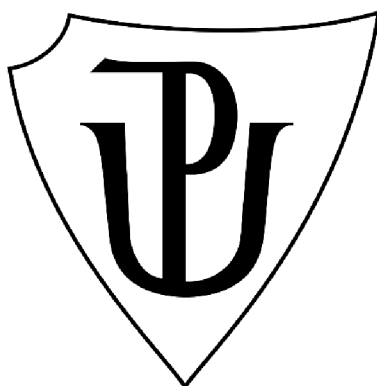


# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Prírodovedecká fakulta  
Katedra biotechnológií



## **Identifikácia nekódujúcich RNA ovplyvňujúcich auxínový transport**

### **BAKALÁRSKA PRÁCA**

Autor:	Karolína Turčiaková
Študijný program:	B0512A130007 Biotechnológie a génové inžinierstvo
Študijný odbor:	Biotechnológie a génové inžinierstvo
Forma štúdia:	Prezenčná
Vedúci práce:	Mgr. Jakub Hajný, Ph.D.
Rok:	2022

## **Bibliografická identifikácia**

Meno a priezvisko autora	Karolína Turčiaková
Názov práce	Identifikácia nekódujúcich RNA ovplyvňujúcich auxínový transport
Typ práce	Bakalárska
Pracovisko	Laboratórium rastových regulátorov
Vedúci práce	Mgr. Jakub Hajný, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022

### **Abstrakt**

Ribonukleové kyseliny hrajú dôležitú rolu pri prenose informácie, ale veľké množstvo z nich vykazuje aj regulačné schopnosti. Napríklad v procese alternácie génovej expresie. Tieto nekódujúce varianty RNA (ncRNA) boli dlho považované za nadbytočné a nefunkčné, alebo neaktívne formy. Dnes je ale známe, že ncRNA riadia množstvo bunkových procesov na vysoko špecifickej úrovni. Naša znalosť funkcie ncRNA v rastlinnom vývoji je zatiaľ obmedzená, preto sme sa v tejto práci zamerali na identifikáciu a charakterizáciu nových dlhých ncRNA, regulujúcich auxínom riadený vývojový program rastlín. Jedná sa o rastlinný hormón, ktorého smerovo orientovaný transport z bunky do bunky umožňuje tvorbu koncentračných gradientov, ktoré sú kľúčové pre širokú škálu vývojových procesov. Smer auxínového transportu je prevažne určený PIN transportérmi proteínmi. Subcelulárna lokalizácia a koordinácia PINov jednotlivých buniek je regulovaná kinázou CAMEL. A preto novo anotované formy lncRNA v promótore PIN1 a v 3'UTR CAMEL (nami pomenované lncRNA-PIN1-1 a lncRNA-CAM) sú výhodnými kandidátmi na sledovanie potenciálnych funkcií lncRNA v auxínovom transporte.

Kľúčové slová	auxín, CAMEL, lncRNA, PIN, RNA
Počet strán	58
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname	Karolína Turčiaková
Title of thesis	Identification of non-coding RNAs regulating transport of auxin
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Jakub Hajný, Ph.D.
The year of presentation	2022

### **Abstract**

Ribonucleic acids play important role in the metabolism of living organisms. A great amount show regulatory capabilities in the processes of gene expression and alternation. These non-coding variants of RNA (ncRNA) used to be considered as mere transcriptional junk as also non-functional and inactive. However today it is known, that ncRNAs have the ability to control a number of cellular processes at a highly specific level. Our knowledge of the function of ncRNAs in plant development is still limited, so in this work, we focused on the identification and characterization of new long ncRNAs regulating the auxin-driven plant development program. It is a plant hormone whose directionally oriented transport from cell to cell allows the formation of concentration gradients, which are key to a wide range of developmental processes. The direction of auxin transport is predominantly determined by PIN transporter proteins. The subcellular localization and coordination of individual cell PINs are regulated by CAMEL kinase. Therefore, the newly annotated forms of lncRNA in the PIN1 promoter and in the 3' UTR CAMEL (named lncRNA-PIN1-1 and lncRNA-CAM by us) are preferred candidates for monitoring the potential functions of lncRNA in auxin transport.

Keywords	auxin, CAMEL, lncRNA, PIN, RNA
Number of pages	58
Number of appendices	0
Language	Slovak (English)

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne s vyznačením všetkých použitých prameňov a spoluautorstva. Súhlasím so zverejnením bakalárskej práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bola som zoznámená s tým, že sa na moju prácu sťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa .....

.....

Podpis študenta

## Pod'akovanie

Týmto by som rada pod'akovala vedúcemu svojej bakalárskej práce Mgr. Jakubovi Hajnému Ph. D. za možnosť vypracovania práce pod jeho vedením. Taktiež by som sa rada pod'akovala za odbornú pomoc poskytnutú z jeho strany pri spisovaní bakalárskej práce. V neposlednom rade by som sa chcela pod'akovať kolektívu Odd. Laboratória rastových regulátorov, kde som pracovala.

## OBSAH

1 ÚVOD .....	1
2 LITERÁRNY PREHLAD .....	2
2.1 Rastlinné hormóny .....	2
2.2 Auxín .....	2
2.2.1 Transport auxínu a jeho formy .....	3
2.2.2 Auxínové transportéry .....	3
2.2.3 Auxínové receptory (CAMEL-CANAR komplex) .....	7
2.3 Ribonukleové kyseliny .....	10
2.3.1 Nekódujúce RNA .....	10
2.4 APOLO lncRNA .....	17
3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....	20
3.1 Materiály .....	20
3.1.1 Biologický materiál .....	20
3.1.2 Chemikálie .....	20
3.1.3 Štandardy molekulovej hmotnosti .....	20
3.1.4 Antibiotiká .....	20
3.1.5 Enzýmy a enzýmové pufrы .....	21
3.1.6 Roztoky pre gélovú elektroforézu .....	21
3.1.7 Roztoky a médiá pre prácu s baktériami .....	21
3.1.8 Roztoky pre výsev semien <i>Arabidopsis</i> .....	22
3.1.9 Roztoky pre stabilnú transformáciu <i>Arabidopsis</i> : .....	22
3.1.10 Komerčné kity .....	22
3.1.11 Primery .....	22
3.1.12 Vektory .....	23
3.1.13 Zariadenia a pomôcky .....	24
3.1.14 Software .....	25
3.2 Metódy .....	26

3.2.1 Polymerázová reťazová reakcia .....	26
3.2.2 Elektroforetická separácia na agarózovom géli .....	26
3.2.3 Prečistenie fragmentov DNA.....	28
3.2.4 Stanovenie koncentrácie DNA.....	28
3.2.5 Ligácia .....	28
3.2.6 Gibson assembly .....	28
3.2.7 LR – reakcia.....	30
3.2.8 Transformácia bakteriálneho druhu <i>Escherichia coli</i> metódou teplotného šoku .....	31
3.2.9 Kolony PCR.....	31
3.2.10 Transformácia <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101 pomocou elektroporácie .....	32
3.2.11 Transformácia rastlín <i>Arabidopsis thaliana</i> – metóda floral dip.....	33
3.2.12 Spracovanie, sterilizácia a vysievanie semien transformovaných rastlín <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	34
3.2.13 Fluorescenčná mikroskopia .....	34
3.2.14 GUS farbenie .....	36
3.2.15 Mikroskopia.....	38
4 VÝSLEDKY .....	39
4.1 Príprava konštruktov .....	39
4.2 Transformácia konštruktov do <i>Agrobacterium tumefaciens</i> a floral dip.....	45
4.3 Selekcia transformovaných jedincov T1 generácie a lokalizácia expresie .....	45
5 DISKUSIA .....	50
6 ZÁVER .....	52
7 REFERENCIE .....	53
8 ZOZNAM SKRATIEK.....	58

## CIELE PRÁCE

- Vypracovanie prehľadu problematiky na predloženú tému.
- Vyhľadanie najlepších kandidátov, zostrojenie konštruktov, naklonovanie a transformácia do rastlín.
- Štúdium vplyvu lncRNA na auxínový transport.
- Zaznamenanie výsledkov a diskusia.

Cieľom bakalárskej práce bolo vypracovanie literárneho prehľadu zameriavajúceho sa na nekódujúce RNA (ncRNA), ich formy, funkcie a vplyv na organizmus. V neposlednom rade taktiež vplyv ncRNA na auxínový transport u rastlín, konkrétne u druhu *Arabidopsis thaliana*.

V praktickej časti sa práca zameriava na rozdielne molekulárne metódy využívané v laboratóriu pri klonovaní génov a ich následnej transformácii. Cieľom bolo nájdenie formy dlhej nekódujúcej RNA (lncRNA) ovplyvňujúcej auxínový transport. Práca pozostávala z prípravy promótorovej fúzie pre lncRNA a z následnej transformácie do rastlinných jedincov druhu *Arabidopsis thaliana*. Nakoniec boli mikroskopicky sledované transformované jedince T1 generácie pre otestovanie aktivity promótoru a lokalizáciu jeho expresie.



# 1 ÚVOD

Ribonukleová kyselina, alebo aj RNA je molekula biopolyméru nachádzajúca sa v bunkách živých organizmov. Pozostáva z ribózy, dusíkatej bázy a fosfátu. Všeobecne je známe, že existuje veľa foriem RNA, z ktorých najznámejšími sú mediátorová RNA, ribozomálna RNA a transférová RNA. Tieto tri najznámejšie varianty RNA sa priamo podieľajú na prepise DNA do proteínov.

Okrem už spomenutých foriem RNA, existujú aj ďalšie typy. Tieto druhy RNA sa aj s transférovou RNA a ribozomálnou RNA považujú za nekódujúce formy. Veľmi dôležitými a dnes už našťastie neopomínanými formami sú aj nekódujúce RNA (ncRNA), ktoré môžu mať množstvo podôb, ale aj funkcií. Dôkazom objemnosti tejto skupiny je aj fakt, že v živočíšnom organizme je prevažujúce množstvo DNA nekódujúcej formy, a preto nedochádza k expresii do podoby proteínov. DNA a jej gény ktoré nemajú proteín-kódovaciu schopnosť, ale nie vždy musia byť po procese transkripcie považované za nepotrebné a odpadné formy bez akejkoľvek funkcie. Odhaduje sa, že veľké množstvo ncRNA je významné z hľadiska regulácie organizmu v procesoch epigenetickej regulácie, regulácie procesov transkripcie, translácie. ncRNA sa môžu podieľať aj na posttranslačných úpravách. Čo dáva týmto nekódujúcim formám RNA veľký potenciál. Konkrétne aj formy dlhých nekódujúcich RNA (lncRNA) sú variabilné vo svojej funkcii, a to až natoľko, že dokážu interagovať aj s rastlinnými metabolitmi. Medzi tieto metabolity môže patriť napríklad aj auxín. Vďaka interakcii medzi auxínom a lncRNA by mohlo dochádzať k modulácii procesov, ktoré by mali priamy vplyv na smer a spôsob transportu auxínu. Preto sme sa v našej práci rozhodli nájsť nové formy lncRNA, ktoré potenciálne regulujú auxínový transport a tiež sledovať lokalizáciu ich expresie.

## 2 LITERÁRNY PREHĽAD

### 2.1 Rastlinné hormóny

Rastlinné hormóny, alebo inak aj fytohormóny, hrajú vo vývoji rastlinného jedinca dôležitú rolu. Jedná sa o metabolity – prirodzene sa vyskytujúce organické zlúčeniny s pomerne vysokou aktivitou aj pri nízkych hodnotách koncentrácií. V rastlinnom tele majú zásadné postavenie v procesoch rastu, diferenciácie a reprodukcie (Davies, 2015). Sú produktami sekundárneho metabolizmu a sú nepostrádateľné pri adaptácii rastlinného jedinca na externé podmienky životného prostredia. Delíme ich do skupín auxínov, gibberelínov, brazinosteroidov, etylénov či kyseliny abscisovej a po novom aj do skupiny jasmonátov a strigolaktónov (Dilworth et al., 2017).

### 2.2 Auxín

Auxíny sú prvými známymi rastlinnými hormónmi. Ich syntéza prebieha prevažne v meristematických regiónoch stonkového apexu, odkiaľ dochádza k ich priamemu transportu do koreňovej špičky. Ďalším miestom ich produkcie sú aj mladé listy či korene v štádiu svojho vývoja. Do tejto skupiny rastlinných hormónov sú zaradované napríklad IAA (kyselina indol-3-octová), PAA (kyselina fenylactová), IBA (kyselina indol-3-ylmaslová) či 4-Cl-IAA (4-chlórindol-3-ylactová kyselina) (Sauer et al., 2013). Spomenuté varianty auxínov spadajú do skupiny prírodných foriem. Počas dlhoročného štúdia tejto rodiny rastlinných hormónov sa podarilo získať aj niekoľko syntetických foriem, medzi ktoré patria napríklad 2,4-D (kyselina 2,4-dichlórfenoxyoctová), NAA (kyselina 1-naftylactová) Dicamba (kyselina 3,6-dichlór-2-metoxybenzoová) (*Dicamba Technical Fact Sheet*, n.d.), Picloram (4-amino-3,5,6-trichlór-2-pyridínkarboxylová kyselina) (Dumancas, 2014) a mnoho ďalších (*Synthetic Auxins - Herbicide Symptoms*, n.d.). Pri procese transportu má auxín unikátnu vlastnosť byť smerovo orientovaný, a tým vytvárať koncentračné gradienty dôležité pre vývoj rastliny (Blakeslee et al., 2005). Medzi základné funkcie vplyvu rozličných auxínových koncentrácií môžu byť zaradované procesy ako gravitropizmus, fototropizmus, organogenéza a embryogenéza (Paque & Weijers, 2016).

### 2.2.1 Transport auxínu a jeho formy

Transport auxínu je zabezpečovaný dvomi cestami. Prvou variantou je transport auxínu a iných metabolitov pomocou floému. Touto cestou sa zabezpečuje transport veľkého množstva auxínov na dlhé vzdialenosti (napríklad z listov do koreňov).

Druhou formou transportu je polárny auxínový transport (PAT). Ten je možné charakterizovať ako smerovú distribúciu auxínu medzi bunkami na základe aktívnych prenášačov. Tento transport je veľmi dôležitý z hľadiska tvorby lokálnych vysokých koncentrácií auxínu, významných pre procesy ako je diferenciácia pletív, fototropizmus, organogenéza, embryogenéza a gravitropizmus (Blakeslee et al., 2005). PAT je založený na aktívnej a pasívnej zložke. Pasívna je daná chemoosmotickou hypotézou, ktorá opisuje transport auxínu ako rastlinného hormónu na základe jeho chemickej štruktúry. Kyselina indol-3-octová v mierne kyslom prostredí apoplastu (hodnoty pH = 5) voľne difunduje cez membránu vďaka svojej protonizovanej forme (IAAH). V prostredí cytozolu, kde sú hodnoty pH mierne vyššie (pH = 7,5), dochádza k disociácii vodíkového protónu zo štruktúry auxínu, a ten sa v tom prípade stáva IAA. Táto forma zabraňuje molekulám auxínu podniknúť pasívne prúdenie z obsahu bunky von. Preto je následne potrebná aktívna zložka pre jeho ďalší pohyb. Aktívny transport využíva proteínové prenášače, ktoré sú lokalizované v plazmatickej membráne buniek a ich presná subcelulárna lokalizácia priamo ovplyvňuje PAT (Adamowski & Friml, 2015).

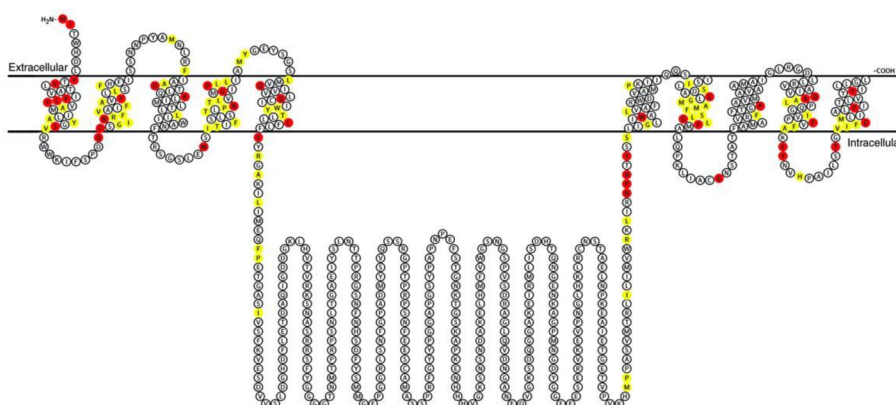
### 2.2.2 Auxínové transportéry

Transport auxínu do bunkového priestoru a taktiež smerom von je spravovaný rozdielnymi prenášačovými proteínmi. Smerom do vnútra bunky má na starosti import AUXIN1/LIKE-AUX1 (AUX/LAX) rodina proteínov, ktoré sú lokalizované v plazmatickej membráne (R. Swarup & Bhosale, 2019). V tejto rodine proteínov sú zatiaľ charakterizované AUX1, LAX1, LAX2, LAX3. Zodpovedajú či už za riadenie správneho vývoja gravitropizmu u koreňovej sústavy (AUX1), ovplyvňujú tiež vývoj laterálnych koreňov (AUX1, LAX3) (K. Swarup et al., 2008). Dokonca napomáhajú vývoju cievneho systému rastliny (LAX2) (Péret et al., 2012). Patria však aj medzi dôležité faktory ovplyvňujúce skorý, čiže embryonálny vývoj rastlinného jedinca v tesnej a výraznej spolupráci s PIN proteínmi (Robert et al., 2015).

Ďalšou skupinou transportérov sú aj členovia rodiny *ATP-BINDING CASSETTE* (ABC). Jedná sa všeobecne o pomerne veľkú skupinu transportérov podieľajúcich sa či

už na procesoch detoxifikácie rastlinného metabolizmu, alebo vykazujúcich schopnosť transportu rozmanitých foriem substrátov. Medzi transportované metabolicky aktívne látky patria napríklad ťažké kovy, lipidy, katabolity chlorofylu a rozličné formy fytohormónov. Pre samotný transport metabolitov je využívaná hydrolyza ATP a systém transportu nie je závislý od hodnôt koncentračných gradientov a membránových potenciálov v bunke (Kretschmar et al., 2011). Na procese auxínového transportu sa podieľajú členovia tejto rodiny na exporte rastlinného hormónu z buniek smerom von. V tomto transporte je výrazná práve jedna podskupina, anglicky pomenovaná BC-B/multi-drug resistance/P-glycoprotein (ABCB/MDR/PGP). Jedná sa o podrodinu s konkrétnymi predstaviteľmi ABCB6 a ABCB20, ktoré vykazujú významný prínos v transporte hormónu v smere ku koreňom. Dôležitá je aj ABCB19, schopná transportu auxínu a jemu príslušných derivátov (Jeness et al., 2019).

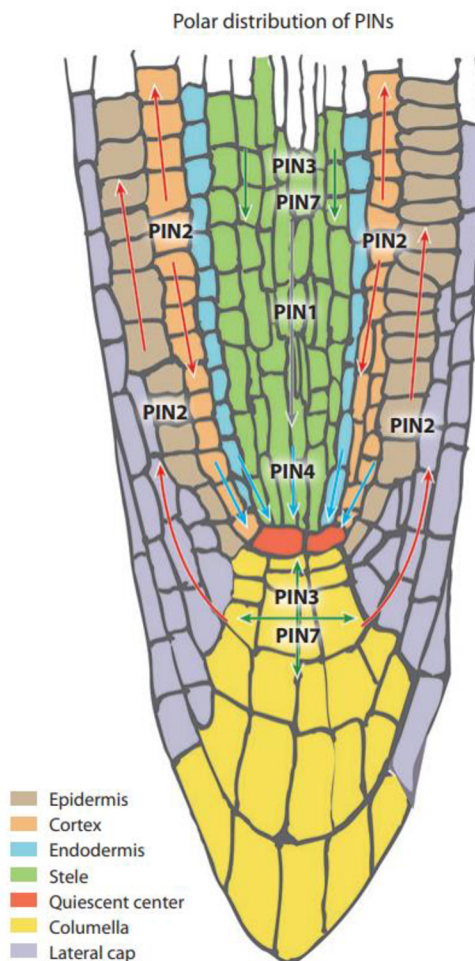
PIN-Formed proteíny sú jednou z najštudovanejších rodín membránových proteínov podieľajúcich sa na exporte rastlinného hormónu auxínu smerom von z bunkového tela. Zo štruktúrneho hľadiska obsahujú dva hydrofóbne regióny pozostávajúce z alfa-helixových štruktúr, ktoré sú spojené hydrofílnou cytoplazmaticky lokalizovanou slučkou (Obrázok 1). V *Arabidopsis* bolo charakterizovaných niekoľko druhov proteínov rodiny PIN. Tieto proteíny sa teda delia do skupín podľa lokalizácie a dĺžky hydrofilnej slučky. PIN1-7 sú najbežnejšie umiestnené na plazmatickej membráne buniek v asymetrickom usporiadaní (Adamowski & Friml, 2015). Ich charakteristickým znakom odlišnosti je aj výrazne väčšia dĺžka hydrofilnej slučky nachádzajúcej sa v centre polypeptidového reťazca (Jiang et al., 2017).



