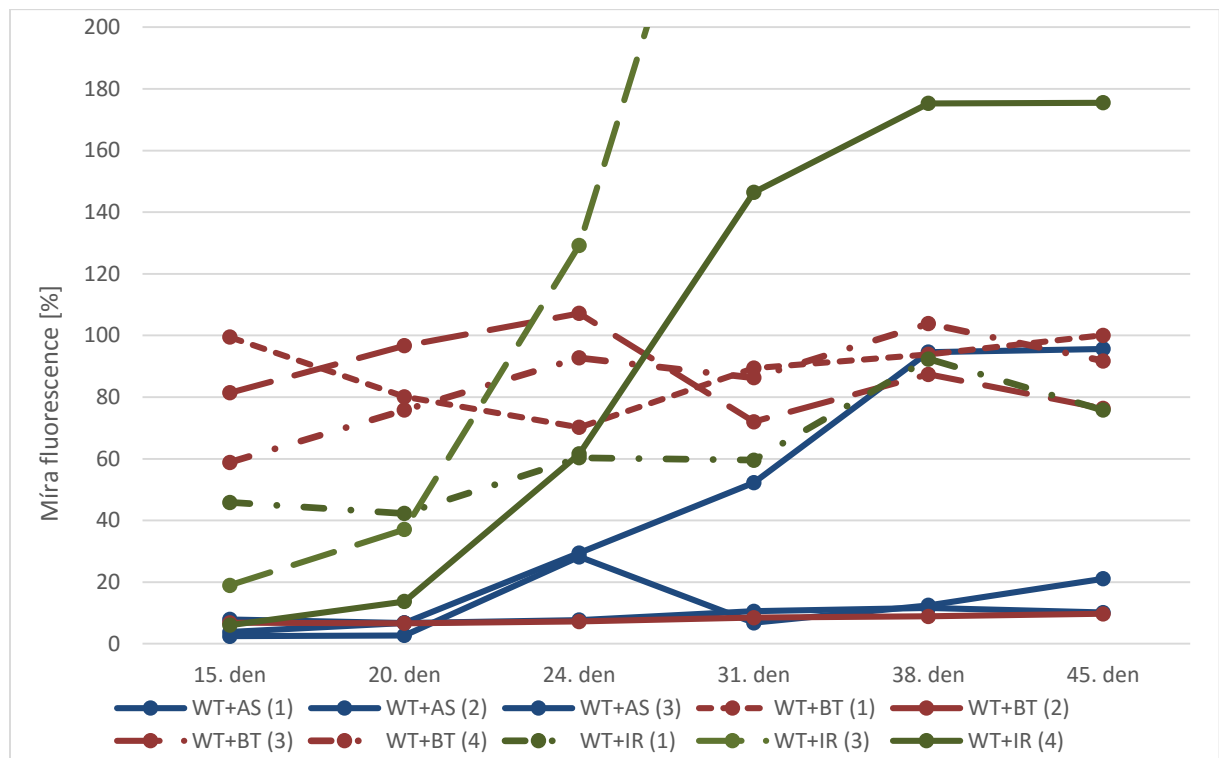
4.5.2 Rychlost vzestupu relativní míry fluorescence (%)

Rozdíly ve strmosti nárůstu poměru fluorescence jednotlivých variant byly hodnoceny pomocí rozdílu poměrů fluorescence ve 31. a 15. den; dále také rozdíl mezi 45. a 15. dnem. V prvním případě je jasně patrný vliv typu konstruktů (ANOVA, p -hodnota = $3,2 \times 10^{-3}$). Konkrétně se jedná o rychlejší nárůst relativní míry fluorescence u *GFP-IR* oproti *GFP-BT* a *GFP-AS* (Tukeyho test, p -hodnoty = $2,6 \times 10^{-3}$ a 0,035).

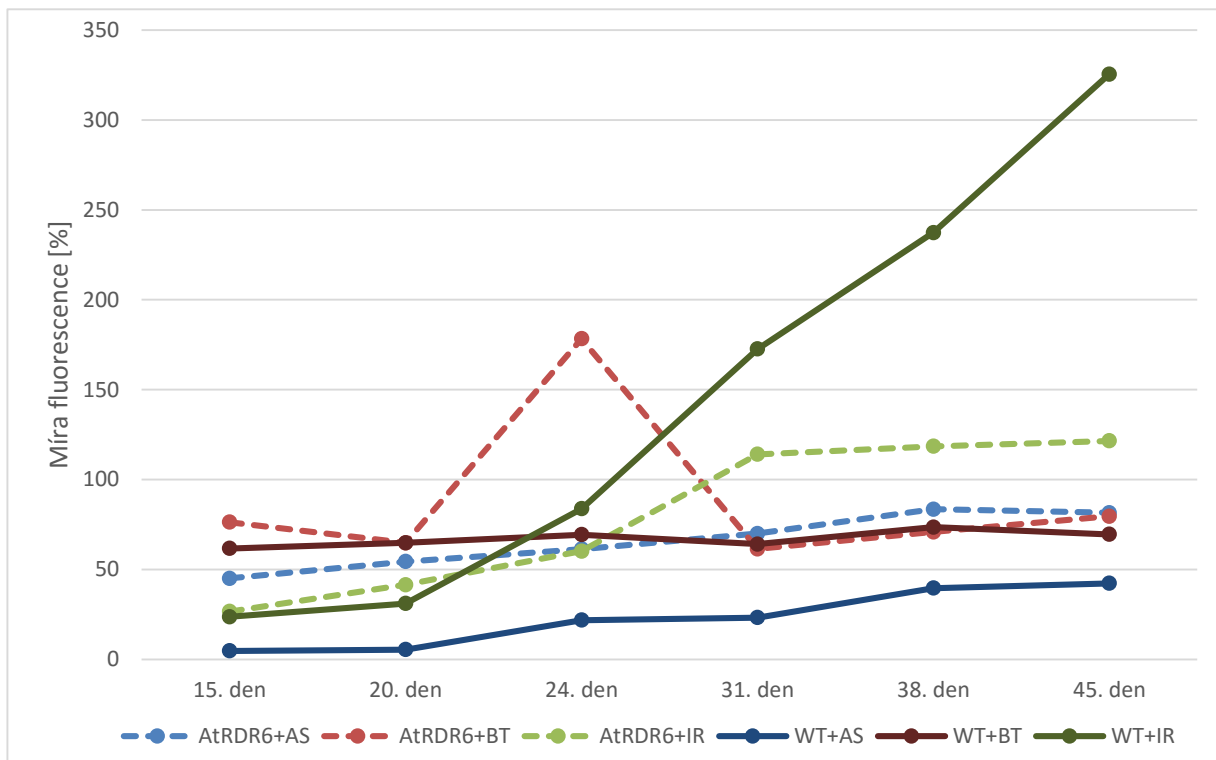
V případě rozdílu mezi 45. a 15. dnem je stále signifikantní vliv typu konstruktů (ANOVA, p -hodnota = 0,014), konkrétně pro *GFP-IR* a *GFP-BT* (Tukeyho test, p -hodnota = 0,011). Mezi jednotlivými variantami nebyl nalezen žádný průkazný rozdíl.

20. a 24. den se hodnoty poměrů fluorescence ještě prokazatelně liší od 100 % (t-test, p -hodnoty = $1,8 \times 10^{-5}$), kterých by měly podle předpokladů postupně nabývat. V další dny již rozdíl není statisticky signifikantní.

Graf 4.22: Poměry intenzit fluorescence (%) jednotlivých suspenzních linií s genetickým pozadím *WT* po vysazení estradiolu v jednotlivé dny měření. 15. den je posledním dnem kultivace buněk BY-2 v indukčním médiu. Pro lepší přehlednost bylo rozmezí osy y (Míra fluorescence [%]) zvoleno od 0 % do 200 %, z toho důvodu jsou u linie *WT+IR* (3) zobrazeny jen 3 body měření, hodnoty poměru fluorescence u ní kontinuálně rostly, až ve 45. den poměr dosáhl 725,15 %.



Graf 4.23: Průměrné poměry intenzit fluorescence (%) genetických pozadích *AtRDR6* a *WT* suspenzních kultur BY-2 po vysazení estradiolu v jednotlivé dny měření. 15. den je posledním dnem kultivace buněk BY-2 v indukčním médiu.



4.5.3 Poměry živých „svítících“ buněk BY-2

Dále bylo hodnoceno poměrné zastoupení živých „svítících“ buněk BY-2 v jednotlivé dny měření. 20. den se vliv typu konstruktů nachází na hranici významnosti (ANOVA, p-hodnota = 0,046), ale konkrétní rozdíly nalezeny nebyly. 24. den nebyl průkazný vliv genetického pozadí ani konstruktů. 31. den je již přítomen vliv konstruktů (ANOVA, p-hodnota = 0,028). Jedná se o rozdíl mezi *GFP-IR* a *GFP-AS* (Tukeyho test, p-hodnota = 0,029). Ve zbývajících dnech měření již nejsou významné žádné rozdíly.

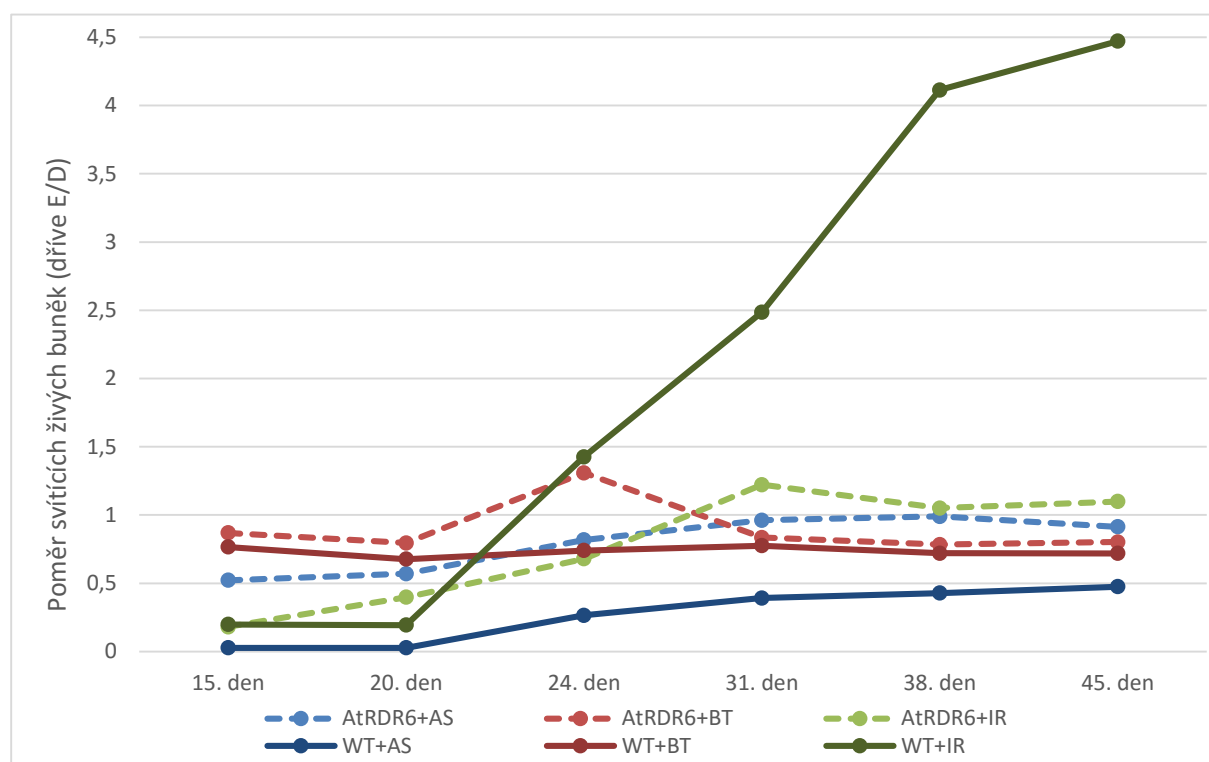
4.5.4 Rychlost vzestupu poměru živých „svítících“ buněk BY-2

Rychlost nárůstu množství živých „svítících“ buněk byla stanovena jako rozdíl mezi poměry procentuálních množství živých „svítících“ buněk, které byly původně kultivovány v indukčním a kontrolním médiu (E/ D), a poměry procentuálních množství živých „svítících“ buněk, které byly v 15. den ještě kultivovány v indukčním a kontrolním médiu (E/D), a to pro 31. a 15. den, a také pro 45. a 15. den. V prvním případě je signifikantní vliv typu konstruktů (ANOVA, p-hodnota = $5,3 \times 10^{-3}$). Při bližším stanovení jde o významně strmější nárůst u *GFP-*

IR oproti *GFP-BT* (Tukeyho test, p -hodnota = $4,1 \times 10^{-3}$). V případě rozdílu mezi 45. a 15. dnem je výsledek obdobný, pouze p -hodnoty jsou vyšší (ANOVA, p -hodnota = 0,016).

