

Abstrakt

RNA interference (RNAi) je jedním z důležitých mechanismů, který se účastní řady biologických procesů, jako je kontrola exprese rostlinných genů, ovlivnění uspořádání chromatinu či zajištění ochrany proti invazivní DNA či RNA transposonů, virů či transgenů. RNAi je spouštěna dvouvláknovou RNA (dsRNA) která je u rostlin štěpena proteiny DICER-LIKE na malé RNA (sRNA). Velikost těchto sRNA se pohybuje v rozmezí 21 - 24 nukleotidů. Malé RNA působí v místě vzniku a často jsou i mobilním signálem, který se v rostlinách může šířit na krátkou vzdálenost skrz plasmodesmy či na dlouhou vzdálenost floémem. sRNA vytváří společně s proteinem ARGONAUTE RNA-indukovaný umlčující komplex. Společně rozpoznávají cílovou molekulu RNA a podílí se na výkonné fázi RNAi, která se může projevit umlčením genové exprese na úrovni posttranskripční (PTGS) či transkripční (TGS).

Účelem této práce bylo na modelovém organismu *Arabidopsis thaliana* porovnat účinky umlčujících konstruktů, které odlišným způsobem řízeně spouštějí RNAi cílenou proti expresi reportérového genu pro GFP. Umlčující konstrukty, umístěné pod inducibilním promotorem aktivovaným přítomností 17- β -estradiolu (XVE systém), se vzájemně lišily ve způsobu tvorby dsRNA a v úrovni, na které umlčovaly (PTGS či TGS). Jednalo se o *GFP* v antisense orientaci (AS), *GFP* bez terminátoru (BT), *GFP* v podobě invertované repetice (IR) a o invertovanou repetici 35S promotoru (35SIR), pod kterým byl vložen reportérový gen.

V rámci diplomové práce byly vytvořeny čtyři konstrukty nesoucí reportérový gen spolu s jedním z umlčujících konstruktů. Těmito konstrukty byly transformovány rostliny *A. thaliana*. Experimenty provedené na těchto rostlinách ukázaly vysokou frekvenci samovolného umlčování nezávislého na variantě neseného konstruktů, které mohlo být důsledkem neočekávané samovolné aktivace XVE systému. Rostliny jednotlivých klonů vykazovaly povětšinou uniformní reakci, avšak dané klony vykazovaly vysokou míru variability v rámci varianty. Pozorované rozdíly mezi variantami, především v lokalizaci a šíření umlčování, budou předmětem dalšího výzkumu.

Klíčová slova: RNA interference (RNAi), PTGS (posttranskripční umlčování), TGS (transkripční umlčování), RNA-dependentní DNA metylace (RdDM), *Arabidopsis thaliana*, GFP, řízené umlčování, XVE systém