Obrázok 1. Predpokladaná štruktúra proteínov rodiny PIN (prevzaté a upravené podľa Křeček et al., 2009). Zobrazená štruktúra sa odvíja od predpokladanej formy *AtPIN7*. Pozície značené žltou farbou sú invariantné v sekvencii pre všetky PIN proteíny s dlhou slučkou, pozície značené červenou farbou poukazujú na invariantné sekvencie všetkých PIN proteínov.

Druhou skupinou sú proteíny PIN5, 6 a 8. Charakteristika ich hydrofilnej slučky predstavuje mierne (PIN6) alebo výrazne (PIN5/8) redukovanú dĺžku. Proteíny sú prevažne lokalizované na endoplazmatickom retikule. Ich presná lokalizácia viažuca sa na špecifické pletivá, a s ňou spojená funkcia smerovo orientovaného transportu auxínu, je nevyhnutná v procese regulácie rastlinného vývoja. Názornou ukážkou je aj Obrázok 2, poukazujúci na lokalizáciu variant PIN proteínov v štruktúrach koreňa *Arabidopsis* (Mravec et al., 2009). Zatiaľ čo prvá skupina s lokalizáciou plazmatickej membrány moduluje prenos auxínu z bunkového tela, druhá skupina svojou lokalizáciou spôsobuje reguláciu výmeny auxínu medzi bunkovým cytozolom a lumenom endoplazmatického retikula (ER) (Zwiewka et al., 2019). ER je všeobecne významný aj v procese syntézy auxínu. Bolo preukázané že gény rodiny *YUC* a *TAA*, kódujúce enzýmy potrebné pre auxínovú syntézu sú lokalizované v ER samotnom (Blakeslee et al., 2019). Pre ER je však známe, že sa podieľa aj na skladovaní auxínu, vďaka čomu môže endoplazmatické retikulum na základe týchto dvoch faktov fungovať aj ako zdroj auxínu (Friml & Jones, 2010).

Smerovo organizovaná distribúcia auxínu je značne daná polárnou distribúciou rôznych skupín PIN proteínov v cytoplazmatickej membráne. Pre príklad funkcie - PIN2 proteín je bežne exprimovaný v oblastiach koreňovej epidermy a kortexu (Obrázok 2). Získané mutantné jedince *pin2* nesú charakteristiku kratších koreňov súvisle aj so stratou schopnosti gravitropizmu (Müller et al., 1998). To naznačuje, že jeho úloha spočíva v presmerovaní auxínových koncentrácií v zmysle elongácie buniek pri odpovedi na tento tropizmus (Y. Zhang et al., 2019).



Obrázok 2. Lokalizácia PIN proteínov v koreňovej špičke *Arabidopsis* (prevzaté a upravené podľa Kleine-Vehn & Friml, 2008). Šípky označujú polárnu lokalizáciu PIN proteínov v plazmatickej membráne, čo naznačuje, že polárna vlastnosť lokalizácie je priamo ovplyvňovaná typom buniek. Dôležité je poukázať aj na odlišnú lokalizáciu PIN2 v epiderme (apikálnych bunkách) a v mladom kortexe (bazálnych bunkách).

Ako ďalší príklad je možné uviesť PIN1 proteín, u ktorého je pozorovaná asymetrická lokalizácia na bazálnom konci cievnych buniek (Obrázok 2). Alternácia expresie *PIN1* génu má teda priamy vplyv na priestorovú organizáciu vznikajúceho cievneho systému vo vyvíjajúcom sa rastlinnom tele (Kreusch et al., 1998). PIN1 expresia je bežne v rastlinnom tele riadená rôznymi mechanizmami pre zabezpečenie vyváženej koncentrácie auxínu v bunkách, v dôsledku čoho dochádza k regulácii auxínového transportu pomocou PIN1 prenášača. Priama pozitívna regulácia expresie je riadená samotným auxínom na úrovni transkripcie *PIN1*. Auxín ako taký dokáže regulovať aj stabilitu štruktúry PIN1 proteínu a jeho subcelulárnu lokalizáciu (Omelyanchuk et al., 2016).

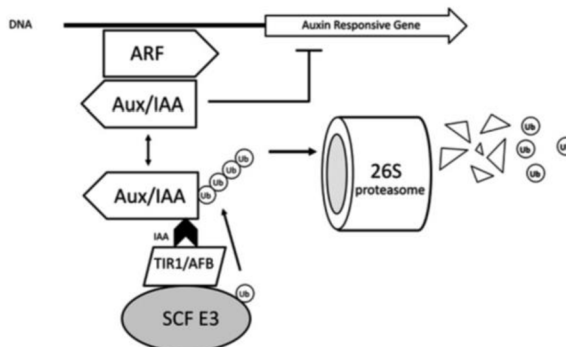
Vysoký význam PIN proteínov z hľadiska polárneho auxínového transportu dosvedčuje aj mutant *pin1*. Ten vykazuje zaujímavé defekty v štruktúre rastlinného tela. Najvýraznejším fenotypom je absencia kvetov vedúca k tvorbe obnažených stoniek. Taktiež dochádza k fúzovaniu kotyledónov. Tieto zmeny v štruktúrach spôsobuje najmä nedostatočný polárny transport, ktorý následne nie je dostačujúci pre ustanovenie lokálneho auxínového maxima, a teda k tvorbe delivého pletiva. Treba si teda uvedomiť, aký veľký vplyv má zmena transportnej dráhy auxínu (Okada et al., 1991).

### **2.2.3 Auxínové receptory (CAMEL-CANAR komplex)**

Celý metabolizmus auxínu, jeho transport, ale aj signalizácia sú dôležité činitele ovplyvňujúce rastlinné telo a procesy v ňom. Počas auxínového prenosu sú nenahraditeľnými činiteľmi prenášačové proteíny priamo zabezpečujúce riadený transport. Tieto proteíny ale musia podliehať regulácii na podnet komplexného mechanizmu

Flexibilita regeneračného mechanizmu rastlín je vysoko špecializovaná, a preto aj vysoko variabilná. Na neustále meniace sa podmienky prostredia, stres ale aj vplyv patogénov musí sesilný organizmus a jeho telo odpovedať adekvátne tak, aby nedošlo k jeho uhynutiu. Jedným z mechanizmov adaptácie sa na prostredie je aj schopnosť riadenia „patterning“ procesov. Tento mechanizmus zahŕňa napríklad konjugáciu nových a vznikajúcich orgánov s už existujúcim cievny systémom rastlinného tela. Taktiež sa dá hovoriť aj o mechanizmoch flexibilnej regenerácie vaskulatúry v oblasti mechanického poškodenia, alebo poranenia. Tieto procesy zahŕňujúce tvorbu nového cievneho pletiva sú riadené repolarizáciou buniek na základe toku auxínu. Jedným z najvýznamnejších faktorov v tomto procese je už spomínaná rodina PIN proteínov. V krátkosti sa jedná o polárne auxínové transportéry schopné generovať lokálne rozdielne koncentrácie auxínu. V prípade ich ovplyvnenia dochádza k upraveniu transportu auxínu. Dôležité je ale poznamenať, že samotná funkcia týchto prenášačových proteínov je riadená na úrovni transkripcie tým istým metabolitom, ktoré majú PIN za úlohu transportovať. Tým metabolitom je teda auxín. Treba si uvedomiť, že aby dochádzalo k procesom repolarizácie spomínaných proteínov, musí prvotne dochádzať k detekcii špecifického signálu. Ten celý proces zmeny polarizácie naštartuje. Tu vstupujú do hry auxínové receptory.

Jediným potvrdeným receptorom zapojeným v tomto procese je receptor pochádzajúci z rodiny TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE/AUXIN-SIGNALING F-BOX (TIR/AFB). V genóme *Arabidopsis* sa nachádza 6 proteínov tejto rodiny (Prigge et al., 2020), ktorých produkty sú prítomné v bunkovom jadre (Dharmasiri et al., 2005). Mechanizmus funkcie TIR/AFB (Obrázok 3) spočíva v tvorbe ko-receptoru spolu s rodinou transkripčných faktorov AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF), a s represormi rodiny AUXIN/INDOLE ACETIC ACID (Aux/IAA). ARF sú schopné aktivácie, ale aj represie procesu transkripcie. Aux/IAA vykazujú schopnosť transkripcie auxin-responzivných génov. Princíp celej funkcie komplexu ko-receptorov je závislý od vzrastajúcej koncentrácie samotného auxínu, tá podmieňuje interakciu TRANSPORT INHIBITOR1/AUXIN-SIGNALING F-BOX PROTEIN (TIR1/AFB) a Aux/IAA proteínu. To následne aktivuje proces ubiquitinácie, ktorý zabezpečí degradáciu Aux/IAA. Tento proces degradácie slúži na to, aby došlo k aktivácii funkcie ARF, ktorej následkom je aktivácia auxin-response genes (Lakehal et al., 2019).



Obrázok 3. Mechanizmus aktivity auxínu založenej na TIR1. Po naviazaní auxínu na podjednotku F-Box (TIR1/AFB) komplexov SCF TIR1/AFB sa ich afinita k doméne II proteínov Aux/IAA výrazne zvýši vďaka auxínu samotnému. Ten pôsobí ako spojovací faktor, ktorý spája dva proteíny dohromady; táto väzba spúšťa proces ubiquitinácie Aux/IAA komplexom SCF. To vedie k jeho deštrukcii proteazómom 26S. Degradácia transkripčného represora uvoľňuje transkripčnú aktivitu ARF a exprimujú sa gény citlivé na auxín. E3 – ubiquitin proteín ligáza (prevzaté a upravené podľa da Costa et al., 2013).

Dôležité je aj podotknúť, že rozdielne kombinácie ko-represorov zabezpečujú rôzne odpovede, a vďaka tomu môže auxín riadiť nespočet rozličných procesov.

Medzi spomínanými auxín-responzívnymi génmi je aj *WRKY23* kódujúci transkripčné faktory u *Arabidopsis*. Tie sú dôležité v procesoch stresovej odpovede

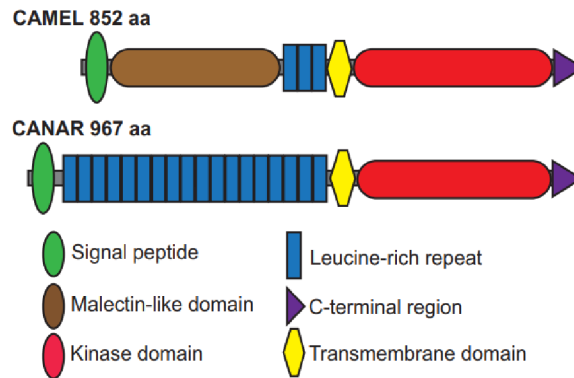


a v prípade interakcii s patogénnymi organizmami. Zaujímavým faktom je ich riadenie expresie, ktoré je závislé od auxínu.

WRKY23 priamo ovplyvňuje expresiu receptorovej kinázy CAMEL - anglicky Malectin-type LRR receptor-like kinase. Bolo preukázané, že pri represii aktivity WRKY23 klesla aj abundancia mRNA *CAMEL*. V skratke je CAMEL membránovo orientovaná kináza bohatá na leucín s obsahom malektínu (Obrázok 4). CAMEL priamo ovplyvňuje lokalizáciu PIN1 na membráne, pomocou modifikácie – fosforylácie. Tá priamo prebieha na slučkách PINov, ktoré sú umiestnené v cytozole. Tento fakt je potvrdený vlastnosťami mutantných variant v štruktúrach týchto slučiek, kedy v ich prípade pri narušení stavby slučky, nedochádza k aktívnej fosforylácii. Nedochádza teda k riadenej repolarizácii prenášačových proteínov.

Aktivita CAMELu je závislá na svojom interakčnom partnerovi – CANAR. Anglicky pomenovaná ako Canalization-related Receptor-like kinase, je taktiež lokalizovaná na plazmatickej membráne a má charakteristický vysoký obsah leucínu (Obrázok 4). Môžeme hovoriť, že sa jedná o pseudokinázu, z dôvodu jej neschopnosti fosforylácie. Funkcia CANAR sa odhaduje na antagonistickú voči CAMEL. To je dokázané najmä poznatkom, že mutanty v oboch génoch naraz (*camel-1xcanar-1*) podliehali obnoveniu štruktúry cievneho systému, ktorý býva v prípade jednoduchých mutantov (*camel-1/canar-1*) chybný. Dodatočným dôkazom tvrdenia antagonistickej funkcie CANAR voči CAMEL, je schopnosť CANARu znižovať autofosforyláciu CAMELu a tiež aj jeho kinázovú aktivitu voči PIN proteínom.

Celý proces regulácie repolarizácie PIN proteínov je pomerne vysoko prepojený. *WRKY23* a *CAMEL* podliehajú podobnému procesu transkripcie. Tá je indukovaná priamo vplyvom samotného auxínu, zmenou jeho koncentrácie a dĺžky pôsobenia. Pre tento proces je ale nevyhnutná schopnosť transkripčnej auxínovej signalizácie. Preto pri mutantoch v tejto dráhe (*HS::axr3-1*, *arf 7arf19*) je proces repolarizácie obmedzený. Dôležité je tiež poznamenať, že CAMEL obsahuje 6 auxín-responzívnych elementov. Ich aktivita je podporovaná rýchlou zvýšenou reguláciou CAMEL spôsobenou vplyvom auxínu. To znamená, že CAMEL je regulovaný na úrovni transkripcie pomocou transkripčného faktora WRKY23 (Hajný et al., 2020).



Obrázok 4. Schéma vizuálnej reprezentácie organizácie štruktúrnych domén CAMEL a CANAR (prevzaté a upravené podľa Hajný et al., 2020).

## 2.3 Ribonukleové kyseliny

Molekula ribonukleovej kyseliny (RNA) má vysoký význam vzhľadom na formy priamo využívané pre proces proteínovej syntézy. Existujú však aj štruktúry RNA známe svojou katalytickou funkciou podobnou tej enzymatickej v mnohých procesoch, a existujú aj formy schopné komplexnej regulačnej aktivity v bunkách (Eddy, 2001). Do formy RNA je veľká časť genómu všetkých známych organizmov kontinuálne transkribovaná. Všeobecne je známe, že existuje veľa foriem RNA, z ktorých najznámejšími sú mediátorová RNA (mRNA), ribozomálna RNA (rRNA) a transférová RNA (tRNA). Tieto tri najznámejšie typy RNA sa priamo podieľajú na procese expície DNA do formy proteínov.

### 2.3.1 Nekódujúce RNA

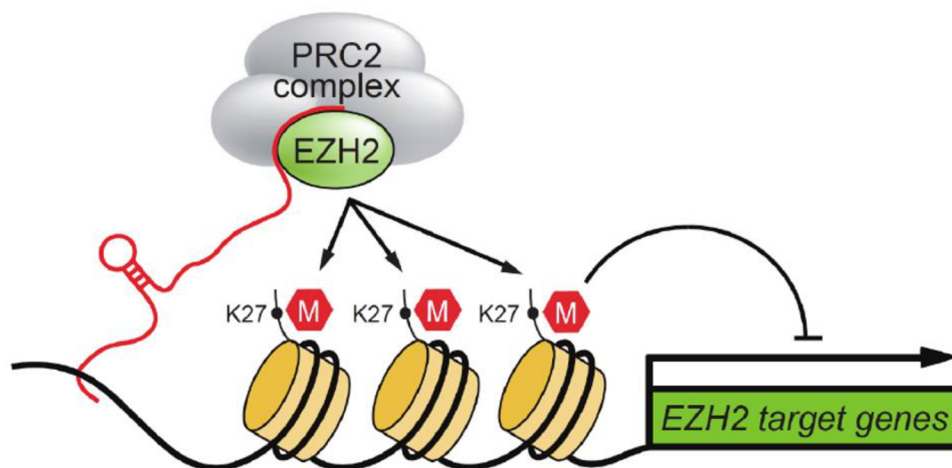
Okrem už spomenutých foriem RNA, existujú aj ďalšie typy. Tieto druhy RNA sa aj s tRNA a rRNA považujú za nekódujúce formy, z dôvodu že nedochádza k ich translácii do formy proteínu (Uchida, 2012; Feinbaum et al., 2004). Keďže pri týchto formách priama primárna funkcia, a to prepis do formy proteínu neexistuje, vyskytujú sa ďalšie úlohy, ktoré môžu tieto nekódujúce formy RNA (ncRNA) vykonávať. Medzi ne patrí napríklad regulácia transkripcie, zostrihu, translácie, alebo aj regulácia proteín-proteínových interakcií (D. Wang & Farhana, 2021).

Vo všeobecnosti existuje veľké množstvo variant delenia ribonukleových kyselín do špecifických skupín. Či už na základe ich funkcie, veľkosti alebo aj iných faktorov. A keďže je prevažné množstvo transkripcie v genóme nekódujúce, nie je isté či väčšina ncRNA nie je v podstate odpadnou formou, vznikajúcu ako šum pervazívnej transkripcie

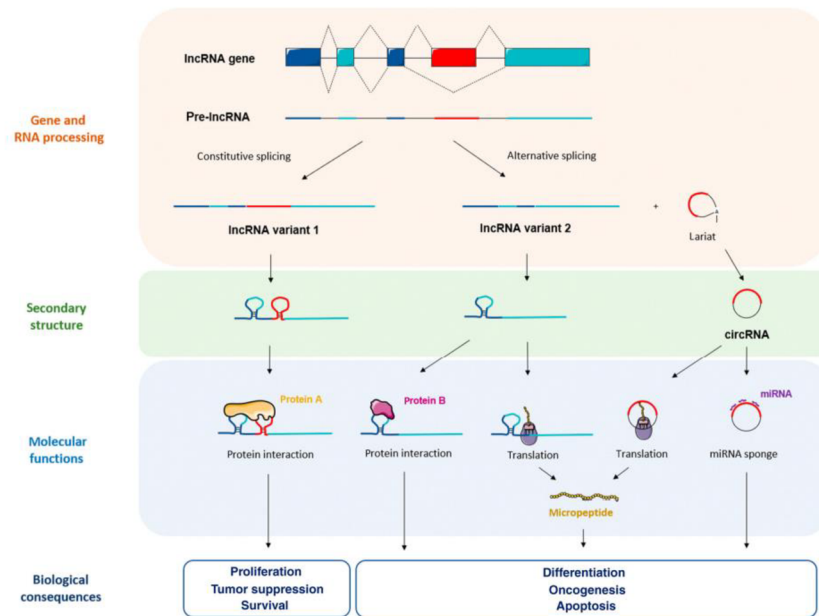
genómu (Diamantopoulos et al., 2018). ncRNA je možné deliť do skupín na základe dĺžky ich nukleotidového reťazca. Prvú skupinu tvoria krátke nekódujúce RNA. Jedná sa o kyseliny s dĺžkou menšou ako 200 nukleotidov. Medzi ne patria miRNA, ktorých funkciou je posttranskripčná úprava vznikajúcej mRNA v procese génovej expzie v cytozole. Podobnú funkciu, prevažne v jadre, vykazujú aj formy anglicky nazývané small-interfering RNA (siRNA) (Dana et al., 2017; O'Brien et al., 2018). Ich hlavnou funkciou je RNA interferencia (RNAi). Jedná sa o proces posttranskripčného umlčovania génov (PTGS), čo je pomerne vysoko konzervovaná biologická odpoveď regulujúca expresiu proteín-kódujúcich génov. Služi teda na ochranu pred endogénnymi parazitickými a exogénnymi patogénnymi formami nukleových kyselín. V jednoduchosti dochádza k tvorbe siRNA z dsRNA alebo miRNA primárneho transkriptu, pomocou enzýmov Dicer a Drosha. Vzniknutá forma siRNA je následne zapojená do tvorby RNA-indukovaného efektorového komplexu (RISC). Významným komponentom RISC je Argonaut proteín, ten zabezpečuje štiepenie siRNA. Tvorí sa aktivovaná forma RISC komplexu s obsahom jednovláknovej „vodiacej“ molekuly siRNA, špecifickej pre cieľovú mRNA. Táto mRNA podlieha nakoniec degradácii vplyvom RNasy H (D. H. Kim & Rossi, 2008). Ďalšími sú anglicky small nucleolar RNA (snoRNA), ich úlohou je metylácia ribózy a pseudouridylácia ribozomálnych RNA (Liang et al., 2019). Nasledujúcimi sú aj formy anglicky nazývané small nuclear RNA (snRNA), zabezpečujúce odstraňovanie intrónových sekvencií zo štruktúr pre-mRNA (Karijolic & Yu, 2010). Do skupiny nakoniec patria aj PIWI-interagujúce RNA (piRNA), interagujúce s PIWI proteínmi, zabezpečujúce represiu transpozomálnych foriem génov (Iwasaki et al., 2015).