20. den jsou poměry živých „svítících“, původně indukovaných a kontrolních buněk ještě prokazatelně odlišné od 100 % (t-test, p -hodnoty = $7,6 \times 10^{-5}$), kterých by měly podle předpokladů postupně nabývat. V další dny již rozdíl není statisticky signifikantní.

Graf 4.24: Průměrné poměry procentuálního množství živých „svítících“ buněk BY-2 u genetických pozadí *AtRDR6* a *WT* po vysazení indukce v jednotlivé dny měření. 15. den je posledním dnem kultivace buněk BY-2 v indukčním médiu.



4.6 Tvorba konstruktů *35S-IR* pro spuštění transkripčního umlčení

Pro indukci TGS byl připraven konstrukt nesoucí sekvenci *CaMV 35S* promotoru v podobě invertované repetice (*35S-IR*) přerušené sekvencí intronu *MSPi* pod inducibilním promotorem v plazmidu *pER8* (podobně jako v případě konstruktů *GFP-IR*).

Nejprve byla pomocí PCR s příslušnými primery amplifikována sekvence *35S* promotoru z plazmidu *psmRS-GFP*, a pomocí TA-klonování byly části vlásenky (*IR1* a *IR2*) jednotlivě vloženy do vektoru *pDrive*. Vytvořené plazmidy byly pomnoženy v bakteriích *E. coli*, ze kterých byly následně vyizolovány, a správnost vložených sekvencí byla ověřena restrikcí a sekvenací.

Fragment *IR2* byl vyštěpen z *pDrive-IR2* restrikčními enzymy BamHI a PstI. Podobně byl těmito enzymy rozštěpen i *pDrive-MSPi*, který byl poskytnut Mgr. Vojtěchem Čermákem. Po izolaci z agarózového gelu byly obě části spojeny ligací.

pDrive-MSPi-IR2 byl pomnožen v *E. coli*, vyizolován z bakterií a ověřen restrikčním štěpením. *pDrive-IR1* byl štěpen restrikčními enzymy HindIII a XhoI za účelem vyštěpení fragmentu *IR1*. Stejnými enzymy byl restrikčně štěpen také *pDrive-MSPi-IR2*. Po izolaci z agarózového gelu následovala ligace fragmentu *IR1* s rozštěpeným vektorem *pDrive-MSPi-IR2* a pomnožení *pDrive-35S-IR* v *E. coli*. Správnost *pDrive-35S-IR* byla po izolaci z bakterií ověřena restrikčním štěpením a sekvenací. Následovalo restrikční štěpení za účelem vložení sekvence *35S-IR* do plazmidu *pER8* s indukibilním promotorem. Segment byl vyštěpen restrikčními enzymy XhoI a XbaI. *pER8* byl otevřen pomocí restrikčních enzymů XhoI a BclI. (Po štěpení BclI a XbaI jsou vzniklé přesahující konce navzájem komplementární.) Po izolaci DNA z agarózového gelu byla provedena ligace fragmentu *35S-IR* a vektoru *pER8*. Plazmid *pER8-35S-IR* byl pomnožen v *E. coli* a následně izolován.

pER8-35S-IR byl elektroporován do *A. tumefaciens*, prostřednictvím něhož byly posléze transformovány buňky BY-2.

4.7 Indukce umlčování exprese GFP konstruktem v kalusech BY-2

Konstruktem byly buňky BY-2 transformovány dvakrát nezávisle na sobě. V prvním případě se jednalo o linii BY-2 již nesoucí gen pro GFP (poskytnutou Mgr. Vojtěchem Čermákem), tedy místa inzerce tohoto genu byla shodná u všech kalusů následně transformovaných konstruktem. Podruhé byla provedena kotransformace konstrukty a *35S:GFP* (v plazmidu *pCP60*, který byl poskytnut Mgr. Dimitrijem Tyčem), takto vytvořené kalusy byly tedy geneticky variabilnější oproti předchozím (variabilní bylo i místo inzerce *35S:GFP*). Měření fluorescence kalusů probíhalo stejným způsobem jako v předchozích případech, opět v pravidelném intervalu 2-3 dnů, tentokrát po dobu 29 dnů. Mezi 15. a 17. dnem byly kalusy přesazeny na nová indukční a kontrolní média.

Pro statistickou analýzu byly i v tomto případě vybrány jen ty kalusy, u kterých intenzita fluorescence na kontrolním médiu ve všech dnech měření byla alespoň o 500 jednotek (odpovídající 13,6 - 23,6 % celkové hodnoty fluorescence pozadí) vyšší než intenzita fluorescence pozadí (negativní kontroly).

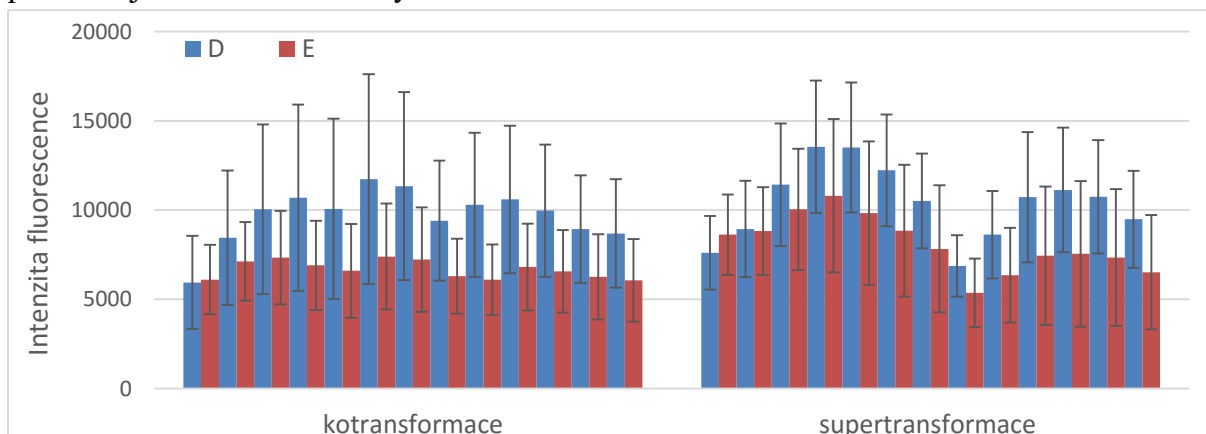
Tabulka 4.5: Počty kalusů přesazených na indukční médium pro variantu 35S-IR a jejich množství následně vybrané pro statistickou analýzu.

	způsob transformace	
	supertransformace	kotransformace
vysazeno na indukční médium	88	63
pro statistickou analýzu	84	34

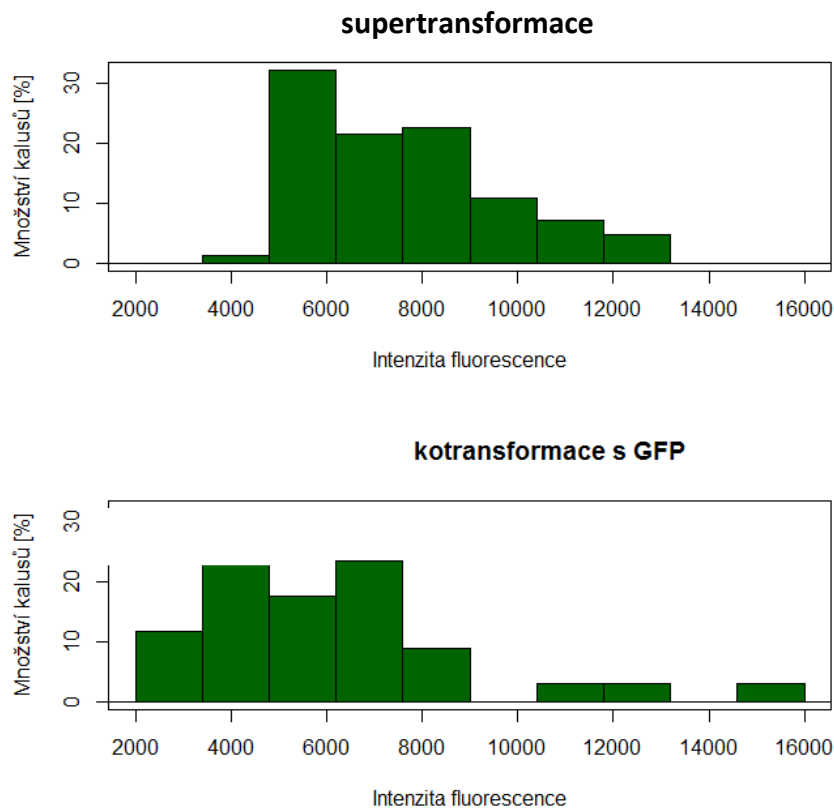
Odlišnost dvou souborů kalusů z hlediska homogenity inzerce *GFP* se projevila vyšší intenzitou fluorescence na kontrolním médiu v 1. den u varianty s jednotnou inzerací *GFP* (ANOVA, p -hodnoty = 0,023). Průměrná intenzita fluorescence kalusů na kontrolním médiu v 1. den činila u varianty s homogenní inzerací *GFP* 7600,8, u varianty s nejednotnou inzerací 5945,41 jednotek. Efektivita, s jakou byla každá sada kalusů (kotransformace, supertransformace) schopna indukovat TGS, je vyjádřena jako poměr fluorescence kalusu na médiu indukčním (E) a kontrolním (D) s odečteným pozadím nesvítící negativní kontroly (P) pro dané měření v procentech, tedy: $(E-P)/(D-P) \times 100$. Tento poměr udává relativní zůstatek fluorescence (relativní míru fluorescence), odrážející „míru transkripčního umlčení,“ kde 100 % značí bez umlčování a 0 % kompletní umlčení.

Míra umlčení supertransformovaných kalusů byla ve 3. den průkazně nižší oproti kotransformovaným (ANOVA s pevnými efekty, p -hodnota = 0,039). V ostatních porovnávaných dnech (1., 6., 8., 15., 22., 29. den) se mezi kotransformovanými a supertransformovanými kalusy nelišila.

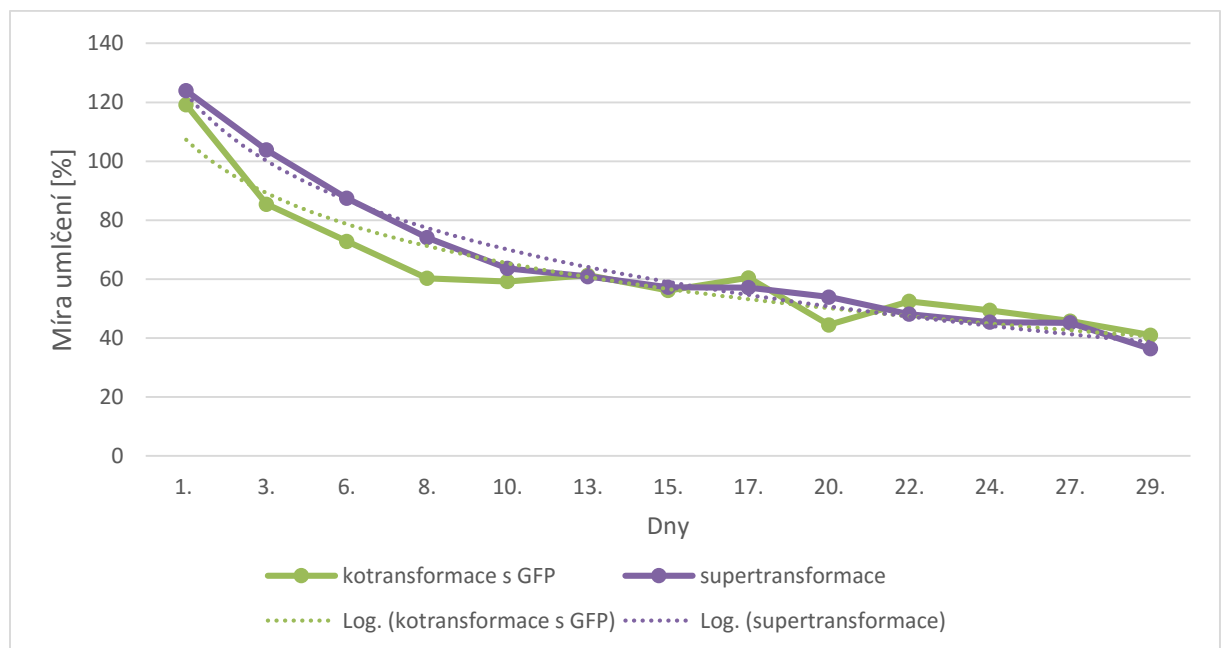
Graf 4.25: Průměrná intenzita fluorescence kalusů 35S-IR. Měření jsou od sebe vzdálená 2-3 dny. Dvojice modrých (intenzita fluorescence na médiu s DMSO) a červených (intenzita fluorescence na médiu s estradiolem) sloupečků znázorňuje jedno měření. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku.



