

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Prírodovedecká fakulta

Katedra biotechnológií



Epigenetická regulácia auxínového transportu

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Autor:	Karolína Turčiaková
Štúdijný program:	N0512A130007 Biotechnológie a génové inžinierstvo
Štúdijný odbor:	Biotechnológie a génové inžinierstvo
Forma štúdia:	Prezenčná
Vedúci práce:	Mgr. Jakub Hajný, Ph.D.
Rok:	2024

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Bc. Karolína Turčiaková
Názov práce	Epigenetická regulácia auxínového transportu
Typ práce	Diplomová
Pracovisko	Katedra biotechnológií a génového inžinierstva
Vedúci práce	Mgr. Jakub Hajný, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2024

Abstrakt

PIN proteíny sú rodinou takzvaných prenášačových proteínov. Tieto typicky membránové proteíny sú nevyhnutné v procese nastavovania auxínových maxím a miním, ktoré sú kľúčovými pre tvorbu rastlinných orgánov. Nonovznikajúce orgány musia byť napojené na už existujúcu cievnú sústavu rastliny pre zabezpečenie prísunu nevyhnutných živín. V našej práci sa však budeme zameriavať konkrétne iba na jedného člena tejto rodiny, ktorým bude PIN1. Dôvodom je najmä fakt, že sa jedná o významného činiteľa v procese tvorby rastlinnej vaskulatúry. Tvorba vodivých dráh u rastlín je zložitý proces a pri jeho narušení môže dochádzať k tvorbe špecifických a silných fenotypov. Čo je pre nás v našej práci významný faktor umožňujúci štúdium vplyvov epigenetickej regulácie PIN1 za pomoci dlhých nekódujúcich RNA (lncRNA), nachádzajúcich sa v promótoch PIN1 (ďalej už iba lncRNA-PIN1-1 a lncRNA-PIN1-2). V tejto práci sa zameriame na testovanie PIN1 aktivity u mutantných variantov týchto lncRNA. Zistili sme, že lncRNA-PIN1-1 a lncRNA-PIN1-2 sú negatívnymi regulátormi aktivity PIN1. Táto negatívna regulácia je nevyhnutná pre presnú kontrolu auxínového transportu pomocou PIN1, a tým pre správnu tvorbu vodivých pletív.

Kľúčové slová	auxín, epigenetická regulácia, exosomálny komplex, lncRNA, PIN1
Počet strán	67
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Karolína Turčiaková
Title	Epigenetic regulation of auxin transport
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Biotechnology
Supervisor	Mgr. Jakub Hajný, Ph.D.
The year of presentation	2024

Abstract

PINs are a family of auxin transport proteins. Members of this family are typically membrane-localized and they are truly a necessity in moderating specific auxin maxima and minima, which tend to be key factors in organ developmental processes. It is important that newly emerging organs are well connected to already existing vasculature, which is important for securing proper nourishment in novel parts. In our work, we will be focusing on only one member of this family of auxin-transporting proteins - PIN1. The reason lies in the fact that PIN1 is a significant player in the process of vasculature formation. If by any means this developmental process is disturbed, it will lead to the formation of specific and strong phenotypes. In a matter of fact, this is the reason enabling studies of epigenetic regulation of PIN1 protein by long noncoding RNAs (lncRNAs), that are situated in the promoter region of PIN1 (lncRNA-PIN1-1 and lncRNA-PIN1-2). In this work, we will be testing the activity of PIN1 in plants with a mutation in stated lncRNAs. Eventually, we were able to discover that lncRNA-PIN1-1 and lncRNA-PIN1-2 are likely negative regulators of PIN1 activity. This negative form of regulation is inevitable for precise control of auxin transport moderated by PIN1 and ultimately for proper vasculature formation.

Keywords	auxin, epigenetic regulation, exosomal complex, lncRNA, PIN1
Number of pages	67
Number of appendices	0
Language	Slovak

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

V Olomouci dňa

.....

Podpis študenta

Podakovanie

Týmto by som chcela poďakovať Mgr. Jakobovi Hajnému, Ph.D. nie len za teoretické vedenie pri práci a poskytnutú pomoc v oblasti metodiky, ale taktiež za ochotu a spoluprácu v procese písania tejto diplomovej práce. Vďaku by som chcela preukázať aj vedeniu laboratória za ochotu, toleranciu a poskytnutie pracovných prostriedkov a priestorov. V neposlednom rade by som chcela vyjadriť vďaku ostatným zamestnancom a študentom laboratória taktiež za ochotu, poskytnuté rady a pomoc.

OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	LITERÁRNY PREHLAD	2
2.1	Auxín.....	2
2.1.1	Funkcia auxínu	3
2.1.2	Transport Auxínu	4
2.2	PIN proteíny a ich stručná charakteristika.....	4
2.3	Pin1 a jeho charakteristika.....	9
2.4	Nekódujúce RNA	11
2.5	Varianty ncRNA.....	11
2.5.1	Dlhé nekódujúce RNA	12
2.5.2	Možné funkcie lncRNAs.....	15
2.6	RNA exosom	17
2.7	Epigenetická regulácia.....	18
2.7.1	Modifikácie histónov	18
2.7.2	Acetylácia, fosforylácia a metylácia	20
2.7.3	Metylácia v epigenetickej regulácii	21
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	23
3.1	Materiály	23
3.1.1	Biologický materiál	23
3.1.2	Chemikálie	23
3.1.3	Štandardy molekulovej hmotnosti.....	24
3.1.4	Antibiotiká	24
3.1.5	Enzýmy a enzýmové purfy.....	24
3.1.5.1	Rastlinné hormóny	24
3.1.6	Roztoky pre elektroforézu.....	24
3.1.7	Roztoky pre výsev semien	25
3.1.8	Roztoky na auxínový treatment	25
3.1.9	Roztoky na izoláciu DNA	25
3.1.10	Komerčné kity	25
3.1.11	Primery.....	25
3.1.12	Software	26
3.1.13	Zariadenia.....	26
3.2	Metódy.....	27

3.2.1	Sterilizácia a vysievanie semien transformovaných rastlín <i>Arabidopsis thaliana</i> 27	
3.2.2	GUS staining	28
3.2.3	Izolácia rastlinnej DNA.....	29
3.2.4	PCR reakcia a genotypovanie	30
3.2.5	Elektroforéza na agarózovom géli (1 %)	31
3.2.6	PCR reakcia a sekvenovanie	32
3.2.7	Izolácia RNA z rastlinného materiálu za použitia komerčného kitu od spoločnosti Omega BIO-TEK.....	32
3.2.8	Odstraňovanie zvyškovej genomickej DNA z izolovanej z RNA	33
3.2.9	Reverzná transkripcia.....	34
3.2.10	Kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia.....	35
3.2.11	Auxínový treatment.....	35
4	VÝSLEDKY	37
4.1	Genotypovanie mutantných línií <i>Arabidopsis thaliana</i>	38
4.1.1	Genotypovanie mutantných línií <i>Arabidopsis thaliana</i> za použitia zmenenej kombinácie primerov	40
4.1.2	Kontrolné genotypovanie SALK mutantov	43
4.1.3	Kontrolné genotypovanie jedincov SALK.....	48
4.1.4	Mikroskopická analýza lncRNA-PIN1-1 a lncRNA-PIN1-2.....	49
4.1.5	Mikroskopická analýza delečných mutantov	51
4.1.6	qPCR analýza	55
4.1.6.1	qPCR pre detekciu lncRNA u <i>hen2-4</i> mutantov	55
4.1.6.2	qPCR pre analýzu aktivity PIN1 pri absencii lncRNA-PIN1-1/2	56
4.1.6.3	qPCR pre detekciu množstva amplifikácie lncRNA-PIN1-1/2 u mutantov <i>hen2-4</i> za aplikácie exogénneho NAA.....	57
5	DISKUSIA.....	59
6	ZÁVER	61
7	REFERENCIE	62
8	ZOZNAM SKRATIEK.....	67

CIELE PRÁCE

Cieľom diplomovej práce bolo vypracovanie literárneho rešeršu na tému práce za použitia dostupnej literatúry. Prvotným krokom bola príprava rastlinného materiálu pre nasledovnú prácu v zmysle získania homozygótnych línií jedincov s T-DNA inzertom v géne pre lncRNA-PIN1-1 a lncRNA-PIN1-2.

Následne dochádzalo k štúdiu variantov lncRNA-PIN1-1 a lncRNA-PIN1-2 za použitia mikroskopických a genetických metód u rozličných jedincov druhu *Arabidopsis thaliana*. V tomto kroku dochádzalo k spracovaniu a vyhodnoteniu dát z mikroskopického sledovania transgénnych *plncRNA-PIN1-1::NLS-GFP-GUS*, *plncRNA-PIN1-2::NLS-GFP-GUS* a *pPIN1-ΔlncRNA::NLS-GFP-GUS*. Za použitia metódy kvantitatívnej polymerázovej reťazovej reakcie dochádzalo k detekcii relatívnych hodnôt expresie u sledovaných lncRNA za použitia mutantov *hen2-4*, a taktiež za aplikácie exogénneho syntetického fytohormónu u týchto jedincov. Finálne bola analyzovaná aj relatívna expresia PIN1 proteínu u jedincov *pPIN1-CRISPR-ΔlncRNA*.

1 ÚVOD

Fytohormón auxín je neodmysliteľnou súčasťou rozličných procesov prebiehajúcich v rastlinnom tele. Samotný jeho transport je vysoko významným dejom regulovaným komplexne na rozličných úrovniach. Už len jeho samotná prítomnosť alebo absencia indukuje rozdielne procesy a prejavy v tele. Prenos auxínu je zabezpečovaný rôzne, no práve transportný systém ktorý je zodpovedný za vytváranie lokálnych maxim a miním tohto hormónu je pre nás podstatným z hľadiska štúdia jeho regulácie. Tú majú na starosti prenášačové proteíny, medzi ktoré patrí aj PIN1. Jedná sa o dlhý transmembránový proteín schopný modulácie transportu fytohormónu v závislosti od vlastnej polarizácie. Polarizácia, a teda jeho poloha na bunkovej membráne je zásadnou v jeho funkcii a aktivite, a je taktiež regulovaná na rozličných úrovniach rozličnými vplyvmi, dokonca aj samotným auxínom. Najpodstatnejší je ale fakt, že došlo k objaveniu a anotácii dvoch dlhých nekódujúcich RNA v promótorovej oblasti génu pre tento proteín. Jedná sa o lncRNA-PIN1-1 a lncRNA-PIN1-2. A aj keď existuje značné množstvo spôsobov regulácie auxínového transportu, no epigenetický variant je nie dokonale prebádaný, a preto ponúka nový a pomerne atraktívny cieľ pre detailnejšie štúdium.

2 LITERÁRNY PREHLAD

2.1 Auxín

Rastliny sú sesilné organizmy, na ktoré prostredie bežne vplyva rozličnými environmentálnymi faktormi, ktoré dokážu vytvárať stresové podmienky. Či sa už pojednáva o biotických alebo abiotických stresoroch, treba mať na pamäti, že odpoveď rastlinných jedincov je často komplexná. Kedy môže zahŕňať napríklad moduláciu rastu či vývoja. To je možné vďaka určitému typu plasticity, ktorú dokázali tieto organizmy nadobudnúť v procese evolúcie. A teda zohľadňujúc tieto vlastnosti je potrebné sa zamyslieť nad činiteľmi, ktoré celý tento mechanizmus umožňujú. Tu sa na rad dostávajú rastlinné hormóny. Ktoré sú zapojené do širokej škály metabolických procesov v ktorých hrajú významnú úlohu. Často sú charakterizované ako molekuly syntetizované v metabolizme de novo a v rastlinnej ríši sú často vysoko konzervované a ich úlohou je reguláciou procesov ako napríklad rast, vývoj či aklimtizácia na biotické ale aj abiotické stresy. Medzi rastlinné hormóny zaraďujeme napríklad etylén, kyselinu abscisovú či salicylovú. Patria sem ale aj skupiny ako sú brazinosteroidy, gibberelíny, strigolaktóny a iné (Parsons et al., 2020), (Nambara & Van Wees, 2021).

Aj auxín je fytohormón, ktorý hrá významnú rolu v metabolických procesoch u živých rastlinných jedincov. Auxín je možné charakterizovať z chemického hľadiska ako kyselinu indol-3-octovú (IAA). Jedná sa o pomerne slabú organickú kyselinu a jeho štruktúra nápadne pripomína štruktúru tryptofánu. Obsah jeho štruktúry, a teda prítomnosť indolového kruhu a karboxylovej skupiny, a tiež ich vzájomná poloha a vzdialenosť určuje jeho hlavné vlastnosti. No vzhľadom na to že auxíny sú skupinou fytohormónov a IAA nepredstavuje jediného činiteľa, je možné auxíny charakterizovať širšie. Do skupiny auxínov teda radíme látky, ktorých funkcia v rastlinnom tele je podobná tej, ktorú má samotné IAA. Jedná sa o nízko-molekulárne látky so schopnosťou indukcie rastu v rastlinnom tele. Iné prírodné auxíny ako kyselina 4-chloroindol-3-acetová (4-Cl-IAA) alebo fenylacetová kyselina (PAA) boli identifikované v rastlinách (a teda predpokladáme ich rolu v rastlinnom metabolizme) a iné syntetické varianty ako kyselina 1-naftyloctová (NAA) alebo kyselina dychlórfenoxyoctová (2,4-D) v dnešnej dobe hrajú významnú rolu v oblastiach poľnohospodárstva, vedy a výskumu. IAA – najštudovanejší auxín spomedzi členov spomínanej skupiny vykazuje vysoký potenciál v možnostiach modulácie rozličných biologických procesov. Počínajúc bunkovým delením a rastom,

končiac reguláciou diferenciácie samotných buniek. Je možné tvrdiť že má všadeprítomnú a kontextovo závislú funkciu, a preto je teda namáhavé vymedziť presné hranice charakteristiky jeho vplyvu a účinku (Paque & Weijers, 2016).