Druhou skupinou sú dlhé nekódujúce RNA (lncRNA), kde je možné zaradiť nekódujúce RNA s dĺžkou nukleotidového reťazca minimálne 200 bází. Je však veľmi dôležité dodať, že aj lncRNA môžu podliehať zostrihu, kedy sú pretvárané na kratšie úseky funkčnej RNA (Lakhotia et al., 2020). Vyznačujú sa podobnosťou s mRNA, môžu obsahovať aj poly-adenylované konce (poly-A) či metyl-guanozínové čiapočky. Funkcia poly-A koncov spočíva v ochrane pred degradáciou molekuly RNA a úlohou metyl-guanozínových čiapočiek je okrem ochrany pred degradáciou aj pomoc pri napájaní ribozómu na mRNA v procese translácie (Cowling, 2010). Oproti mRNA, sú lncRNA exprimované vo výrazne menších množstvách a bežne nie sú v genóme vysoko konzervované. lncRNA tiež obsahujú dlhšie exónové úseky, ktoré sa ale vyskytujú v menšom počte oproti štruktúram mRNA (X. Zhang et al., 2019a). Dlhé nekódujúce

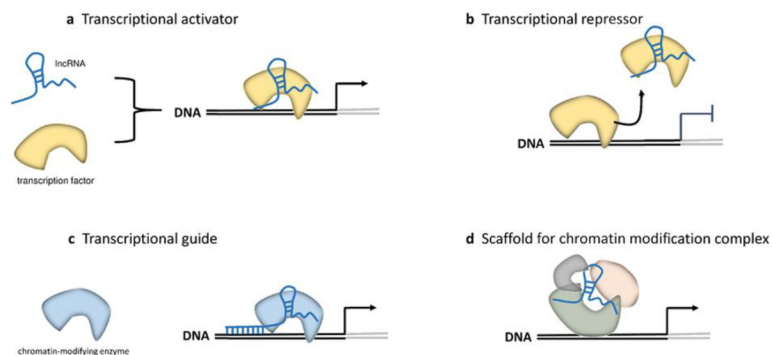
ribonukleové kyseliny sa tvoria pomocou nuclear DNA-dependent RNA polymerases (Wierzbicki et al., 2021). lncRNA hrajú dôležitú rolu v procese génovej regulácie. Vzhľadom na ich lokalizáciu dokážu interagovať nie len s DNA a RNA samotnými ale aj s proteínmi, a teda sú schopné riadiť epigenetickú, transkripčnú, post-transkripčnú a translačnú reguláciu, či dokonca aj post-translačnú modifikáciu (Statello et al., 2021). Ich funkcie je možné rozdeliť podľa lokalizácie na tie jadrové. Medzi ne patria napríklad remodelácia chromatinu (Obrázok 5) alternatívny zostrih (Obrázok 6) alebo epigenetická kontrola transkripcie (Obrázok 7). Druhou variantou sú funkcie, ktoré sa lokalizujú do cytoplazmatického priestoru. Medzi ne sú zaradované napríklad modulácia translácie a stability mRNA alebo dokonca skafoldovanie proteínov (Noh et al., 2018).



Obrázok 5. Chromatínový remodeling (prevzaté a upravené podľa Nie et al., 2012). V procese chromatínového remodelingu sú zahrnuté lncRNA ako napríklad Xist/RepA, Air, Hotair, Tsix, ANRIL and Kcnq1ot1, tie dokážu naviesť POLYCOMB REPRESSIVE COMPLEX (PRC) pomocou priamej interakcie s EZH2 alebo inými komponentami na smer daného lokusu, kde následne dochádza k trimetilácii H3K27, čo dokáže následne umlčať špecifické gény.

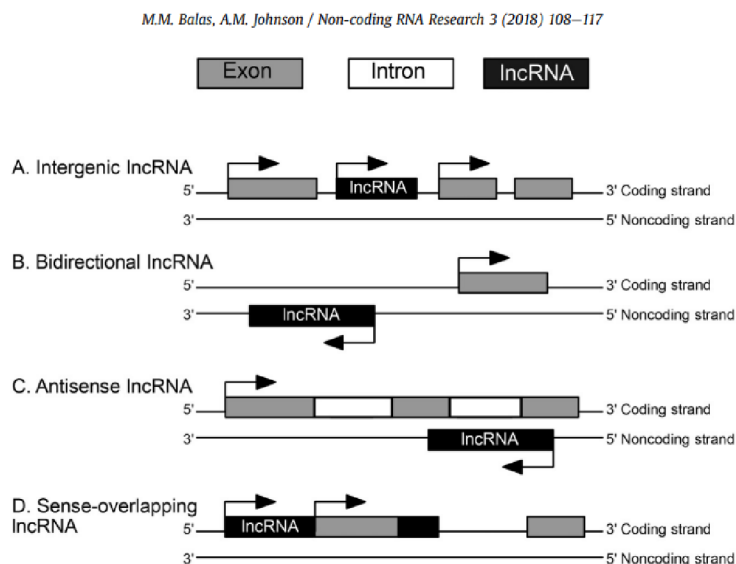


Obrázok 6. Úloha AS vo funkčnej diverzifikácii lncRNA (Prevziate a upravené podľa Khan et al., 2021). Po transkripcii môže gén lncRNA prejsť konštitutívnym zostrihom, aby sa vytvorila zrelá forma lncRNA (variant 1), ale môže sa tiež prechádzať alternatívnym zostrihom, aby sa vytvorila zrelá forma lncRNA (variant 2). lncRNA variant 1 je skelet pre interakciu s proteínom A, zatiaľ čo lncRNA variant 2 selektívne interaguje s proteínom B. Alternatívne môže lncRNA variant 2 obsahovať malý nekanonický ORF, ktorý môže byť preložený do formy funkčného mikropeptidu. Udalosti spätného zostrihu môžu tiež produkovať circRNA, ktoré môžu pôsobiť ako špongia pre miRNA alebo produkovať funkčný mikropeptid prostredníctvom translácie malých nekanonických ORF. Vďaka produkcii mikropeptidov môžu produkty AS génu lncRNA (ako varianty zostrihu lncRNA alebo circRNA) vykazovať opačné alebo odlišné biologické funkcie (napríklad prežitie verzus apoptóza), ako je znázornené na obrázku. Majú tiež podobné biologické funkcie zabezpečené prostredníctvom rôznych mechanizmov. Skratky: AS, alternatívny zostrih; circRNA, kruhová RNA; lncRNA, dlhá nekódujúca RNA; ORF, otvorený čítací rámec.



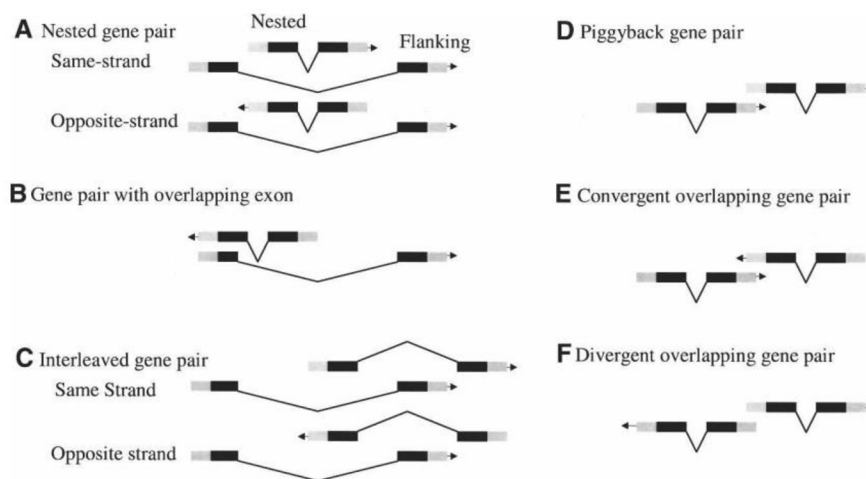
Obrázok 7. lncRNA v epigenetickej a transkripčnej regulácii (prevzaté a upravené podľa (F. Y. Wang et al., 2020)). Sú zobrazené štyri mechanizmy epigenetickej a transkripčnej regulácie prostredníctvom lncRNA. a - Priama interakcia lncRNA s transkripčnými faktormi (TF) indukuje alosterickú zmenu TF, b - lncRNA pôsobia ako návnada pre TF tým, že ich držia ďaleko od ich cieľových štruktúr na chromatine, c - lncRNA pôsobia ako transkripčný sprievodca náborom enzýmov modifikujúcich chromatin do cieľových génov, buď v cis alebo trans do vzdialených cieľových génov, d - lncRNA pôsobia ako a skafold, ktorý spája viacero proteínov za vzniku ribonukleoproteínových komplexov

Sú známe aj formy takzvaných kódujúcich lncRNA, kedy môže dochádzať k tvorbe malých peptidov. Existujú rôzne formy delenia lncRNA hľadiac na rôzne kritériá. Vzhľadom na polohu génu pre danú lncRNA v genóme poznáme skupiny ako intergénová, intragénná či promótorová ncRNA (Obrázok 8).



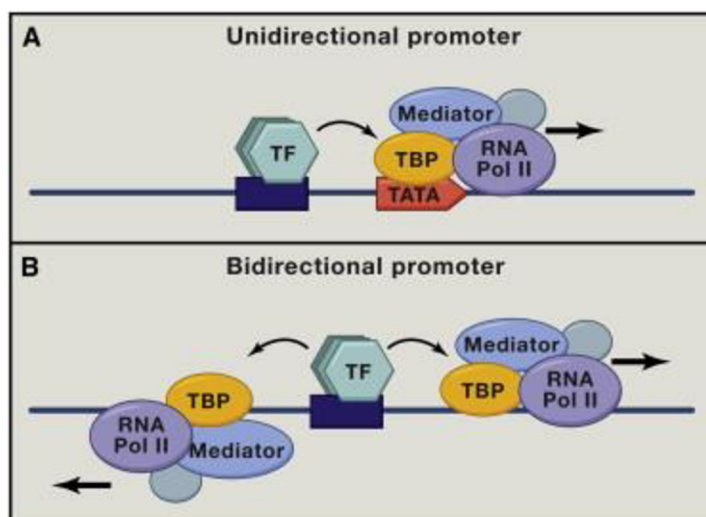
Obrázok 8. Klasifikácia lncRNA založená na umiestnení genómu (prevzaté a upravené podľa Balas & Johnson, 2018). A - Intergénové lncRNA sa nachádzajú medzi génmi kódujúcimi proteín. B - Obojsmerné lncRNA sa transkribujú z rovnakého promótoru ako gén kódujúci proteín, ale v opačnom smere. C - Antisense lncRNA pochádzajú z antisense vlákna RNA génu kódujúceho proteín. D - Sense-prekrývajúce sa lncRNA sa prekrývajú s jedným alebo viacerými intrónmi a/alebo exónmi génu kódujúceho proteín v smere sense vlákna RNA.

Je známe aj delenie ktoré sa zakladá na umiestnení lncRNA vzhľadom ku génu kódujúcemu proteín, ktorý sa nachádza vo vzťahu s danou formnou ncRNA. Tu patria skupiny anglicky nazývané - nested, overlapping, sense, antisense, divergent, convergent. (Obrázok 9). „Sense” forma je štruktúrou originálnej sekvencie DNA alebo aj RNA molekúl. „Antisense” zas odkazuje na komplementárnu sekvenciu danej DNA alebo RNA molekuly (Gupta et al., 2011).



Obrázok 9. Typy prekrývania (prevzaté a upravené podľa Chen & Stein, 2006). Šesť typov prekrývajúcich sa génov. A - Vnorený génový pár, rovnaký reťazec. Každý pár vnoreného génu pozostáva z príľahlého génu (vonkajší gén) a vnoreného génu (vnútorný gén). B - Skupina génových párov s prekrývajúcim sa exónom, opačným vláknom. C - Preložené génové páry rovnakého vlákna a opačného vlákna. D - Génový pár na chrbte. E - Konvergentný prekrývajúci sa génový pár. F - Divergentná prekrývajúca sa génová skupina.

Potrebné je zmieniť aj obojsmernú (anglicky bidirectional) metódu transkripcie, ktorá je hlavným dôvodom vzniku „antisense“ transkriptov. Zakladá sa na replikačnom procese prebiehajúcom v oboch alebo teda dvoch smeroch (Obrázok 10). Dochádza k iniciácii syntézy nového vlákna dvomi polymerázami naraz na danom úseku v DNA. Vzhľadom na rôzne typy tejto transkripcie, dochádza k začiatku transkripcie buď na rovnakom mieste v DNA, ale na opačných vláknach. V tomto prípade by sa polymerázy pohybovali smerom od seba a nedochádzalo by k prekrývaniu (Seila et al., 2009). Pri druhom type je začiatok transkripcie vo vnútri génu na opačných vláknach. Pohyb polymeráz by smeroval oproti sebe, čo by spôsobilo v miestach prekrytia polymeráz takzvaný „antisense“ transkript. rovnakom úseku v DNA (Chatterjee et al., 2011).



Obrázok 10. Transkripčné faktory vedú k divergentnej transkripcii (prevzaté a upravené podľa Wu & Sharp, 2013).

Čo sa ešte týka delenia RNA, taktiež určujeme samostatné skupiny. Napríklad vzhľadom na potenciálne funkcie lncRNA foriem, ako sú riboswitches, epigenetické, translačné, kódujúce a architekturné lncRNA. Takýchto delení a skupín je ale mnoho, čo častokrát dokáže spôsobiť isté nezrovnalosti v zaradení. Tie môžu byť spôsobené napríklad faktom, že jeden typ ncRNA môže vykazovať viacero vlastností, alebo taktiež že gén kódujúci nejakú formu ncRNA môže vytvárať rôzne formy lncRNA (Lakhota et al., 2020).

Dlhé formy nekódujúcich RNA sú významnými faktormi epigenetickej regulácie, do ktorej procesov sú zaradované modifikácie génovej expresie nezávislé od potreby alternácie samotnej sekvencie DNA. Jedná sa o procesy ako metylácia DNA, modifikácia histónov alebo remodelácia chromatinu. Tu dochádza k riadeniu priamo na úrovni procesu transkripcie prevažne pomocou acetylácie a metylácie DNA, alebo histónovej modulácie (X. Zhang et al., 2019b).

Netreba však zabúdať ani na enhancerové RNA (eRNA). Sú to formy nekódujúcej RNA lokalizovanej pred ale aj za cieľovým génom, regulujúce jeho expresiu. Spolu aj s promótormi regulujú nie len procesy transkripcie, ale vo všeobecnosti aj osud bunky. Vznikajú z enhancerov pôsobením enzýmu RNA-polymerasy II. Bežne sú však transkribované iba enhancerové štruktúry, ktoré obsahujú malé množstvo metylovaných regiónov, majú dostupný chromatin a transkripčné iniciačné faktory ako sú TBP alebo TFII. Aj keď štruktúra a pôvod eRNA je vzdialená od lncRNA foriem, tieto dva rozdielne typy RNA ale ukrývajú spoločnú vlastnosť. Tou je aktivácia transkripcie mRNA. Na



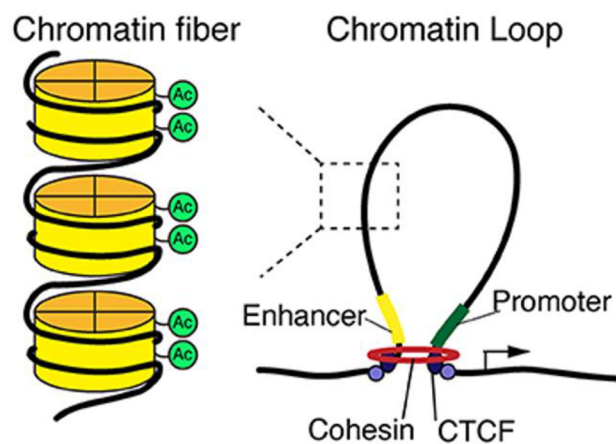
rozdiel od lncRNA, ktoré sú pomerne dlhé a stabilné, transkribované pomocou svojich vlastných promótorov, eRNA sú bežne exprimované „bidirectionally“ (obojsmerne) v jadre a ich stabilita nie je vysoká. Sú exprimované v ešte nižších hodnotách ako spomínané lncRNA. To môže byť spôsobené faktom, že enhancerové sekvencie často neobsahujú špecifickú tri-metyláciu 4. lyzínového zvyšku na histónovom proteíne H3 (H3K4me3) v promótorových úsekoch. Prítomnosť H3K4me3 priamo koreluje so silou expresie génu. Ďalšou odlišnosťou je aj fakt, že väčšina eRNA nepodlieha bežnej maturácii vo forme zostrihu štruktúry a polyadenylácie, ktoré sú pre lncRNA bežné. Táto forma úpravy je skôr typická pre dlhšie formy eRNA, ktoré však vykazujú inú formu aktivity. Krátke a teda nepolyadenylované eRNA fungujú ako cis-regulačné elementy - fungujú interchromozomálne. Regulujú funkciu blízkych alebo susedných génov. Na rozdiel od nich, dlhé a stabilné eRNA s polyadenyláciou ovplyvňujú expresiu abundantných génov procesom relokácie na iné chromozomálne regióny. Preto vykazujú tvorbu takzvaných trans-regulačných elementov. Jedná sa o proces regulácie vzdialených génov. Funkcia samotných foriem eRNA je závislá od procesu ich syntézy, ktorý podlieha regulácii. To znamená, že syntéza eRNA nie je iba takzvaný transkripčný šum. Táto eRNA zabezpečuje reguláciu expresie cieľových génov na základe signalizácie vyvolanej stimulom. Na rozdiel od promótorových štruktúr, ktorých aktivite sú veľmi podobné, sa enhancery neriadia spôsobom závislým od pozície a smeru v procese iniciácie transkripcie. Sú teda schopné ignorovať tieto podmienky a tvoriť chromatinové slučky, čo im umožňuje dosah na vzdialené promótory. To zabezpečí špecifickú génovú expresiu (T. K. Kim et al., 2015; Han & Li, 2022).

## 2.4 APOLO lncRNA

*AUXIN REGULATED PROMOTER LOOP (APOLO)*. Jedná sa o formu RNA, pomerne novoobjavenú a anotovanú u rastlinného druhu *A. thaliana*. Konkrétne je možné hovoriť o long intergenic noncoding RNA (lincRNA). Je známe, že dochádza k jej transkripcii pomocou enzýmov DNA dependentných RNA polymeras II (polymerasa II, RNAP II, EC 2.7.7.6) a V (polymerasa V, Pol V, EC 2.7.7.7). Je však potrebné poukázať aj na fakt, že celý proces transkripcie je iniciovaný rastlinným hormónom auxínom, a je teda znateľné, že sa jedná o auxín-responzívny gén. *APOLO* je umiestnený na lokuse v blízkosti ďalšieho auxín-responzívneho génu *PINOID (PID)*, čo zabezpečuje ich ko-reguláciu v procese génovej expresie. *PINOID* kóduje serín/threonín-proteín kinázu,

ktorá pozitívne reguluje auxínový transport. Aktívne fosforyluje PIN proteíny, čo má za následok ovplyvnenie ich polarity (Ariel et al., 2020).

V bežných podmienkach oba gény podliehajú represii. Tá je zabezpečená zložitou kompozíciou spolupráce viacerých faktorov. Faktor trimetylácie H3K27me3 je sprostredkovaný *POLYCOMB REPRESSIVE COMPLEX 2 (PRC2)*, dokopy v spolupráci s DNA metyláciou, chromatinovou slučkou (Obrázok 11) a zložkou komplexu - *LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 (LHP1)* zaisťuje epigenetickú represiu (Ariel et al., 2014).



Obrázok 11. Schéma chromatinovej slučky (prevzaté a upravené podľa Fujita & Yamashita, 2021). CTCF – väzbový faktor zabezpečujúci spojenie vzdialených sekvencií DNA vytvárajúci 3D chromatinovú slučku.

Zvýšená hladina koncentrácie rastlinného hormónu aktivuje pôsobenie demetylasy, vplyvom ktorej dochádza k zníženiu metylácie DNA, čomu nasleduje rozvoľnenie lokálnej chromatinovej slučky. Vtedy sa otvorí promótor a dochádza k transkripcii *APOLO* a *PINOID*. Proces expsie génov je indukovaný aj v ďalšom kroku, kedy novovznikajúca *APOLO* lncRNA je zodpovedná za oddelenie z *PRC1* zložky *LHP1*, následkom čoho dochádza k strate H3K27 trimetylácie. Týmto procesom dochádza k odbúraniu chromatinovej slučky. V súlade s tým, však auxín indukuje tvorbu aj iných transkripčných faktorov, ktorým je napríklad *AUXIN RESPONSIVE FACTOR 7 (ARF7)*. Ten vykazuje schopnosť väzby na promótorovú sekvenciu *APOLO*, najmä v čase neprítomnosti chromatinovej slučky. To indukuje proces transkripcie pomocou už spomínanej RNA-polymerasy II (Csorba, 2021).

Ako už bolo uvedené lncRNA fungujú v organizme ako vysoko dôležité faktory regulácie chromatinu a dynamiky jeho štruktúr, vplyvom čoho sú schopné modulovať proces transkripcie génov. To môže mať za následok alternáciu procesu vývoja jedinca spôsobujúcu anatomické a iné zmeny. Do skupiny lncRNA patrí aj APOLO, ktoré konkrétne rozoznáva rozličné a nezávislé lokusy génov u *A. thaliana* v genóme. Keďže sa jedná o aktivitu na vzdialených génoch, je možné teda hovoriť o *trans*-aktivite na vzdialených miestach v genóme. Lokusy detekovaných génov majú spoločnú charakteristiku, tou je sekvenčná komplementarita a možnosť tvorby R-slučiek (DNA-RNA duplexy) a auxin-responzívna vlastnosť. Jeho činnosť pozostáva z odstránenia PRC1 zložky - LHP1, čo indukuje zmeny v 3D štruktúrach chromatinu cieľových génov. V jednoduchosti to znamená, že dochádza k modulácii procesu transkripcie (Moison et al., 2021).