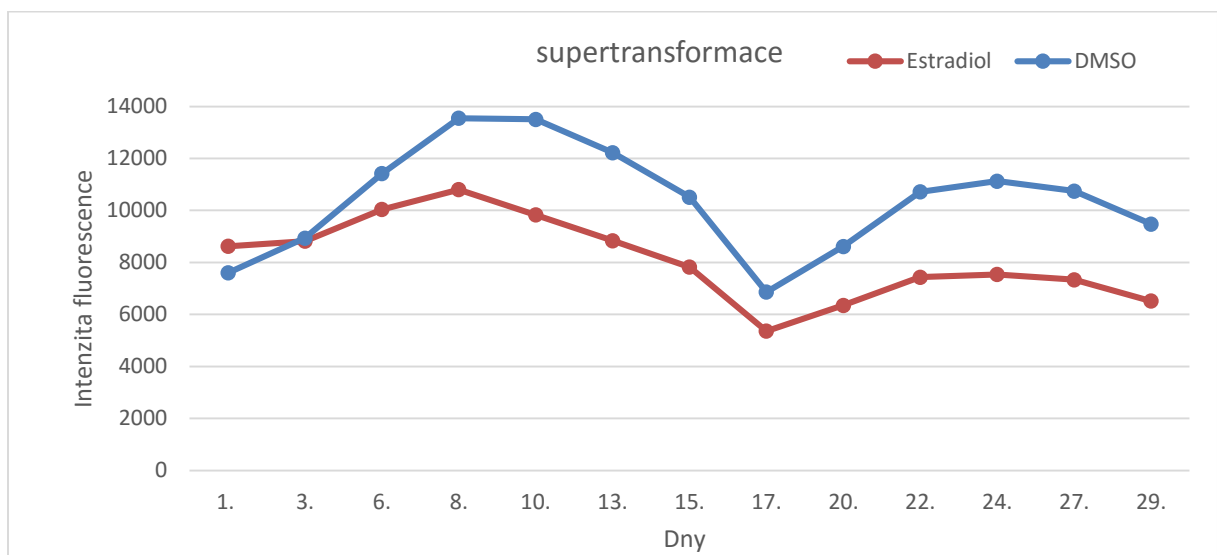
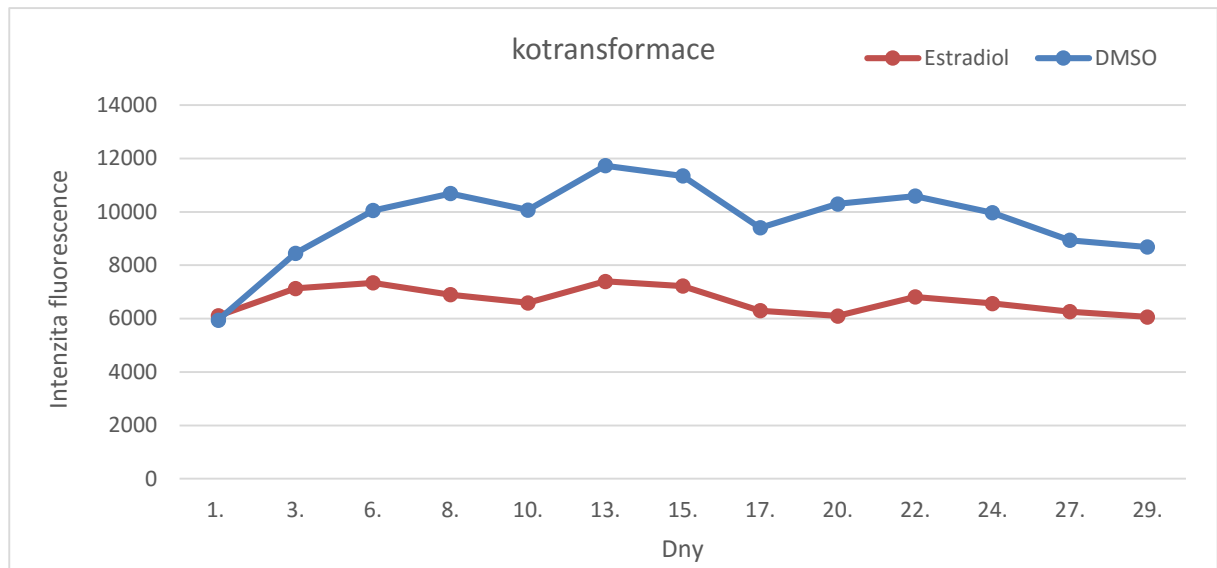
Graf 4.26: Distribuce četností kalusů v procentech pro intenzitu fluorescence v 1. den měření.



Graf 4.27: Průběh umlčení exprese *GFP* u kalusů transformovaných konstruktem *35S-IR* vyjádřený jako poměr fluorescence [%]. Tečkované čáry znázorňují trend průběhu umlčení fluorescence, pokud by se jednalo o logaritmickou funkci. Mezi 15. a 17. dnem byly kalusy přesazeny na nová indukční a kontrolní média.



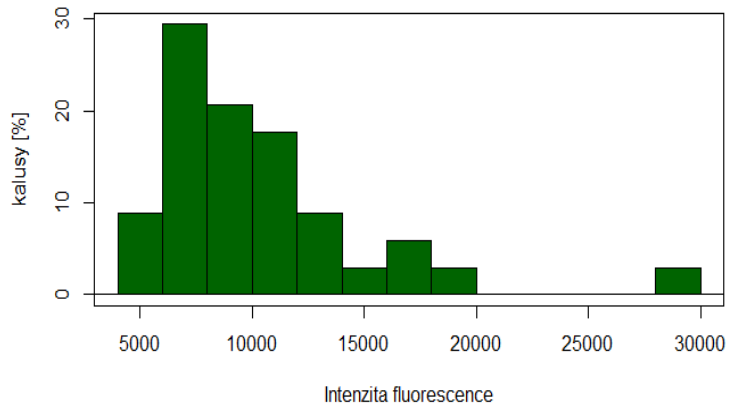
Graf 4.28: Srovnání průměrné intenzity fluorescence kalusů *35S-IR* na médiu s estradiolem a DMSO. Mezi 15. a 17. dnem byly kalusy přesazeny na nová indukční a kontrolní média.



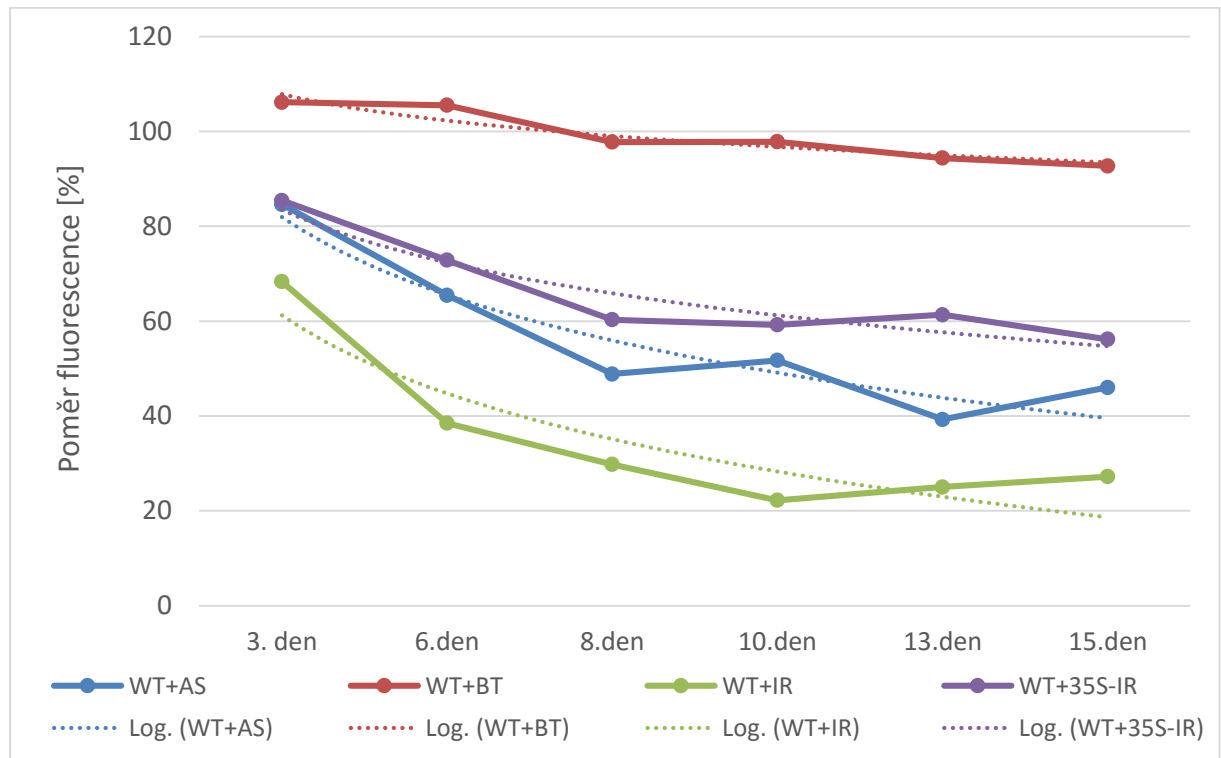
Kalusy *35S-IR* kotransformované s *35S:GFP* (dále jen *35S-IR*) bylo možné porovnávat s posttranskripčně umlčovanými variantami *WT+GFP-AS*, *WT+GFP-BT* a *WT+GFP-IR*.

Statisticky významně se průměrná intenzita fluorescence kalusů *35S-IR* (3. – 15. den) nelišila od zbylých variant. Celkový vliv konstruktů byl patrný (ANOVA s pevnými efekty, p-hodnota = 0,011).

Graf 4.29: Histogram znázorňující četnosti (%) průměrné intenzity fluorescence kalusů na kontrolním médiu v průběhu 3. až 15. dne pro transkripčně umlčující variantu *35S-IR* (pro srovnání s posttranskripčně umlčujícími variantami s pozadím *WT* viz graf 4.8).



Graf 4.30: Průběh umlčení exprese *GFP* u kalusů s *WT* genetickým pozadím na indukčním médiu vyjádřený jako poměr fluorescence [%]. Tečkované čáry znázorňují trend průběhu umlčení fluorescence, pokud by se jednalo o logaritmickou funkci.



Tabulka 4.6: Směrodatné odchylky míry umlčení pro kalusy *35S-IR* vztahující se ke svrchnímu grafu (směrodatné odchylky ostatních variant na pozadí *WT* viz tabulku 4.4.).