2.1.1 Funkcia auxínu

IAA a je z hľadiska funkcie v zmysle jeho koncentrácie multifunkčný. A preto jeho množstvo priamo moduluje prejav jeho vplyvu. Rozličné koncentrácie dokážu vytvárať rozličné fenotypové prejavy. Pre príklad vyššia koncentrácia exogénneho IAA indukuje väčšie množstvo laterálnych koreňov, kedy nižšie koncentrácie exogénneho auxínu v médiu spôsobujú vytváranie primárnych koreňov ktoré vykazujú vyššiu dĺžku a naopak (Bell, 2017).

IAA aj v pomerne malých/nízkych koncentráciách dokáže regulovať génovú expresiu moduláciou špecifických transkripčných faktorov, či rozličných metabolitov/proteínov zapojených do signálnych kaskád. Samotná podstata auxínu tkvie v jeho distribúcii. Tá môže byť zabezpečená transportom cez pletivo floému, alebo polárnou cestou (PAT) z bunky do bunky. Jadro celej funkcie auxínu leží v jeho špecifických receptoroch. TIR1 (transport inhibitor receiver1) je nukleárnym auxínovým receptorom, ktorý priamo viaže auxín. Väzbou auxínu dochádza aj k interakcii s IAA represormi. Tie sa následne degradujú, to spôsobí uvoľnenie auxín responzívnych faktorov – ARFs (transkripčné faktory) zo stavu represie a dochádza k regulácii génovej expresie (S. B. Li et al., 2016), (Leyser, 2018). Auxín ako už bolo povedané reguluje rozličné fyziologické procesy. K nim sa radia napríklad nastavenie bilaterálnej symetrie priamo u embryí, formovanie koreňov a tiež vytváranie apikálnej dominancie, ako aj odpovede na environmentálne vplyvy, či dokonca aj gravitropizmus a fototropizmus (Perrot-Rechenmann & Napier, 2005). Tieto procesy sú regulované špecifickým bunkovým signálom, ktorý môže byť modulovaný aj samotným zložením fytohormónov v tele jedinca. Prítomnosť IAA a iných hormónov (a tiež ich koncentrácia) je charakteristická pre rozličné typy pletív a aj samostatných buniek. A dá sa teda tvrdiť že špecifická koncentrácia fytohormónov a špecifické zloženie ich zmesi je podmienkou pre „existenciu“ rozličných typov buniek a pletív. No funkcia auxínu a jeho signálu ale nie je obmedzená iba na moduláciu rastu a vývoja rastlinného tela. Je neopomenuteľným a dôležitým aj v procesoch ochrany voči virálnym patogénom.

Auxíny sú abundantné a tiež produkované v každej časti rastlinného tela. Najvýraznejšie sú ale syntetizované v kotyledónoch, mladých výhonkoch a koreňoch. A to je spôsobené najmä nevyhnutnosťou ich prítomnosti v pletivách, ktoré podliehajú procesom bunkového delenia a rastu, kde je auxín nevyhnutný.

Auxíny môžu byť v metabolizme rozličných rastlín produkované v rozličných dráhach a to platí aj pre samotnú IAA. V skratke sú pre produkciu IAA známe dve cesty - na tryptofáne závislá (TRP) a na tryptofáne nezávislá (TAM) cesta (X. Cao et al., 2019).

2.1.2 Transport Axínu

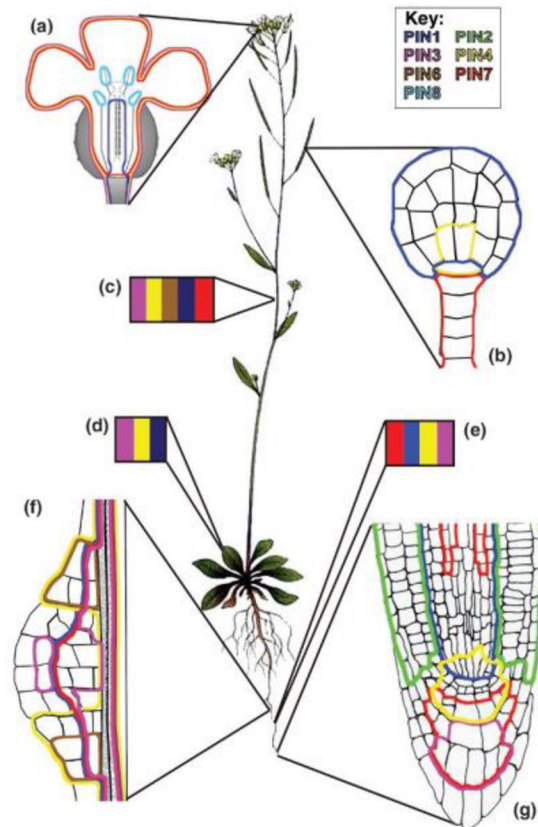
IAA je slabou kyselinou, a preto sa v kyslom prostredí nachádza v protonovanej forme a v prostredí s neutrálnym pH je jeho štruktúra deprotonovaná. A teda keďže je pre prostredie cytozolu typické pH vyššie alebo rovné sedem, IAA sa dostáva do deprotonovaného štádia a nie je teda schopný prenikat' cez bunkovú membránu procesom difúzie. V apoplaste je ale pH = 5,5 a tým môže IAA zastávať protonovanú formu. To mu umožňuje difúziu do vnútra bunky. Tento pasívny transport sa nazýva chemiosmotická hypotéza. Pre našu prácu je ale podstatnejšia dráha aktívneho polárneho transportu (PAT) zabezpečujúca smerovaný pohyb fytohormónu z bunky do bunky. Takto dokáže transportný systém "vyberať" iba malú skupinu buniek ktoré sa následne diferencujú do cievného pletiva. Tento transport je zabezpečovaný prítomnosťou špecifických membránových proteínov rôznych typov, pochádzajúcich z rozličných rodín. Konkrétne sa jedná napríklad o AUXIN RESISTANT1/LIKE AUX (AUX/LAX), PIN-FORMED (PIN) A ABC-B/MULTIDRUG RESISTANCE/ P-GLYCOPROTEIN (ABCB/MDR/PGP) zabezpečujúce dráhy dnu aj smerom von z buniek. Existuje tiež transport IAA využívajúci dráhy floému, ktorý slúži skôr k prenosu fytohormónu na veľké vzdialenosti. Napríklad z miesta syntézy od miesta jeho funkcie. PAT zabezpečuje ale detailnejší prístup a formuje lokálne maximá a minimá IAA. To v konečnom dôsledku vykazuje regulačnú schopnosť s vysokou mierou presnosti (Gomes & Scortecci, 2021).

2.2 PIN proteíny a ich stručná charakteristika

Počas našej práce sme sa zameriavali na jednu z rodín transportných proteínov - rodinu PIN. Tieto prenášačové proteíny (8 jednotlivých druhov) sa bežne vyskytujú u rozličných rastlinných jedincov. Aj keď sa medzi jednotlivými členmi vyskytuje určitá variabilita

týkajúca sa štruktúry samotných proteínov, je tu stále zachovaná určitá podobnosť, ktorej tieto proteíny vďaka svojej charakteristickej a veľmi príbuznej aktivite a funkcii. Dá sa konštatovať, že každý z týchto proteínov obsahuje vo svojom základe takzvanú hydrofilnú slučku. Štruktúra a veľkosť tejto slučky zabezpečuje aj diferenciáciu medzi jednotlivými členmi tejto rodiny proteínov. Čo sa týka dĺžky spomínanej štruktúry, je možné na základe tohto faktu rozdeliť PIN proteíny do troch skupín. Prvá kategória zahŕňa členov s pomerne dlhou hydrofilnou slučkou (323 – 355 reziduí). Tu je možné zaradiť proteíny PIN1 – PIN4 a taktiež proteín PIN7. Jednotlivých členov tejto skupiny nazývame aj kanonickými PIN proteínmi a ich ďalšou špecifickou vlastnosťou je ich lokalizácia v cytoplazmatickej membráne (ďalej už len CM). V ďalšej skupine sa objavujú jedince s krátkou štruktúrou hydrofilnej slučky (27 – 46 reziduí), kde patria proteíny PIN5 a PIN8. Členovia tejto skupiny sú pre zmenu nazývaní nekanonickými proteínmi a bežne sa udáva, že PIN proteíny s touto štruktúrou sú prítomné v endoplazmatickom retikule (ďalej už len ER). Toto delenie uzatvára proteín PIN6, ktorý ako jediný obsahuje slučku, ktorej dĺžka nespadá ani do jednej zo spomínaných skupín a nachádza sa niekde medzi nimi. A teda o PIN6 proteíne hovoríme, že má strednú dĺžku svojej hydrofilnej slučky a vykazuje duálnu bunkovú lokalizáciu - na endoplazmatickom retikule ale aj na plazmatickej membráne, čo je ovplyvnené v závislosti od expresných levelov a fosforylácie tohto proteínu. Vzhľadom na sekvenčné dáta je ale možné povedať, že je bližšie podobný krátkym variantom PIN proteínov (Bennett et al., 2014). Čo sa týka funkcie jednotlivých skupín vzhľadom na ich lokalizáciu, membránovo lokalizované PINy transportujú auxín von z buniek. Zatiaľ čo nekanonické varianty týchto auxín transportných proteínov majú za úlohu transport hormónu medzi ER a cytoplazmou. Táto dráha je tiež vysoko významná, pretože v tejto oblasti je IAA nie len produkovaný, ale dochádza tu aj k jeho inaktivácii, konjugácii a k prípadnému uskladneniu (Strohm et al., 2013), (Sun et al., 2023), (Dobrev et al., 2024).

Špecifická lokalizácia PIN proteínov je dvojité. Lokalizácia na úrovni bunky je zabezpečovaná posttranslačnými modifikáciami, no všeobecné rozmiestnenie PINov v rámci tela (Obrázok 1) je ale moderované špecifickou aktivitou promotora typického pre každý variant PIN (Luschnig & Vert, 2014).



Obrázok 1 – Expresná mapa PIN génov v tele *Arabidopsis thaliana*, zostavená z údajov o promótorovej aktivite a proteínovej lokalizácii. Každý špecifický proteín má priradenú farebnú charakteristiku. Zobrazené orgány: kvet (a), globulárne štádium embrya (b), stonka (c), list ružice (d), zrelá časť primárneho koreňa (e), primordium laterálneho koreňa (f), špička koreňa (g). Zdroj: (Pavel Křeček et al., 2009)

Pletivovo špecifická lokalizácia PIN1 je typická nielen pre dospelé štádium rastliny, no je možné ho nájsť aj počas embryogenézy. U dospelých jedincov je možné PIN1 badať napríklad v oblasti koreňa, konkrétne v bunkách endodermy.

Čo sa týka bunkovej lokalizácie je PIN1 v štruktúre primárneho koreňa typicky bazálna vzhľadom na štruktúru buniek vodivého pletiva. Ten istý PIN proteín je ale v oblasti endodermy lokalizovaný aj bazálne, ale aj na vnútorných laterálnych stranách endodermálnych buniek.

Členovia skupiny kanonických proteínov (konkrétne PIN2, PIN3 a PIN4) sú na druhú stranu zapojení do procesu nastavovania gravitropizmu v koreni rastlín. V tomto prípade sa jedná o súhru bunkovo a pletivovo špecifickej lokalizácie. Bližšie môžeme uviesť že PIN2 je pri procese nastavovania gravitropizmu vzhľadom na pletivovú špecifickosť lokalizácie umiestnený v epiderme a v laterálnej koreňovej čiapočke kedy je

na bunkovej úrovni v týchto miestach orientovaný smerom k stonke. No u kortikálnych buniek meristému je jeho bunková lokalizácia opačná (Rahman et al., 2010).

A aby sme nezabudli ani na krátke varianty PIN proteínov a ich špecifickú a rozdielnú lokalizáciu, PIN5 je pomerne nízko abundančný. No zato PIN8 má zreteľne špecifickú pletivovú lokalizáciu, a to konkrétne v samčom gametofyte, kde zohráva významnú roľu v jeho vývoji a funkcii (P Křeček et al., 2009).

Pre zmenu ale PIN6 ukazuje svoju úlohu na opačných častiach rastliny, kedy je potrebným pri distribúcii auxínu v procese formovania laterálnych a adventitívnych koreňov (Simon et al., 2016).

Všeobecne je presná biologická funkcia týchto krátkych variantov PIN proteínov nie úplne známa a špecifikovaná, odhaduje sa, že vďaka svojej polohe zodpovedajú za auxínovú homeostázu (Sisi & Růžička, 2020).

Vzhľadom na reguláciu PINov na rozličných úrovniach je nevyhnutné spomenúť viaceré faktory ovplyvňujúce v konečnom dôsledku proces transportu auxínu. Medzi tieto faktory patrí napríklad abundancia PINov či hodnoty fosforylácie a mnohé iné, ktorým sa budeme bližšie venovať v neskoršej časti tejto práce.

Čo sa týka bundancie PIN proteínov ktorá má tiež svoj vplyv, tá je regulovaná systémom anglicky nazývaným auxin turnover, kedy dochádza k prenosu vybraných PINov do prostredia vakuoly za účelom degradácie. Tento proces nazývame anglicky constitutive intracellular recycling. Konkrétne sa jedná o - na klathrine závislý (dependentný) proces endocytózy PIN proteínov lokalizovaných na plazmatickej membráne. Keďže sa jedná o cyklický proces, dochádza k spätnému prenosu týchto proteínov na membránu. Spätňý krok recyklovania je zabezpečený pomocou exocytózy závislej guanínovom výmennom faktore z ADP-rybosilačného faktoru (ARF-GEF) (Geisler et al., 2019).