No aj v dnešnej dobe ešte stále neexistujú kompletne poznatky o funkcii nekódujúcej regulácie v auxínovom transporte, a preto sme sa rozhodli zamerať svoju pozornosť na novo anotované kandidáty lokalizované v blízkosti *PINI* a *CAMEL* sekvencií. Tieto kandidáty sme pomenovali lncRNA-PIN1-1 a lncRNA-CAM.

## 3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 3.1 Materiály

#### 3.1.1 Biologický materiál

semená *Arabidopsis thaliana*, ekotyp Columbia (Col-0)

chemokompetentné baktérie *Escherichia coli* TOP10

elektrokompetentné baktérie *Agrobacterium tumefaciens* GV3101

#### 3.1.2 Chemikálie

Agarosa - Sigma Aldrich (USA)

2-amino-2-hydroxymetylpropán-1,3-diol (Tris) – Duchefa Biochemie (Holandsko)

Deoxyribonukleozidtrifosfáty (dNTPs) – Sigma-Aldrich (USA)

Dimetylsulfoxid (DMSO) – New England Biolabs (UK)

Etanol – Lachner (Česká republika)

Etídium bromid – NeoLab (Nemecko)

Etyléndiaminotetraoctová kyselina (EDTA) – Penta (Česká republika)

Murashige & Skoog including vitamins – Duchefa Biochemie (Holandsko)

MgCl<sub>2</sub> - Thermo Fisher Scientific (USA)

Protease Inhibitor Cocktail Tablets – Roche Applied Science (Švajčiarsko)

Sacharóza – Lachner (Česká republika)

X-Gluc – Thermo Fisher Scientific (USA)

#### 3.1.3 Štandardy molekulovej hmotnosti

1 kb plus DNA ladder – Thermo Fisher Scientific (USA)

#### 3.1.4 Antibiotiká

Gentamycín – Duchefa Biochemie (Holandsko)

Kanamycín – Duchefa Biochemie (Holandsko)

Rifampicín – Duchefa Biochemie (Holandsko)

Spectinomycín – Duchefa Biochemie (Holandsko)

### **3.1.5 Enzýmy a enzýmové pufry**

5x Go Taq Green Flexi Buffer – Promega (USA)

5x Phusion HF pufri – Thermo Fisher Scientific (USA)

6x TriTrack DNA loading dye - Thermo Fisher Scientific (USA)

10x FastDigest buffer - Thermo Scientific (USA)

10x T4 DNA ligase buffer - Thermo Scientific (USA)

50x TAE (Tris/Acetat/EDTA) - Thermo Scientific (USA)

DpnI – NEB (USA)

Gateway BP Clonase II enzyme mix – Thermo Fisher Scientific (USA)

Gateway LR Clonase II enzyme mix – Thermo Fisher Scientific (USA)

GoTaq G2 Flexi DNA polymerase (5 U/ $\mu$ l) – Promega (USA)

High-Fidelity DNA polymerase - Thermo Fisher Scientific (USA)

Phusion HF (High-Fidelity)

DNA polymerase (2 U/ $\mu$ l) – Thermo Fisher Scientific (USA)

Proteinase K solution (2  $\mu$ g/ $\mu$ l) – Thermo Fisher Scientific (USA)

SalI – NEB (USA)

T4 DNA ligase - Thermo Scientific (USA)

TE buffer - Thermo Scientific (USA)

### **3.1.6 Roztoky pre gélovú elektroforézu**

50x TAE pufri:

50 mol·l<sup>-1</sup> EDTA, 2 mol·l<sup>-1</sup> Tris, 1 mol·l<sup>-1</sup> kyselina octová

1 % (w/v) agarózový gél:

10 g agarózy na 1000 ml TAE pufri, uvarené v mikrovlnnej rúre

### **3.1.7 Roztoky a médiá pre prácu s baktériami**

Tekuté Luria Bertani (LB) médium:

10 g trypton, 5 g kvasnicový extrakt, 10 g NaCl, Milli-Q H<sub>2</sub>O do 1000 ml, sterilizované autoklávaním

### LB agar:

1000 ml tekuté LB + 15 g agaru, sterilizované autoklávaním

### SOC médium:

20 g trypton, 5 g kvasnicový extrakt, 0,5 g NaCl, Milli-Q H<sub>2</sub>O do 950 ml, 10 ml 250 mmol·l<sup>-1</sup> KCl (pH 7,0). Milli-Q H<sub>2</sub>O do 1000 ml, sterilizované autoklávaním, 20 ml sterilnej 1 mol·l<sup>-1</sup> D-glukózy a 5 ml sterilného 2 mol·l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>

## **3.1.8 Roztoky pre výsev semien *Arabidopsis***

### Polovičné Murashige & Skoog (AM+) médium:

1,1 g MS solí, 5 g sacharóza, pH 5,7 (NaOH), 4g agar, MilliQ H<sub>2</sub>O do 500 ml, sterilizované autoklávaním

## **3.1.9 Roztoky pre stabilnú transformáciu *Arabidopsis*:**

### Inokulačné médium:

5 g sacharóza, 50 µl Silwet L-77, Milli-Q H<sub>2</sub>O do 50 ml

## **3.1.10 Komerčné kity**

ENZA Plasmid DNA Mini Kit I – Omega Bio-tek (USA)

NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up kit – Machenery Nagel (Nemecko)

## **3.1.11 Primery**

Lyofilizované primery – Sigma Aldrich (USA)

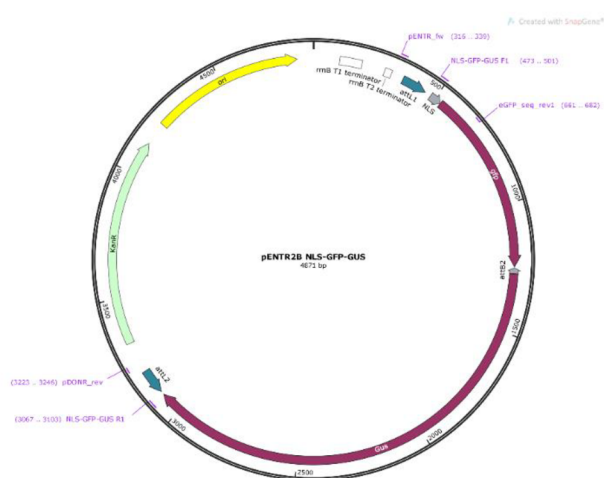
Tab. 1: Zoznam použitých primerov

Primer	Sekvencia
29_JH_GA_pCAMEL_F1	cgagattagatgatgacggctttgg
30_JH_GA_pCAMEL_R1	ttcgtctggttcttgaaaaacaagg
31_JH_GA_pCAMEL_F2	ttcaagaaaccagacgaaaAAGGGCGAATTCGACCCAAG
32_JH_GA_pCAMEL_R2	cgatcatatctaatctcgAAGGGCGAATTCGGAGCCAAC

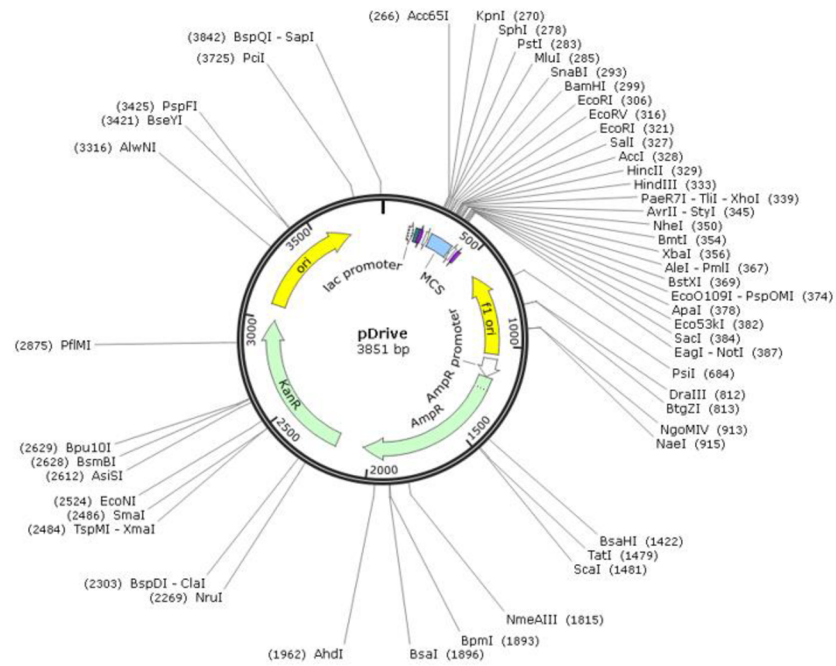
Tab. 2: Zoznam použitých primerov (pokračovanie)

17_JH_GA_IncRNA-PIN1-1_3.9kb_F1	CCGGAACCAATTCAGTCGACTTCGTAGTTGGAAGGTCTCGGAG
18_JH_GA_IncRNA-PIN1-1_3.9kb_R1	AGGCTGCATGTCGACTGAATaacatgcattatcttcgggtgcg
19_JH_GA_IncRNA-PIN1-1_3.9kb_F2	accgaaaataatgcatgttATTCAGTCGACATGCAGCCTTCTCTTAAAC
20_JH_GA_IncRNA-PIN1-1_3.9kb_R2	CGAGACCTTCCAACACTACGAAGTCGACTGAATTGGTTCCGGC
14_JH_M13_R	CAGGAAACAGCTATGACC
59_JH_plncRNA-PIN1-1-F1_3.8	GGTGTGCGCAGATAAGCCTTGAG
60_JH_plncRNA-PIN1-1-R1	aaaCTCGAGaacatgcattatcttcgggtgcg
54_JH-NLS-GFP-GUS-F1	TCAGTCGACATGCAGCCTTCTCTTAAACG
55_JH-NLS-GFP-GUS-R1	GGGTCTAGATATCTCGAGTCATTGTTTGCCTCCCTGC
74_JH_attL4_F1	GATCAAATAATGATTTTATTTTACTGATAGTGACCTGTTTCGTTGC AACAAATTGATAAGCAATGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTATA GAAAAGTTG
75_JH_attL4_R1	GATCCAACCTTTTCTATACAAAGTTGGCATTATAAAAAAGCATTGC TTATCAATTTGTTGCAACGAACAGGTCATTATCAGTCAAATAAAA ATCATTATTT
76_JH_attR1_F1	TCGACCAAGTTTGTACAAAAAAGTTGAACGAGAAACGTAAAATG ATATAAATATCAATATATTAATAGATTTTGCATAAAAAACAGA CTACATAATACTGTAAAACACAACATATGCAGTCACTATG
77_JH_attR1_R1	TCGACATAGTGACTGCATATGTTGTGTTTTACAGTATTATGTAGTC TGTTTTTATGCAAAATCTAATTTAATATATTGATATTTATATCAT TTTACGTTTCTCGTTCAACTTTTTTGTACAAACTTGG

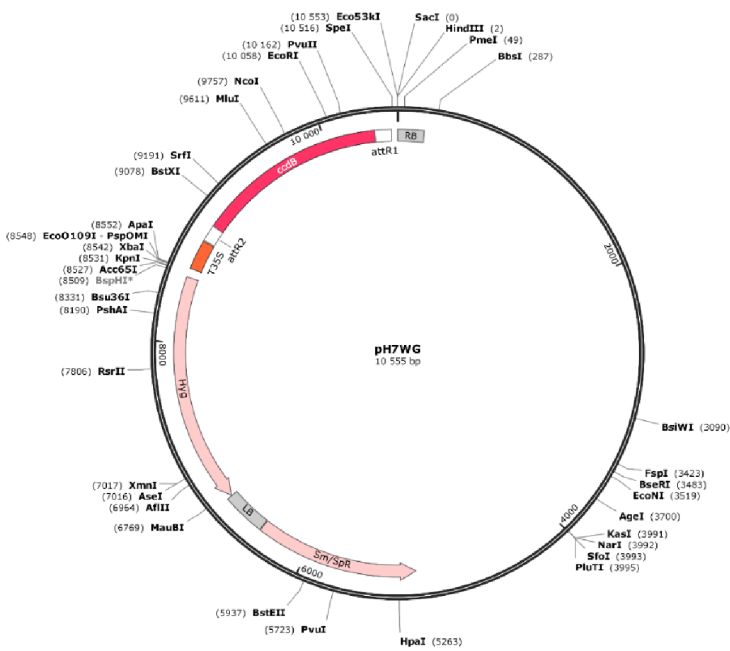
### 3.1.12 Vektory



Obrázok 12. Mapa plazmidu pENTR2B fúzovaného s GFP a GUS



Obrázok 13. Mapa plazmidu pDrive



Obrázok 14. Mapa plazmidu pH7WG

### 3.1.13 Zariadenia a pomôcky

Elektroporačný systém ECM 399 – BTX (USA)

Flowbox Esco Sentinel Gold microprocessor.- Esco Senitel (Singapur)



Fluorescenčný mikroskop

Mikrotrepačka a vortex Combi-spin PCV-2400 – GrantBio (UK)

Minitrepačka Thermomixer comfort – Eppendorf (Nemecko)

Mini Gel Tank – Thermo Fisher Scientific (USA)

NanoDrop OneC – Thermo Fisher Scientific (USA)

pH meter EDGE – Hanna Instruments (USA)

Pipety research 1000; 200; 20; 10µl; 2,5 µl – Eppendorf (Nemecko)

Stereomikroskop SZX16 – Olympus (Japonsko)

Termálny cyklér Analytik Jena GmbH - Biometra (USA)

Termálny cyklér Doppio – Avantor (USA)

Transiluminátor Gel Doc EZ Imager - Bio-Rad (USA)

Ventilovaná mikrocentrifúga Micro Star 17R – Avantor (USA)

Vortex Orbital shaker vortex 2 – IKA (Nemecko)

Výrobník ľadu GB 903 HC - Brema Ice (Taliansko)

Zdroj napätia pro elektroforézu – Biometra (Nemecko)

### **3.1.14 Software**

ImageLab – Bio-Rad (USA)

Microsoft Office 365

SnapGene – GSL Biotech LLC (USA)

## 3.2 Metódy

### 3.2.1 Polymerázová reťazová reakcia

Metóda bola využitá pre amplifikovanie génov promótorov sledovaných lncRNA-PIN1, plncRNA-CAM. Použité templáty pochádzali z genomickej DNA izolovanej z *A. thaliana*. Reakcia prebiehala v 50  $\mu$ l objemu reakčnej zmesi (Tab. 3) za použitia termálneho cykléru so špecifickým nastavením podmienok (Tab. 4). Výsledný produkt bol podrobený elektroforetickej separácii na 1 % agarózovom géli s použitím GelRed farbiva a TriTrack DNA loading dye pre detekciu správnosti amplifikácie.

Tab. 3: Zloženie reakčnej zmesi pre amplifikáciu génu

Chemikália	Objem pre 1 vzorku ( $\mu$ l)
5 x Phusion HF buffer	10
dNTP (10 mmol $\cdot$ l <sup>-1</sup> )	3
Forward primer (5 mmol $\cdot$ l <sup>-1</sup> )	2,5
Reverse primer (5 mmol $\cdot$ l <sup>-1</sup> )	2,5
Genomická DNA	1
Phusion DNA Polymerase	0,5
PCR H <sub>2</sub> O	32,5
Celkový objem	50

Tab. 4: Program termocykléru pre amplifikáciu Phusion HF polymerasou

Krok	Teplota (°C)	Čas	Opakovanie
Počiatočná denaturácia	98	30 sekúnd	
Denaturácia	98	10 sekúnd	
Nasadenie pimerov	59	20 sekúnd	40 cyklov
Elongácia	72	2 minúty	
Konečná elongácia	72	10 minút	
Uskladnenie	16	neobmedzený	

### 3.2.2 Elektroforetická separácia na agarózovom géli

Zásobný roztok 50x TAE pufru pozostáva z Trisu – (HOCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub>, acetátu a EDTA - ((CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>COOH)<sub>4</sub>. Príprava zásobného roztoku EDTA (0,5 M) pozostávala zo

zmesi 93,05 g EDTA, rozpustenej v 400 ml deionizovanej vody. Následne bolo potrebné upraviť hodnoty pH za použitia NaOH. Po upravení hodnoty pH = 8 bol objem vznikajúceho roztoku doplnený na finálny objem 500 ml. Nakoniec bol roztok autoklávovaný. Pre prípravu samotného 50x TAE pufru bolo potrebné navážiť 242 g Tris a následne rozpustiť v 700 ml deionizovanej vody. Ďalej bolo potrebné opatrne pridať 57,1 ml 100% kyseliny octovej a následne aj 100 ml predom pripraveného 0,5 M roztoku EDTA (pH 8,0). Objem musel byť doplnený na finálny objem 1000 ml a pH pufru bolo upravené na hodnotu pH 8,5. Takto pripravený TAE pufr bol skladovaný pri izbovej teplote, a po nariadení využitý pre gélovú elektroforézu. Potrebný 1x TAE pufer bol pripravený zo zásobného 50x TAE pufru. Tento pufer je využívaný v procese elektroforetických separačných metód na polyakrylamidovom alebo agarózovom géli, pre separáciu nukleových kyselín o veľkosti viac ako 1500 bp. Výhodou je jeho možnosť variability využitia aj pri separácii rôznych štruktúr DNA ako je vysoko špiralizovaná alebo genomická DNA. Nevýhodou je ale jeho nízka pufracia kapacita, a nie je odporúčané jeho použitie pri dlhých separačných procesoch.

Samotný roztok 1x TAE pufru vzniká nariadením 8 ml 50x koncentrovaného roztoku TAE pufru pomocou destilovanej H<sub>2</sub>O o objeme 400 ml. Pufr sa tiež využíva nie len ako migračná tekutina, ale nachádza svoje využitie aj v procese prípravy gélov. Sterilizácia prebieha pomocou filtrácie cez 0,22 μm membránu.

Pre prípravu gélu je roztok bol potrebný roztok 1% agarózy. Ten vznikol povarením 4g agarózy v 1x TAE pufri o objeme 400 ml. 100 ml roztoku 1% agarózy bolo zmiešaných s 8 μl farbiva GEL RED. Následne bol roztok naliaty do elektroforetickej vaničky s hrebienkom. Z gélu bol po stuhnutí odstránený hrebienok a gél bol presunutý do komory elektroforátoru vyplnenej 1x TAE pufrom. Pre orientáciu pri vizualizácii bolo potrebné použiť 1 kb plus DNA ladder, ktorý bol pipetovaný o objeme 5 μl do prvej jamky gélu. Pred pipetovaním boli vzorky zmiešané s migračným pufrom TriTrack DNA loading dye. Na 8 μl vzorky pripadal objem 2 μl migračného pufru. Následne boli vzorky pipetované do jamiek a separované 30 min pri 100 V. Vzniknutý gél bol vizualizovaný za použitia UV transiluminátora Gel Doc EZ Imager - Bio-Rad (USA) a výsledné snímky boli spracovávané v programe ImageLab – Bio-Rad (USA).

### 3.2.3 Prečistenie fragmentov DNA

Amplikony získané PCR reakciou boli purifikované použitím kitu NucleoSpin Gel and PCR clean-up (Machery Nagel). Proces prebiehal na základe dodaného návodu. Vzorka bola zmiešaná s činidlom NTI o objeme 100  $\mu$ l a následne bola premývaná NT3 pufrom 2x. Objem použitého elučného pufru bol 15  $\mu$ l. Po prečistení bola výsledná koncentrácia vzorky meraná pomocou zariadenia NanoDrop OneC – Thermo Fisher Scientific (USA).

### 3.2.4 Stanovenie koncentrácie DNA

Detekcia prebiehala za použitia spektrofotometrického zariadenia NanoDrop (Thermo Scientific). Pri meraní bol prístroj nastavený na detekciu dsDNA formy fragmentov pri vlnovej dĺžke 260 nm. Ako blank bol použitý samostatný elučný pufer z kitu NucleoSpin Gel and PCR clean-up (Machery Nagel). Vzorky boli pipetované na detektor o objeme 1  $\mu$ l.

### 3.2.5 Ligácia

Inkubácia prebiehala v reakčnej zmesi (Tab. 5) po dobu 2 hodín pri izbovej teplote a následne pri teplote 16 °C cez noc. Pre inhibíciu enzymatickej aktivity sa využila metóda tepelnej inaktivácie inkubáciou pri 70 °C po dobu 10 minút.