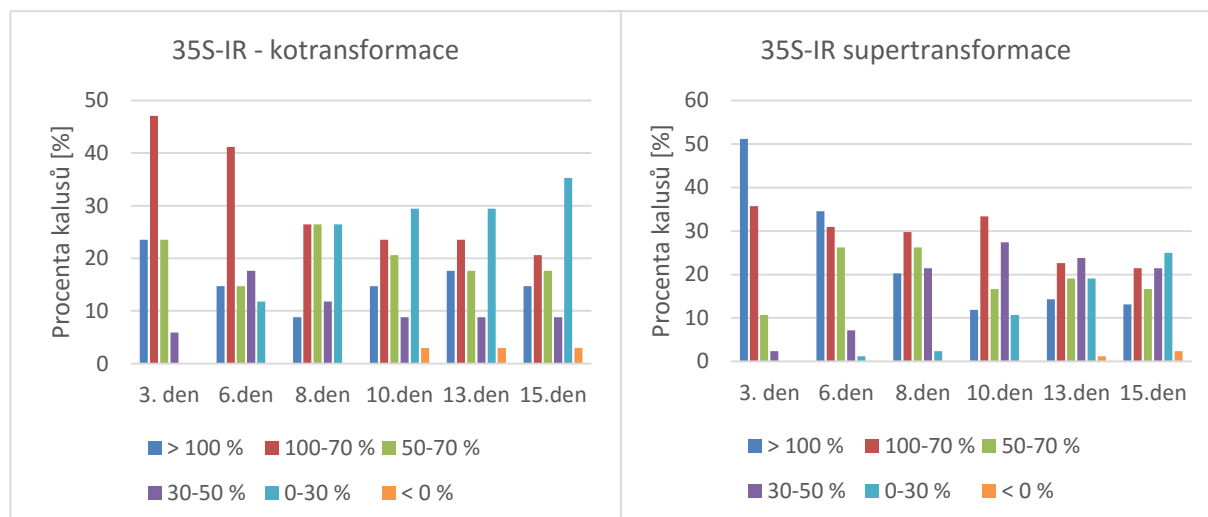
	3. den	6. den	8. den	10. den	13. den	15. den
<i>WT+35S-IR</i>	26,27	36,75	34,95	41,56	46,01	40,43

Ve 3. den měření nebyl nalezen žádný významný rozdíl v poměru fluorescence *35S-IR* od ostatních variant s pozadím *WT*. Kalusy *35S-IR* se mírou svého umlčení lišily oproti variantám

WT+GFP-IR a *WT+GFP-BT* v 6. dni (Tukeyho test, p-hodnoty = $2,3 \times 10^{-3}$ a 0,019), 8. dni (Tukeyho test, p-hodnoty = $1,3 \times 10^{-3}$ a 0,015) a 15. dni (Tukeyho test, p-hodnoty = $9,5 \times 10^{-3}$ a 0,043). 10. a 13. den byla relativní fluorescence *35S-IR* stále průkazně vyšší než *WT+GFP-IR* (Tukeyho test, p-hodnoty = $2,5 \times 10^{-4}$ a $9,6 \times 10^{-4}$). Celkový vliv konstruktů byl průkazný ve všech dnech měření (ANOVA s pevnými efekty, nejvyšší p-hodnota = $1,4 \times 10^{-6}$).

Rychlost poklesu fluorescence byla hodnocena jako rozdíl relativní míry fluorescence mezi 3. a 8. dnem a mezi 8. a 15. dnem. V tomto ohledu se varianta *35S-IR* významně neliší od žádné ze tří variant s pozadím *WT*. Průkazně se nelišila od žádné ze tří variant ani v případě rozdílu mezi 3. dnem a průměrem 13. a 15. dne.

Graf 4.31: Procentuální zastoupení kalusů rozdělených do 6 kategorií podle relativního poklesu fluorescence (%) pro kalusy transformované konstruktem *35S-IR*.



5 Diskuze

5.1 Samovolné a indukované umlčování *GFP* při modulované hladině

RDR6 v kalusech

Jedním z hlavních cílů práce bylo posoudit vliv změn v expresi proteinu RDR6 v buňkách BY-2 na průběh PTGS. Za tímto účelem byly připraveny linie se zvýšenou hladinou proteinu RDR6 pomocí vnesení genu *AtRDR6* pod kontrolou konstitutivního 35S promotoru a linie se sníženým množstvím RDR6 za využití konstruktů *RDR6-IR* vyvolávající PTGS proti *RDR6*.

RDR6 má ze tří funkčně charakterizovaných RNA-dependentních RNA polymeráz nejširší spektrum účinku. RDR6 se účastní tvorby některých virových siRNA (vsRNA), nat-siRNA, ta-siRNA a zřejmě také na přechodu z PTGS na TGS. Bylo doloženo, že RDR6 se podílí na PTGS u transgenů bez sekvence terminátoru, které dávají vzniknout aberantním transkriptům bez polyadenylace (Luo and Chen 2007). RDR6 je také pravděpodobně zodpovědná za zesílení PTGS prostřednictvím sekundárních siRNA v případě, kdy je iniciováno tvorbou vlásenky ze sekvence transgenů (Harmoko et al. 2013). Z těchto důvodů byl pro deregulaci exprese zvolen protein RDR6, protože tvoří společný bod řady drah RNAi a je tedy jedním z důležitých proteinů účastnících se PTGS u endogenních i cizorodých sekvencí. V používaném modelovém systému linií BY-2 nejsou dostupní mutanti, tedy jedinou možností pro snížení exprese *RDR6* byla RNAi. Vzniká tak ale komplikovaná situace, kdy se RDR6 zřejmě podílí na umlčování i své exprese.

Nejprve byl testován vliv modulované exprese *RDR6* na samovolné umlčování *GFP*. Snížení hladiny RDR6 (*RDR6-IR*) vedlo podle očekávání k nižší četnosti umlčených kalusů (tabulka 4.1) i k menšímu poklesu relativní fluorescence (graf 4.5) oproti genetickému pozadí se zvýšenou expresí *AtRDR6* a *WT*. V případě zvýšené exprese *RDR6* bylo procento i míra umlčení kalusů srovnatelná s pozadím *WT*. Nejpravděpodobnějším vysvětlením je supra optimální hladina exprese *AtRDR6*, která by mohla brzdit expresi jiných komponent dráhy RNAi. Jinou příčinou by mohla být negativní zpětná vazba jiným proteinem dráhy RNAi na posttranskripční úrovni, která by oslabovala vliv zvýšené hladiny RDR6. Protein *AtRDR6* je pro buňky BY-2 sice cizorodý, takže k endogenní regulaci pomocí RNAi by nemělo docházet, ale proteinové sekvence *AtRDR6* a *NtRDR6* jsou z více než 60% shodné, takže protein-proteinové interakce nelze vyloučit. Zdá se, že u *Arabidopsis thaliana* má RDR2 částečně antagonistický vliv na aktivitu RDR6, což je podloženo zvýšením efektivity PTGS u sense transgenů v mutantech *rdr2* (Jauvion et al. 2012). Je tedy možné, že i u buněk BY-2 existuje negativní regulace mezi

NtRDR2 a AtRDR6, která mohla v některých ohledech maskovat vliv zvýšené exprese *RDR6*. V úvahu přichází také naopak případné oslabení nebo nemožnost interakce AtRDR6 s jiným endogenním proteinem v důsledku odlišné proteinové sekvence, např. SGS3, který se podílí na PTGS sense transgenu a zřejmě interaguje s RDR6 v cytoplazmě (Kumakura et al. 2009; Mourrain et al. 2000). Zvýšená hladina RDR6 v buňkách BY-2 pomocí AtRDR6 by se tedy nemohla při samovolném umlčování uplatnit.

K řízenému vyvolání posttranskripčního umlčení a posouzení vlivu modulované exprese *RDR6* na jeho průběh byly použity tři odlišné inducibilní konstrukty, které byly vytvořeny a použity v rámci diplomové práce Mgr. Vojtěchem Čermákem za účelem sledování postupu umlčování reportérového genu pro GFP. Jednalo se o invertovanou repetici ze sekvence *GFP* (*GFP-IR*), sekvenci *GFP* v antisense orientaci (*GFP-AS*) a sekvenci *GFP* bez terminátoru (*GFP-BT*) exprimované pod fúzním promotorem, který je aktivován po přidání β -estradiolu.

Vzhledem k tomu, že invertovaná repetice vzniká samovolně jen na základě intramolekulárního párování, bylo předpokládáno, že u konstruktů *GFP-IR* bude mít změna exprese *RDR6* nejmenší dopad na celkový průběh umlčování. U *GFP-AS* může docházet ke vzniku dsRNA také samovolně díky intermolekulárnímu párování, i když s nižší efektivitou než u *GFP-IR*, proto byl v tomto případě předpokládán možný vyšší vliv modulované exprese *RDR6* kvůli významnější roli sekundárních siRNA. Naproti tomu nejvíce patrný rozdíl oproti genetickému pozadí WT byl očekáván v případě konstruktů *GFP-BT*, kde pro spuštění PTGS je aktivita RDR6 nutná pro vytvoření dsRNA, která slouží jako prekurzor i pro tvorbu primárních siRNA (Luo and Chen 2007). Nicméně podle získaných výsledků relativní míry fluorescence kalusů (viz graf 4.12) byl celkově největší rozdíl mezi třemi genetickými pozadími (*AtRDR6* se zvýšenou celkovou hladinou proteinu RDR6, *RDR6-IR* se sníženou expresí *RDR6* a *WT* s nativní expresí *RDR6*) znatelný naopak v případě konstruktů *GFP-IR*, což je v souladu s výsledky Harmoko et al. 2013, které ukazují, že mutace *rdr6* u *Arabidopsis thaliana* měla negativní vliv na PTGS *GFP* indukované *GFP-IR*.

U většiny variant došlo k nejvýraznějšímu relativnímu poklesu fluorescence kalusů mezi 1. a 6. dnem měření. Právě na počátku měření (3. den), byl vliv hladiny RDR6 statisticky významný. Pro schopnost dané varianty umlčet je tedy stěžejní několik prvních dní. Bohužel rychlost umlčení mezi 1. a 3. dnem nemohla být přesně zhodnocena z důvodu přílišné variability dat v čase 0 (1. den). Relativní efektivita umlčování jednotlivými konstrukty byla v rámci stejného genetického pozadí podobná – nejlépe umlčoval *GFP-IR*, zatímco *GFP-BT* umlčel nejhůře nebo vůbec a *GFP-AS* se pohyboval mezi těmito dvěma extrémy.

Možným vysvětlením, proč změna exprese *RDR6* neměla významný vliv na schopnost umlčovat *GFP* prostřednictvím konstruktů *GFP-BT*, je přednostní regulace degradace aberantních transkriptů v jádře prostřednictvím proteinů kontroly kvality RNA (RNA quality control) jako např. 5'-3' exoribonukleáz XRN2 a XRN3 nebo exosomálního komplexu s 3'-5' exonukleázovou aktivitou podobně, jako je tomu v cytoplasmě, kdy mutace některých proteinů účastnících se odčepičkování a tím i následné degradace transkriptů v tzv. P-tělískách vede ke zvýšení účinnosti PTGS sense-trans genu prostřednictvím *RDR6* (Martinez de Alba et al. 2015). Také mutace cytoplazmatické XRN4 vede k akumulaci aberantních transkriptů bez čepičky spouštějících tvorbu malých RNA z endogenních lokusů (Gregory et al. 2008). Navíc mutace převážně jaderně lokalizovaných centrálních podjednotek exosomu vede k výraznému zvýšení účinnosti umlčení sense trans genu (Moreno et al. 2013). Pokud by tedy byla degradace aberantních transkriptů produkovaných z konstruktů *GFP-BT* regulována primárně proteiny kontrolujícími kvalitu RNA, nehrála by rozdílná hladina *RDR6* takovou roli. Výkyvy v míře umlčení, které jsou patrné nejen pro *RDR6-IR+GFP-BT* (jak je vidět z průměrné míry fluorescence na grafu 4.12), ale u všech variant *GFP-BT* pro jednotlivé kalusy (data neukázána) mohou být způsobené střídáním stavu, kdy systém kontroly kvality RNA je již aberantními transkripty saturován a spouští se PTGS, a stavu, kdy dochází k výraznému poklesu těchto transkriptů v důsledku aktivity *RDR6* a PTGS a kontrola kvality opět funguje efektivně.