Vzhľadom na proces repolarizácie si treba uvedomiť, že aj keď sú bunky rastlinného tela vyzbrojené množstvom mechanizmov pre udržanie charakteristickej mapy polarizácie jednotlivých PINov špecifickej pre daný moment počas dlhej doby. Polarizáciu PIN proteínov môžeme v skratke charakterizovať ako špecifickú subcelulárnu lokalizáciu na plazmatickej membráne. Čo sa týka špecificity je možné hovoriť o presnej polohe PIN proteínov na špecifických stranách tejto membrány v celej bunke. To v

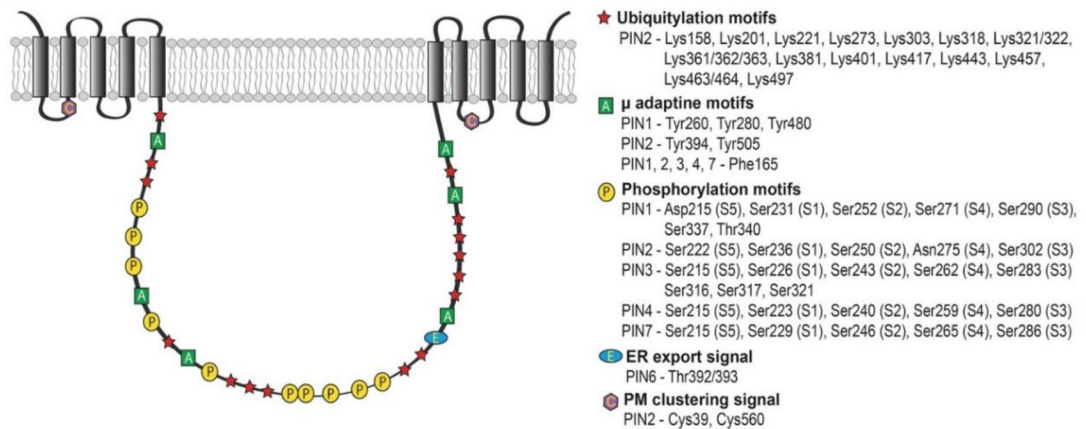
konečnom dôsledku spôsobuje špecifický transport fytohormónu takým smerom, akým ho daný regulačný mechanizmus posiela (Sauer & Grebe, 2021).

Polarita auxín - prenášačových proteínov býva regulovaná na mnohých úrovniach a dá sa tvrdiť, že je hlavnou podstatou funkcie samotných proteínov. A to najmä z dôvodu, že na jej druhu závisí ich správanie, a tým pádom aj ich hlavná rola v rastlinnom tele. Polarita, ako už bolo spomínané, je naozaj komplexne regulovaná a faktory ktoré ju ovplyvňujú, môžu vykazovať exogénny pôvod (signály vonkajšieho prostredia ako je zmena gravitácie) alebo aj endogénny základ (procesy prebiehajúce v bunkách – endocytóza) (Cheng & Wang, 2022).

Počas posledných rokov bola veda schopná objasniť viaceré činitele proteínovej povahy, ktoré dokážu modulovať polaritu PIN proteínov. Medzi ne patria napríklad proteíny CAMEL a CANAR fungujúce v komplexe, ktoré koordinujú polaritu PIN1 v bunkách pri tvorbe smerovaného auxínového transportu (Hajný et al., 2022). Ako ďalšieho ale už dlhšie známeho hráča zapojeného v modulácii polarizácie PIN proteínov môžeme spomenúť PINOID (EC 2.7.11.1.). Jedná sa o serín-treonín kinasu, ktorá moduluje polaritu PINov na základe ich fosforylácie špecifických motívov ktorú sprostredkováva.

Fosforylácia motívov hydrofilnej slučky je ďalším z faktorov, ktorý je schopný modulovať polaritu PIN proteínov. Tieto motívy nemajú “exogénny” pôvod a sú situované v oblasti hydrofilnej slučky (ďalej už iba HL), ktorá sa nachádza v štruktúre samotných auxín - prenášačových proteínov. Celkovo má HL blízky súvis s aktivitou a funkciou PINov, a to najmä z toho dôvodu, že obsahuje veľké množstvo týchto funkčných elementov (príklady funkčných zložiek - Obrázok 2). Nachádzajú sa tu motívy, ktoré sú často špecifické pre jednotlivé skupiny a ovplyvňujú chovanie a aktivitu jednotlivých PINov. Bližšie hovoríme o fosforylačných a ubiquitinilačných miestach kanonických variantov PIN proteínov v spomínaných slučkách, ktoré môžu vykazovať auto-inhibičnú aktivitu. V tomto procese je ale nevyhnutná prítomnosť napríklad aj špecifických kinas (Ung et al., 2022). Medzi tieto kinasy môžeme zaradiť aj vyššie uvedené varianty ako PINOID a CAMEL. Pre príklad potenciálu fosforylácie motívov v HL je možné uviesť, že fosforylácia týchto štruktúr vyúsťuje do zvýšenej apikalizácie v oblasti buniek koreňového vodivého systému. Na druhej strane pri defosforylácii viacerých skupín u PIN1 v jeho HL a dochádza k polarite smerom ku koreňu

(Bilanovičová et al., 2022). Je možné teda tvrdiť, že aj samotná hodnota fosforylácie dokáže modulovať polaritu PIN proteínov.



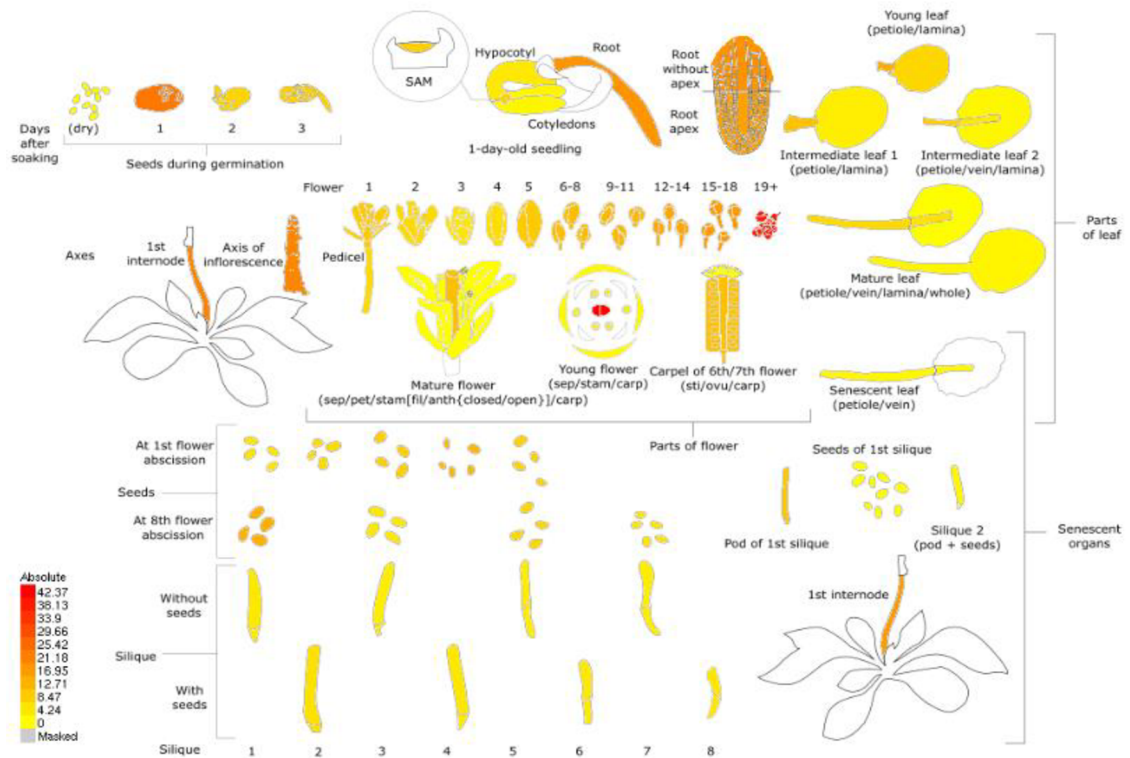
Obrázok 2 – schéma známych sekvencií a reziduí vo všeobecnom modeli štruktúry dlhých PIN proteínov u *Arabidopsis thaliana*. Symboly charakterizujú jednotlivé funkčné elementy a ich približnú polohu v štruktúre modelu kanonických PINov. Presné pozície týchto motívov a ich poloha u jednotlivých variantov PIN je uvedená vpravo. Zdroj: (Zwiewka et al., 2019).

Neposledným, už známym a proteínovým regulátorom polarity je aj MEL. Jedná sa o ACG kinasu (PKC, EC.2.7.11.13), ktorá limituje proces laterálnej difúzie PINov v CM, a tým udržiava špecifickú polaritu týchto prenášačových proteínov (Glanc et al., 2021)

2.3 Pin1 a jeho charakteristika

Proteín PIN1 z druhu *Arabidopsis thaliana* je kódovaný génom s polohou na prvom chromozóme a v jeho promótorovej časti boli novo anotované dve lncRNA. Génový produkt má veľkosť 622 aminokyselinových zvyškov a jeho hmotnosť sa odhaduje na 67,019 Da. V rastlinnom tele je PIN1 prevažne exprimovaný v cievnej sústave. Je však výrazne dôležitým faktorom vo vývoji v embryonálnom štádiu rastliny (čo je možné vidieť snímke - Obrázok 3) (Omelyanchuk et al., 2016). Zaujímavým faktom je aj výskyt jeho ortológov u množstva iných rastlinných druhov, čo iba poukazuje na nevyhnutnosť samotného proteínu a jeho funkcie. Zaujímavé je, že k jeho expresii dochádza ešte pred výskytom samotných markerov vaskulatury určujúcich osud buniek, a teda typ pletiva. Špecifická polarita PIN1 v tomto mieste určuje špecifický smer transportu auxínu do

vzdialených bodov konvergencie v epiderme. Tento proces potom priamo definuje pozíciu hlavnej žilnatiny v listoch.



Obrázok 3 – expresná mapa PIN1 proteínu u *Arabidopsis thaliana* v jednotlivých častiach tela a tiež v jednotlivých vývojových štádiách. Odtieň zafarbenia je charakterizuje silu expresie v danej časti alebo v danom štádiu. Farebný odtieň spojený s intervalmi intenzity expresie je charakterizovaný grafom v ľavom dolnom rohu. Zdroj: TAIR (AT1G73590(PIN1) <https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=30683&type=locus> (20. 4. 2024).

Polárny, a teda regulovaný a pomalý transport fytohormónu medzi jednotlivými časťami organizmu zabezpečuje reguláciu vývoja a rastu rastlinného tela, ako aj v prípade odpovede na vonkajšie podnety, na základe čoho dochádza k relevantnej odpovedi. No auxín samotný dokáže regulovať svoj vlastný transport a to na základe hypotézy o jeho kanalizácii. Tá uvádza, že auxín je schopný modulovať smer svojho transportu pomocou spätnej väzby. Tento proces potom indukuje tvorbu samostatne sa organizujúcich kanálov, transportujúcich auxín. Transport auxínu vo vnútri týchto kanálov slúži pre bunky ako signál na zahájenie diferenciácie do tkaniva špecifického pre cievnú sústavu (Scarpella et al., 2006).

Čo sa vývoja týka je možné hovoriť o významnej role *AtPIN1* v prípade formácie embryí, apikálnych meristémov, ako aj vodivého pletiva, či v prípade vznikajúcich orgánov. Vysoký vplyv PIN1 v tele *Arabidopsis thaliana* v podstate umožnil samotný objav

tohto proteínu. Kedy vďaka mutantom so stratou funkcie dochádzalo k tvorbe takzvaných aflorescentných (bezkvetých) jedincov.

Dnes sa dá tvrdiť, že v procesoch regulácie PIN proteínov poznáme už veľa hráčov proteínovej povahy zapojených do týchto modulačných dráh. No deje a faktory v epigenetickej regulácii týchto auxín - prenášačových proteínov sú pre nás stále pomerne neznáme, a teda do dnešnej doby čakajú na objavenie a objasnenie.

2.4 Nekódujúce RNA

Pre pochopenie funkcie nekódujúcich ribonukleových kyselín je nevyhnutné si uvedomiť, že veľké množstvo genómu organizmov obsahuje vyššie percento nekódujúcich úsekov. Všeobecne sa udáva že z celkového genómu napríklad u človeka je transkribovaných asi 90 % celkovej genetickej informácie, a následne je translatovaných menej ako 5 % transkriptu do proteínovej formy (H. Cao & Kapranov, 2022).

2.5 Varianty ncRNA

Nekódujúce RNA je možné rozdeliť do viacerých skupín. Prvou skupinou sú infraštruktúrne varianty ncRNA ktoré vykazujú pomerne stálu expresiu. Do tejto skupiny sú zaradované napríklad rRNA, tRNA, snoR, a táto skupina vykazuje takzvanú housekeeping aktivitu. To znamená že vďaka ich prítomnosti je zabezpečený všeobecný a základný chod bunky. Druhou skupinou sú ncRNA s regulačným potenciálom. Túto skupinu tvoria miRNA, piRNA, siRNA a lncRNA. Dá sa tvrdiť, že ich expresia je malá, no to na ich podstate neuberá, kedy ako príklad môžeme uviesť aktivitu miRNA pri regulácii expresie samotnej mRNA. Samozrejme existuje veľké množstvo typov a druhov delení ribonukleových kyselín, ktoré my nebudeme ďalej rozoberať, pretože v konečnom dôsledku nemá vplyv na našu prácu. U niektorých druhov ncRNA bola potvrdená predpokladaná aktivita v rozličných metabolických procesoch. Iné varianty sú však neustále záhadou a predpokladá sa, že sú skôr len takpovediac odpadom vznikajúcim v procese pervazívnej transkripcie génov. Predpokladáme to prevažne pre tie, ktoré vykazujú nízku stabilitu a nízku abundanciu. Všeobecne je proces štúdia nekódujúcich variantov RNA pomerne náročný vďaka predom uvedeným faktorom (nestabilita a malá abundancia). Niektoré lncRNA môžu byť významnými markerami

v prípade rozličných typov rakoviny. A preto sú významnými faktormi s potenciálom pre štúdium a následnú priamu aplikáciu v humanitnej medicíne (Wang et al., 2022).