Tab. 5: Zloženie reakčnej zmesi pre ligáciu

Zložka zmesi	Objem ( $\mu$ l)
10x T4 DNA ligase buffer	1
T4 DNA ligasa	1
Vektor	2
PCR produkt	6
Celkový objem	10

### 3.2.6 Gibson assembly

Je jednou z variánt klonovania. Metóda vyvinutá doktorom Danielom Gibsonom a jeho tímom v roku 2009 na inštitúte J. Craig Ventera. Aj keď nepatrí medzi tradičné metódy, je pomerne jednoduchá a nevyžaduje vysokú časovú náročnosť. Zakladá sa na využívaní reštrikčných enzýmov v kombinácii s tými ligačnými. Je schopná využívať 2 a viac fragmentov ssDNA alebo dsDNA počas procesu klonovania, kedy ich počet môže

dosiahnuť až 15 rôznych variant, to znamená že je možné ligovať viac fragmentov v jednom jednoduchom kroku. Ďalšou výhodou tejto metódy je aj fakt, že nie je potrebné mať špecifické reštrikčné miesta v oblasti spojov fragmentov, a preto je možné ligovať akékoľvek fragmenty takmer neobmedzene. Taktiež pri procese konjugácie nedochádza k tvorbe „jaziev“ – nerovností v mieste spojov. Celý proces konjugácie fragmentov je založený na spájaní prekrývajúcich sa koncov oligonukleotidov, ktorých dĺžka môže byť variabilná vo veľkosti prekryvov od 15 do 30 bp. Keďže sa v našom prípade jednalo o jednokrokový proces inkubácie, dochádzalo k aplikácii enzymatického mixu aktívneho v jednom pufrovacom roztoku. Aktívnymi enzýmami boli exonukleáza, polymerasa a DNA ligasa. Funkciou využívaného exonukleázového enzýmu je štiepenie a tvorba prekrývajúcich sa koncov na 3' strane použitej nukleotidovej sekvencie. Tento proces štiepenia je nepostrádateľný z dôvodu tvorby komplementárnych miest potrebných pre správne spájanie. Polymerasový enzým má zabezpečiť zužovanie voľných medzier medzi jednotlivými úsekmi DNA. Finálne DNA ligasa zabezpečí vytvorenie väzieb medzi jednotlivými fragmentami, čo vedie k vytvoreniu požadovaného konštruktú. Celý proces prebieha počas inkubácie v teplote cca 50 °C. Výsledný produkt môže byť následne využitý na priame spracovanie metódou PCR bez potrebného predchádzajúceho prečistenia.

V našom prípade sme ligovali dva fragmenty, a preto sme použili jednoduchšiu metódu zahrňujúcu jednostupňovú inkubáciu a to konkrétne pri teplote 55 °C. Na celý proces sme využili High-Fidelity DNA polymerasu.

do ktorého boli pridané dve varianty fragmentov, a to DNA (plncRNA-CAM a plncRNA-PIN1-1) fragment a vektor, ktoré museli byť navzájom v rovnomernej ekvimolárnej koncentrácii.

Metóda vyžaduje konštrukciu dlhých primerov pre svoju funkciu. Tieto špecifické primery boli navrhnuté v programe Snapgene. Po vytvorení týchto primerov (Tab. 1) bolo prvým krokom prípravy amplifikovanie konštruktov plncRNA-CAM a plncRNA-PIN1-1 pomocou jednoduchej PCR metódy. Reakcia prebiehala v reakčnej zmesi (Tab. 3) a za nastavenia termálneho cykléra (Tab. 4). Následne bolo potrebné potvrdiť prítomnosť amplikónov. To prebiehalo metódou gélovej elektroforézy na 1% agarózovom géli za použitia farbiva GEL RED. Výsledný gél bol vizualizovaný pomocou UV transiluminátora Gel Doc EZ Imager - Bio-Rad (USA) a výsledné snímky boli spracovávané v programe ImageLab - Bio-Rad (USA). Po potvrdení prítomnosti

amplifikácie boli PCR produkty prečistené. Takto pripravené PCR produkty mohli byť využité priamo v metóde Gibson assembly (GA).

Metóda GA bola využitá ako náhrada reštrikčného klonovania, ktoré v prípade plncRNA-CAM::NLS-GFP-GUS aj plncRNA-PIN1-1::NLS-GFP-GUS bolo neúspešné.

Objem pipetovaného vektoru voči DNA fragmentu bol v ekvimolárnom pomere koncentracii vyrovnaný pre zamedzenie nešpecifického zhlukovania a uzatvárania častí fragmentu. Reakcia prebiehala v reakčnej zmesi (Tab. 6) pri teplote 50 °C po dobu 30 minút.

Tab. 6: Zloženie reakčnej zmesi pre Gibson assembly

Zložka zmesi	Objem (μl)
High-Fidelity DNA polymerasa	5
Fragment DNA	3,5
Vektor	1,5
Celkový objem	10

### 3.2.7 LR – reakcia

Výsledkom LR reakcie bol expresný/destinačný vektor pripravený zo vstupných konštruktov obsahujúcich lncRNA-CAM/PIN1-1::NLS-GFP-GUS v pENTR2B (Obrázok 12) do vektoru pH7WG (Obrázok 14). Inkubácia prebiehala v reakčnej zmesi (Tab. 7).

Tab. 7: Zloženie reakčnej zmesi pre LR reakciu

Zložka zmesi	Objem (μl)
pENTR2B entry klon (150 ng)	5
destinačný vektor (150 ng)	1
TE pufer. pH 8,0	8
LR Clonase II enzyme mix	2

Finálna zmes bola dvakrát zvortexovaná (2 sekundy) a následne bola krátko cektrifugovaná za použitia mikrocentrifúgy. Zmes bola ponechaná na inkubáciu pri laboratórnej teplote počas noci. Pre ukončenie reakcie rekombinácie bolo potrebné pridanie 1 μl proteinázy K. Následne musela byť reakčná zmes inkubovaná po dobu 10 minút pri teplote 37 °C.

### **3.2.8 Transformácia bakteriálneho druhu *Escherichia coli* metódou teplotného šoku**

Na transformáciu boli využité chemokompetentné baktérie druhu *E. coli* TOP10, skladované pri teplote -80 °C. Pred prácou boli roztopené na ľade. K 50 µl bakteriálnej kultúry bolo pipetovaných 2 µl LR reakcie, alebo 4 µl ligačnej zmesi. Tento roztok bol ponechaný na ľade po dobu 30 minút pre prípravu podmienok na navodenie teplotného šoku. Po vychladení boli baktérie inkubované pri 42 °C po dobu 30 s a ihneď potom boli zas umiestnené do ľadu na dobu 2 minút. Následne bol baktériám pridaný roztok SOC média o objeme 500 µl. Zmes bola umiestnená na vyhrievanú trepačku (37 °C) a bola inkubovaná po dobu 1 hodiny pri teplote 37 °C a 400 RPM.

Po inkubácii bol celý objem zmesi v sterilnom prostredí flowboxu očkovaný na pevné LB médium s obsahom kanamycínu (pre pENTR2B) alebo spectinomycínu (pre pH7WG), a kultúra bola rozotretá po povrchu pomocou sterilnej sklenenej hokejky. Naočkované misky boli umiestnené do 37 °C pre inkubáciu cez noc.

Narastené kolónie boli následne testované pomocou PCR pre detekciu pozitívnej transformácie.

### **3.2.9 Kolony PCR**

Proces obsahoval postup podobný metóde PCR samotnej. Narastené kolónie transformovaných bakteriálnych buniek boli očíslované. Reakcia prebiehala v reakčnej zmesi (Tab. 8) s použitím špecifických primerov M13 - všeobecné primery a Forward primery (Tab. 1) pre amplifikovaný fragment. Zmes bola následne pipetovaná do PCR stripov o objeme 25 µl pre jednu jamku. Následne boli odoberané časti kolónií umiestňované do reakčnej zmesi. Každá kolónia mala samostatnú jamku, ktorej číslo korešpondovalo s číslom kolónie. Nastavenie automatického termálneho cykléru bolo špecifikované pre tento proces (Tab. 9).

Tab. 8: Zloženie reakčnej zmesi pre kolony PCR

Zložka zmesi	Objem ( $\mu\text{l}$ )
5x Go Taq pufer	10
25 mM $\text{MgCl}_2$	1
10 mM dNTP	1
10 $\mu\text{M}$ primer A	1
10 $\mu\text{M}$ primer B	1
Go Taq polymerasa	0,25
$\text{H}_2\text{O}$	31,75
Celkový objem	50

Tab. 9: Program termocykléru pre kolony PCR Go Taq polymerasou

Krok	Teplota ( $^{\circ}\text{C}$ )	Čas	Opakovanie
Počiatočná denaturácia	95	5 minút	1x
Denaturácia	95	30 sekúnd	
Nasadanie primerov	55	30 sekúnd	25x
Elongácia	72	1 minúta	
Konečná elongácia	72	10 minút	
Uskladnenie	16	neobmedzený	

Po ukončení procesu amplifikácie boli produkty kontrolované metódou elektroforézy na agarózovom géli 1% bez použitia TriTrack DNA loading dye, z dôvodu že využívaný pufer už obsahoval túto zložku.

Kolónie u ktorých sa pomocou elektroforetickej metódy detekcie potvrdila prítomnosť transformovaného konštruktú boli očkované do tekutého média pre inkubáciu.

Z narastenej suspenznej kultúry boli izolované plazmidy a tie boli následne nariadené na požadovanú koncentráciu ( $\sim 100 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ) a poslané na sekvenovanie pre potvrdenie správnosti vlozenej sekvencie.

### 3.2.10 Transformácia *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 pomocou elektroporácie

Využitá transformačná metóda zahrňovala použitie bakteriálneho druhu *A. tumefaciens* GV3101 skladovaného pri teplote  $-80^{\circ}\text{C}$ . Prvotne boli baktérie rozmrazené ponechaním na ľade po dobu 10 minút. Do pripravenej kultúry bola pipetovaná izolovaná DNA



destinačného plazmidu objemu 2  $\mu$ l. Vzorky boli následne pipetované do kyviet, ktoré boli predom ponechané na ľade po dobu 30 minút. Zmes bola podrobená procesu elektroporácie pri podmienkach napätia rovného 1800 V a času trvajúceho 5 ms, po ktorom bolo potrebné prídanie predhriateho SOC média (28 °C). Vzorky boli umiestnené na trepačku pre následnú inkubáciu (400 rpm, 28 °C, 2 h). Po inkubácii bola transformovaná kultúra o objeme 25  $\mu$ l sterilne v prostredí flowboxu očkovaná na LB agar s obsahom gentamycínu, rifampicínu a spectinomycínu. Misky boli ponechané na inkubáciu po dobu 2 dní pri teplote 28 °C.

### **3.2.11 Transformácia rastlín *Arabidopsis thaliana* – metóda floral dip**

Tekuté médium s objemom 10 ml a obsahom rifampicínu, gentamycínu a spectinomycínu bolo naočkované transformovanými bakteriálnymi bunkami *A. tumefaciens* GV3101 daným konštruktom. Transformované baktérie niesli konštrukty plncRNA-PIN1-1::NLS-GFP-GUS a plncRNA-CAM::NLS-GFP-GUS. Takto pripravené bakteriálne kultúry boli inkubované cez noc pri teplote 28 °C na miešačke 180 rpm.

Nasledujúci deň bol celý objem kultúry zmiešaný s 50 ml LB média v sterilných Erlenmeyerových bankách (200 ml). Banky boli ponechané na inkubáciu pri 28 °C a 180 RPM cez noc.

Tretí deň pred samotným procesom transformácie, boli rastliny *A. thaliana* Col-0 premiestnené do laboratória z prostredia fytotronu pre zabezpečenie aklimatizácie. Bolo potrebné z nich prednostne odstrániť šesule a ponechať už iba otvorené kvety. Proces prípravy bolo potrebné vykonávať predčasne tak, aby boli rastliny ponechané na regeneráciu po dobu približne 2 hodín. Predpripravené bakteriálne kultúry boli centrifugované 10 minút pri teplote 28 °C a 2 800xg. Supernatant bol odstránený a vznikajúci pelet bol resuspendovaný v transformačnom roztoku so zložením: 50 ml Mili-Q H<sub>2</sub>O, 5 g sacharóza, 50  $\mu$ l Silwet L-77.

Proces transformácie spočíval v namáčaní kvetov do pripraveného transformačného roztoku/média *A. tumefaciens* po dobu asi 8 sekúnd. Rastliny boli zabalené do tmavého igelitového obalu pre zabezpečenie tmy a vlhkosti cez noc.

Ďalší deň bol z rastlín odstránený igelitový obal. Nakoniec bolo potrebné rastliny zaliať a umiestniť do fytotronu.

### **3.2.12 Spracovanie, sterilizácia a vysievanie semien transformovaných rastlín *Arabidopsis thaliana***

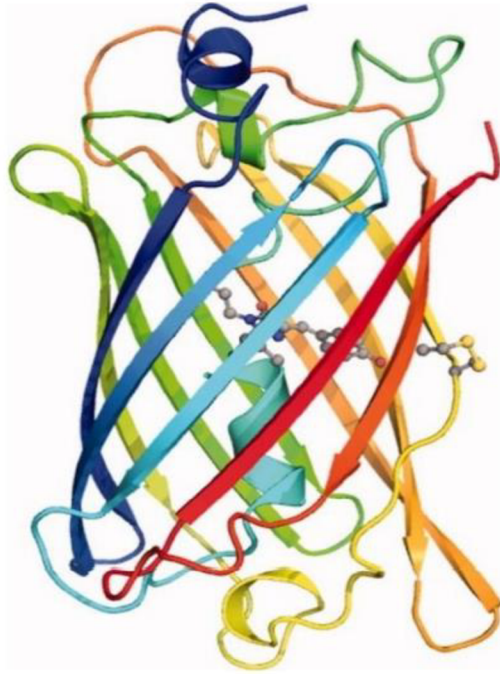
Pozbierané semená transformovaných jedincov druhu *A. thaliana* boli primárne sterilizované pomocou etanolu v prostredí flowboxu. Na proces sterilizácie bol využitý etanol o koncentrácii 70% a 100%. Semená boli nasypané do Eppendorf túb 2 ml. Následne bol pridaný 70% etanol o objeme 1 ml na dobu 8 min. Semená boli počas procesu sterilizácie premiešané. Následne bol prvý sterilizačný roztok odpipetovaný a bol aplikovaný etanol o koncentrácii 100% na dobu pôsobenia 8 min. Po uplynutí doby pôsobenia bol roztok odstránený a sterilizované semená boli umiestnené samostatne na filtračný papier pre vysušenie.

Po sterilizácii boli semená vysievané na pevné AM+ médium s obsahom selekčného antibiotika hygromycínu. AM+ médium je vlastne MS médium s polovičným obsahom MS solí. Médium bolo získané zmiešaním SM solí, sacharózy a agaru. Primárne bol 1,1 g SM solí (0,22%) rozpustených v 450 ml Mili-Q vody. Zmes bola neustále miešaná a následne bolo potrebné pridať 5 g sacharózy (1%). Následne bolo pH roztoku upravené na hodnotu pH 5,7 použitím NaOH a boli pridané 4g agaru (0,8%). Objem roztoku bol doplnený na 500 ml. Zmes bola nakoniec autoklávovaná, čo zabezpečilo aj sterilizovanie média aj rozpustenie agaru.

### **3.2.13 Fluorescenčná mikroskopia**

Zelený fluorescenčný proteín je jedným z najvyužívanejších reportérových génov v oblasti molekulárnej a bunkovej biológie, a to aj z dôvodu nízkej toxicity pre bunkový metabolizmus. Jeho využitie je takmer neobmedzené a nachádza svoje aplikácie aj v medicíne. Výhodnými charakteristikami sú pomerne vysoká tepelná stabilita a odolnosť proteínu voči denaturujúcim látkam, čo zabezpečuje zachovanie jeho fluorescenčných vlastností v rôznych podmienkach. Primárne bol získaný z tela morskej medúzy *Aequorea victoria*. V dnešnej dobe už existuje nespočet mutantných foriem, ktoré ale nie sú dokonale charakterizované a ich základné vlastnosti sú stále neznáme. Aj keď fluorescenčné vlastnosti týchto mutantov sú výrazne odlišné, ich štruktúrne vlastnosti sú nápadne totožné. Veľkosť proteínu je 27 kDA a je zložený z 238 aminokyselín. Tento zelený fluorescenčný proteín má typický valcovitý tvar pozostávajúci z jedenástich reťazcov  $\beta$  – skladaného listu a jedného reťazca štruktúry  $\alpha$  – helixu, nachádzajúceho sa v stredovej časti, obsahujúceho dôležité fluorescenčné

centrum (Obrázok 15). Toto centrum obsahuje aminokyselinovú sekvenciu s poradím serín, tyrozín, glycín. Skladanie celého proteínu do finálnej štruktúry je vysoko dôležité pre jeho bioluminescenčné vlastnosti. (Yang et al., 1996; Zimmer, 2002).



Obrázok 15. Terciárna štruktúra GFP zložená z jedenásť  $\beta$ -skladaných listov a jednej  $\alpha$ -helix závitnice s fluorescenčným centrom – chromofórom (prevzaté a upravené z Remington, 2011).

Známe varianty tohto proteínu nesú rôzne vlastnosti vzhľadom na vlnové dĺžky svetla potrebného na excitáciu. Sú udávané hodnoty od 490 nm do 520 nm, s maximom v okolí hodnôt 508 - 509 nm. Zato emisné spektrá doteraz známych a testovaných zelených fluorescenčných proteínov nevykazujú takú širokú škálu, a teda rozdiel vo vlnovej dĺžke emitovaného svetla v oblasti ich maxím, nie je až tak markantný (Ward, 2005). Aplikácie zeleného fluorescenčného proteínu sa však v genetických a molekulárnych štúdiách neobmedzujú iba na schopnosť vizuálnej lokalizácie génových produktov. Vďaka univerzálnosti GFP, ale aj jeho variant disponujúcich rôznymi spektrálnymi vlastnosťami, môže byť tento proteín využívaný aj v procesoch detekcie bunkových aktivít a dokonca aj v prípade štúdia samotnej bunkovej organizácie. Nachádza teda svoju aplikáciu pri procesoch sledovania transportu metabolitov a ich interakcie. V neposlednom rade sa jeho schopnosť neobmedzuje ani na skúmanie bunkových kompartmentov, ich tvaru, mobility, a taktiež dynamického vývoja prebiehajúceho počas odpovede metabolizmu na vplyvy prostredia (Hanson & Köhler, 2001).

V našom prípade boli pre lokalizáciu expresie konštruktov využité reportérové gény GUS a GFP v kombinácii s nukleárnym lokalizačným signálom (NLS). Jedná sa o sekvenciu krátkych peptidov, ktorá sa prejavuje ako jeden kompletný fragment so schopnosťou navádzania exprimovaných proteínov z cytoplazmatického priestoru do jadra bunky. NLS samo o sebe vykazuje schopnosť prenosu štruktúry cez jadrový obal pomocou v ňom prítomných pórov na základe prenášačových proteínov rodiny importínov (Lu et al., 2021). Pre náš prípad transformácie konštruktov plncRNA-CAM a plncRNA-PIN1-1, kedy sa jedná o dlhé nekódujúce RNA, je známe, že ich expresia v organizme nedosahuje vysokej úrovne. Preto je abundancia lncRNA častokrát veľmi nízka. Ak by dochádzalo k expresii reportérových génov GUS a GFP v celej cytoplazme príslušných buniek, a nie len v jadre, mohlo by dochádzať k „rozptýleniu“ signálu. Signál pri detekcii by bol teda nižší a horšie detekovateľný. Takto s použitím NLS teoreticky zabezpečíme expresiu a jej lokalizáciu koncentrovane na jednom mieste bunky – v jadre. To by malo zabezpečiť jednoduchšiu detekciu aj v prípade slabo abundantných produktov.

Varianta fluorescenčnej mikroskopie bola využitá pre selekciu prežívajúcich transformantov s najvyššou expresiou daného konštruktú a pre jeho lokalizáciu. Preparáty boli pripravené z rastlinných jedincov T1 generácie, ktoré prežili selekciu. Na prípravu preparátov bol potrebný set krycieho a podložného skla a destilovaná voda. Na sledovanie bol využitý konfokálny mikroskop ZEISS LSM 900.

### **3.2.14 GUS farbenie**

Jedná sa o enzým využívaný vo forme reportérového génu (*gus* alebo aj *uidA*) pre vizualizáciu génovej expresie, pochádzajúci z bakteriálneho rodu *Escherichia coli*, z kmeňa K-12. Tento enzým je využívaný počas histochemických chromogénnych (farebných) a fluorometrických esejí, pri vizualizácii pozitívnej genetickej transformácie. Vzhľadom na typy transformačných metód kedy sa tento reporterový systém môže využívať nie je GUS obmedzený ani na tranzientné, ale ani na stabilné transformačné metódy (Hull & Devic, 1995). Jedná sa o enzým zo skupiny hydrolas, kedy dochádza k štiepeniu substrátu za prítomnosti H<sub>2</sub>O (Jefferson et al., 1986). Jeho substrátmi je široká škála β-glukuronidov a β-galakturonidov, ktoré podliehajú hydrolýze vplyvom tohto enzýmu. Počas chromogénnych esejí vizualizujúcich pletivo špecifickú expresiu, sú využívané substráty X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolylβ-D-glucuronid), kedy sa

procesom hydrolýzy a následnej oxidatívnej dimerizácie za prítomnosti vzdušného kyslíka vytvára typické modré zafarbenie.

Samotný proces prípravy vzoriek pri vizualizácii GUS zahrňuje aj proces fixácie. Ten je počas tohto typu vizualizácie nevyhnutný a dokáže častokrát manipulovať výsledkami procesu farbenia. Pre príklad je možné uviesť glutaraldehyd - bežne využívaná fixačná zložka. Ten však vzhľadom na kutikulárny povrch listov nedokáže dokonale prenikat' do samotného pletiva. Naopak však v prípade stoniek je jeho schopnosť penetrácie pletiva výrazne vyššia. Fixačná časť postupu ale zamedzuje prežitiu sledovaných rastlinných jedincov, čo je jednou z výrazných nevýhod samotnej metódy vizualizácie (Bottino, 2015).

Z nášho hľadiska bola metóda GUS využitá z dôvodu vizualizácie expresie transformovaných konštruktov v celej rastline, teda aj v nadzemných častiach, kde je monitorovanie GFP expresie problematické. Všeobecne sú hodnoty expresie lncRNA nízke a táto metóda je výhodná pre potvrdenie prítomnosti aj nízkej abundancie génových produktov.