Zajímavé je také zjištění, že typ konstruktů i typ genetického pozadí má vliv na celkovou intenzitu fluorescence kalusů i na kontrolním médiu, jak je patrné z grafu 4.6. Genetické pozadí *WT* má výrazně vyšší celkovou intenzitu fluorescence na kontrolním médiu než *AtRDR6* a *RDR6-IR*. Nemůže se jednat jednoduše pouze o samovolné umlčování na kontrolním médiu ovlivněné hladinou *RDR6*, protože to by mělo být, podle výsledků zmíněných výše, přibližně stejné pro pozadí *AtRDR6* a *WT*. Nelze vyloučit, že v případě genetického pozadí *AtRDR6* by nízká celková fluorescence mohla souviset kromě samovolného umlčování také s energetickou náročností nadměrné exprese *AtRDR6*, což by vedlo ke kompetici s *GFP* o transkripční a translační aparát a navíc ke snížení hladiny důležitých endogenních proteinů, i když tato možnost se nejeví jako příliš pravděpodobná. U genetického pozadí *RDR6-IR* by naopak nedostatek endogenní *RDR6* mohl teoreticky vést k poruše produkce ta-siRNA, která se podílí např. na hormonální regulaci (Adenot et al. 2006), nebo ke snížení produkce nat-siRNA, která se účastní odpovědi na stres (Zhang et al. 2012), což by v konečném důsledku mohlo také vést ke snížení produkce *GFP* vysvětlující celkovou nižší fluorescenci variant s *RDR6-IR* a *AtRDR6*. Ze srovnání tabulek 4.2 a 4.3 je vidět, že počty vysazených kalusů a kalusů následně použitých pro statistiku se nejvíce lišily právě u variant *AtRDR6+GFP-BT* a *RDR6-IR+GFP-BT*, dále také

u *AtRDR6+GFP-IR*, což bylo způsobeno samovolným umlčováním kalusů na kontrolním médiu. V samostatném experimentu sledujícím samovolné umlčování *GFP* na odlišných genetických pozadích byla frekvence umlčování (většinou jen částečného) u genetických pozadí *WT* a *AtRDR6* srovnatelná, přesto v případě samovolného umlčování na DMSO k němu u pozadí *WT* v průběhu měření téměř nedocházelo. U experimentu se samovolným umlčováním bylo to, zda kalus umlčel či nikoliv, hodnoceno z hlediska referenčních kalusů exprimujících *GFP*, naproti tomu kalus na DMSO byl označen za samovolně umlčený, teprve když jeho fluorescence klesla poblíž úrovně negativní kontroly (pozadí). Pokud by byla stejná metodika uplatněna na samovolně umlčující kalusy, tedy by za umlčené byly považovány jen ty, jejichž fluorescence klesla v 15. den pod stanovenou hranici vycházející z fluorescence pozadí, byly by tyto počty velice nízké (pro genetické pozadí *WT* žádný, *AtRDR6* pět a pro *RDR6-IR* dva kalusy) a samovolné umlčování by se dalo považovat za zanedbatelné. Avšak v experimentu se samovolným umlčováním bylo cílem zhodnotit vliv *RDR6* na schopnost indukovat samovolné umlčení do jakékoliv míry a nejen na schopnost zcela samovolně umlčet. Jestliže připustíme výše zmíněné důvody pro obecně výrazně nižší fluorescenci variant s *AtRDR6* a *RDR6-IR* oproti genetickému pozadí *WT*, je jasné, že kalusy, jejichž fluorescence byla nízká již na počátku, mohly snadněji umlčet pod stanovenou hranici než kalusy s genetickým pozadím *WT* s počáteční vyšší fluorescencí. Z toho také vyplývá, že na relativní míře fluorescence (poměr intenzit fluorescence na indukčním a kontrolním médiu po odečtení pozadí) se může podílet jak indukované, tak samovolné umlčování.

V případě hodnocení vlivu typu konstruktů na intenzitu fluorescence na kontrolním médiu se velmi nízké hodnoty vyskytují na všech genetických pozadích u konstruktů *GFP-IR*, což bylo pro genetické pozadí *WT* pozorováno již Mgr. Vojtěchem Čermákem (Čermák 2012, osobní sdělení). Mohlo by se jednat o nedostatečnou spolehlivost indukibilního systému, která by vedla k částečné samovolné aktivaci PTGS ještě před zahájením měření. Existují případy, kdy k samovolné aktivaci XVE systému zřejmě došlo (Kang et al. 2009), i když jiné výsledky zabývající se indukcí exprese *GFP* naznačují opak (Okuzaki et al. 2011). Pokud by tomu tak skutečně bylo, lze očekávat nejsilnější projev právě u *GFP-IR* vzhledem k tomu, že invertovaná repetice (*IR*) navozuje umlčení vysoce efektivně (Kanno et al. 2008; Smith et al. 2000).

V případě konstruktů *GFP-IR* se také nabízí možnost nízké bazální hladiny transkripce rostlinné RNA polymerázy IV nebo V. Z literatury je známo, že k indukci umlčování *IR* může v některých případech docházet i bez přítomnosti promotoru pro *IR* (Sijen et al. 2001). Dokonce byla popsána nutnost Pol IV pro transkripci a produkci 24nt siRNA z oblasti *IR* bez sekvence promotoru. V tomto případě ale mohlo dojít k metylaci a ustanovení transkripce Pol IV ještě

v době, kdy byl promotor přítomen, neboť ke ztrátě promotoru došlo náhodnou delecí (Sasaki et al. 2014)

Podle snížené průměrné intenzity fluorescence na kontrolním médiu u variant *AtRDR6+GFP-BT* a *RDR6-IR+GFP-BT* oproti *WT+GFP-BT* lze usuzovat, že se zde jedná o interakci genetického pozadí a typu konstruktů, která u „opačných“ genetických pozadí (*AtRDR6* vs. *RDR6-IR*) vyvolala podobnou reakci.

U některých variant je patrná tendence vzrůstu průměrné míry relativní fluorescence v 15. den měření. Nelze vyloučit, že by to mohlo být dáno silicím vlivem samovolného umlčování na DMSO. Pravděpodobnějším vysvětlením je však snižování metabolické aktivity a exprese *GFP* a počínající senescence buněk nebo jejich slábnoucí citlivost na estradiol.

AtRDR6 má oproti zbývajícím genetickým pozadím nejvyšší procentuální množství kalusů, jejichž fluorescence byla umlčena na 0-30 % již ve 3. den, i když v průběhu měření se rozdíly mezi genetickými pozadími poměrně rychle zmenšují oproti situaci, kdy jsou mezi sebou porovnávány inducibilní konstrukty. Toto zjištění dobře zapadá do teorie o důležité roli RDR6 v PTGS. Indukované umlčování vyjádřené jako pokles relativní míry fluorescence bylo celkově nejúčinnější v případě varianty *AtRDR6+GFP-IR* (graf 4.12), což je zřejmě dáno účastí RDR6 na tvorbě sekundárních siRNA (Harmoko et al. 2013), avšak podobně znatelný pokles nebyl pozorován u ostatních konstruktů na pozadí *AtRDR6* v porovnání s genetickým pozadím *WT*.

Protože možná příčina neexistence rozdílu v celkové efektivitě umlčování u *GFP-BT* mezi třemi genetickými pozadími byla zmiňována výše, zaměřím se dále na srovnání RNAi indukované invertovanou repeticí (IR) a antisense transkripty. V genomech rostlin se nalézají významné množství sekvencí, ze kterých mohou vznikat přirozené antisense transkripty (natural antisense transcripts = NATs). Odhaduje se, že téměř 24 % genů *Arabidopsis thaliana* by mohlo dát vzniknout NATs. NATs lze rozdělit podle jejich původu na *cis*-NATs, ze kterých vznikají *cis*-nat-siRNA, a *trans*-NATs, které dávají vzniknout *trans*-nat-siRNA. *cis*-NATs jsou přepisovány ze stejného lokusu jako jejich párující sense vlákno, zatímco *trans*-NATs vznikají na jiném místě v genomu. U mutantů *rdr2* *A. thaliana* vznikala většinou 21nt *cis*-nat-siRNA a u mutantů *rdr6*, naopak převážně 24nt *trans*-nat-siRNA (Yuan et al. 2015). Lze se tedy domnívat, že biogeneze převážné většiny 21nt *cis*-nat-siRNA je závislá na RDR6, zatímco u 24nt *trans*-nat-siRNA především na RDR2. Většina (přes 66 %) lokusů kodujících *trans*-NATs nekóduje proteiny, oproti tomu *cis*-NATs jsou přepisovány často (asi 79 %) z protein kódujících genů (Yuan et al. 2015). Konstrukt *GFP-AS* podle uvedených charakteristik připomíná *trans*-NATs. Z toho důvodu není zcela neopodstatněné se domnívat, že by se na tvorbě sekundárních siRNA v případě konstruktů *GFP-AS* mohla podílet kromě RDR6 také

RDR2. Tomu napovídají i výsledky Tang et al. 2005, dokazující přítomnost 21nt nebo 23nt siRNA vznikajících v podobném inducibilním systému vedoucím k PTGS GFP (Tang et al. 2005). V případě snížené exprese *RDR6*, by ji tedy mohla RDR2 efektivně zastupovat. Jak již bylo zmíněno výše, RDR2 má částečně antagonistický vliv na tvorbu siRNA, jejichž produkce je závislá na *RDR6* (Jauvion et al. 2012). Je tedy možné, že negativní regulace mezi RDR2 a *RDR6* mohla potlačit vliv zvýšené exprese *RDR6* především v případě *AtRDR6+GFP-AS*.

Invertované repetice (IR) představují v genomech rostlin ještě bohatěji zastoupenou skupinu sekvencí, ze kterých mohou vznikat malé RNA, než NATs. Podle nedávné *in silico* analýzy, by se v genomu *Arabidopsis thaliana* mohlo nalézat několik set tisíc IR (Ye et al. 2014). Přítomnost IR je specifická pro velké množství transponovatelných elementů (TE), především pro ty z II. třídy, které využívají strategii cut-and-paste (vyříznutí a vložení). Příkladem mohou být u rostlin časté, neautonomní krátké MITEs (miniature inverted-repeat transposable elements) charakteristické vysokým počtem kopií. MITEs u *A. thaliana* tvoří asi 3,3 % genomu (necelých 24% genomu zabírají TEs celkem), u rýže je to přes 5% (39,45 % genomu tvoří TEs) a u kukuřice jen asi 0,3 % genomu oproti více než 80% genomu představujících TEs (Paterson et al. 2009; Hu et al. 2011). Bylo doloženo, že v genomu rýže jsou MITEs schopny rychlého skokového zmnožení a mohou mít vliv na expresi okolních genů (Naito et al. 2006; Lu et al. 2012). Je patrné, že nekontrolované množení TEs, často charakterizovaných invertovanými repeticemi, může mít dalekosáhlé následky pro rostlinné genomy. Protože některé TEs jsou schopné množit se velmi rychle, je pro rostliny žádoucí schopnost také rychle reagovat. Proto se domnívám, že v případě konstruktů *GFP-IR* je uplatňován odlišný mechanismus regulace než je tomu u *GFP-AS*. Pokud by zde nebyla (nebo nebyla tak silná) negativní zpětná vazba prostřednictvím RDR2, „výhoda“ nadměrné exprese *RDR6* by se mohla projevit. Vzhledem k tomu, že nat-siRNA jsou odvozeny z endogenních sekvencí, které jsou často kódující, je možné, že tato dráha, která by mohla zajišťovat i PTGS v případě konstruktů *GFP-AS*, musí být mnohem přísněji zpětně regulována, aby nedocházelo k nežádoucímu umlčování genů. Většina IR se naopak nachází v mezigenových oblastech; lze je však nalézt také uvnitř intronů nebo promotorů (Ye et al. 2014), což odpovídá regulační úloze některých TEs (Zheng et al. 2013). Regulace RNAi může být nastavena citlivě proti IR jakožto „potenciálně škodlivé sekvenci“ značící TEs, protože k vytvoření regulační úlohy IR, respektive TEs, docházelo v evoluci až sekundárně.

Vedle možné interakce *RDR6* a *RDR2* je vhodné zvážit i případný vliv *RDR1* na výslednou efektivitu umlčování. Přestože bylo zdokumentováno, že *RDR1* se podílí spolu s *RDR6* především při reakci na napadení virem (Qi et al. 2009), nelze vyloučit její zástupnou či regulační

úlohu v případě PTGS při vychýlení hladiny RDR6 z nativního stavu. Expres *RDR1* je regulována velice komplexně a je ovlivněna řadou biotických a abiotických stresů (Xu et al. 2013). Změněná endogenní hladina RDR6 by zajisté stres indukovat mohla, jak bylo zmíněno výše. Zdá se, že RDR1 se podílí i na jiných procesech než je antivirová obrana, protože bylo zjištěno, že RDR1 spolu se SGS3, se podílí na regulaci biosyntézy kutikulárního vosku u *Arabidopsis thaliana* (Lam et al. 2012). Z tohoto pohledu je také zajímavé, že SGS3 je zapojen do drah PTGS, na kterých působí RDR6 (Mourrain et al. 2000; Yoshikawa et al. 2005).

5.2 Indukované umlčování *GFP* při modulované hladině RDR6 v suspenzních kulturách

Přestože většina klonů použitých pro sledování PTGS v suspenzních kulturách byla vybrána na základě své výrazně vyšší schopnosti umlčet oproti průměru dané varianty (všechny vybrané kalusy umlčely v 15. den alespoň na 50 %, naprostá většina ještě méně), velká část si tuto schopnost nezachovala po převedení do suspenzních kultur. Nejvýrazněji je to patrné u *GFP-BT*. Příčinou může být ztráta schopnosti reagovat na přidání induktoru umlčování (estradiolu) do média, nebo částečná aktivace samovolného umlčování, ke které došlo v době, než byly kalusy převedeny do formy suspenzí, nebo v průběhu tohoto procesu. Právě proto, že byly vybrány klony silně umlčující po indukci, je logické se domnívat, že tato jejich vlastnosti může souviset i se zvýšenou tendencí umlčovat samovolně. Především v případě variant obsahujících *GFP-IR*, které obecně umlčují nejúčinněji, často nemohl být použit primárně zvolený klon, protože došlo k samovolnému umlčení ještě před započítáním měření na cytometru. Je proto možné, že v případě *GFP-BT*, které v podobě kalusů reagují na indukci umlčování nejméně, došlo u vybraných linií k aktivaci samovolného umlčování později nebo pozvolněji ve srovnání s *GFP-IR*, takže nemohly být vyřazeny před započítáním vlastního experimentu. To by vysvětlovalo i skutečnost, že poměr fluorescence na indukčním a kontrolním médiu některých suspenzních linií se v průběhu experimentu začal opět postupně zvyšovat. Tento proces může stát za vysvětlením, proč průměrné míry umlčení suspenzních kultur neodrážejí u řady variant výsledky naměřené u kalusů. Zaměříme-li se pouze na suspenzní linie, které si svoji nadprůměrnou schopnost umlčovat zachovaly (v 15. den byla míra umlčení nižší než 40 %), stále jednoznačně nejrychleji umlčuje *GFP-IR*.