No potenciál spomínaných nekódujúcich RNA nekončí len pri možnosti využitia vo forme markerov. Bolo preukázané, že niektoré typy ncRNA dokážu modulovať mnohé metabolické procesy neobmedzene v rastlinnom či živočíšnom tele. Medzi ne je možné zaradiť napríklad moduláciu génovej expzie v zmysle ich schopnosti interakcie nie len so samotnou DNA, ale aj s rozličnými regulačnými faktormi modulujúcimi expresiu génov. Ako príklad by sme mohli uviesť rastlinnú lncRNA *APOLO* (*AUXIN-REGULATED PROMOTER LOOP*) a jej schopnosť interakcie s transkripčným faktorom WRKY. Jedná sa o proces kedy *APOLO* moduluje väzbu transkripčného faktoru WRKY23 do promótoru *RDH6* (*ROOT HAIR DEFECTIVE 6*). Čo vo výsledku zabezpečuje aktiváciu *RDH6* nízkymi teplotami, a to vyúsťuje do procesu regulácie rastu koreňových vláskov za špecifických podmienok. Potvrdenie prítomnosti tejto interakcie a jej schopnosť regulácie poukazuje na vysoký význam ncRNA v rastlinnom organizme a nabáda k ďalšiemu štúdiu týchto dlhých nekódujúcich RNA.

APOLO pre nás nesie veľký význam, jedná sa o lincRNA (long intergenic noncoding RNA) s potvrdenou regulačnou funkciou. A ako teda táto dlhá ncRNA funguje? Vo všeobecnosti dokáže rozpoznať množstvo nezávislých lokusov v genóme *Arabidopsis* a moduluje priestorovú štruktúru chromatinu v týchto miestach, čo vyúsťuje do zmeny transkripčnej aktivity (Moison et al., 2021). Najdôležitejším faktorom ale je, že *APOLO* vytvára preň špecifickú chromatinovú slučku ktorá zasahuje aj do promótorovej sekvencie jeho susedného génu. V tomto mieste sa nachádza gén kódujúci PINOID. Ako už bolo vopred spomínané PINOID je kľúčovým regulátorom bunkovej lokalizácie PINov v procese polárneho auxínového transportu. A to tak, že moduluje polaritu PIN proteínov procesom fosforylácie, ktorú sám PID sprostredkúva (Ariel et al., 2014).

2.5.1 Dlhé nekódujúce RNA

Väčšina nekódujúcich foriem RNA postráda konzerváciu primárnych sekvencií a niekedy aj sekundárnych štruktúr. Špecifita a funkcia útvarov vyššej funkcie bola v podstate donedávna neznáma. Dnes už však vieme, že usporiadanie štruktúry lncRNA priamo súvisí s jej aktivitou a tiež môže byť modulované vplyvom rozličných faktorov medzi ktoré patria napríklad zmena teploty, interakcia s proteínmi, väzba RNA alebo aj DNA,

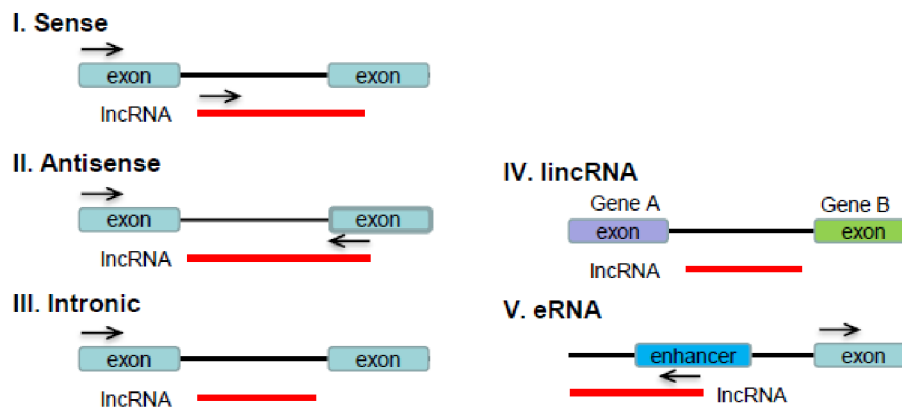
interakcia s iontami, posttranskripčné modifikácie a dokonca aj mutácie v samotnej sekvencii lncRNA. Moduláciou štruktúry lncRNA teda dochádza k ovplyvňovaniu jej funkcie čo vytvára regulačný potenciál (Aydın et al., 2023).

Čo sa týka biogenézy lncRNA, tá je podobná mechanizmu formovania mRNA, to ale v konečnom dôsledku nezaručuje ich funkčnú a štruktúrnu podobnosť. LncRNA vykazujú vyššiu formu variability týkajúcu sa ich dĺžky, no podobne ako mRNA sú ich konce polyadenylované a často obsahujú aj guanozínovú čiapočku. Tieto dva faktory zabezpečujú stabilitu vznikajúcej RNA a ochraňujú ju pred degradáciou. Napríklad u mRNA hrajú rolu aj v procese väzby ribozomálnych komplexov na ribonukleotidové vlákno, a tiež sú neopomenuteľné v procese exportu mRNA z jadra do cytoplazmy. Počas rastu a vývoja rastlinného tela sú lncRNA exprimované v nižších hodnotách oproti tým, ktoré vykazujú mRNA (Chen et al., 2020). Zaujímavý je aj fakt, že niektoré lncRNA môžu obsahovať krátky otvorený čítací rámec (ORF), ktorý slúži k tvorbe malého peptidu alebo proteínu (Matsumoto et al., 2017), (Zhao et al., 2022).

Čo sa týka priamo samotného vzniku tejto formy RNA, tie sú špecificky produkované za pomoci transkripčnej aktivity RNA polymerasy II (EC 2.7.7.6.). Tento univerzálny enzým dokáže produkovať lncRNA z rozličných regiónov, ako sú napríklad intrónové sekvencie či intergénové úseky. Nie je tiež obmedzený ani na produkciu lncRNA s rozličným smerom funkcie/významu, a teda v smere (sense) a v protismere (antisense). Toto však nie je jediná cesta produkcie týchto nekódujúcich úsekov ribonukleových sekvencií. Špecificky u rastlín je možné nájsť aj polymerasy IV (EC 2.7.7.6.) a V (EC 2.7.7.48.) (L. Li et al., 2014). Spôsob produkcie lncRNA je podstatný pre pochopenie ich role v organizme, a preto je potrebné sa zamerať aj na fakt, že väčšina vznikajúcich lncRNA v rastlinnom organizme je polyadenylovaná. Táto vlastnosť taktiež môže ovplyvniť aktivitu a životnosť samotných lncRNA pretože môže byť faktorom zabezpečujúcim ich úplnú degradáciu. Polyadenylácia sa vyskytuje primárne na 3' konci sekvencie a jedná sa o krátky úsek s obsahom polyadenylácie nazývaný aj chvost. Udáva sa, že väčšina lncRNA je stabilizovaná pomocou polyadenylácie, no varianty lncRNA ktoré neobsahujú tento úsek si zachovávajú svoju stabilitu vďaka vytváraniu špecifických sekundárnych štruktúr. Treba ale dodať že táto konzervačná modifikácia nesie aj iný význam. Môže byť dôležitá pri zabezpečovaní efektívneho nukleárneho transportu (Beaulieu et al., 2012), (Bridges et al., 2021).

Dlhé nekódujúce ribonkleové kyseliny sú variantmi ncRNA, ktoré je možné charakterizovať ich minimálnou dĺžkou (200 nt). Existuje nespočet spôsobov ako výhodne a logicky rozčleňovať lncRNA do rozličných skupín na základe rozdielnych kritérií. Jedným z nich je aj spôsob rozdelenia na základe ich potenciálu pre takzvaný overlapping. V jednoduchosti ide o ich vlastnosť ktorá opisuje prekryv úsekov týchto lncRNA s úsekmi proteín-kódujúcich génov. Prvou skupinou sú teda lncRNA nezasahujúce do génov s proteín-kódujúcim potenciálom a do tejto skupiny radíme intergénové lncRNA. Potrebné je spomenúť aj enhancerové RNA (eRNA), ktoré sa vyznačujú tým, že vznikajú transkripciou z enhancerových regiónov v DNA a sú schopné interagovať s promótorovnými sekvenciami. Druhú skupinu tvoria dlhé nekódujúce RNA prekryvajúce sa s úsekmi génov s proteín-kódujúcim potenciálom. Túto skupinu ďalej delíme na varianty v anglickom znení sense a antisense vzhľadom na orientáciu voči vláknku, ktoré prekryvajú alebo obsadzujú (Obrázok 4).

Treba však ale upozorniť na skutočnosť, že pervazívna transkripcia u *Arabidopsis thaliana* nie je až taká rozsiahla ako napríklad v ľudskom genóme, či dokonca aj v porovnaní s inými rastlinnými druhmi. U *Arabidopsis* má asi až 25% génov proteín-kódujúci potenciál, čo môže teoreticky znižovať množstvo a zloženie prítomných ncRNA v organizme. Najpočetnejším variantom ncRNA u tohto rastlinného druhu sú lncRNA (Budak et al., 2020). To umožňuje vyššiu schopnosť anotácie jednotlivých lncRNA čo otvára cestu za samotným pochopením ich regulačnej schopnosti. Pre potvrdenie je možné uviesť výsledky štúdie lncRNA s názvom *COOLAIR*, ktorá je regulátorom jedného z hlavných vývojových génov kvitnutia *FLC* (*FLOWERING LOCUS C*), a to pri procese jarovizácie. Izoforma *COOLAIR*, ktorá má typický diskovitý tvar vykazuje u *Arabidopsis* je vysokú komplexitu s množstvom motívov v sekundárnej štruktúre, ako sú napríklad aj dve netypické asymetrické slučky lokalizované na C-konci reťazca. Zaujímavé ale je, že dokonca aj singletný jedno-nukleotidový polymorfizmus (SNP) v jej prirodzenej štruktúre ovplyvní stabilitu tejto RNA, čo vyúsťuje vo fenotyp s charakteristickým neskorým kvitnutím – *var2-6* (Hawkes et al., 2016), (Yang et al., 2018).



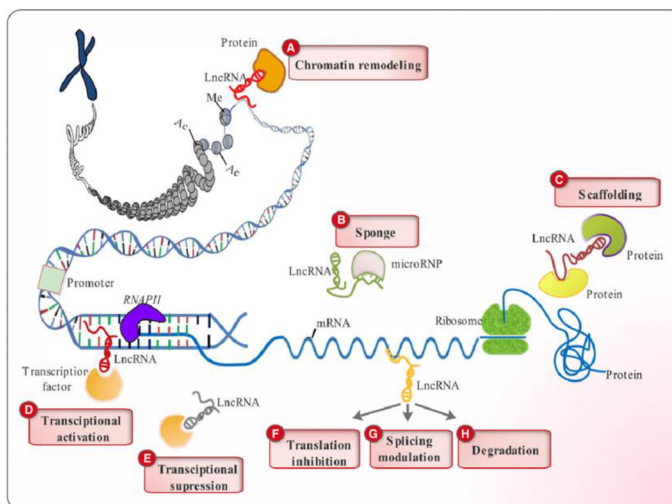
Obrázok 4 – Klasifikácia lncRNA do piatich skupín: v smere, v protismere, intrónové, lincRNA a eRNA. Zdroj: LncRNA Transcriptional Control of Inflammatory Responses – LncRNA Blog, <https://www.lncrnablog.com/lncrna-transcriptional-control-of-inflammatory-responses/> (14. 4. 2024).

2.5.2 Možné funkcie lncRNAs

Funkcie ktoré lncRNA môžu niesť priamo súvisia s ich lokalizáciou. Typickým miestom ich výskytu je jadro a cytoplazma. Ich prítomnosť v jadre priamo súvisí s ich schopnosťou interakcie s chromatinovými štruktúrami ako bolo už predom uvedené. LncRNA však fungujú ako v jadrových, tak aj v cytoplazmatických kompartmentoch a za posledné roky bolo preukázané že tieto varianty ncRNA vykazujú schopnosť regulácie génovej expsie, dokážu ovplyvňovať stabilitu genómu a dokonca vedia vplývať aj na organizáciu jadrových domén nezávisle od ich výskytu. Či už v rastlinnom alebo živočíšnom tele.