Vyčlenené semenáčky vykazujúce GFP pozitívny signál počas mikroskopického sledovania fluorescenčným mikroskopom, boli podrobené vizualizačnej metóde GUS. Keďže sa jedná histochemickú metódu je jasné že počas prípravy preparátov dochádza k usmrteniu rastlinných jedincov. Zložkami roztoku boli substrát X-Gluc, ktorý bolo potrebné rozpustiť v DMSO (Tab. 10). Reakcia prebiehala v reakčnej zmesi (Tab. 11) s obsahom substrátu X-Gluc. Nutné je aj pridanie činidiel ako Hexokynoželezitan draselný -  $K_3[Fe(CN)_6]$  a feroxyanid draselný -  $C_6FeK_4N_6$ . Pridanie feroxyanidu draselného zabezpečuje zaostrenie signálu vznikajúceho substrátu s charakteristickým modrým sfarbením a zabráni jeho pohybu medzi bunkami.

Príprava hexokynoželezitanu draselného spočívala v navážení a rozpustení 0,823 g v 40 ml  $H_2O$ . Po rozpustení bol roztok doplnený na finálny objem 50 ml pre vytvorenie zásobného roztoku (50 mM). Tento roztok bol pre použitie vo farbení následne nariadený 1000x. Pre prípravu zásobného roztoku feroxyanidu draselného bolo potrebné rozpustiť 1,056 g v 40 ml  $H_2O$  a doplniť finálny na objem 50 ml. Pred použitím bol roztok taktiež 1000x nariadený. Pre vytvorenie 0,5 M EDTA bolo potrebné rozpustiť 18,61 gramov soli v 80 ml  $H_2O$ . Ďalej bolo potrebné upraviť hodnotu pH pomocou NaOH na požadované pH 8,0 a objem bol potom doplnený na finálnu hodnotu 100 ml. Vytvorenie požadovaného fosfátového pufru vyžadovalo prípravu 2 roztokov. Jeden 0,2 M

monohydrát dihydrogénfosforečnanu sodného -  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , kedy bolo 24g rozpustených v 900 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , následne bol objem doplnený na požadovanú hodnotu 1000 ml. Druhým roztokom bol 0,2 M dihydrát hydrogénfosforečnanu sodného -  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , kedy bolo 28,4 g rozpustených v 900 ml vody a objem bol doplnený na 1000 ml. Samotný fosfátový pufer vznikal zmiešaním 32 ml dihydrogénfosforečnanu sodného a 68 ml hydrogénfosforečnanu sodného z ich zásobných roztokov. Nakoniec bolo potrebné pripraviť aj 10% Triton X-100, nariadením 10 ml objemu Triton-X pomocou 90 ml  $\text{H}_2\text{O}$ .

Použité objemy látok prislúchali finálnemu objemu použitému na namáčanie rastlinných jedincov, kedy bol objem závislý od použitého množstva sledovaných rastlín.

Následne dochádzalo k inkubácii v tme pri teplote  $37^\circ\text{C}$  počas noci, a to z dôvodu očakávania nízkej expresie. Reakcia bola ukončená použitím 70% etanolu, v ktorom boli rastliny ponechané na fixáciu a odfarbenie vzorky cez noc.

Tab. 10: Objemy DMSO pre rozpustenie príslušného množstva X-Gluc

xGluc (mg)	DMSO ( $\mu\text{l}$ )	Objem zmesi (ml)
5	50	5
10	100	10
15	150	15
20	200	20

Tab. 11: Zloženie reakčnej zmesi pre GUS farbenie

Zložka zmesi	Objem (ml)
Hexokyanoželezitan draselný (50 nM)	1
Ferokyanid draselný (50 nM)	1
Sodná soľ EDTA (0,5 M)	0,02
Pufer (fosforečnan sodný) pH 7,0	5
Triton X (10%)	1
$\text{H}_2\text{O}$	0,78
Celkový objem	10

### 3.2.15 Mikroskopia

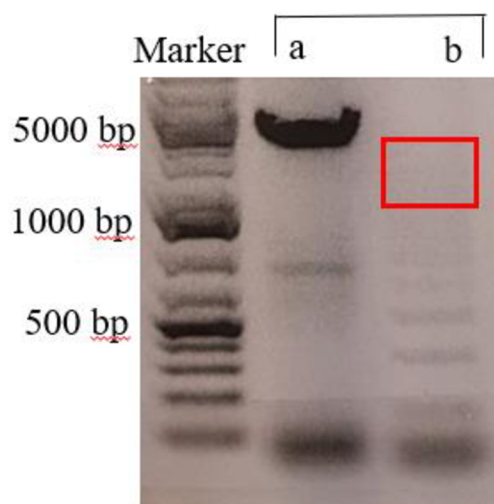
Stereomikroskop Olympus SZX16 bol využitý pre detekciu transformácie a lokalizáciu expresie pomocou metódy GUS. Predom ofarbené a fixované rastlinné selektanty T1 generácie boli využité pre tvorbu preparátov zložených z krycích a podložných sklíčok s obsahom chloralhydrátu -  $\text{C}_2\text{H}_3\text{Cl}_3\text{O}_2$  pre ďalšie odfarbenie rastlín. Získané snímky boli následne vyhodnocované.

## 4 VÝSLEDKY

V tejto bakalárskej práci sú získané výsledky a poznatky prezentované v oddelených podkapitolách zahŕňajúcich prípravu konštruktov, ich následnú transformáciu do baktérií s konečnou metódou selekcie transformovaných jedincov a spôsobom vizualizácie lokalizácie expresie.

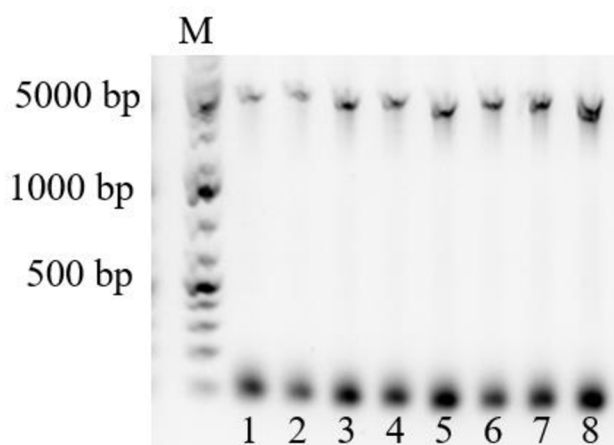
### 4.1 Príprava konštruktov

Bola získaná genomická DNA z *A. thaliana* pre amplifikáciu promótorov lncRNA-CAM, lncRNA-PIN1-1. Jedná sa o novo anotované formy lncRNA v okolí génov PIN a CAMEL, ktoré hrajú významnú rolu v procese regulácie auxínového transportu. Kandidátne lncRNA sme nazvali na základe príslušného proteín-kódujúceho génu. Kandidát lncRNA-CAM sa nachádza v 3'UTR oblasti génu CAMEL, zatiaľ čo lncRNA-PIN1-1 sa nachádza v promótoře PIN1, a táto lncRNA je podľa databázy transkribovaná z oboch strán. Pre analýzu funkčnosti týchto lncRNA, sme sa rozhodli naklonovať transkripčné fúzie oboch promótorov s GFP-GUS. Promótoři (o dĺžke okolo 4 kb) lncRNA-CAM a lncRNA-PIN1-1 boli najprv boli najprv amplifikované za použitia metódy PCR. Následne boli podrobené gélovej elektroforéze za požadovaných podmienok s následnou detekciou vznikajúceho gélu. Veľkosť jednotlivých konštruktov charakterizovala veľkosť bendov vznikajúcich po separácii v prípade pozitívneho nálezu výskytu (Obrázok 16). Prvý promótor (Obrázok 16 a) tvoril silný bend. V prípade druhého promótoru (Obrázok 16 b) sa ale bend netvoril. Nedochoádzalo teda k amplifikácii, preto bolo nevyhnutné optimalizovať podmienky procesu.



Obrázok 16. Elektroferogram gélovej elektroforézy pre analýzu detekcie reštrikcie konštruktov a - plncRNA-CAM (4,1 kb), b - plnc-RNA-PIN1-1 (3,8 kb). Červený obdĺžnik vyjadruje približné miesto vznikajúceho bendu pre konštrukt b, plnc-RNA-PIN1-1 (3,8 kb) v prípade pozitívnej detekcie. Marker – 1 kb Plus DNA Ladder marker molekulovej hmotnosti. Separácia bola prevedená na 1 % agarózovom géli.

Pre optimalizáciu procesu a získanie bendu pre plnc-RNA-PIN1-1 (3,8 kb), dohádzalo ku zmene teploty využitej v kroku PCR amplifikácie, kedy bola využitá optimalizovaná teplota 61 °C. Táto teplota bola získaná na základe testovania primerov v teplotnom gradiente metódou PCR. Vznikajúce produkty boli podrobené gélovej elektroforéze na základe spomenutých podmienok (Obrázok 17).



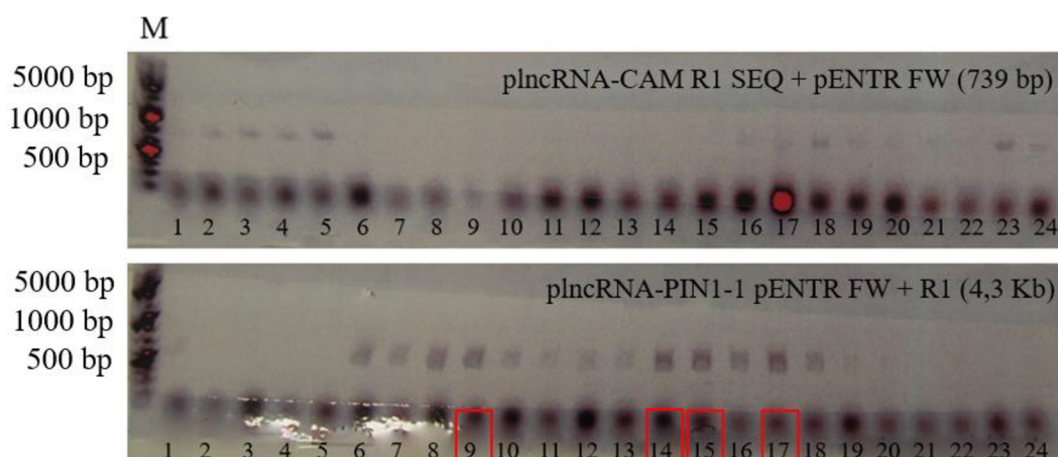
Obrázok 17. Elektroferogram gélovej elektroforézy pre analýzu teplotného gradientu pre primery použité na amplifikáciu konštruktu plncRNA-PIN1-1 (3,8 kb). 1 – 56 °C. 2 – 57,1 °C. 3 – 58,3 °C. 4 – 59,4 °C. 5 – 60,6 °C. 6 – 61,7 °C. 7 – 62,9 °C. 8 - 64°C. M – 1 kb Plus DNA Ladder marker molekulovej hmotnosti. 5, 6 – rozmedzie optimálnej teploty. Separácia bola prevedená na 1 % agarózovom géli.



Po potvrdení prítomnosti amplifikácie došlo k prečisteniu PCR produktov a následne bola detekovaná koncentrácia fragmentov dsDNA.

Ďalej boli PCR produkty podrobené reštrikčnému štiepeniu enzýmom SalI.

Ďalšími krokmi bola purifikácia a ligácia produktov štiepenia do vektoru pENTR2B nesúceho GFP a GUS za použitia T4 ligasy. Výsledok procesu ligácie bol následne transformovaný do baktérii *E. coli*. Využitý postup transformácie, očkovania a inkubácie kultúry sa zhodoval s obsahom v sekcii Metódy. Narastené kolónie boli pomocou metódy kolony PCR otestované na prítomnosť požadovaného inzertu plncRNA-CAM (739 bp), plncRNA-PIN1-1 (4,3 Kb). Vznikajúce PCR produkty boli podrobené elektroforetickej separácii (Obrázok 18) za uvedených podmienok separácie a vizualizácie.



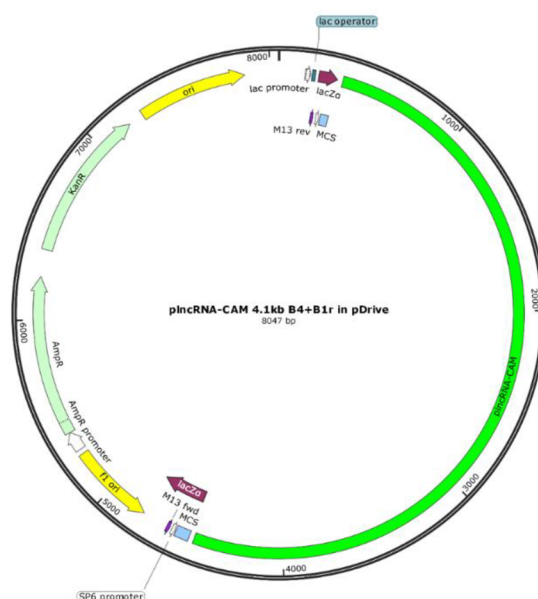
Obrázok 18. Elektroferogram gélovej elektroforézy pre analýzu kolony PCR pre konštrukty plncRNA-CAM a plncRNA-PIN1-1 a vektorom pENTR2B. Bola analyzovaná prítomnosť fragmentov o veľkosti plncRNA-CAM (739 bp), plncRNA-PIN1-1 (4,3 kb). M – 1 kb Plus DNA Ladder marker molekulovej hmotnosti. Čísla značia jednotlivé klony bakteriálnych kolónií. Červené obdĺžniky signalizujú kolónie odoslané na sekvenáciu. Separácia bola prevedená na 1 % agarózovom géli.

Na základe výsledkov metódy kolony PCR, boli vybraté kolónie pre konštrukt plncRNA-PIN1-1 č. 9, 14, 15 a 17. Prislúchajúce bakteriálne kolónie boli následne naočkované do tekutého LB média pre inkubáciu a vytvorenie suspenzných kultúr. Vznikajúce kultúry boli následne odoslané na komerčné sekvenovanie pre kontrolu správnosti konštrukt. Sekvenácia ale nepotvrdila prítomnosť danej sekvencie.

Ani pre konštrukt plncRNA-CAM však nedochádzalo k potvrdeniu prítomnosti požadovaného fragmentu u žiadneho z výsledkov kolony PCR. Preto boli oba konštrukty podrobené metóde Gibson assembly ako náhrada metódy reštrikčného klonovania.

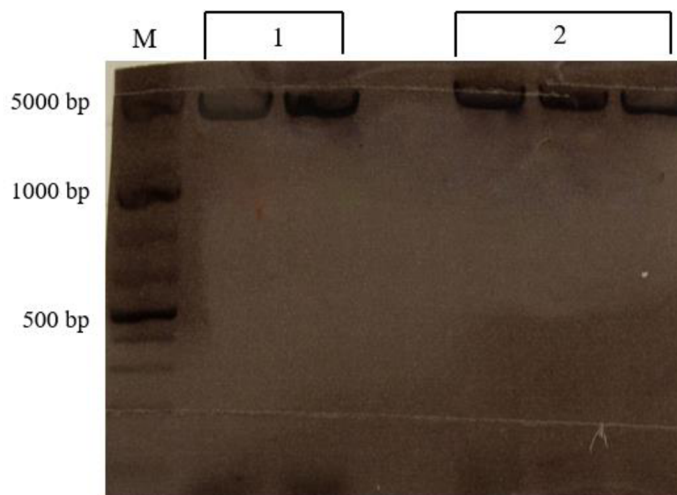
Dôvodom nepotvrdenia prítomnosti konštruktov mohol byť fakt, že v procese klonovania mohlo dochádzať k tvorbe takzvaných vlásenkových štruktúr alebo iných sekundárnych štruktúr. Tie môžu často vznikajúť v prípade repetitívnych sekvencií ako sú napríklad promótoxy. Dôvodom je, že mnohé reštrikčné enzýmy neštiepia DNA efektívne na konci lineárneho úseku. Preto je napríklad odporúčané pridať 3-6 báz pred miestom reštrikcie pre zvýšenie účinnosti štiepenia. Táto kombinácia báz je variabilná, ale treba sa vyvarovať variantám, ktoré môžu zvýšiť pravdepodobnosť tvorby sekundárnych štruktúr ešte viac. Druhou možnosťou úpravy postupu pre obmedzenie tvorby spomínaných štruktúr je metóda klonovania Gibson assembly, ktorú sme využili my.

Pred aplikáciou samotnej GA bolo potrebné najprv fragmenty konštruktov amplifikovať podľa už uvedeného postupu v časti Metódy. Všetky amplifikácie boli štiepené DpnI enzýmom pre odstránenie vektorov, ktoré slúžili ako templát po amplifikácii. Za použitia GA boli amplifikované konštrukty - konkrétne plncRNA-CAM\_F<sub>2</sub> + R<sub>2</sub> z NLS-GFP-GUS v pENTR2B a plncRNA-CAM\_F<sub>1</sub> + R<sub>1</sub> z plncRNA-CAM v pDRIVE (Obrázok 19).



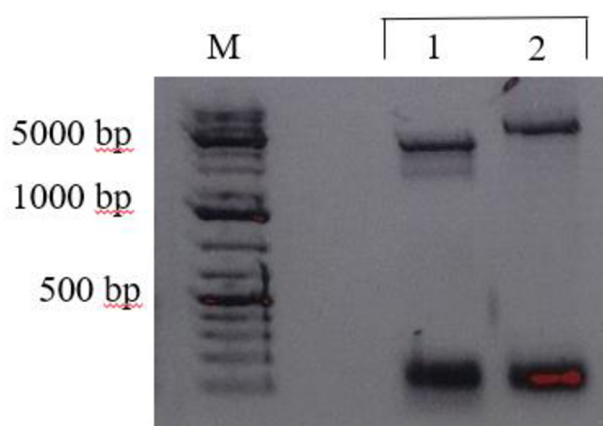
Obrázok 19. Vektor pDrive po fúzii s konštruktom plncRNA-CAM\_F<sub>1</sub> + R<sub>1</sub> z plncRNA-CAM

Následne boli tieto konštrukty detekované elektroforézou za uvedených podmienok (Obrázok 20). Veľkosť plncRNA-CAM\_F<sub>1</sub> + R<sub>1</sub> z plncRNA-CAM v pDRIVE zodpovedala veľkosti 4 200 bp a plncRNA-CAM\_F<sub>2</sub> + R<sub>2</sub> z NLS-GFP-GUS v pENTR2B zas 5 000 bp.



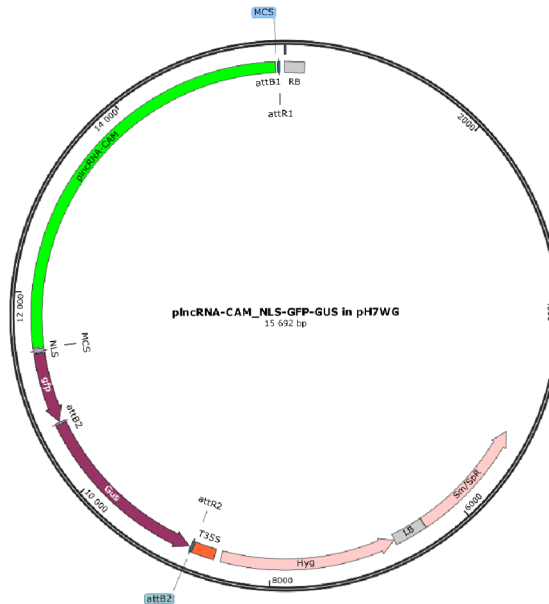
Obrázok 20. Elektroferogram gélovej elektroforézy pre analýzu produktov Gibson assembly pre konštrukt plncRNA-CAM. Bola analyzovaná prítomnosť fragmentov 1. plncRNA-CAM\_F<sub>1</sub> + R<sub>1</sub> z plncRNA-CAM v pDRIVE (4 200 bp), 2. plncRNA-CAM\_F<sub>2</sub> + R<sub>2</sub> z NLS-GFP-GUS v pENTR2B (5 000 bp). M – 1 kb Plus DNA Ladder marker molekulovej hmotnosti. Separácia bola prevedená na 1 % agarózovom géli.

Konštrukt plncRNA-PIN1-1 detekovaný elektroforézou za uvedených podmienok ako plncRNA-PIN1-1\_F<sub>1</sub> + R<sub>1</sub> genomická (3 900 bp) a plncRNA-PIN1-1\_F<sub>2</sub> + R<sub>2</sub> z NLS-GFP-GUS v pENTR2B (5 000 bp). Výsledky detekcie prítomnosti konštrukt boli analyzované použitím elektroforézy na 1% agarózovom géli za využitia už spomenutých podmienok separácie a detekcie uvedených v sekcii Metódy plncRNA-CAM (Obrázok 21).