Skutečnost, že průměrná míra relativní fluorescence suspenzních kultur neodráží průměrnou relativní míru fluorescence kalusů (graf 4.12 vs. graf 4.19), může být dána vedle rozdílné efektivity a rychlosti samovolného umlčení mezi jednotlivými variantami také rozdíly ve

variabilitě schopnosti umlčet mezi variantami. Je oprávněné se domnívat, že alespoň v případě genetických pozadí *AtRDR6* a *RDR6-IR* by měla být variabilita populace vyšší než je tomu u genetického pozadí *WT* z důvodu vnesení jednoho konstruktů navíc.

U suspenzních kultur je celkově patrný rychlejší relativní pokles průměrné fluorescence buněk v indukčním médiu oproti kalusům (vyjádřený jako míra fluorescence) Tento jev je pravděpodobně způsoben přímou expozicí všech buněk estradiolu a rychlejším tempem dělení v suspenzních kulturách, které je spojeno s urychlením dějů probíhajících v buňkách, tedy i procesu PTGS.

U vybraných efektivně umlčujících linií (pod 40 %) i při zahrnutí všech suspenzních linií dochází k výraznému poklesu relativní fluorescence mezi 1. a 6. dnem (pokud nebereme v úvahu mírné fluktuace). Podle výsledků statistiky je rozdílná rychlost poklesu relativní fluorescence v závislosti na typu konstruktů průkazná pouze mezi 1. a 3. dnem (pro vybrané suspenze také mezi 1. a 6. dnem). Později se od sebe již jednotlivé varianty v relativní míře fluorescence průkazně neliší, což je pravděpodobně dáno výběrem suspenzních linií na základě schopnosti dobře umlčet, který zapříčinil podobnou konečnou relativní míru fluorescence suspenzních linií.

Naproti tomu, porovnáme-li poměry živých „svítících“ buněk na indukčním a kontrolním médiu, k poklesu těchto hodnot dochází pozvolněji (vliv typu konstruktů je signifikantní po celou dobu měření). To znamená, že k poklesu fluorescence u buněk reagujících na indukci estradiolem dochází poměrně rychle, ale úplné vymizení fluorescence u těchto buněk je pozvolnější.

V případě sledování obnovování fluorescence buněk BY-2 po vysazení estradiolu, došlo u všech efektivně umlčujících linií nesoucích *GFP-IR* (pod 40 %) k obnově nad 100 % původní intenzity (v případě linií *WT+GFP-IR* dokonce výrazně nad 100 %). Je pravděpodobné, že tato zvýšená fluorescence by postupně opět klesala, jak naznačuje průběh poměrů fluorescence některých linií. Byť příčina tohoto jevu není zřejmá, opět ukazuje na vysokou citlivost aparátu PTGS vůči IR a možný odlišný způsob regulace.

5.3 Indukce transkripčního umlčování *GFP* prostřednictvím konstruktů *35S-IR*

Důvodem vytvoření inducibilního konstruktů *35S-IR*, který nese invertovanou repetici proti sekvenci *35S* promotoru, bylo sledování dynamiky TGS u *35S:GPF*. Vzhledem k tomu, že přítomnost estradiolu v médiu vyvolala pokles fluorescence kalusů, lze předpokládat, že došlo

k umlčení *GFP* na transkripční úrovni (TGS). Vyvolání TGS proti expresi transgenů pomocí IR ze sekvence jeho promotoru je již dlouho známou a efektivní metodou, která je využívána ke studiu mechanismů TGS (Deng et al. 2014; Finke, Kuhlmann, and Mette 2012; Mette et al. 2000; Mette et al. 1999; Sijen et al. 2001). V současnosti je uznáván model, ve kterém jsou transkripty *35S-IR* zpracovány DCL3 na 21 – 24nt siRNA, která interagují s AGO4. Prostřednictvím komplementarity siRNA a transkriptů Pol V je indukována *de novo* metylace promotoru pravděpodobně DNA metyltransferázou DRM1/2, případně také CMT3 (Jones et al. 2001; Sijen et al. 2001; Wierzbicki et al. 2009; Xie et al. 2004). Následně je symetrická metylace DNA udržována metyltransferázou MET1 (Jones et al. 2001).

Při srovnání relativního poklesu fluorescence supertransformovaných a kotransformovaných kalusů dochází u supertransformovaných kalusů k pomalejšímu poklesu. Možné vysvětlení by mohlo souviset s vnesením *35S-IR* do linie se stabilní a vysokou intenzitou fluorescence, u které by mohlo zřejmě v souvislosti s místem inzerce docházet k metylaci promotoru v průměru pomaleji. V souladu s tím je i prokázána vyšší intenzita fluorescence v první den měření u supertransformovaného souboru. Nabízí se vysvětlení, že možnou příčinou je vnesení genu pro GFP do oblasti transkripčně aktivního euchromatinu, které přispělo k vyšší hladině exprese *GFP* i pomalejšímu postupu TGS z důvodu přítomnosti aktivačních chromatinových značek jako jsou acetylace a metylace histonů na určitých pozicích. Například aktivační metylace H3K4 blokuje interakci proteinu SHH1 s metylovanými H3K9 histony (Zhang et al. 2013), což by mohlo znesnadňovat efektivní udržování metylace DNA prostřednictvím Pol IV. Alternativně by mohlo docházet k udržování acetylovaného stavu histonů prostřednictvím histonové acetyltransferázy IDM1 (INCREASED DNA METHYLATION 1), která u *A. thaliana* rozpoznává nemetylované H3K4 histony a přes interakci dalších proteinů zřejmě navádí DNA glykosylázu ROS1 na acetylované lokusy k jejich demetylaci (Kan et al. 2012; Li et al. 2015).

V kontextu klesající intenzity fluorescence GFP vyvolané TGS by bylo vhodné zmapovat postup metylace na jeho *35S* promotoru. Tato práce byla započata, ale bohužel zatím byla dokončena pouze její přípravná část (vytipování vhodných linií pomocí Southern blotu a odběr vzorků).

6 Závěry

- 1) Vnesením konstruktů *AtRDR6* a *RDR6-IR* do buněk BY-2 byly získány klony se stabilně zvýšenou hladinou transkriptu *RDR6* (*AtRDR6*) a se stabilně sníženou hladinou transkriptu *RDR6* (*RDR6-IR*). Tyto klony byly spolu s buňkami BY-2 divokého typu transformovány konstruktem nesoucím *35S:GFP*. U takto vytvořených tří souborů kalusů s rozdílnými hladinami *RDR6* byla hodnocena schopnost samovolného umlčení *GFP*. Bylo zjištěno, že snížená exprese *RDR6* snižuje efektivitu samovolného umlčování transgenů.
- 2) Vnesením po jednom ze tří konstruktů indukujících PTGS různými způsoby spolu s konstruktem nesoucím *35S:GFP* do obou typů klonů s modulovanou hladinou *RDR6* nebo do buněk BY-2 divokého typu (WT) vzniklo celkem 9 souborů kalusů zahrnujících všechny kombinace tří genetických pozadí (*AtRDR6*, *RDR6-IR*, WT) a tří inducibilních konstruktů (*GFP-AS*, *GFP-BT*, *GFP-IR*). Sledování postupu indukovaného posttranskripčního umlčování *GFP* v čase umožnilo posoudit vliv *RDR6* na tento proces u rozdílných RNA induktorů PTGS. Ukázalo se, že nejvýraznější roli hraje *RDR6* v případě umlčování vyvolaného invertovanou repeticí (*GFP-IR*). U zbylých dvou inducibilních konstruktů nebyl vliv genetického pozadí významný. U všech tří genetických pozadí bylo nejefektivnější umlčování prostřednictvím IR, méně účinně umlčovala antisense RNA (*GFP-AS*) a minimální účinnosti dosahovalo PTGS vyvolané RNA bez polyadenylace (*GFP-BT*).
- 3) Sledování postupu PTGS na vybraných nejlépe umlčujících suspenzních liniích, které byly odvozeny z nejlépe umlčujících klonů od každé varianty z bodu 2) potvrdilo, že nejrychleji umlčuje IR. Dále upozornilo na velmi častou ztrátu schopnosti reagovat na estradiol/ umlčovat v průběhu kultivace analyzovaných linií.
- 4) Byl vytvořen inducibilní konstrukt *35S-IR*, který byl vnesen do buněk BY-2 spolu s (příp. již obsahujících) *35S:GFP*, což umožnilo sledování průběhu umlčování *GFP* na transkripční úrovni a jeho porovnání s konstrukty indukujícími PTGS na genetickém pozadí WT.

7 Seznam použité literatury

- Adenot, X. et al., 2006. DRB4-dependent TAS3 trans-acting siRNAs control leaf morphology through AGO7. *Current biology*, 16(9), pp.927–32.
- Allen, E. et al., 2005. microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell*, 121(2), pp.207–21.
- Baulcombe, D.C. & Dean, C., 2014. Epigenetic regulation in plant responses to the environment. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(9), p.a019471.
- 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.
- Baumbusch, L.O. et al., 2001. The Arabidopsis thaliana genome contains at least 29 active genes encoding SET domain proteins that can be assigned to four evolutionarily conserved classes. *Nucleic acids research*, 29(21), pp.4319–4333.
- Beisel, C. & Paro, R., 2011. Silencing chromatin: comparing modes and mechanisms. *Nature reviews. Genetics*, 12(2), pp.123–35.
- Bond, D.M. & Baulcombe, D.C., 2015. Epigenetic transitions leading to heritable, RNA-mediated de novo silencing in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014(13), p.201413053.
- Borsani, O. et al., 2005. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis. *Cell*, 123(7), pp.1279–91.
- Boutet, S. et al., 2003. Arabidopsis HEN1: A Genetic Link between Endogenous miRNA Controlling Development and siRNA Controlling Transgene Silencing and Virus Resistance. *Current Biology*, 13, pp.843–848.
- Boyko, A. & Kovalchuk, I., 2010. Transgenerational Adaptation of Arabidops is to Stress Requires DNA Methylation and the Function of Dicer-Like Proteins. *Plant signaling & behavior*, 5(8), pp.995–8.
- Brodersen, P. et al., 2008. Widespread Translational Inhibition by Plant miRNAs and siRNAs. *Science*, 320, pp.1185–1190.
- Cao, M. et al., 2014. Virus infection triggers widespread silencing of host genes by a distinct class of endogenous siRNAs in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(40), pp.14613–8.
- Cao, X. et al., 2003. Role of the DRM and CMT3 Methyltransferases in RNA-Directed DNA Methylation. *Current Biology*, 13(24), pp.2212–2217.

- Carmell, M.A. et al., 2002. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes & development*, 16, pp.2733–2742.
- Cokus, S.J. et al., 2008. Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. *Nature*, 452(7184), pp.215–9.
- Cramer, P., Bushnell, D. a & Kornberg, R.D., 2001. Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science*, 292(5523), pp.1863–76.
- Creasey, K.M. et al., 2014. miRNAs trigger widespread epigenetically activated siRNAs from transposons in Arabidopsis. *Nature*, 508(7496), pp.411–415.
- Cuperus, J.T. et al., 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.
- Cutter, A.R. & Hayes, J.J., 2015. A brief review of nucleosome structure. *FEBS Letters*, In Press(10.1016/j.febslet.2015.05.016), pp.1–9.
- Čermák, V., 2012. Studium mechanismu posttranskripčního a transkripčního umlčování transgenů v buněčné linii tabáku BY-2. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha
- Dalmay, T. et al., 2001. SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in Arabidopsis. *EMBO Journal*, 20(8), pp.2069–2077.
- 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.
- Deblaere, R. et al., 1985. Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants. *Nucleic acids research*, 13(13), pp.4777–4788.
- Delauney, A.J., Tabaeizadeh, Z. & Verma, D.P., 1988. A stable bifunctional antisense transcript inhibiting gene expression in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(12), pp.4300–4304.
- Deleris, A. et al., 2010. Involvement of a Jumonji-C domain-containing histone demethylase in DRM2-mediated maintenance of DNA methylation. *EMBO reports*, 11(12), pp.950–955. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/embor.2010.158>.
- Deng, S. et al., 2014. Transcriptional silencing of arabidopsis endogenes by single-stranded RNAs targeting the promoter region. *Plant and Cell Physiology*, 55(4), pp.823–833.
- Devert, A. et al., 2015. Primer-Dependent and Primer-Independent Initiation of Double Stranded RNA Synthesis by Purified Arabidopsis RNA-Dependent RNA Polymerases RDR2 and RDR6. *Plos One*, 10(3), p.e0120100. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0120100>.