Niekedy lokalizácia lncRNA priamo súvisí aj s ich aktivitou. No typy vplyvov, ktoré lncRNA môžu mať je mnoho. Poďme si teda povedať niečo viac o ich funkciách, ktoré sa odvíjajú priamo od ich jadrovej lokalizácie. Jedným z procesov v ktorých môžu byť lncRNA zapojené je napríklad alternatívny splicing. V tomto procese sa môžu tieto varianty ncRNA priamo viazať, alebo len interagovať so splicing faktormi. Alternatívny splicing v skratke umožňuje produkciu rozdielnych produktov z rovnakého génového základu. V dnešnej dobe bolo objavených už niekoľko skupín RNA - viažucich proteínov ale najvýznamnejšie do dnešnej doby stále ostávajú humánne varianty, ktorých aktivita sa spája s prejavmi rozličných závažných ochorení (Malakar et al., 2024). Ďalšou v jadre lokalizovanou aktivitou ktorú lncRNA vykazujú je aj modulácia funkcie a organizácie jadrových teliesok. Jedná sa o špecifické formy lncRNA s názvom “architectural long noncoding RNAs” (arcRNAs) (Chujo & Hirose, 2017). Netreba však zabúdať ani na schopnosť lncRNA ovplyvňovať štruktúru chromatinu napríklad na základe interakcie

týchto RNA s enzýmami schopnými modifikovať chromatinovú štruktúru alebo aj s faktormi remodeľujúcimi štruktúru nukleozómov. Nevyhnutné je uviesť aj fakt, že rozličné typy lncRNA asociujú aj so samotným chromatinom, kedy dokážu fungovať ako „nosná“ konštrukcia umožňujúca zostavenie komplexov pre tieto enzýmy (schéma funkcií lncRNA - Obrázok 5). Počas tohto procesu môže aj nemusí byť nevyhnutná prítomnosť aj iných malých variantov RNA. Pre príklad môžeme uviesť siRNA – riadenú metyláciu vlákna DNA nazývanú (RdDM). Ako už bolo spomenuté, táto dráha je špecifická pre rastlinné organizmy a je siRNA dependentná. Samozrejme, že existujú aj systémy samostatne založené na funkcii a aktivite lncRNA, no mechanizmus ktorý zabezpečuje špecificitu lncRNA v tomto procese zostáva pre nás neznámym. Ešte je potrebné podotknúť, že produkcia samotných lncRNA je často regulovaná na základe spätnej väzby vyššie uvedenými faktormi (Han & Chang, 2015). Napríklad u živočíšnych buniek boli preukázané viaceré mechanizmy interakcie so špecifickými proteínmi, čo vyúsťuje v moduláciu expície. Napríklad dochádza k aktivácii transkripcie pomocou trimetylácie H3K4 histónu alebo pri interakcii s inými proteínmi môže dochádzať k represii transkripcie pomocou metylácie inej varianty histónov (H3K27) (Wierzbicki et al., 2021).



Obrázok 5 – Schéma klasifikácie funkcií lncRNA. Rekrutovanie rozličných proteínových komponentov chromatinového remodelling komplexu pre zmenu chromatinových organizačných vzorov (A). Aktivita „špongie“ na základe bázeového párovania sa s komplementárnymi miRNA čo spôsobuje zníženie ich efektu (B). lncRNA dokážu plniť rolu lešenia, a to vďaka poskytnutiu dokovacích miest pre proteíny, ktoré fungujú spoločne v rovnakých dráhach (C). Aktivujú transkripciu špecifických génov pomocou navádzania transkripčných faktorov do promótorov (D). lncRNA sú schopné potlačenia transkripcia pomocou sekvestrácie transkripčných faktorov, čo spôsobí zamedzenie ich prístupu do promótorov (E). Dokážu modulovať fungovanie mRNA pomocou párovania s ich sekvenciami a inhibovať ich transláciu (F), meniť ich splicing vzory (G) a navádzať ich na degradáciu (H). Zdroj: (Salehi et al., 2017).

Tak ako lncRNA vykazujú rozličné spektrum aktivít v jadre, tak sú schopné pôsobiť aj v iných častiach bunky. Procesom v ktorom hrajú lncRNA svoju rolu je aj transport z jadra, anglicky - nuclear retention. Táto dráha je pochopiteľne výrazne viac preštudovaná v humánnom odvetví. Celkovo proces transportu lncRNA z jadra za účelom inej aktivity mimo tejto organely je indukovaný na rozličných úrovniach. Bolo potvrdené, že procesy transportu sú u mRNA a lncRNA zabezpečované rovnakými faktormi, ako napríklad TREX (transkripčný-export) a NFX (jadrový transportný faktor) (Guo et al., 2020).

Zapojenie lncRNA do modulácie procesu transkripcie blízko súvisí s lokalizáciou jednotlivých lncRNA. Dôležitá je ich prítomnosť v oblasti cytoplazmy a teda mimo jadra. Celý systém modulácie v podstate stojí na fakte, že lncRNA dokážu ovplyvňovať stabilitu niektorých mRNA. LncRNA dokážu inhibovať tvorbu miRNA-mRNA komplexu alebo sa dokážu viazať s RNA-binding proteínmi (RBPs) (Karakas & Ozpolat, 2021), (Rashid et al., 2016).

2.6 RNA exosom

Efektívny spôsob spravovania a degradácie RNA je kľúčovým pre kontrolu génovej expresie na posttranskripčnej úrovni. Hlavným systémom pre 3'-5' RNA degradáciu u eukaryotických buniek je exosom. Jedná sa o multi-podjednotkový komplex špecifický ako pre cytoplazmu, tak aj pre jadrové kompartmenty u rastlinných buniek. Základom komplexu je štruktúrne stále jadro zložené z deviatich podjednotiek ktoré dokáže asociovať s rozličnými enzymaticky aktívnymi podjednotkami či kofaktormi. Tie majú schopnosť určovať napríklad aj substrátovú špecifitu celého komplexu. Z molekulárneho hľadiska je možné hovoriť o zmesi proteínov a ribonukleových kyselín. Celú aktivitu RNA exosomového komplexu možno zhrnúť v skratke ako reguláciu a moduláciu širokej škály RNA variantov. Bližšie je komplex nevyhnutný pre processing rRNA ale aj snoRNA, či snRNA. Zapojený je tiež do procesu zmeny a kontroly kvality mRNA a zodpovedá aj za degradáciu vedľajších produktov vznikajúcich v procese maturácie mRNA.

V ľudských a kvasinkových bunkách všetky funkcie exosomu špecifické pre jadro vyžadujú prítomnosť helicasy MTR4 (EC 3.6.4.13.). U *Arabidopsis* sa jadrový exosom asociuje s dvomi RNA helikasami, ktoré sú navyše príbuzné. Jedná sa o AtMTR4

a HEN2. Za použitia ko-imunoprecipitácie bolo preukázané že obe RNA helikasy boli ko-purifikované spolu jadrovým exosomálnym komplexom. Aj keď AtMTR4 je skôr jadrovým proteínom čo sa lokalizácie týka, helikasa HEN2 je prítomná skôr v nukleoplazme, s tým že sa javí jej vylučovanie z prostredia jadierka. Pre AtMTR4 je všeobecnou funkciou degradácia prekursorov rRNA a vedľajších produktov zabezpečujúcich maturáciu rRNA. No primárnou funkciou helikas HEN1 a 2 je degradácia napríklad substrátov pre nukleárny exosom komplex, ktoré vykazujú polyadenyláciu, ako sú napríklad prekuzory snoRNA, miRNA, nedokonale splicované mRNA a nakoniec aj lncRNA, ktoré vykazujú nízku stabilitu. Mutantné jedince *Arabidopsis thaliana hen2-4* nevykazujú typickú aktivitu tejto helikasy, a preto nedochádza k degradácii polyadenylovaných RNA variantov, čo nám teda umožňuje štúdium našich sledovaných lncRNA, ktoré sú za normálnych podmienok vysoko nestabilné (Oyoshi & Kurokawa, 2012), (Lange et al., 2014), (Schmitz et al., 2016).

2.7 Epigenetická regulácia

Celá podstata epigenetickej regulácie spočíva v tom, že u mnohobunkových organizmov je genetická výbava buniek ich tvoriacich v podstate homogénna. No štruktúrna a funkčná tvár týchto buniek je odlišná a variabilná. Tento fakt môžeme pripisovať aj procesom regulácie génovej expresie, ktorých účinkov sa postupne ukazuje počas rastu organizmu, a teda počas diferenciácie a rastu jednotlivých variantov buniek. Takéto „alternácie“ sú nazývané epigenetickými. A to z toho dôvodu, že sú z krátkodobého hľadiska dedičné (v zmysle bunkového delenia), ale nejedná sa priamo o zmenu genetickej informácie na úrovni samotnej DNA. Jedná sa o typy modifikácii, ktoré boli už v predchádzajúcich častiach spomínané, ale nie priamo opisované ako varianty epigenetických mechanizmov. Pre príklad sa teda môže jednať o metyláciu DNA reťazca, histónovú modifikáciu, remodeláciu chromatínu (Teras, 2017).

2.7.1 Modifikácie histónov

Jednou zo študovaných epigenetických foriem regulácie je histónová modifikácia. Tá je definovaná ako posttranslačná modifikácia jednej z niektorých postranných reťazcov aminokyselín v samotnom históne. Epigenetická regulácia štruktúry chromatínu za pomoci modifikácie histónov umožňuje bunkám regulovať expresiu génov, a to priamym ovplyvnením prístupu transkripčných faktorov do cieľových úsekov. Bežne je chromatín

v bunkách usporiadaný do dvoch hlavných typov v závislosti napríklad od špecifického štádia bunkového cyklu, či od polohy chromatinu na samotnom chromozóme. Jedná sa o rozvoľnenú formu chromatinu nazývanú euchromatín, heterochromatín predstavuje nedostupnú štruktúru s vyšším stupňom kondenzácie, ktorú je možné charakterizovať ako transkripčne neaktívnu zónu. Bežne sa heterochromatín nachádza v oblastiach centromér – funkčné časti chromozómov, ale konzervuje aj repetitívne úseky všade inde v genóme. A prečo je pre nás heterochromatín taký závažný? Heterochromatínová štruktúra je epigeneticky a stabilne dedená v procesoch bunkového delenia, kedy je jeho štruktúra neovplyvnená prostredím a jeho faktormi.

Netreba teda zabúdať že bez samotnej organizácie DNA by spomínané štruktúrovanie ani nebolo možné, a preto treba uviesť na pravú mieru že aj toto dvojvlákno ribonukleových kyselín je organizované do jednotiek nazývaných nukleozómy a to vďaka prítomnosti a funkcii histónov. Históny sú špecifické a vysoko konzervované proteínové komplexy vykazujúce kladný náboj. Vďaka tomuto faktoru vykazujú schopnosť viazať záporne nabitú fosfátovú skupinu vo vlákne DNA. Na základe funkcie rozdelíme histónové proteíny na jadrové a linkerové histónové varianty (Engelhard et al., 2018). Nukleozóm je základnou štruktúrnou jednotkou chromatinu a skladá sa z deviatich histónových proteínov ovinutých vláknom DNA o dĺžke 150 nukleotidov. N – terminálne konce histónov preúsádzajú zo štruktúry nukleozómu a sú nazývané aj „histone tails“. Aminokyseliny nachádzajúce sa v týchto útvaroch sú často náchylné na rozličné typy posttranslačných modifikácií. Tie majú v konečnom dôsledku priamy vplyv na modifikácie a zmeny v procese transkripcie, v procesoch DNA opráv a replikácii, či aj pri kondenzácii chromatinu. Výsledok modifikácie priamo závisí od variantu zmeny, a taktiež je ovplyvnený polohou samotnej alternácie. Týmito zmenami sa postupne vytvára „histone code“. Tento termín opisuje schopnosť modulácie chromatinovej štruktúry za použitia prítomných histónov ovplyvňovať aj proces transkripcie priamo. A to tak, že špecifická štruktúra chromatinu ovplyvnená napríklad histónovou modifikáciou, môže regulovať prístup špecifických štruktúr (enzýmy, TF a iné) k požadovaným úsekom v sekvencii DNA čo v konečnom dôsledku vyúsťuje do regulácie transkripcie.

Histónové modifikácie môžu fungovať na rozličných princípoch. Jedná sa o kovalentné modifikácie vedľajších aminokyselinových reťazcov. Tie môžu priamo vyúsťiť do interakcií medzi jednotlivými nukleosomami navzájom. Dokážu však

indukovať aj interakciu medzi vláknom DNA a histónom samotným. Jednými z najbežnejších a najpočetnejších modifikácií sú acetylácie, fosforylácie a metylácie na rozličných aminokyselinových reziduách.

2.7.2 Acetylácia, fosforylácia a metylácia

Navýšenie acetylových skupín, a teda acetylácia priamo úmerne zvyšuje samotnú transkripčnú aktivitu. Táto skutočnosť platí aj obrátene a teda vo veľkom množstve prípadov je heterochromatínové štádium priamo spájané s hypoacetyláciou v tamojších histónoch. Treba si uvedomiť, že lysín vo fyziologickom pH nesie kladný náboj a teda priamo atrahuje záporne nabité vlákno DNA. Pomocou acetyl-transferasy pridaná acetylová skupina mení náboj lysínu, čím nedochádza k interakcii histónov, a tým nedochádza ani ku kondenzácii vlákna DNA (Grewal & Moazed, 2003).

Podobne ako acetylácia aj fosforylácia je mimoriadne dynamický proces. Je možné detekovať ju väčšinou na reziduálnych serínoch, threonínoch a tyrozínoch. Prebieha vďaka kinásovej aktivite, kedy je pri samotnej adícii fosfátovej skupiny prenášaný negatívny náboj na takto modifikovaný histónový proteín. To následne vyúsťuje do modulácie chromatinovej štruktúry.

Čo sa týka metylácie, tá je typická aj pre lysínové či arginínové reziduá. a to aj vo viacnásobnej forme (Bannister & Kouzarides, 2011). Čo sa týka jej priameho účinku, uvádza sa že taktiež prispieva k stabilite kondenzovaných úsekov chromatinu ale nemodifikuje priamo náboj na reziduách (Marques & Outeiro, 2013). Jej podstata je výrazne komplexnejšia ako predchádzajúce varianty modifikácií v slova zmysle jej dvojitého účinku, a preto sa jej bližšou špecifikáciou nebudeme zaoberať. V skratke je však potrebné definovať, že metylácia na argínínu podporuje transkripčnú aktivitu. U lysínu je to ale variabilné aký vplyv má, a ten je modulovaný najmä miestom modifikácie Histones Factory, <https://www.ks-vpeptide.com/histones> (12. 1. 2024).

Acetylácie, fosforylácie a metylácie ani zďaleka nie sú jedinými formami modifikácií histónov. Sú však najpočetnejšími, najvýznamnejšími, a taktiež najštudovanejšími spomedzi modifikácií histónových proteínov a ich reziduí.