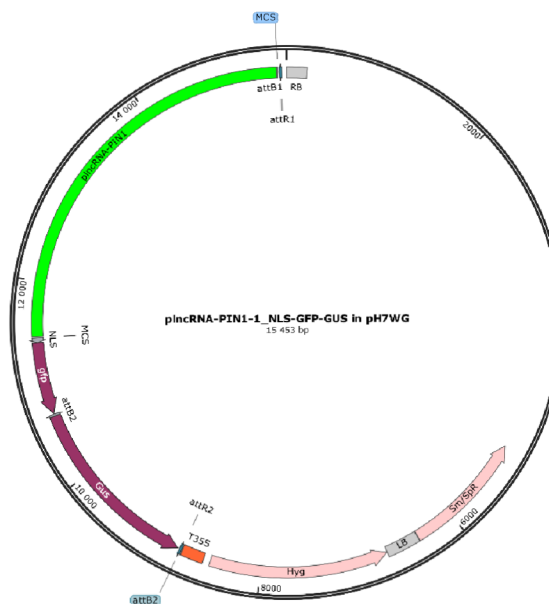


Obrázok 21. Elektroferogram gélovej elektroforézy pre analýzu produktov Gibson assembly pre konštrukt plncRNA-PIN1-1. Bola analyzovaná prítomnosť fragmentov 1. plncRNA-PIN1-1\_F<sub>1</sub> + R<sub>1</sub> z plncRNA genomická (3 900 bp), 2. plncRNA-PIN1-1\_F<sub>2</sub> + R<sub>2</sub> z NLS-GFP-GUS v pENTR2B (5 000 bp). M – 1 kb Plus DNA Ladder marker molekulovej hmotnosti. Separácia bola prevedená na 1 % agarózovom géli.

Produkty GA reakcie ktorými boli plncRNA-CAM::NLS-GFP-GUS v pENTR2B a plncRNA-PIN1-1::NLS-GFP-GUS v pENTR2B boli využité na vkladovanie do pH7WG pomocou enzýmu LR Clonase II enzyme mix. Vznikali konštrukty plncRNA-CAM::NLS-GFP-GUS v pH7WG (Obrázok 22) a plncRNA-PIN1-1::NLS-GFP-GUS v pH7WG (Obrázok 23).



Obrázok 22. Vektor pH7WG s konštruktom plncRNA-CAM::NLS-GFP-GUS



Obrázok 23. Vektor pH7WG s konštruktom plncRNA-PIN1-1::NLS-GFP-GUS

Produkty reakcie boli transformované do chemokompetentných baktérií *E. coli* pomocou metódy teplotného šoku. Vznikajúca kultúra bola očkovaná na pevne LB médium s obsahom selekčného prvku kanamycínu. Narastené kolónie boli podrobené metóde klony PCR a produkty tejto reakcie boli detekované na 1% agarózovom géli. Výsledky boli zaslané na sekvenáciu.

## **4.2 Transformácia konštruktov do *Agrobacterium tumefaciens* a floral dip**

Po potvrdení prítomnosti boli konštrukty transformované do bakteriálneho druhu *A. tumefaciens* GV3101 a očkované na médium pre inkubáciu. Proces prebiehal podľa postupu uvedeného v časti Metódy.

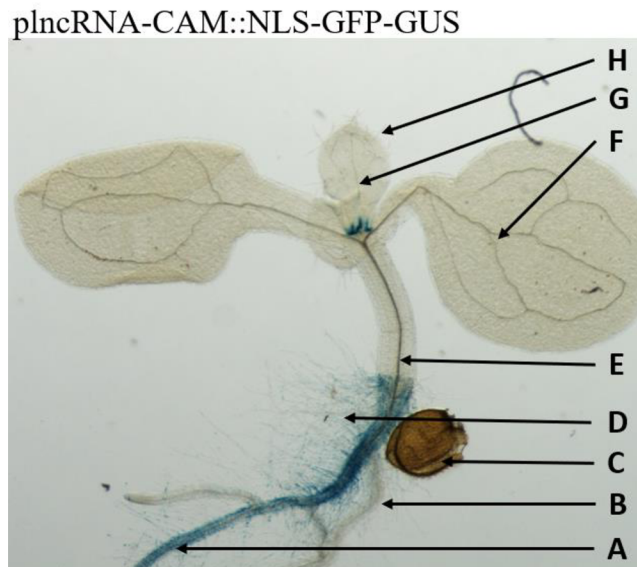
Narastené kolónie boli využité pre vytvorenie tekutých kultúr pre vytvorenie inokulačného média. Toto médium bolo aplikované na kvety rastlinných jedincov *A. thaliana* Col-0 pre transformovanie. Semená transformovaných rastlín boli vysiate na pevné AM+ médium s obsahom hygromycínu pre selekciu úspešne transformovaných línií.

## **4.3 Selekcia transformovaných jedincov T1 generácie a lokalizácia expresie**

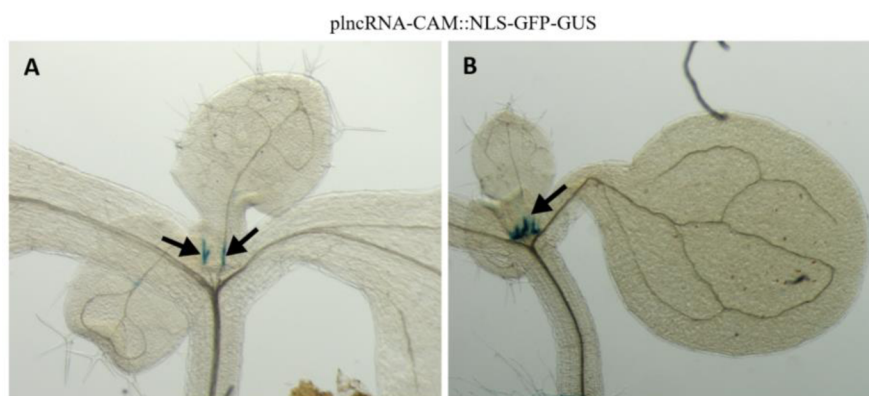
Vznikajúce selektanty boli odlišené od netransformovaných jedincov vďaka väčším kľúčnym listom a dlhšiemu koreňu. Tieto selektované semenáčky boli použité na vytvorenie mikroskopického preparátu pre sledovanie pod konfokálnym mikroskopom. Bol detekovaný nízky fluorescenčný signál v častiach koreňovej sústavy u oboch konštruktov. Výsledky ale neboli použiteľné pre reprezentáciu lokalizácie.

Preto bolo nevyhnutné využiť metódu GUS. A to aj z dôvodu vizualizácie expresie konštruktov v nadzemných častiach rastliny. Metóda farbenia GUS prebiehala podľa zadaného protokolu. Doba trvania inkubácie vzoriek bola dlhšia, kedy dochádzalo k inkubácii počas noci. To malo zabezpečiť výraznejšie zafarbenie nízko abundantných transformovaných plncRNA. Ofarbené jedince obsahujúce konštrukty plncRNA-CAM a plncRNA-PIN1-1 boli použité na vytvorenie preparátov pre sledovanie. Prítomnosť signálu sa potvrdila v prípade oboch konštruktov. Výsledné obrázky boli upravené.

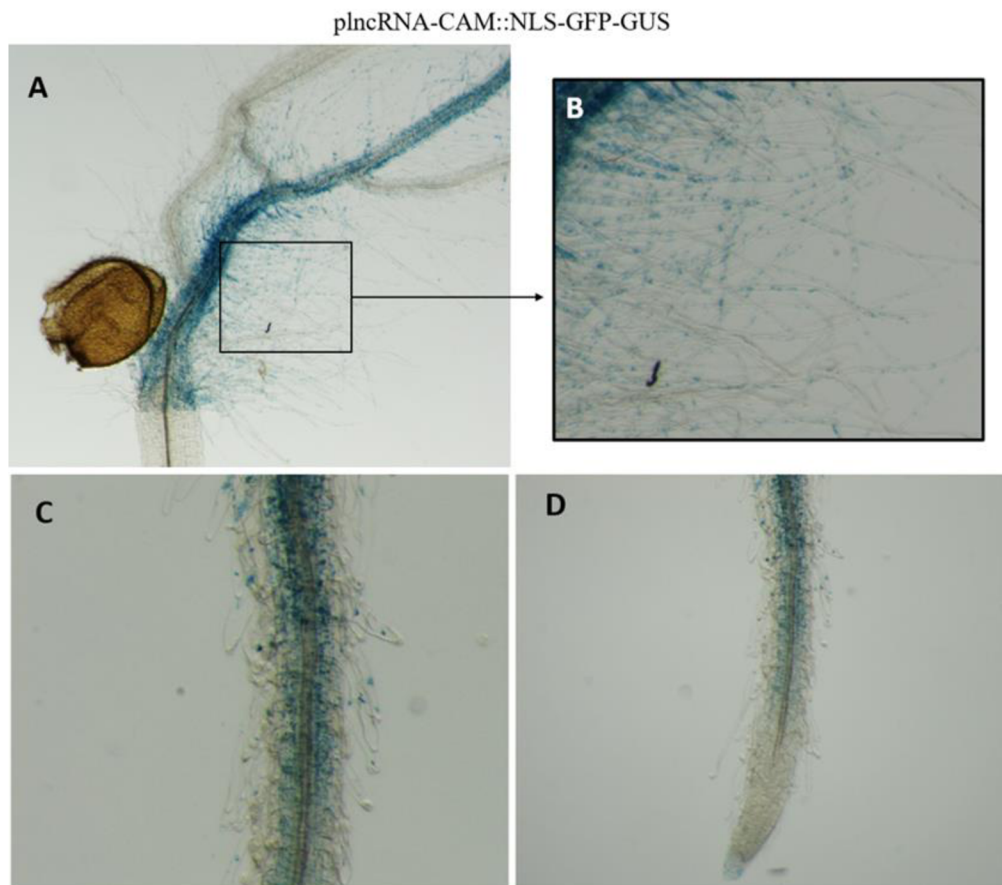
Transformovaný konštrukt *plncRNA-CAM::NLS-GFP-GUS* (Obrázok 24) bol vizualizovaný za použitia stereomikroskopu. Prítomnosť signálu bola viditeľná v žilnatinе novovznikajúcich pravých listov (Obrázok 25) a v epidermis hlavného koreňa (Obrázok 26 A, D). Tento signál končil na prechode koreň/hypokotyl. Zaujímavá expresia bola tiež detekovaná v koreňových vláskoch (Obrázok 26 B, C). Prítomnosť signálu ale nebola potvrdená v koreňovej špičke, apikálnom meristéme koreňa (Obrázok 26 D).



Obrázok 24. Preparát transformovaného jedinca *A. thaliana* T1 generácie s konštruktom *plncRNA-CAM::NLS-GFP-GUS*. Je viditeľná celá rastlina s lokalizáciou expresie konštruktu v koreňových vláskoch a žilnatinе na báze mladého pravého listu. A – hlavný koreň, B – laterálny koreň, C - semenný obal, D – koreňové vlásky, E – hypokotyl, F – klíčne listy, G -pravý list, H – trichómy.



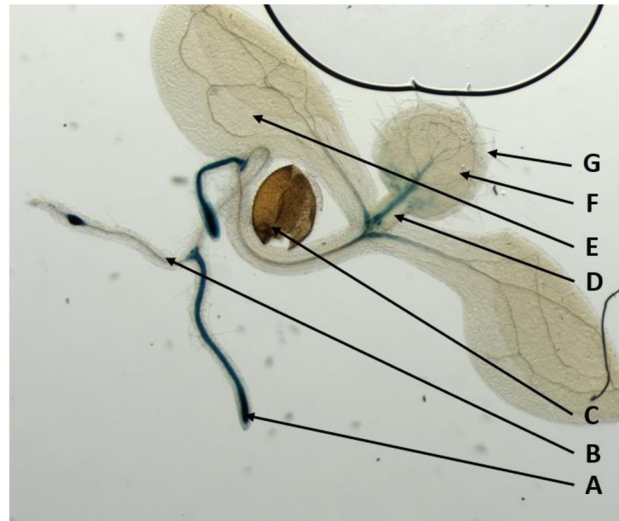
Obrázok 25. Preparát transformovaných jedincov *A. thaliana* T1 generácie s konštruktom *plncRNA-CAM::NLS-GFP-GUS*. Na obrázkoch je možné pozorovať dobre viditeľné trichómy. A, B - viditeľné sú klíčne listy dvoch jedincov. Šípka - lokalizácia expresie konštruktu v epikotyl/žilnatinе na báze mladého pravého listu.



Obrázok 26. Preparát transformovaných jedincov *A. thaliana* T1 generácie s konštruktom plncRNA-CAM::NLS-GFP-GUS. A – hlavný koreň s badateľnou lokalizáciou expresie konštruktu v koreňových vláskoch. B – expresia v koreňových vláskoch, dochádza pravdepodobne k precipitácii GUS vďaka dlhému farbeniu, čo spôsobuje tvorenie viacerých zhlukov v jednej bunke koreňového vláska. C – ofarbená časť hlavného koreňa, lokalizácia expresie konštruktu v povrchových bunkách koreňa a koreňových vláskoch. D – koreňová špička hlavného koreňa bez expresie.

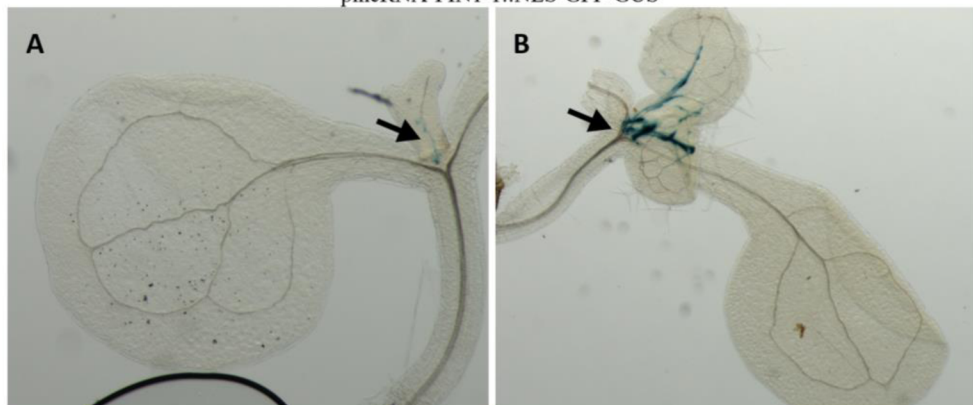
Pre konštrukt plncRNA-PIN1-1::NLS-GFP:GUS (Obrázok 27). Potvrdená prítomnosť expresie bola aj ako v prípade konštruktu plncRNA-CAM::NLS-GFP-GUS v nadzemných častiach rastliny. Ofarbenie bolo detekovateľné v žilnatine na báze mladých pravých listov, v žilnatine epikotylu po celej jeho dĺžke. Signál bol detekovaný až do žilnatiny bázy kľúčnych listov. (Obrázok 28). Potvrdila sa prítomnosť expresie v laterálnych koreňoch, konkrétne v časti stredového valca (Obrázok 29 A, B). Expresia bola badateľná už v skorých štádiách vývinu bočných koreňov (Obrázok 29 C). Signál nebol potvrdený v primárnom koreni a ani v jeho meristematickej časti (Obrázok 30).

plncRNA-PIN1-1::NLS-GFP-GUS



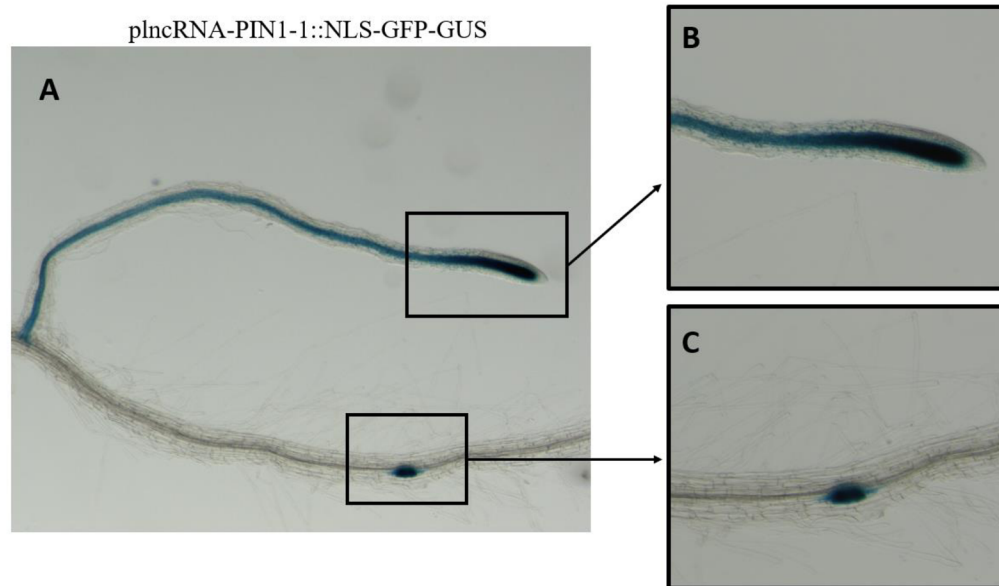
Obrázok 27. Preparát transformovaného jedinca *A. thaliana* T1 generácie s konštruktom plncRNA-PIN1-1::NLS-GFP-GUS. Je viditeľná rastlina s neúplným hlavným koreňom s lokalizáciou expzie v laterálnych koreňoch a v žilnatinе na báze mladého pravého listu. A – laterálny koreň, B – primárny koreň, C – semenný obal, D – epikotyl, E – klíčny list, F – mladý pravý list, G – trichóm.

plncRNA-PIN1-1::NLS-GFP-GUS



Obrázok 28. Preparát transformovaných jedincov *A. thaliana* T1 generácie s konštruktom plncRNA-PIN1-1::NLS-GFP-GUS. Na obrázkoch je možné pozorovať dobre viditeľné trichómy. A, B - viditeľné sú klíčne listy dvoch jedincov. Šípka - lokalizácia expzie konštruktu v epikotyl/žilnatinе na báze mladého pravého listu.





Obrázok 29. Preparát transformovaných jedincov *A. thaliana* T1 generácie s konštruktom plncRNA-PIN1-1::NLS-GFP-GUS. A – hlavný koreň bez prítomnosti zafarbenia a zafarbený laterálny koreň. B – zafarbená apikálna časť laterálneho koreňa, kedy je badateľná expresia konštruktu v centrálnej časti koreňa a nie v pokožkových bunkách. C – vznikajúci laterálny koreň s prítomnosťou GUS signálu.



Obrázok 30. Preparát transformovaného jedinca *A. thaliana* T1 generácie s konštruktom plncRNA-PIN1-1::NLS-GFP-GUS. Viditeľný je hlavný koreň s koreňovými vláskami a žiadna časť nevykazuje prítomnosť expresie konštruktu.

## 5 DISKUSIA

Bakalárska práca sa zaoberá identifikáciou kandidátnych lncRNA, ktoré môžu zohrávať rolu v auxínovom transporte, v jeho regulácii a alternácii. Medzi vybrané sledované varianty patria novo anotované lncRNA, nachádzajúce sa v blízkosti génov *PIN* a *CAMEL*, nami nazvané lncRNA-PIN1-1 a lncRNA-CAM.

Z týchto variant lncRNA boli pripravené promótorové fúzie s GFP a GUS, pre detekciu promótorovej aktivity.

V prípade pozitívnej detekcie bolo cieľom aj lokalizovať miesto expresie. Spomínanými konštruktami došlo k transformácii *Arabidospis thaliana*, na základe čoho boli získané jedince T1 generácie. Jedince ktoré prežili metódu selekcie, boli podrobené mikroskopickému pozorovaniu s vizualizáciou expresie za pomoci GUS farbenia.

Počas pozorovania sme boli schopní detekovať expresie transformovaných konštruktov, čo naznačuje, že študované kandidátne lncRNA sú funkčné. Intenzita expresie sa vzhľadom na rozličné konštrukty líšila, ale jej lokalizácia bola podobná vo všetkých analyzovaných nezávislých transformantoch. Tento rozdiel vznikol na základe rozličných pozícií transgénov v genóme transformovaných rastlín. Minimálne 15 transformovaných jedincov bude spropagovaných do ďalšej generácie, kde sa vyberú kandidáti iba s jednou inzerciou. Následne v ďalšej generácii sa zo vznikajúcich línií vyselektujú homozygótne jedince.

Expresia plncRNA-PIN1-1 bola viditeľná prevažne vo vaskulatúre listov (Obrázok 27 a 28) a v laterálnych koreňoch (Obrázok 29). Tento expresný patern korešponduje s expresiou PIN1-1 (Adamowski & Friml, 2015). Prekvapivo oproti PIN1, lncRNA-PIN1-1 nie je exprimovaná v primárnom koreni (Obrázok 30). Keďže expresia plncRNA-PIN1-1 v niektorých orgánoch korešponduje s expresiou PIN1 proteínov samotných, navádza to na myšlienku, že v týchto miestach táto lncRNA priamo moduluje chovanie PIN1 proteínov. Aký je mechanizmus tejto modulácie zatiaľ nie je možné povedať bez viacerých experimentálnych dát. Tento fakt však musí byť ešte hlbšie preštudovaný pre jeho prípadné potvrdenie. Hoci pozícia lncRNA-PIN1-1 vo vzdialenejšom promótoře PIN1 a fakt, že lncRNA-PIN1-1 je transkribovaná obojstranne (lncRNA-PIN1-2 na druhom vlákne) naznačuje, že sa jedná o enhancerovú lncRNA, modulujúcu lokálnu štruktúru chromatinu a tým transkripciu PIN1.

U konštruktu plncRNA-CAM bol signál prítomný v pokožkových bunkách hlavného koreňa (mimo meritématickú zónu a laterálnych koreňov) (Obrázok 26) a tento

signál končil na hranici koreň/hypokotyl (Obrázok 24). Signál bol tiež viditeľný v koreňových vláskoch v žilnatinе na báze vznikajúcich pravých listov (Obrázok 25).