- Dimmick, I., 2011. Multiple flow cytometry applications: use of DAPI. *The Biomedical scientist*, (August), pp.541–543.
- Du, J. et al., 2012. Dual binding of chromomethylase domains to H3K9me2-containing nucleosomes directs DNA methylation in plants. *Cell*, 151(1), pp.167–80.
- Dunoyer, P. et al., 2007. Intra- and intercellular RNA interference in *Arabidopsis thaliana* requires components of the microRNA and heterochromatic silencing pathways. *Nature genetics*, 39(7), pp.848–56.
- Eamens, A.L. et al., 2009. The *Arabidopsis thaliana* double-stranded RNA binding protein DRB1 directs guide strand selection from microRNA duplexes. *RNA (New York, N.Y.)*, 15(12), pp.2219–2235.
- Elmayan, T. et al., 1998. *Arabidopsis* mutants impaired in cosuppression. *The Plant cell*, 10(10), pp.1747–58.
- El-Shami, M. et al., 2007. Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes & development*, 21(20), pp.2539–44.
- Fan, D. et al., 2012. IBM1, a JmjC domain-containing histone demethylase, is involved in the regulation of RNA-directed DNA methylation through the epigenetic control of RDR2 and DCL3 expression in *Arabidopsis*. *Nucleic acids research*, 40(18), pp.8905–16.
- Finke, A., Kuhlmann, M. & Mette, M.F., 2012. IDN2 has a role downstream of siRNA formation in RNA-directed DNA methylation. *Epigenetics*, 7(8), pp.950–960.
- Fire, A. et al., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(February), pp.806–811.
- Fojtova, M. et al., 2003. Epigenetic Switch from Posttranscriptional to Transcriptional Silencing Is Correlated with Promoter Hypermethylation. *Plant Physiology*, 133(November), pp.1240–1250.
- Fojtová, M. & Fajkus, J., 2014. Epigenetic Regulation of Telomere Maintenance. *Cytogenetic and Genome Research*, 143(1-3), pp.125–135.
- Garcia, D. et al., 2012. Ago hook and RNA helicase motifs underpin dual roles for SDE3 in antiviral defense and silencing of nonconserved intergenic regions. *Molecular cell*, 48(1), pp.109–20.
- Garcia-Ruiz, H. et al., 2010. *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during Turnip Mosaic Virus infection. *The Plant cell*, 22(2), pp.481–96.
- Garcia-Ruiz, H. et al., 2015. Roles and Programming of *Arabidopsis* ARGONAUTE Proteins during Turnip Mosaic Virus Infection. *PLoS pathogens*, 11(3), p.e1004755.

- Gascioli, V. et al., 2005. Partially Redundant Functions of Arabidopsis DICER-like Enzymes and a Role for DCL4 in Producing trans-Acting siRNAs. *Current Biology*, 15, pp.1494–1500.
- Greenberg, M.V.C. et al., 2013. Interplay between Active Chromatin Marks and RNA-Directed DNA Methylation in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genetics*, 9(11).
- Gregory, B.D. et al., 2008. A Link between RNA Metabolism and Silencing Affecting Arabidopsis Development. *Developmental Cell*, 14(6), pp.854–866.
- Groth, M. et al., 2014. SNF2 chromatin remodeler-family proteins FRG1 and -2 are required for RNA-directed DNA methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(49), pp.17666–71.
- Haag, J.R. et al., 2012. In Vitro Transcription Activities of Pol IV , Pol V , and RDR2 Reveal Coupling of Pol IV and RDR2 for dsRNA Synthesis in Plant RNA Silencing. *Molecular Cell*, 48(5), pp.811–818. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.027>.
- 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.
- Harmoko, R. et al., 2013. RNA-dependent RNA polymerase 6 is required for efficient hpRNA-induced gene silencing in plants. *Molecules and cells*, 35(3), pp.202–9.
- Havecker, E.R. et al., 2010. The Arabidopsis RNA-directed DNA methylation argonautes functionally diverge based on their expression and interaction with target loci. *The Plant cell*, 22(2), pp.321–34.
- He, X.-J. et al., 2009. 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. et al., 2000. pGreen : a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. , pp.819–832.
- Hoffer, P. et al., 2011. Posttranscriptional gene silencing in nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(1), pp.409–414.
- Hothorn, T., Bretz, F. & Westfall, P., 2008. Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical Journal*, 50(3), pp.346–363.
- Hu, T.T. et al., 2011. The Arabidopsis lyrata genome sequence and the basis of rapid genome size change. *Nature genetics*, 43(5), pp.476–481.
- Huang, Y. et al., 2015. Ancient origin and recent innovations of RNA Polymerase IV and V. *Molecular biology and evolution*, March.
- Chan, S.W. et al., 2004. RNA Silencing Genes Control de Novo DNA Methylation. *Science*, 303(February), p.1336.

- Chan, S.W.-L. et al., 2006. RNAi, DRD1, and histone methylation actively target developmentally important non-CG DNA methylation in Arabidopsis. *PLoS genetics*, 2(6), p.e83.
- Inagaki, S. et al., 2010. Autocatalytic differentiation of epigenetic modifications within the Arabidopsis genome. *The EMBO journal*, 29(20), pp.3496–506.
- Jackson, J.P. et al., 2002. Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature*, 416(6880), pp.556–60.
- Jackson, J.P. et al., 2004. Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for DNA methylation and gene silencing in Arabidopsis thaliana. *Chromosoma*, 112, pp.308–315.
- Jauvion, V. et al., 2012. RDR2 partially antagonizes the production of RDR6-dependent siRNA in sense transgene-mediated PTGS. *PLoS one*, 7(1), p.e29785.
- 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*, 22(8), pp.2697–709.
- Johnson, L.M. et al., 2014. SRA- and SET-domain-containing proteins link RNA polymerase V occupancy to DNA methylation. *Nature*, 507(7490), pp.124–128.
- Johnson, L.M. et al., 2008. SRA-domain proteins required for DRM2-mediated de novo DNA methylation. *PLoS genetics*, 4(11), p.e1000280.
- Johnson, L.M. et al., 2007. The SRA Methyl-Cytosine-Binding Domain Links DNA and Histone Methylation. *Current Biology*, 17, pp.379–384.
- Jones, L., Ratcliff, F. & Baulcombe, D.C., 2001. RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance. *Current Biology*, 11, pp.747–757.
- Jones, R.S. & Gelbart, W.M., 1990. Genetic analysis of the Enhancer of zeste locus and its role in gene regulation in Drosophila melanogaster. *Genetics*, 126(1), pp.185–199.
- Jones-Rhoades, M.W. & Bartel, D.P., 2004. Computational Identification of Plant MicroRNAs and Their Targets, Including a Stress-Induced miRNA. *Molecular Cell*, 14, pp.787–799.
- Kan, Y. et al., 2012. A histone acetyltransferase regulates active DNA demethylation in Arabidopsis. *Science*, 336(6087), pp.1445–1448.
- Kang, C.-Y. et al., 2009. Cryptochromes, phytochromes, and COP1 regulate light-controlled stomatal development in Arabidopsis. *The Plant cell*, 21(9), pp.2624–2641.
- Kanno, T. et al., 2008. A structural-maintenance-of-chromosomes hinge domain-containing protein is required for RNA-directed DNA methylation. *Nature genetics*, 40(5), pp.670–5.

- Kanno, T. et al., 2004. Involvement of Putative SNF2 Chromatin Remodeling Protein DRD1 in RNA-Directed DNA Methylation. *Current Biology*, 14, pp.801–805.
- Katiyar-Agarwal, S. et al., 2006. A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(47), pp.18002–7.
- Katsani, K.R. et al., 2001. A homeotic mutation in the trithorax SET domain impedes histone binding. *Genes and Development*, 15(17), pp.2197–2202.
- Kumakura, N. et al., 2009. SGS3 and RDR6 interact and colocalize in cytoplasmic SGS3/RDR6-bodies. *FEBS letters*, 583(8), pp.1261–6.
- Kurihara, Y. & Watanabe, Y., 2004. Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(34), pp.12753–8.
- Lam, P. et al., 2012. RDR1 and SGS3, components of RNA-mediated gene silencing, are required for the regulation of cuticular wax biosynthesis in developing inflorescence stems of Arabidopsis. *Plant physiology*, 159(4), pp.1385–95.
- Langen, G. et al., 2014. The CRT1 subfamily of MORC ATPases Regulates Disease Resistance in Barley to Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Plant physiology*, 164(February), pp.866–878.
- Law, J. A. et al., 2010. A protein complex required for polymerase V transcripts and RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis. *Current biology*, 20(10), pp.951–6.
- Law, J. A. et al., 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.
- Law, J. A. & Jacobsen, S.E., 2010. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature reviews. Genetics*, 11(3), pp.204–20.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L. & Ambros, V., 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), pp.843–54.
- Lee, T. et al., 2012. RNA polymerase V-dependent small RNAs in Arabidopsis originate from small, intergenic loci including most SINE repeats. *Epigenetics*, 7(7), pp.781–95.
- Lee, Y. et al., 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal*, 23(20), pp.4051–60.
- Lei, M. et al., 2015. Regulatory link between DNA methylation and active demethylation in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(11), pp.3553–3557.

- Li, Q. et al., 2015. Regulation of Active DNA Demethylation by a Methyl-CpG-Binding Domain Protein in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS Genetics*, 11(5), p.e1005210. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1005210>.
- Li, S. et al., 2015. Detection of Pol IV / RDR2-dependent transcripts at the genomic scale in *Arabidopsis* reveals features and regulation of siRNA biogenesis. *Genome Research*, 25, pp.235–245.
- Lindroth, A.M. et al., 2001. Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5524), pp.2077–80.
- Lindroth, A.M. et al., 2004. Dual histone H3 methylation marks at lysines 9 and 27 required for interaction with CHROMOMETHYLASE3. *The EMBO journal*, 23(21), pp.4286–4296.
- Lippman, Z., Gendrel, A. & Black, M., 2004. Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature*, 430(6998), pp.471–476.
- Lister, R. et al., 2008. Highly Integrated Single-Base Resolution Maps of the Epigenome in *Arabidopsis*. *Cell*, 133(3), pp.523–536.
- Liu, Z.-W. et al., 2014. The SET Domain Proteins SUVH2 and SUVH9 Are Required for Pol V Occupancy at RNA-Directed DNA Methylation Loci C. S. Pikaard, ed. *PLoS Genetics*, 10(1), p.e1003948.
- Lorković, Z.J. et al., 2012. Involvement of a GHKL ATPase in RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Current biology*, 22(10), pp.933–8.
- Lu, C. et al., 2012. Miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) have been accumulated through amplification bursts and play important roles in gene expression and species diversity in *oryza sativa*. *Molecular Biology and Evolution*, 29(3), pp.1005–1017.
- Lu, F. et al., 2008. Comparative Analysis of JmjC Domain-containing Proteins Reveals the Potential Histone Demethylases in *Arabidopsis* and Rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(7), pp.886–896.
- Luger, K. et al., 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648), pp.251–260.
- Luo, J. & Hall, B.D., 2007. A multistep process gave rise to RNA polymerase IV of land plants. *Journal of molecular evolution*, 64(1), pp.101–12.
- 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.943–58.
- Martinez de Alba, A. E. et al., 2015. In plants, decapping prevents RDR6-dependent production of small interfering RNAs from endogenous mRNAs. *Nucleic Acids Research*, 43(5), pp.2902–2913.