2.7.3 Metylácia v epigenetickej regulácii

Metylácia na 5' konci u cytozínových reziduí je kovalentná forma modifikácie DNA. Týmto procesom vzniká 5-methyl-cytosine a u rozličných druhov organizmov je možné pozorovať rozdielne hodnoty metylácie v ich genetickom kóde. Samotná metylácia prebieha vďaka enzymatickej aktivite DNA methyltransferas. No bežne dochádza k fluktuácii množstva metylovaných skupín, a tým pádom môže dochádzať aj k samotnej demetylácii. Celý tento kolobeh má teda za úlohu regulovať génovú expresiu v závislosti od hodnôt a polohy metylovaných reziduí. Čím môže dochádzať aj napríklad k regulácii odpovedí na podnety prostredia či iné faktory, ako to bolo uvedené na začiatku tejto kapitoly.

Vzhľadom na methyltransferasy špecifické pre rastlinné druhy, u *Arabidopsis thaliana* je možné hovoriť napríklad o methyltransferase 1 (MET1) (EC 2.1.1.). Jej úlohou je udržiavanie konštantných hodnôt metylácie CG v procese replikácie vlákna DNA. Zatiaľ čo chromomethylasa 2 a 3 (CMT2 a CMT3) (EC 2.1.1.37.) bežne metyluje CHG a CHH (v zmysle sekvencie). Pozornosť je ale potrebné sa upriamiť najmä na DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE 2 (DRM2) (EC 2.1.1.37.). Je plne zodpovedná za „de-novo“ metylácie. Najpodstatnejším faktorom je ale to, že DRM2 je navádzaná do špecifických miest vyžadujúcich metyláciu za pomoci malých molekúl RNA v dráhe ktorá je špecifická pre rastlinné organizmy a je nazývaná RNA-directed DNA methylation (RdDM). RdDM udržiava potrebné hodnoty metylácie v regiónoch heterochromatínu a v transpozónoch. Metylácia im dokonca bráni v mobilnom presune do inej časti DNA.

Celkovo môžeme proces metylácie v rastlinných bunkách charakterizovať ako vysoko vplyvný mechanizmus na štruktúru a aktivitu rastlinného genómu. Množstvá rozličných molekulárnych procesov je ovplyvnených samotnou DNA metyláciou, čo len podtrháva význam tohto epigenetického mechanizmu regulácie v rastlinných bunkách (Lucibelli et al., 2022).

A tu dochádza k uzavretiu celého kruhu. Kedy lncRNA sú v niektorých prípadoch aktívne v procese génovej regulácie na epigenetickej úrovni. Tak si teda poďme načrtnúť ako sa na celý tento mechanizmus díva veda vzhľadom na objavy ktoré boli doposiaľ dosiahnuté. Bolo potvrdené zapojenie variantov lncRNA v procesoch samotného vývoja, ale aj pri udržiavaní homeostázy fytohormónov v rastlinnom metabolizme. No ich aktivita

nie je výnimkou ani v procesoch odpovede na biotické a abiotické stresy. Ako už bolo vopred uvedené, lncRNA môžu byť produkované rôznymi typmi enzýmov, čo môže vplývať na ich funkciu. LncRNA produkované polymerasou IV majú obsirnejší účinok, kedy dokážu napríklad rekrutovať takzvaný silencing komplex do samotných promótorových regiónov proteín-kódujúcich génov (Lucero et al., 2020).

Samotný auxín zabezpečuje zväčša upreguláciu transkripcie dlhých PIN proteínov a dokonca aj iné fytohormóny a rastové regulátory dokážu ovplyvňovať aktivitu promótorov PIN proteínov na rozdielnych úrovniach. V prípade PIN1 a jeho zvýšenej expresie vďaka vplyvu IAA je potrebné spomenúť transkripčné faktory (často typu ARF), ktorým v tomto procese pripadá dôležitá úloha. Modulácia aktivity promótorov PIN je ale aj vysoko špecifická v zmysle preferencie na úrovni orgánov až buniek a celý proces je výrazne závislý od druhu využívaného rastového regulátoru (Mateo-Bonmatí et al., 2019).

3 EXPERIMENTÁLNÁ ČASŤ

3.1 Materiály

3.1.1 Biologický materiál

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

semená *Arabidopsis thaliana*, mutant *hen2-4*

semená *Arabidopsis thaliana*, *pPIN1-lncRNA::NLS-GFP-GUS*

semená *Arabidopsis thaliana*, *pPIN1-ΔlncRNA::NLS-GFP-GUS*

semená *Arabidopsis thaliana*, *pPIN1::NLS-GUS*

semená *Arabidopsis thaliana*, *pPIN1-CRISPR-ΔlncRNA*

semená *Arabidopsis thaliana*, SALK_047002

semená *Arabidopsis thaliana*, SALK_048701

semená *Arabidopsis thaliana*, SALK_69733

semená *Arabidopsis thaliana*, SALK_72248

3.1.2 Chemikálie

Agarosa - Sigma Aldrich (USA)

C₆FeK₄N₆ (ferokyanid draselný) - Sigma-Aldrich (USA)

CaCl₂·2H₂O – Sigma-Aldrich (USA)

Chloralhydrát (2,2,2-trichlóretán-1,1-diol) - Lachner (Česká republika)

Chlorid draselný (KCl) - Lachner (Česká republika)

Chlorid horečnatý (MgCl₂) – Promega (USA)

Chlorid lítny (LiCl) - Sigma-Aldrich (USA)

Deoxyribonukleozidtrifosfáty (dNTPs) – Sigma-Aldrich (USA)

Dimetylsulfoxid (DMSO) – New England Biolabs (UK)

D-manitol – Lachner (Česká republika)

Etanol – Lachner (Česká republika)

Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) - Sigma Aldrich (USA)

GelRed - Duchefa Biochemie (Holandsko)

H₂NaO₄P (hydrogénfosforečnan sodný) - Lachner (Česká republika)

K₆ [Fe(CN)₆] (hexokyanoželezitan draselný) - Sigma Aldrich (USA)

Merkaptoetanol - Lachner (Česká republika)

Murashige & Skoog including vitamins – Duchefa Biochemie (Holandsko)

NaH₂PO₄ (dihydrogénfosforečnan sodný) - Lachner (Česká republika)

Nuclease-free voda – Invitrogen by Thermo Fisher Scientific (USA)

Oligo(dT) primer – Sigma-Aldrich (USA)

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

X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide) - – Duchefa Biochemie (Holandsko)

3.1.3 Štandardy molekulovej hmotnosti

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

3.1.4 Antibiotiká

Kanamycín – Duchefa Biochemie (Holandsko)

Hygromicín - Duchefa Biochemie (Holandsko)

3.1.5 Enzýmy a enzýmové purfy

5x Go Taq Flexi Buffer (Promega, USA)

50x TAE (Tris/Acetát/EDTA)

GoTaq G2 Flexi DNA polymerase (5 U/μl) – Promega (USA)

Proteinase K solution (2 μg/μl) – Thermo Fisher Scientific (USA)

RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (200 U/μl) – Thermo Fisher Scientific (USA)

3.1.5.1 Rastlinné hormóny

NAA (1-naftyloctová kyselina) – Sigma Aldrich (USA)

3.1.6 Roztoky pre elektroforézu

50x TAE pufer:

50 mol·l⁻¹ EDTA, 2 mol·l⁻¹ Tris, 1 mol·l⁻¹ kyselina octová

1 % (w/v) agarózový gél:

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

3.1.7 Roztoky pre výsev semien

Murashige & Skoog (MS) médium:

4,3 g MS+vitamíny, 10 g sacharóza, 0,5 g MES, pH 5,7 (KOH), 8 g Plant Agar, MilliQ H₂O do 1000 ml, sterilizované autoklávaním

3.1.8 Roztoky na auxínový treatment

½ Murashige & Skoog (½ MS⁻) médium:

4,3 g MS + vitamíny, MES, pH 5,7 (KOH), MilliQ H₂O (1000 ml)

3.1.9 Roztoky na izoláciu DNA

Etanol (70%):

70 ml Etanol (100%) + 30 ml MilliQ H₂O

Izopropanol (35%):

35 ml Izopropanol (100%) + 65 ml MilliQ H₂O

TPS pufor:

100 mmol/l Tris-Cl (pH = 8), 10 mmol/l EDTA (pH = 8), 1 mol/l KCl

3.1.10 Komerčné kity

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

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

3.1.11 Primery

Lyofilizované primery – Sigma Aldrich (USA) boli podľa návodu rozpustené v uvedenom množstve nuclease-free vody pre získanie zásobnej koncentrácie 100 μmol·l⁻¹

¹. Ďalej boli v čistej 1,5 ml mikroskúmavke 20 x zriedené na pracovnú koncentráciu 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Všetky uvedené primery (Tabuľka 1) boli navrhnuté vedúcim práce na základe cDNA sekvencií jednotlivých génov lncRNA-PIN1-1 a lncRNA-PIN1-2 *A. thaliana*.

Tabuľka 1 - použité primery

Primer č.	sekvencia	Špecificita pre líniu	Špecificita primeru
8	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC	T-DNA inzert	LBb1.3
9	ACAAAACGACGCAGGCTAAG	PIN1	LB
10	AGCTGGCATTTC AATGTTC	PIN1	RB
31	GGCTGAGTCGGATGATATGTGAA	AT1G09393.1 (1)	LB
32	AAACACGCTTCGCTAAAGCA	AT1G09393.1 (1)	RB
33	CCCTCCTGTTTCTCGCTCTG	AT1G09393.1 (2)	LB
34	TCACATATCATCCGACTCAGCC	AT1G09393.1 (2)	RB
37	ACATATCATCCGACTCAGCCT	AT1G09393.1 (3)	LB
38	CTCCTGTTTCTCGCTCTGTTC	AT1G09393.1 (3)	RB
84	TATCGGATGACGATTCTTCGTGCAG	PP2A	LB
85	GCTTGGTCGACTATCGGAATGAGAG	PP2A	RB
100	AAACCATTGGGTTTGTGTCTG	SALK_69733	LB
101	ACCCGAAAATAATGCATGTTG	SALK_69733	RB
104	TGCAATAAGACCAAATCGAGC	SALK_72248	LB
105	TTCGTCTGCTTCATCAAACC	SALK_72248	RB
112	CTGACGCTGAGAATGGAGAAG	SALK_048701	LB
113	AGATATCGCTAACCCACCGAG	SALK_048701	RB
114	TAATGTTAATGGCGATGCCTC	SALK_047002	LB
115	AAGAATTCAACTGGGGAAAGC	SALK_047002	RB

3.1.12 Software

Imagelab - Bio-Rad (USA)

Fiji – ImageJ2 (USA)

3.1.13 Zariadenia

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

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; 10 μl ; 2,5 μl – Eppendorf (Nemecko)

Step One Plus Real Time PCR - Thermo Fisher Scientific (USA)

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 pre elektroforézu – Biometra (Nemecko)

3.2 Metódy

3.2.1 Sterilizácia a vysievanie semien transformovaných rastlín *Arabidopsis thaliana*

Roztoky využité na samotný proces sterilizácie boli 70 % a 100 % etanol. Počas sterilizácie bolo potrebné pracovať v priestore flowboxu pre zabezpečenie čo najvyššej eliminácie kontaminácií. Primárne bol využívaný 70 % roztok etanolu, ktorý bol o objeme 500 µl pipetovaný do Eppendorf tuby (2 ml) s obsahom semien. Roztok bol ponechaný na sterilizáciu po dobu 5 minút a následne bol z Eppendorf tuby vyliaty. Ako ďalší bol využitý 100 % roztok etanolu. Ten bol taktiež ponechaný pre sterilizáciu po dobu 5 minút. Etanol aj s obsahom sterilizovaných semien bol vyliaty na predom pripravený filtračný papier. Takto sterilizované semená boli pozbierané a uskladnené pre ďalšiu manipuláciu.

Semená boli po predom uvedenom procese sterilizácie vysievané na príslušné médium. Počas našej práce sme využívali ½ AM⁻ médium (zložky a ich príslušné objemy - Tabuľka 2). Pred samotným rozlivaním do misiek bolo namiešané médium o objeme 500 ml so špecifickou hodnotou pH = 5,7 (úprava za použitia NaOH). Pri procese selekcie bolo ale potrebné využívať aj špecifické selekčné antibiotikum, to však muselo byť pridávané až po samotnom procese autoklavovania. Takto pripravené a sterilné médium bolo rozlievané do sterilných Petriho misiek. Po zatuhnutí média prebiehal proces vysievania semien.

Tabuľka 2 - zloženie 1/2 MS⁻ média

Zložka	Objem (g)
MS soli (0,22%)	1,1
Agar (0,8%)	4

3.2.2 GUS staining

Úplne prvotným krokom procesu bola príprava transgéennej línie. Jednalo sa o fúzny konštrukt promotrovej sekvencie (o veľkosti zhruba 4000 bp) s génom pre GUS (β -glukuronidasu), GFP (zelený fluorescenčný proteín a NLS (jadrový lokalizačný signál)). Príprava línie (*pPIN1-lncRNA::NLS-GFP-GUS*) prebiehala počas našej bakalárskej práce. Počas našej diplomovej práce dochádzalo k vyselektovaniu finálnych homozygotných línií. Posledná používaná línia *pPIN1::NLS-GUS* bola poskytnutá školiteľom práce.