Na základe dostupnej literatúry je expresia nášho konštruktú znova podobná expresii génu *CAMEL* (Y. Wu et al., 2016). Čo opäť podporuje správnosť voľby nášho kandidáta. Keďže dochádza k expresii v podobných miestach, dá sa predpokladať, že náš kandidát je teda spojený s *CAMEL* kinázou a mohol by mať potenciál ovplyvňovať jeho expresiu.

Expresia génu *CAMEL* ale nebola na základe dostupnej literatúry potvrdená v listoch. To by mohlo byť vysvetlené nedostatočne dlhým promótorom využitím pre transkripčnú fúziu *CAMEL*, ktorý bol len okolo 1500 bp dlhý.

## 6 ZÁVER

Podarilo sa nám identifikovať dve kandidátne lncRNA, ktoré podľa našich výsledkov majú biologickú relevanciu. Ďalším krokom pre ich funkčnú charakterizáciu bude analýza promótorovej aktivity. Hlavnou otázkou je, či táto aktivita je regulovaná auxínom alebo aj iným rastlinným hormónom. Kľúčové bude vytvoriť mutané línie, kde expresia danej lncRNA bude potlačená. Výsledný fenotyp potom budeme študovať v kontexte auxinového transportu.

## 7 REFERENCIE

- Adamowski, M., & Friml, J. (2015). PIN-dependent auxin transport: Action, regulation, and evolution. *Plant Cell*, 27(1), 20–32. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.134874>
- Ariel, F., Lucero, L., Christ, A., Mammarella, M. F., Jegu, T., Veluchamy, A., Mariappan, K., Latrasse, D., Blein, T., Liu, C., Benhamed, M., & Crespi, M. (2020). R-Loop Mediated trans Action of the APOLO Long Noncoding RNA. *Molecular Cell*, 77(5), 1055-1065.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.12.015>
- Balas, M. M., & Johnson, A. M. (2018). Exploring the mechanisms behind long noncoding RNAs and cancer. *Non-Coding RNA Research*, 3(3), 108–117. <https://doi.org/10.1016/j.ncrna.2018.03.001>
- Blakeslee, J. J., Peer, W. A., & Murphy, A. S. (2005). Auxin transport. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(5), 494–500. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.07.014>
- Blakeslee, J. J., Spatola Rossi, T., & Kriechbaumer, V. (2019). Auxin biosynthesis: spatial regulation and adaptation to stress. *Journal of Experimental Botany*, 70(19), 5041–5049. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERZ283>
- Bottino, P. J. (2015). Gus Gene Assay In Transformed Tissues. *Gold Biotechnology*, 314, 3–7.
- Chatterjee, A., Johnson, C. M., Shu, C. C., Kaznessis, Y. N., Ramkrishna, D., Dunny, G. M., & Hu, W. S. (2011). Convergent transcription confers a bistable switch in *Enterococcus faecalis* conjugation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(23), 9721–9726. [https://doi.org/10.1073/PNAS.1101569108/SUPPL\\_FILE/PNAS.201101569SI.PDF](https://doi.org/10.1073/PNAS.1101569108/SUPPL_FILE/PNAS.201101569SI.PDF)
- Chen, N., & Stein, L. D. (2006). Conservation and functional significance of gene topology in the genome of *Caenorhabditis elegans*. *Genome Research*, 16(5), 606–617. <https://doi.org/10.1101/gr.4515306>
- Cowling, V. H. (2010). Regulation of mRNA cap methylation. *Biochemical Journal*, 425(Pt 2), 295. <https://doi.org/10.1042/BJ20091352>
- Csorba, T. (2021). APOLO lncRNA, a self-calibrating switch of root development. *Molecular Plant*, 14(6), 867–869. <https://doi.org/10.1016/J.MOLP.2021.05.015>
- da Costa, C. T., de Almeida, M. R., Ruedell, C. M., Schwambach, J., Maraschin, F. S., & Fett-Neto, A. G. (2013). When stress and development go hand in hand: Main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. *Frontiers in Plant Science*, 4(MAY). <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00133>
- Dana, H., Mahmoodi Chalbatani, G., Mahmoodzadeh, H., Karimloo, R., Rezaiean, O., Moradzadeh, A., Mehmandoost, N., Moazzen, F., Mazraeh, A., Marmari, V., Ebrahimi, M., Menati Rashno, M., Jan Abadi, S., Gharagouzlo, E., & Mar-mari, V. (2017). Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. *International Journal of Biomedical Science : IJBS*, 13(2), 48. <https://pmc/articles/PMC5542916/>
- Davies, W. K. D. (2015). Introduction. *GeoJournal Library*, 112, 1–16. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-9655-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-017-9655-2_1)
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Weijers, D., Lechner, E., Yamada, M., Hobbie, L., Ehrismann, J. S., Jürgens, G., & Estelle, M. (2005). Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Developmental Cell*, 9(1), 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.05.014>
- Diamantopoulos, M. A., Tsiakanikas, P., & Scorilas, A. (2018). Non-coding RNAs: the riddle of the transcriptome and their perspectives in cancer. *Annals of Translational Medicine*, 6(12), 241–241. <https://doi.org/10.21037/ATM.2018.06.10>
- Dicamba Technical Fact Sheet*. (n.d.). Retrieved April 1, 2022, from [http://npic.orst.edu/factsheets/archive/dicamba\\_tech.html](http://npic.orst.edu/factsheets/archive/dicamba_tech.html)
- Dilworth, L. L., Riley, C. K., & Stennett, D. K. (2017). Plant Constituents: Carbohydrates, Oils, Resins, Balsams, and Plant Hormones. In *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy* (Vol. 1). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00005-6>

- Dumancas, G. G. (2014). Picloram. *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*, 3, 948–951. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00185-8>
- Eddy, S. R. (2001). Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nature Reviews Genetics*, 2(12), 919–929. <https://doi.org/10.1038/35103511>
- Feinbaum, R., Ambros, V., & Lee, R. (2004). The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *Cell*, 116(116), 843–854.
- Friml, J., & Jones, A. R. (2010). Endoplasmic Reticulum: The Rising Compartment in Auxin Biology. *Plant Physiology*, 154(2), 458. <https://doi.org/10.1104/PP.110.161380>
- Fujita, Y., & Yamashita, T. (2021). Alterations in Chromatin Structure and Function in the Microglia. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 1884. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2020.626541/BIBTEX>
- Gupta, S., Singh, R. P., Rabadia, N., Patel, G., & Panchal, H. (2011). Review Article ANTISENSE TECHNOLOGY I. 9(2).
- Hajný, J., Prát, T., Rydza, N., Rodriguez, L., Tan, S., Verstraeten, I., Domjan, D., Mazur, E., Smakowska-Luzan, E., Smet, W., Mor, E., Nolf, J., Yang, B. J., Grunewald, W., Molnár, G., Belkhadir, Y., De Rybel, B., & Friml, J. (2020). Receptor kinase module targets PIN-dependent auxin transport during canalization. *Science*, 370(6516), 550–557. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABA3178>
- Han, Z., & Li, W. (2022). Enhancer RNA: What we know and what we can achieve. *Cell Proliferation*, 55(4), e13202. <https://doi.org/10.1111/CPR.13202>
- Hanson, M. R., & Köhler, R. H. (2001). GFP imaging: methodology and application to investigate cellular compartmentation in plants. *Journal of Experimental Botany*, 52(356), 529–539. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.356.529>
- Hull, G. A., & Devic, M. (1995). The beta-glucuronidase (*gus*) reporter gene system. Gene fusions; spectrophotometric, fluorometric, and histochemical detection. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 49(14), 125–141. <https://doi.org/10.1385/0-89603-321-x:125>
- Iwasaki, Y. W., Siomi, M. C., & Siomi, H. (2015). PIWI-Interacting RNA: Its Biogenesis and Functions. *Annual Review of Biochemistry*, 84, 405–433. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-060614-034258>
- Jefferson, R. A., Burgess, S. M., & Hirsh, D. (1986).  $\beta$ -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(22), 8447–8451. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.22.8447>
- Jeness, M. K., Carraro, N., Pritchard, C. A., & Murphy, A. S. (2019). The arabidopsis ATP-BINDING CASSETTE transporter ABCB21 regulates auxin levels in cotyledons, the root pericycle, and leaves. *Frontiers in Plant Science*, 10, 806. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.00806/BIBTEX>
- Jiang, Z., Li, J., & Qu, L. J. (2017). Auxins. In *Hormone Metabolism and Signaling in Plants* (Vol. 2). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811562-6.00002-5>
- Karijovich, J., & Yu, Y. T. (2010). Spliceosomal snRNA modifications and their function. *RNA Biology*, 7(2), 192. <https://doi.org/10.4161/RNA.7.2.11207>
- Khan, M. R., Wellinger, R. J., & Laurent, B. (2021). Exploring the Alternative Splicing of Long Noncoding RNAs. *Trends in Genetics*, 37(8), 695–698. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.03.010>
- Kim, D. H., & Rossi, J. J. (2008). RNAi mechanisms and applications. *BioTechniques*, 44(5), 613–616. <https://doi.org/10.2144/000112792/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE1.JPEG>
- Kim, T. K., Hemberg, M., & Gray, J. M. (2015). Enhancer RNAs: A Class of Long Noncoding RNAs Synthesized at Enhancers. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(1). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A018622>
- Kleine-Vehn, J., & Friml, J. (2008). Polar targeting and endocytic recycling in auxin-dependent plant development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 24, 447–473. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175254>

- Křeček, P., Skůpa, P., Libus, J., Naramoto, S., Tejos, R., Friml, J., & Zažímalová, E. (2009). The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biology*, *10*(12), 1–11. <https://doi.org/10.1186/GB-2009-10-12-249/FIGURES/8>
- Kretzschmar, T., Burla, B., Lee, Y., Martinoia, E., & Nagy, R. (2011). Functions of ABC transporters in plants. *Essays in Biochemistry*, *50*(1), 145–160. <https://doi.org/10.1042/BSE0500145>
- Kreusch, A., Pfaffinger, P. J., Stevens, C. F., Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak Jeanmougin, F. F., Higgins, D. C., Galweiler, L., Guan, C., Muller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A., & Palme, K. (1998). 33. C. C. Hase, A. C. LeDain, B. Martinac. 35. W. J. Sigurdson. 5. I. Sukharev, C. Kung, F. Sachs, *Biophys. J*, *392*(December), 1144. [www.sciencemag.org](http://www.sciencemag.org)
- Lakehal, A., Chaabouni, S., Cavel, E., Hir, R. Le, Ranjan, A., Raneshan, Z., Novák, O., Păcurar, D. I., Perrone, I., Jobert, F., Gutierrez, L., Bakò, L., & Bellini, C. (2019). Molecular framework for TIR1/AFB-Aux/IAA-dependent auxin sensing controlling adventitious rooting in Arabidopsis. *BioRxiv*, 518357. <https://doi.org/10.1101/518357>
- Lakhotia, S. C., Mallick, B., & Roy, J. (2020). Non-coding RNAs: ever-expanding diversity of types and functions. In *Rna-Based Regulation in Human Health and Disease* (Issue January). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817193-6.00002-9>
- Liang, J., Wen, J., Huang, Z., Chen, X. P., Zhang, B. X., & Chu, L. (2019). Small Nucleolar RNAs: Insight Into Their Function in Cancer. *Frontiers in Oncology*, *9*, 587. <https://doi.org/10.3389/FONC.2019.00587/BIBTEX>
- Lu, J., Wu, T., Zhang, B., Liu, S., Song, W., Qiao, J., & Ruan, H. (2021). Types of nuclear localization signals and mechanisms of protein import into the nucleus. *Cell Communication and Signaling*, *19*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S12964-021-00741-Y/FIGURES/1>
- Moison, M., Pacheco, J. M., Lucero, L., Fonouni-Farde, C., Rodríguez-Melo, J., Mansilla, N., Christ, A., Bazin, J., Benhamed, M., Ibañez, F., Crespi, M., Estevez, J. M., & Ariel, F. (2021). The lncRNA APOLO interacts with the transcription factor WRKY42 to trigger root hair cell expansion in response to cold. *BioRxiv*, 2020.07.13.188763. <https://doi.org/10.1101/2020.07.13.188763>
- Mravec, J., Skůpa, P., Bailly, A., Hoyerová, K., Křeček, P., Bielach, A., Petrášek, J., Zhang, J., Gaykova, V., Stierhof, Y. D., Dobrev, P. I., Schwarzerová, K., Rolčík, J., Seifertová, D., Luschnig, C., Benková, E., Zažímalová, E., Geisler, M., & Friml, J. (2009). Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. *Nature* 2009 459:7250, *459*(7250), 1136–1140. <https://doi.org/10.1038/nature08066>
- Müller, A., Guan, C., Gälweiler, L., Tänzler, P., Huijser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennett, M., Wisman, E., & Palme, K. (1998). AtPIN2 defines a locus of Arabidopsis for root gravitropism control. *The EMBO Journal*, *17*(23), 6903–6911. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/17.23.6903>
- Nie, L., Wu, H. J., Hsu, J. M., Chang, S. S., LaBaff, A. M., Li, C. W., Wang, Y., Hsu, J. L., & Hung, M. C. (2012). Long non-coding RNAs: Versatile master regulators of gene expression and crucial players in cancer. *American Journal of Translational Research*, *4*(2), 127–150.
- Noh, J. H., Kim, K. M., McClusky, W. G., Abdelmohsen, K., & Gorospe, M. (2018). Cytoplasmic functions of lncRNAs. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, *9*(3), e1471. <https://doi.org/10.1002/WRNA.1471>
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in Endocrinology*, *9*(AUG), 402. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2018.00402/BIBTEX>
- Okada, K., Ueda, J., Komaki, M. K., Bell, C. J., & Shimura, Y. (1991). Requirement of the Auxin Polar Transport System in Early Stages of Arabidopsis Floral Bud Formation. *The Plant Cell*, *3*(7), 677–684. <https://doi.org/10.1105/TPC.3.7.677>
- Omelyanchuk, N. A., Kovrizhnykh, V. V., Oshchepkova, E. A., Pasternak, T., Palme, K., & Mironova, V. V. (2016). A detailed expression map of the PIN1 auxin transporter in Arabidopsis thaliana root. *BMC Plant Biology*, *16*(1), 1–12.

<https://doi.org/10.1186/S12870-015-0685-0/FIGURES/6>

- Paque, S., & Weijers, D. (2016). Q&A: Auxin: The plant molecule that influences almost anything. *BMC Biology*, *14*(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/S12915-016-0291-0/FIGURES/2>
- Péret, B., Swarup, K., Ferguson, A., Seth, M., Yang, Y., Dhondt, S., James, N., Casimiro, I., Perry, P., Syed, A., Yang, H., Reemmer, J., Venison, E., Howells, C., Perez-Amador, M. A., Yun, J., Alonso, J., Beemster, G. T. S., Laplaze, L., ... Swarup, R. (2012). AUX/LAX genes encode a family of auxin influx transporters that perform distinct functions during arabidopsis development. *Plant Cell*, *24*(7), 2874–2885. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.097766>
- Prigge, M. J., Platre, M., Kadakia, N., Zhang, Y., Greenham, K., Szutu, W., Pandey, B. K., Bhosale, R. A., Bennett, M. J., Busch, W., & Estelle, M. (2020). Genetic analysis of the arabidopsis TIR1/AFB auxin receptors reveals both overlapping and specialized functions. *ELife*, *9*. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.54740>
- Robert, H. S., Grunewald, W., Sauer, M., Cannoot, B., Soriano, M., Swarup, R., Weijers, D., Bennett, M., Boutilier, K., & Friml, J. (2015). Plant embryogenesis requires aux/lax-mediated auxin influx. *Development (Cambridge)*, *142*(4), 702–711. <https://doi.org/10.1242/dev.115832>
- Sauer, M., Robert, S., & Kleine-Vehn, J. (2013). Auxin: simply complicated. *Journal of Experimental Botany*, *64*(9), 2565–2577. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERT139>
- Seila, A. C., Core, L. J., Lis, J. T., & Sharp, P. A. (2009). Divergent transcription: A new feature of active promoters. *Cell Cycle*, *8*(16), 2557–2564. <https://doi.org/10.4161/cc.8.16.9305>
- Statello, L., Guo, C. J., Chen, L. L., & Huarte, M. (2021). Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *22*(2), 96–118. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00315-9>
- Swarup, K., Benková, E., Swarup, R., Casimiro, I., Péret, B., Yang, Y., Parry, G., Nielsen, E., De Smet, I., Vanneste, S., Levesque, M. P., Carrier, D., James, N., Calvo, V., Ljung, K., Kramer, E., Roberts, R., Graham, N., Marillonnet, S., ... Bennett, M. J. (2008). The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nature Cell Biology*, *10*(8), 946–954. <https://doi.org/10.1038/ncb1754>
- Swarup, R., & Bhosale, R. (2019). Developmental Roles of AUX1/LAX Auxin Influx Carriers in Plants. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1306. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.01306/BIBTEX>
- Synthetic Auxins - Herbicide Symptoms*. (n.d.). Retrieved April 1, 2022, from [https://herbicidesymptoms.ipm.ucanr.edu/MOA/Synthetic\\_Auxins/](https://herbicidesymptoms.ipm.ucanr.edu/MOA/Synthetic_Auxins/)
- Uchida, S. (2012). Databases and software to make your research life easier. *Annotating New Genes*, 7–47. <https://doi.org/10.1533/9781908818126.7>
- Wang, D., & Farhana, A. (2021). Biochemistry, RNA Structure. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558999/>
- Wang, F. Y., Gu, Z. Y., & Gao, C. J. (2020). Emerging role of long non-coding RNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Chinese Medical Journal*, *133*(4), 462–473. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000624>
- Ward, W. W. (2005). Biochemical and physical properties of green fluorescent protein. *Methods of Biochemical Analysis*, *47*, 39–65. <https://doi.org/10.1002/0471739499.ch3>
- Wierzbicki, A. T., Blevins, T., & Swiezewski, S. (2021). Long Noncoding RNAs in Plants. <https://doi.org/10.1146/Annurev-Arplant-093020-035446>, *72*, 245–271. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ARPLANT-093020-035446>
- Wu, X., & Sharp, P. A. (2013). Divergent Transcription: A Driving Force for New Gene Origination? *Cell*, *155*(5), 990–996. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.10.048>
- Wu, Y., Xun, Q., Guo, Y., Zhang, J., Cheng, K., Shi, T., He, K., Hou, S., Gou, X., & Li, J. (2016). Genome-Wide Expression Pattern Analyses of the Arabidopsis Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinases. *Molecular Plant*, *9*(2), 289–300.



<https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.12.011>

- Yang, F., Moss, L. G., & Phillips, G. N. (1996). The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, *14*(10), 1246–1251. <https://doi.org/10.1038/NBT1096-1246>
- Zhang, X., Wang, W., Zhu, W., Dong, J., Cheng, Y., Yin, Z., & Shen, F. (2019a). *Mechanisms and functions of DNA-Li-2008.pdf*.
- Zhang, X., Wang, W., Zhu, W., Dong, J., Cheng, Y., Yin, Z., & Shen, F. (2019b). Mechanisms and Functions of Long Non-Coding RNAs at Multiple Regulatory Levels. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(22). <https://doi.org/10.3390/IJMS20225573>
- Zhang, Y., Xiao, G., Wang, X., Zhang, X., & Friml, J. (2019). Evolution of fast root gravitropism in seed plants. *Nature Communications* *2019 10:1*, *10*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11471-8>
- Zimmer, M. (2002). Green fluorescent protein (GFP): Applications, structure, and related photophysical behavior. *Chemical Reviews*, *102*(3), 759–781. <https://doi.org/10.1021/cr010142r>
- Zwiewka, M., Bilanovičová, V., Seifu, Y. W., & Nodzyński, T. (2019). The Nuts and Bolts of PIN Auxin Efflux Carriers. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 985. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.00985/BIBTEX>

## 8 ZOZNAM SKRATIEK

AFB	auxin-signaling F-BOX proteíny
BAM	barely any meristem
CAMEL	Malectin-type LRR receptor-like kinase
CANAR	Canalization-related Receptor-like kinase
DMSO	dimetylsulfoxid
EDTA	Etyléndiaminotetraoctová kyselina
DNA	deoxiribonukleová kyselina
eRNA	enhancerová ribonukleová kyselina
dNTP	2-deoxinukleosid 5-trifosfát
DNA	deoxiribonukleová kyselina
dsDNA	dvojvláknová molekula deoxiribonukleovej kyseliny
ER	endoplazmatické retikulum
GFP	Zelený fluorescenčný proteín (ang. Green fluorescent protein)
GUS	$\beta$ -glukuronidáza
IAA	kyselina indol-3-ostová
LB	Luria-Bretani médium
lncRNA	dlhá nekódujúca ribonukleová kyselina
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
ncRNA	nekódujúca ribonukleová kyselina
NLS	nukleárny lokalizačný signál
PCR	polymerázová reťazová reakcia
PILS	PIN-LIKES proteíny
PIN	PIN-FORMED proteíny
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribozómová nukleová kyselina
ssDNA	jednovláknová molekula deoxiribonukleovej kyseliny
TAE	tris-acetát-ETDA
TIR	transport inhibitor response
tRNA	transférová ribonukleová kyselina