- Le Masson, I. et al., 2012. Mutations in the Arabidopsis H3K4me2/3 Demethylase JMJ14 Suppress Posttranscriptional Gene Silencing by Decreasing Transgene Transcription. *The Plant Cell*, 24(9), pp.3603–3612.
- Mathieu, O. et al., 2007. Transgenerational Stability of the Arabidopsis Epigenome Is Coordinated by CG Methylation. *Cell*, 130, pp.851–862.
- Matzke, M. A., Kanno, T. & Matzke, A.J.M., 2014. RNA-Directed DNA Methylation: The Evolution of a Complex Epigenetic Pathway in Flowering Plants. *Annual review of plant biology*, 66(December 2014), pp.1–25.
- Mccue, A.D. et al., 2014. ARGONAUTE 6 bridges transposable element mRNA-derived siRNAs to the establishment of DNA methylation. *The EMBO journal*, pp.1–17.
- Mette, M.F. et al., 1999. Production of aberrant promoter transcripts contributes to methylation and silencing of unlinked homologous promoters in trans. *EMBO Journal*, 18(1), pp.241–248.
- Mette, M.F. et al., 2000. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO Journal*, 19(19), pp.5194–5201.
- Mi, S. et al., 2008. Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell*, 133(1), pp.116–27.
- Miura, A. et al., 2009. An Arabidopsis jmjC domain protein protects transcribed genes from DNA methylation at CHG sites. *The EMBO journal*, 28(8), pp.1078–86.
- Montgomery, T.A. et al., 2008. Specificity of ARGONAUTE7-miR390 Interaction and Dual Functionality in TAS3 Trans-Acting siRNA Formation. *Cell*, 133, pp.128–141.
- Morel, J. et al., 2002. Fertile Hypomorphic ARGONAUTE (ago1) Mutants Impaired in Post-Transcriptional Gene Silencing and Virus Resistance. *The Plant cell*, 14(March), pp.629–639.
- Moreno, A.B. et al., 2013. Cytoplasmic and nuclear quality control and turnover of single-stranded RNA modulate post-transcriptional gene silencing in plants. *Nucleic Acids Research*, 41(8), pp.4699–4708.
- Mosher, R.A. et al., 2008. PolIVb influences RNA-directed DNA methylation independently of its role in siRNA biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8), pp.3145–50.
- Mourrain, P. et al., 2000. Arabidopsis SGS2 and SGS3 Genes Are Required for Posttranscriptional Gene Silencing and Natural Virus Resistance. *Cell*, 101, pp.533–542.
- Murashige, T. & Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, pp.473–497.
- Nagano, H. et al., 2013. Distinct substrate specificities of Arabidopsis DCL3 and DCL4. *Nucleic acids research*, pp.1–12.

- 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(July), pp.1–30.
- Naito, K. et al., 2006. Dramatic amplification of a rice transposable element during recent domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(47), pp.17620–17625.
- Napoli, C., Lemieux, C. & Jorgensen, R., 1990. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *The Plant cell*, 2(4), pp.279–289.
- 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.
- Nuthikattu, S. et al., 2013. The initiation of epigenetic silencing of active transposable elements is triggered by RDR6 and 21-22 nucleotide small interfering RNAs. *Plant physiology*, 162(1), pp.116–31.
- Nystedt, B. et al., 2013. The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution. *Nature*, 497(7451), pp.579–84.
- Okuzaki, A. et al., 2011. Estrogen-inducible GFP expression patterns in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant cell reports*, 30(4), pp.529–538.
- Paterson, A.H. et al., 2009. The Sorghum bicolor genome and the diversification of grasses. *Nature*, 457(7229), pp.551–556.
- Peragine, A. et al., 2004. SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes & development*, 18(19), pp.2368–2379.
- Pfluger, J. & Wagner, D., 2007. Histone modifications and dynamic regulation of genome accessibility in plants. *Current opinion in plant biology*, 10, pp.645–652.
- Pontier, D. et al., 2012. NERD , a Plant-Specific GW Protein , Defines an Additional RNAi-Dependent Chromatin-Based Pathway in Arabidopsis. , pp.121–132.
- Pontier, D. et al., 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.2030–40.
- Qi, X., Bao, F.S. & Xie, Z., 2009. Small RNA deep sequencing reveals role for Arabidopsis thaliana RNA-dependent RNA polymerases in viral siRNA biogenesis. *PloS one*, 4(3), p.e4971.
- Qi, Y., Denli, A.M. & Hannon, G.J., 2005. Biochemical specialization within Arabidopsis RNA silencing pathways. *Molecular cell*, 19(3), pp.421–8.

- Que, Q. et al., 1997. The Frequency and Degree of Cosuppression by Sense Chalcone Synthase Transgenes Are Dependent on Transgene Promoter Strength and Are Reduced by Premature Nonsense Codons in the Transgene Coding Sequence. *The Plant cell*, 9(8), pp.1357–1368.
- Rahman, M.A. et al., 2014. The Arabidopsis Histone Methyltransferase SUV4 Hinds Ubiquitin via a Domain with a Four-Helix Bundle Structure. *Biochemistry*, 53(13), pp.2091–2100.
- Rajeswaran, R. et al., 2012. Sequencing of RDR6-dependent double-stranded RNAs reveals novel features of plant siRNA biogenesis. *Nucleic acids research*, 40(13), pp.6241–54.
- Rea, S. et al., 2000. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, 406(6796), pp.593–9.
- Ream, T.S. et al., 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.
- Reinhart, B.J. et al., 2002. MicroRNAs in plants. *Genes & development*, 16, pp.1616–1626.
- Rigal, M. et al., 2012. DNA methylation in an intron of the IBM1 histone demethylase gene stabilizes chromatin modification patterns. *The EMBO Journal*, 31(13), pp.2981–2993.
- Rothstein, S.J. et al., 1987. Stable and heritable inhibition of the expression of nopaline synthase in tobacco expressing antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(23), pp.8439–8443.
- Rowley, M.J. et al., 2011. Independent chromatin binding of ARGONAUTE4 and SPT5L/KTF1 mediates transcriptional gene silencing. *PLoS genetics*, 7(6), p.e1002120.
- Sasaki, T. et al., 2014. Distinct and concurrent pathways of Pol II- and Pol IV-dependent siRNA biogenesis at a repetitive trans-silencer locus in Arabidopsis thaliana. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 79(1), pp.127–38.
- Searle, I.R. et al., 2010. JMJ14, a JmjC domain protein, is required for RNA silencing and cell-to-cell movement of an RNA silencing signal in Arabidopsis. *Genes & development*, 24, pp.986–991.
- Schotta, G. et al., 2002. Central role of Drosophila SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *EMBO Journal*, 21(5), pp.1121–1131.
- Sijen, T. et al., 2001. Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. *Current Biology*, 11(6), pp.436–440.
- Smith, L.M. et al., 2007. An SNF2 protein associated with nuclear RNA silencing and the spread of a silencing signal between cells in Arabidopsis. *The Plant cell*, 19(5), pp.1507–21.

- Smith, N.A. et al., 2000. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature*, 407, pp.319–320.
- Song, J.-J. et al., 2004. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, 305(5689), pp.1434–7.
- Soppe, W.J.J. et al., 2002. DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in Arabidopsis. *The EMBO journal*, 21(23), pp.6549–6559.
- Sridhar, V. V et al., 2007. Control of DNA methylation and heterochromatic silencing by histone H2B deubiquitination. *Nature*, 447(7145), pp.735–738.
- Stroud, H. et al., 2013. Comprehensive Analysis of Silencing Mutants Reveals Complex Regulation of the Arabidopsis Methylome. *Cell*, 152(1-2), pp.352–364. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.054>.
- Tang, W., Kinken, K. & Newton, R.J., 2005. Inducible antisense-mediated post-transcriptional gene silencing in transgenic pine cells using green fluorescent protein as a visual marker. *Plant and Cell Physiology*, 46(8), pp.1255–1263.
- Tariq, M. et al., 2003. Erasure of CpG methylation in Arabidopsis alters patterns of histone H3 methylation in heterochromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(15), pp.8823–8827.
- Thorstensen, T. et al., 2006. The Arabidopsis SUVR4 protein is a nucleolar histone methyltransferase with preference for monomethylated H3K9. *Nucleic acids research*, 34(19), pp.5461–70.
- Tsukada, Y. et al., 2006. Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature*, 439(7078), pp.811–816.
- Vaucheret, H. et al., 2004. The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes & development*, 18, pp.1187–1197.
- Vazquez, F. et al., 2004. Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of Arabidopsis mRNAs. *Molecular cell*, 16(1), pp.69–79.
- Weiseth, S. V et al., 2011. The SUVR4 Histone Lysine Methyltransferase Binds Ubiquitin and Converts H3K9me1 to H3K9me3 on Transposon Chromatin in Arabidopsis. *PLoS genetics*, 7(3), p.e1001325.
- Wan, L.-C. et al., 2012. Identification and characterization of small non-coding RNAs from Chinese fir by high throughput sequencing. *BMC Plant Biology*, 12(1), p.146.
- Wang, H. et al., 2011. Deep sequencing of small RNAs specifically associated with Arabidopsis AGO1 and AGO4 uncovers new AGO functions. *The Plant Journal*, 67, pp.292–304.

- Wang, N. et al., 2014. Mutation of the RDR1 gene caused genome-wide changes in gene expression, regional variation in small RNA clusters and localized alteration in DNA methylation in rice. *BMC plant biology*, 14(1), p.177.
- Wang, X.-B. et al., 2010. RNAi-mediated viral immunity requires amplification of virus-derived siRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(1), pp.484–9.
- Wei, W. et al., 2012. A role for small RNAs in DNA double-strand break repair. *Cell*, 149(1), pp.101–12.
- Wierzbicki, A.T. et al., 2009. RNA polymerase V transcription guides ARGONAUTE4 to chromatin. *Nature genetics*, 41(5), pp.630–4.
- 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, pp.635–648.
- Wroblewski, T. et al., 2014. Distinctive profiles of small RNA couple inverted repeat-induced post-transcriptional gene silencing with endogenous RNA silencing pathways in *Arabidopsis*. *RNA*, 20(12), pp.1987–1999.
- Wu, L., Mao, L. & Qi, Y., 2012. Roles of dicer-like and argonaute proteins in TAS-derived small interfering RNA-triggered DNA methylation. *Plant physiology*, 160(2), pp.990–9.
- Xie, Z. et al., 2004. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS biology*, 2(5), p.E104.
- Xu, T. et al., 2013. Expressional and regulatory characterization of *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerase 1. *Planta*, 237(6), pp.1561–9.
- Yang, Z. et al., 2006. HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic acids research*, 34(2), pp.667–75.
- Ye, C. et al., 2014. detectIR: A Novel Program for Detecting Perfect and Imperfect Inverted Repeats Using Complex Numbers and Vector Calculation. *PLoS ONE*, 9(11), p.e113349.
- Yoshikawa, M. et al., 2005. A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes & development*, 19, pp.2164–2175.
- Yuan, C. et al., 2015. Genome-Wide View of Natural Antisense Transcripts in *Arabidopsis thaliana*. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*, 962, pp.1–11.
- Zemach, A. et al., 2013. The *Arabidopsis* Nucleosome Remodeler DDM1 Allows DNA Methyltransferases to Access H1-Containing Heterochromatin. *Cell*, 153(1), pp.193–205. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.033>.

- Zhang, H. et al., 2013. DTF1 is a core component of RNA-directed DNA methylation and may assist in the recruitment of Pol IV. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, online pub, pp.1–6.
- Zhang, H. et al., 2004. Single Processing Center Models for Human Dicer and Bacterial RNase III. *Cell*, 118, pp.57–68.
- Zhang, W. et al., 2008. Epigenetic Modification of Centromeric Chromatin: Hypomethylation of DNA Sequences in the CENH3-Associated Chromatin in *Arabidopsis thaliana* and Maize. *The Plant Cell*, 20, pp.25–34.
- Zhang, X. et al., 2012. Genome-wide analysis of plant nat-siRNAs reveals insights into their distribution, biogenesis and function. *Genome biology*, 13(3), p.R20.
- Zhang, X. et al., 2007. Role of RNA polymerase IV in plant small RNA metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(11), pp.4536–41.
- Zheng, Q. et al., 2010. Genome-wide double-stranded RNA sequencing reveals the functional significance of base-paired RNAs in *Arabidopsis*. *PLoS genetics*, 6(9), p.e1001141.
- Zheng, Q. et al., 2013. RNA polymerase V targets transcriptional silencing components to promoters of protein-coding genes. *The Plant Journal*, 73, pp.179–189.
- Zhu, Y. et al., 2013. A SWI/SNF Chromatin-Remodeling Complex Acts in Noncoding RNA-Mediated Transcriptional Silencing. *Molecular cell*, 49(2), pp.298–309.
- Zong, J. et al., 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. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2009.07.004>.
- 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.

Internetové zdroje:

www.snapgene.com

https://cs.wikipedia.org/wiki/Směrodatná_odchylka