Metóda bola všeobecne využívaná pre mikroskopické sledovanie v celých semenačkoch. Proces farbenia bol ale invazívny, vďaka čomu dochádzalo k usmrteniu, odfarbovaniu a fixovaniu vzoriek. Samotné ofarbovanie bolo zabezpečené roztokom X-Gluc v DMSO (objemy - Tabuľka 3). Ďalšími zložkami bol roztok hexokynoželezitanu draselného - $K_6 [Fe(CN)_6]$ a roztok feroxyanidu draselného - $C_6FeK_4N_6$. Roztok hexokynoželezitanu draselného vznikal rozpustením 0,823 g v 40 ml H_2O . Následne bolo nevyhnutné roztok doplniť na požadovaný objem 50 ml, čím vznikal potrebný zásobný roztok, ktorý bol pred pridaním do reakčnej zmesi nariadený 1000x. Príprava zásobného roztoku feroxyanidu draselného vyžadovala rozpustenie 1,056 g v 40 ml H_2O a následné doplnenie objemu do 50 ml. Pred použitím bolo potrebné 1000x nariadenie. Roztok 0,5 M EDTA obsahoval 18,61 gramov soli v 80 ml H_2O . Ďalej bolo potrebné upraviť jeho hodnotu pH pomocou NaOH na požadované pH 8,0. Objem bol následne doplnený na finálnu hodnotu 100 ml. Vytvorenie fosfátového pufru vyžadovalo prípravu 2 roztokov, ktorými boli 0,2 M dihydrogénfosforečnan sodný - NaH_2PO_4 a 0,2 M hydrogénfosforečnan sodný - H_2NaO_4P . Príprava 0,2 M dihydrogénfosforečnanu sodného vyžadovala rozpustenie 24g v 900 ml H_2O a následné doplnenie objemu na požadovanú hodnotu 1000 ml. Pre_vytvorenie 0,2 M roztoku hydrogénfosforečnanu sodného bolo 28,4 g rozpustených v 900 ml vody a objem bol doplnený na 1000 ml. Samotný fosfátový pufr vznikal zmiešaním 32 ml dihydrogénfosforečnanu sodného a 68 ml hydrogénfosforečnanu sodného z predom vytvorených zásobných roztokov. Nakoniec bolo potrebné pripraviť aj 10% Triton X-100, nariadením 10 ml objemu Triton-X pomocou 90 ml H_2O .

Semenáčky staré 5 dní boli umiestnené do predom pripraveného média (zloženie - Tabuľka 4), tak aby boli jeho objemom dostatočne prevrstvené. V prípade potreby

farbenia kotyledónov museli byť vzorky umiestnené do vákua po dobu 5 minút, pre lepšiu penetráciu X-Gluc roztoku. Nasledovne boli vzorky zabalené do hliníkovej fólie (pre zabezpečenie tmavého prostredia) a ponechané na inkubáciu pri teplote 37 °C po požadovanú dobu. Tá je priamo úmerná potrebnej hodnote zafarbenia. V našom prípade, keďže sa jednalo o konštrukty pre lncRNA, ktorej abundancia nie je vysoká, boli bežne semenáčky farbené 24 hodín. Finálnym krokom celého farbenia bolo odfarbovanie chlorofylu za pomoci vymývania v 70% etanole. Ten mal zabezpečiť aj dodatočnú fixáciu rastlinného pletiva. Z ofarbených jedincov boli v ďalšom kroku vytvorené mikroskopické preparáty za použitia chloralhydrátu ako média pre možné uchovanie vzoriek po dlhší čas. Následne dochádzalo k mikroskopickému sledovaniu za použitia stereo mikroskopu Olympus.

Tabuľka 3 - objemy substrátu pre GUS staining

xGluc (g)	DMSO (μl)	Objem reakčnej zmesi (ml)
0,01	100	10

Tabuľka 4 - objemy zložiek média pre GUS staining

Koncentrácia K ₃ [Fe(CN) ₆] (nM)	Objem roztoku K ₃ [Fe(CN) ₆] (ml)	Koncentrácia C ₆ FeK ₄ N ₆ (nM)	Objem roztoku C ₆ FeK ₄ N ₆ (ml)
1	2	8	10

3.2.3 Izolácia rastlinnej DNA

Selektované rastlinné semenáčky boli primárne vysadené do pôdy pre nasledovné narastenie. Tieto jedince mohli byť využité na samotnú izoláciu genetického materiálu. Izolovaný rastlinný materiál, ktorým bolo požadované množstvo listov, bol vkladán do predom pripravených Eppendorf túb (1,5 ml) s obsahom extrakčného TPS pufru o objeme 200 μl. Takto pripravený materiál bol homogenizovaný v ručne, alebo v homogenizátore po dobu jednej minúty pri frekvencii 27,0 x a následne bol ponechaný na inkubáciu pri teplote 55 °C po dobu 10 minút. Ďalej boli vzorky centrifugované 20 minút pri teplote 22 °C pri 17 000 g. Získaný supernatant o objeme 150 μl bol pipetovaný do nových Eppendorf túb (1,5 ml) s obsahom izopropanolu o objeme 150 μl. Zmes bola dôsledne premiešaná a ponechaná 15 minút pri teplote 22 °C na odstátie. Ďalej dochádzalo k centrifugácii po dobu 15 minút pri teplote 22 °C a 17 000 g. Supernatant bol odliaty a do Eppendorf túb bol pridaný 70% etanol o objeme taktiež 150 μl. Obsah bol následne

zvortexovaný tak, aby sa pelet úplne rozptýlil. Aj v tomto kroku muselo dochádzať k centrifugácii, a to po dobu 20 minút (17 000 g). Supernatant bol odliaty a pelet bol ponechaný na vysušenie. Počas noci pri teplote 37 °C alebo po dobu 2 hodín pri teplote 55 °C. Finálne bol pelet rozpustený pipetovaním H₂O (25 až 50 µl podľa potreby). Tento roztok bol uskladnený v chlade pre nasledovné použitie.

3.2.4 PCR reakcia a genotypovanie

Proces genotypovania bol v práci využitý pre overenie variantov rastlinných selektantov. Tieto selektanty boli získané z výskumného ústavu SALK Institute. Jedná sa o mutanty s inzertom T-DNA vo vybraných génoch. Dôležité pre našu prácu je uviesť, že sa jedná o inzerty v génoch pre lncRNA. Pre proces bola využitá DNA izolovaná z požadovaného rastlinného materiálu podľa predom uvedeného postupu, pre ktorú boli pripravené špecifické primery (Tabuľka 1). Počas práce boli využívané dva varianty komerčných reakčných zmesí Dream Taq a Go Taq. Reakčné zmesi pozostávali zo špecifických zložiek (Tabuľka 5 a Tabuľka 6). Po napipetovaní požadovaných 15 µl reakčnej zmesi do PCR stripov (Go Taq), bola pridávaná predom izolovaná DNA o objeme 2 µl. Pre zmes Dream Taq bol do stripov pipetovaný objem 9 µl, ku ktorému bola následne pridávaná predom izolovaná DNA o objeme 1 µl. Vzorky boli následne umiestnené do cykléra na požadovaný program (bližšie informácie - Tabuľka 7, Tabuľka 8). Po prebehnutí procesu amplifikácie museli byť vzorky uskladnené pri teplote 8 °C pre nasledovnú prácu.

Tabuľka 5 – GoTag zmes na PCR pre genotypovanie

Zložka zmesi	Objem (µl)
5x GoTag	10
GoTag enzým	0,25
MgCl ₂	5
10 nM dNTPs	1
10 µl primer LB	1
10 µl primer RB	1
H ₂ O	31,75
Celkový objem	50 (dostačujúci pre 3 vzorky)

Tabuľka 6 – DreamTaq zmes na PCR pre genotypovanie

Zložka zmesi	Objem (μl)
2x DreamTaq	1
DreamTaq enzým	0,05
10 mM dNTPs	1
10 μl primer LB	0,5
10 μl primer RB	0,5
H ₂ O	5,95
Celkový objem	9

Tabuľka 7 – nastavenie programu cykléra pre zmes GoTag v procese genotypovania

Krok cyklu (č.)	Teplota (°C)	Čas (min)	Počet opakovaní
1	110	-	1
2	95	5	1
3	-	-	35
3a	95	0,5	35
3b	55	0,5	35
3c	72	1	35
4	72	7	1
5	8	neobmedzene	1

Tabuľka 8 – nastavenie programu cykléra pre zmes DreamTaq v procese genotypovania

Krok cyklu (č.)	Teplota (°C)	Čas (min)	Počet opakovaní
1	110	-	1
2	95	5	1
3	-	-	35
3a	95	0,5	35
3b	55	0,5	35
3c	72	1,5	35
4	72	7	1
5	8	neobmedzene	1

3.2.5 Elektroforéza na agarózovom géli (1 %)

Roztok gélu bol pripravený za použitia 1% agarózy v 1x TAE pufri (objemy a miešanie sú uvedené v kapitole 3.1.6). Pre vizualizáciu bolo využité farbivo GelRed. Podľa požadovaného objemu gélu, bol pipetovaný požadovaný objem farbiva, ktoré muselo byť v roztoku rozmiešané. Na 100 ml gélu bol využívaný objem 8 μl samotného farbiva. Takto pripravený gél bol naliaty do misky s hrebeňom a bol ponechaný na zatuhnutie po dobu 20 minút. Pevný gél bol prenesený do elektroforátora. Následne boli požadované vzorky pipetované o objeme 10 μl do jednotlivých jamiek. Pre orientáciu vo veľkosti fragmentov bol použitý 1kb Plus Gene Ruler. Samotná elektroforéza prebiehala pri napätí 100 V a 0,69 mA, počas doby 30 minút. Výsledný gél bol detekovaný za pomoci RTG

žiarenia pre detekciu polohy vytvorených bendov. Získané obrázky boli spracované za využitia programu Imagelab.

3.2.6 PCR reakcia a sekvenovanie

V tomto postupe bolo potrebné využiť špecifickú zmes na amplifikáciu. Počas našej práce bola využívaná zmes pre enzým GoTaq (Tabuľka 5). Druhou variantou bola zmes pre enzým Dream Tag (Tabuľka 6). Potrebné je aj spomenúť, že počas práce sa využíval pufor z komerčnej zmesi, ktorý neobsahoval migračný pufor s farbiacou zložkou. Zmesi pripravené podľa tabulky x a y boli následne pipetované do stripov o objeme 52 μ l pre zmes GoTaq. Reakcie prebiehali podľa požadovaných podmienok (Tabuľka 7, Tabuľka 8). Finálne boli získané PCR produkty uskladnené a následne odoslané na sekvenovanie pomocou LB1.3 primerov pre potvrdenie pozície T-DNA kazety v PIN1 promótoře.

3.2.7 Izolácia RNA z rastlinného materiálu za použitia komerčného kitu od spoločnosti Omega BIO-TEK

Pred samotnou prácou bolo potrebné očistiť pracovné prostredie od prípadných enzýmov štiepiacich RNA a počas práce bolo nevyhnutné manipulovať s pomôckami ktoré boli rovnako ošetrované. Komerčný E.N.Z.A. plant RNA kit bol využívaný v nasledujúcich izoláciách RNA z dôvodu nahradenia predošlej zmesi opísanej vyššie. Prvotným krokom bola príprava vzoriek, kedy boli 5 dní staré semenáčky (predom sterilizované a vysadené na polovičnom AM⁻ médiu) zozbierané do Eppendorf túb. Tie boli po naplnení vložené do tekutého dusíka pre zamrazenie a uchovanie potrebného genetického materiálu. Následne boli vzorky prenesené do trecej misky tiež s obsahom tekutého dusíka aby boli rozdrvené. Takto pripravené vzorky boli premiestnené do predom vychladených Eppendorf túb za pomoci vychladeného náradia a naplnené tuby boli opäť umiestnené do chladu. Takto pripravené vzorky boli ďalej spracovávané za použitia predom uvedeného kitu. Počas nasledujúcich krokov bolo potrebné pracovať v digestore z dôvodu využívania toxických zložiek v procese izolácie. Ku každej vzorke bol pridávaný RB pufor (500 μ l) zmiešaný s merkptoetanolom (20 μ l merkptoetanolu na 1 ml RB pufu). Vzorky boli následne zvortexované a prenesené do filtračnej kolonky spojenej so zbernou kolonkou. Ďalej dochádzalo k centrifugácii (14 000 g, 5 min, 22 °C). Takto získaný lyzát bol prenesený do novej Eppendorf tuby (1,5 ml) a k objemu bol pridávaný rovnaký objem

etanolu (70 %). Do nových koloniek s obsahom RNA väzobnej membrány zostavených so zbernými kolonkami boli pipetované zmesi vzoriek s etanolom o objeme 700 µl a zostava bola scentrifugovaná (12 000 g, 1 min, 22 °C). Vznikajúci filtrát bol odliaty a do koloniek boli pipetované zvyšné objemy vzoriek. Dochádzalo k centrifugácii za rovnakých podmienok ako v predošlom kroku. Filtrát bol opäť vyliaty. Ďalej bolo potrebné membránu s vyviazanou RNA prečistiť za pomoci 500 µl RNA Wash Buffer I a následnou centrifugáciou (10 000 g, 30 s, 22 °C). Filtrát bol odstránený a na prečistenie bol využitý RNA Wash Buffer II. (700 µl), a zmes bola cncentrifugovaná za podmienok uvedených v predošlom kroku. Ďalej boli vzorky premyté opakovane predom uvedeným pufrom o objeme 500 µl za rovnakých podmienok. Po odstránení filtrátu boli kolonky presušené opakovaným stočením po dobu 2 minút (maximálne g, 22 °C). Kolonky s membránou boli prenesené do nových Eppendorf túb (1, 5 ml). Následne bola na membránu pipetovaná Nuclease-free voda (20 – 100 µl) a vzorky boli znova stočené pri maximálnej rýchlosti po dobu 1 minúty pre elúciu izolovanej RNA. Tieto vzorky boli urýchlene umiestnené na ľad pre ochranenie RNA pred degradáciou teplom. Finálnym krokom prípravy bolo odstránenie DNA za pomoci TURBO DNA-free kitu, ktorého postup je opísaný v nasledujúcom kroku.

3.2.8 Odstraňovanie zvyškovej genomickej DNA z izolovanej z RNA

V tomto prípade sa jednalo o optimalizovaný protokol. Primárne bol k vzorkám pridávaný premix s obsahom pufru Turbo DNase buffer (15 µl) s pridaním 1 µl DNasy I. Vzorky boli následne umiestnené na inkubáciu po dobu 30 minút pri teplote 37. Následne bola k vzorkám opäť pridávaná DNasa I taktiež o objeme 1 µl a dochádzalo k inkubácii za rovnakých podmienok. Po inkubácii bol pridávaný chlorid lithný o objeme ktorý zodpovedal polovičnej hodnote objemu vzorky. Takto spracovaný materiál bol následne umiestnený do chladu (- 20°C) na vymrazenie počas noci. Následne bolo potrebné po rozmrazení vzorky centrifugovať 1 hodinu pri teplote 1°C s minimálnym g = 25 000. Po stočení bol odpipetovaný supernatant a ku vzorkám bol pridávaný na ľade vychladený etanol (70 %), ktorý obsahoval vodu zbavenú nukleasových enzýmov. V nasledujúcom kroku taktiež dochádzalo k centrifugácii za rovnakých podmienok po dobu 5 až 10 minút. Vznikajúci supernatnat bol odpipetovaný a vzorky boli ponechané na vysušenie v priestore flowboxu po minimálnu dobu 10 minút. Vysušené vzorky boli nariedené vodou bez nukleas o objeme 20 µl. Finálne dochádzalo k meraniu koncentrácie izolovanej

RNA. Posledným krokom bola aj kontrola fragmentácie izolovaného materiálu za použitia gélovej elektroforézy.

3.2.9 Reverzná transkripcia

Táto metóda bola využitá pre syntézu jednovláknovej cDNA z RNA z rastlinného materiálu v procese izolácie. Postup bol nevyhnutný pre nasledovnú qPCR. Prvotne bolo potrebné nariediť dostupnú RNA tak, aby 12 μ l roztoku obsahovalo 2 ng RNA. Takto nariadené vzorky boli pipetované do PCR stripu o objeme 12 μ l s pridaním 1 μ l špecifického Oligo DT primeru. Zmes bola následne vložená do cykléra na špecifický program (viac informácií - Tabuľka 9). Po prvom kroku programu bol cyklér zastavený a vzorky boli umiestnené na ľad. Predom pripravená reakčná zmes (bližšie informácie - Tabuľka 10) bola pipetovaná jednotlivo ku vzorkám o požadovanom objeme 7 μ l. Vzorky boli opakovane umiestnené do cykléra pre dokončenie programu. Získaná jednovláknová cDNA bola následne 5x nariadená a uskladnená (- 22 °C) pre nasledovnú prácu.

Tabuľka 9 - nastavenie programu cykléra v procese syntézy cDNA

Krok cyklu (č.)	Teplota (°C)	Čas (min)	Počet opakovaní
1	65	5	1
2	42	-	1
3	42	60	1
4	70	10	1
5	8	neobmedzene	1

Tabuľka 10 - zmes pre syntézu cDNA

Zložka zmesi	Objem (μ l)
Pufor	4
dNTPs	2
Enzým	1
Celkový objem	7

3.2.10 Kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia

Reakčná zmes pozostávala z mixu špecifických primerov o požadovanej koncentrácii (pipetované objemy - Tabuľka 11). Ďalšími zložkami reakčnej zmesi boli pufor, H₂O, farba a požadovaná, nami predom pripravená cDNA (pipetované objemy - Tabuľka 12) z komerčného kitu. Zmes bola o objeme 10 µl pipetovaná do jamkovej doštičky. Následne bola doštička zalepená krycou fóliou a umiestnená do qPCR cykléra. Dôležité bolo správne nastavenie programu, lokalizácia vzoriek a presné pomenovanie jednotlivých jamiek pre správne vyhodnotenie. Získané výsledky boli ďalej spracovávané v programe Excel.

Tabuľka 11 - objemy pre riedenie zmesi primerov pre nasledovnú qPCR

Zložka	Objem (µl)
H ₂ O	478
Primer LB	11
Primer RB	11
Celkový objem	500

Tabuľka 12 - zmes pre qPCR

Zložka	Objem (µl)
Pufor	5
Farba	1
Primer mix	1,25
cDNA	2
H ₂ O	0,75
Celkový objem	10

3.2.11 Auxínový treatment

Metóda bola využívaná pre *hen2-4* mutantné jedince *Arabidopsis thaliana*. Prvotná príprava materiálu zahrňovala vysievanie sterilizovaných semien na ½ MS⁻ médium. Následne boli semenáčky staré 6 dní pozbierané so samostatných misiek s obsahom tekutého ½ MS⁻ média s dostatočným množstvom pre prevrstvenie materiálu. Následne bol do média k vzorkám pridávaný NAA o finálnej koncentrácii 1 µM. Vzorky boli ponechané na inkubáciu po dobu ½, 1, 2 a 4 hodiny. Každá vzorka určená na inkubáciu počas požadovanej doby bola po uplynutí času pôsobenia zbieraná do Eppendorf túb a rozdeľovaná na 3 replikáty. Následne musela byť každá vzorka po zozbieraní čo najskôr zmrazená v dusíku pre ochranenie obsahu RNA pred degradáciu. Vzorka bola finálne

uskladnená pri teplote -80°C pre nasledovnú prácu. Ďalej dochádzalo k izolácii RNA podľa syntézy cDNA a predom uvedeného postupu. Génová expresia bola potom meraná pomocou qPCR. Získané výsledky boli vyhodnotené za použitia programu Microsoft Excel. Pre vyhodnotenie bol využívaný postup pre výpočet relatívnej hodnoty génovej expresie. Jednalo sa o vzorec pre výpočet hodnoty $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ a získané hodnoty expresie boli vždy normalizované voči kontrolným hodnotám.

4 VÝSLEDKY

Cieľom našej práce bolo získať bližšie informácie o nami sledovanej lncRNA-PIN1-1 a lncRNA-PIN1-2, a teda bolo nevyhnutné získať patričných knock-out alebo knock-down mutantov a podrobiť ich fenotypovej analýze. Konkrétne sme pracovali s variantami s obsahom T-DNA inzertu v lokuse lncRNA-PIN1-1 a lncRNA-PIN1-2 (SALK_69733, SALK_047002, SALK_072248 a SALK_048701). Transgénné rastliny obsahovali promótorovú fúziu lncRNA-PIN1-1, lncRNA-PIN1-2 s reportérom NLS-GFP-GUS, kde NLS predstavuje retenčný motív pre jadrovú lokalizáciu (*plncRNA-PIN1-1::NLS-GFP-GUS* a *plncRNA-PIN1-2::NLS-GFP-GUS*). V časti práce kde bol sledovaný efekt lncRNA na aktivitu PIN1 génu sme tiež pracovali s variantom, ktorý obsahoval deléciu v promótorovej sekvencii PIN1 – konkrétne v sekvencii sledovaných lncRNA-PIN1-1 a lncRNA-PIN1-2 (*pPIN1-1ΔlncRNA::NLS-GFP-GUS*).

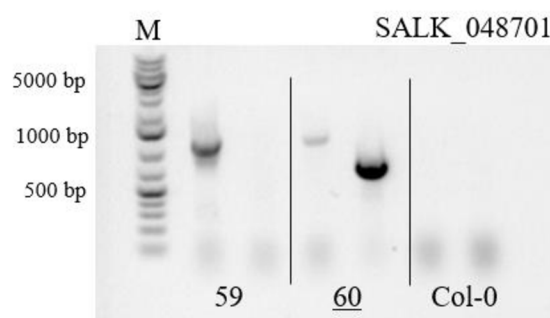
Jedince s inzertovanou T-DNA kazetou boli získané z ústavu SALK Institute. Našou úlohou bolo vytvorenie homozygótnych, jednonásobne - T-DNA inzertných, mutantných jedincov s lokalizáciou kazety v géne pre lncRNA-PIN1-1. Proces získavania pozostával z primárnej selekcie na médiu s obsahom selekčného antibiotika. Následne bol získaný rastlinný materiál podrobený procesu gnotypizácie pre vyselektovanie homozygótnych mutantných jedincov. Spomedzi týchto jednotlivcov boli niektoré vybrané pre sekvenáciu na overenie polohy kazety v genóme. Jedince s požadovaným umiestnením inzertu boli následne krížené s jedincami ekotypu *Col-0* pre vyštiepenie prípadných viacnásobných inzertov v genóme. Získané jedince boli následne opäť genotypované a spomedzi nich boli taktiež vyselektované homozygótné genotypy. Finálne prebiehala posledná kontrolná genotypizácia pre overenie pravdivosti predchádzajúcich výsledkov.

Varianty s obsahom nukleárneho lokalizačného signálu pre gén GUS a GFP boli využívané v mikroskopickej analýze ako kontrola pre získané výsledky počas qPCR. Na tú boli využívané v tomto prípade jedince s obsahom delécie génu lncRNA-PIN1-1. Kedy bola sledovaná intenzita expresie PIN1 proteínu pre následnú špecifikáciu vplyvu lncRNA na PIN1.

Finálne bolo sledované chovanie oboch lncRNA v mutantovi *hen2-4*, ktorý nemá aktívny systém pre degradáciu polyadenylovaných lncRNA.

4.1 Genotypovanie mutantných línií *Arabidopsis thaliana*

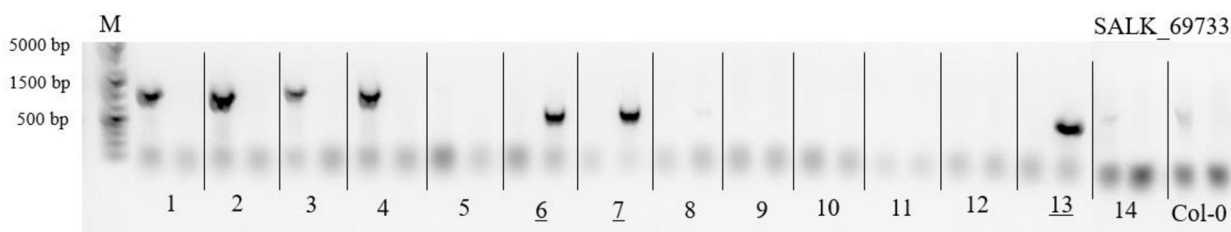
Genetický materiál (DNA) z mutantných variantov *Arabidopsis thaliana* bol izolovaný podľa postupu uvedeného v sekcii metód a následne bol podrobený PCR reakcii za použitia špecifických primerov (Tabuľka 1) z dôvodu genotypizácie, ktorá mala overiť prítomnosť požadovaných homozygótnych mutantov v jednotlivých líniách. Samotná PCR reakcia prebiehala za použitia predom uvedeného postupu. Počas práce boli využívané primery ktoré pozostávali z kombinácie pre samotný gén a z kombinácie pre amplifikáciu inzertovanej kazety. Kombinácia pre T-DNA inzert obsahovala LB primer pre kazetu a RB primer špecifický pre gén. Získané PCR produkty boli následne podrobené elektroforetickej separácii a vznikajúce gély boli vizualizované a vyhodnotené (Obrázok 6, Obrázok 7, Obrázok 8, Obrázok 9). Počas práce sme využívali aj kontrolné vzorky vo forme DNA izolovanej z Col-0 jedincov. U týchto vzoriek ale nedochádzalo k vytvoreniu bendov, a preto by bolo potrebné získané výsledky preveriť. Jednalo sa o línie SALK_048701 (Obrázok 6) a SALK_69733 (Obrázok 8, Obrázok 9). U línie SALK_72248 (Obrázok 7). Vďaka opakovaným testom, kedy sa chybovosť v kontrolných vzorkách opakovala, sme sa rozhodli pokračovať v práci s dostupným materiálom, no za obmeny procesu izolácie genetického materiálu.



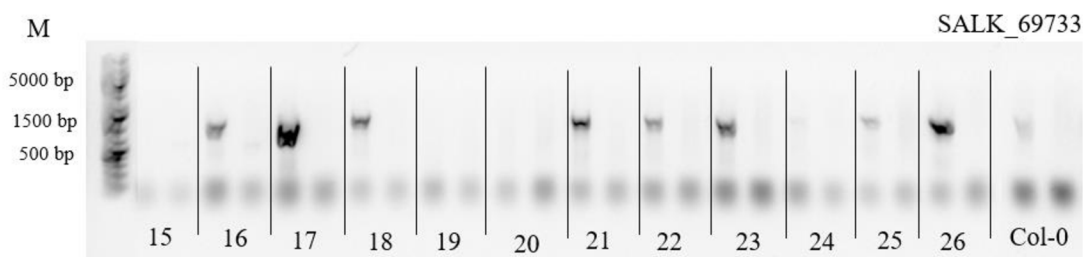
Obrázok 6 - Výsledný elektroforegram analýzy genotypu jedincov línie SALK_048701. Bend v ľavom stĺpci o veľkosti viac ako 1000 bp označuje prítomnosť WT alely v genotype sledovaného jedinca. Bend v pravom stĺpci o veľkosti menej ako 1000 bp označuje prítomnosť mutantnej alely, a teda prítomnosti T-DNA inzertu. Col-0 bola využitá ako kontrola, no bola neúspešná z dôvodu chybných primerov. Podčiarknutie čísla daného jedinca značí, že sa jedná o požadovanú homozygótnu variantu genotypu vzhľadom na polohu bendov. M – marker veľkosti fragmentov (1 kb Plus DNA Ladder). Čísla značia jednotlivé rastlinné jedince z línie SALK_048701 z ktorých bola izolovaná DNA.



Obrázok 7 - Výsledný elektroforegram analýzy genotypu jedincov línie SALK_72248. Bend v ľavom stĺpci o veľkosti viac ako 1000 bp označuje prítomnosť WT alely v genotype sledovaného jedinca. Bend v pravom stĺpci o veľkosti menej ako 1000 bp označuje prítomnosť mutantnej alely, a teda prítomnosť T-DNA inzertu. Col-0 bola využitá ako kontrola. M – marker veľkosti fragmentov (1 kb Plus DNA Ladder). Čísla značia jednotlivé rastlinné jedince z línie SALK_72248 z ktorých bola izolovaná DNA.



Obrázok 8 - Výsledný elektroforegram analýzy genotypu jedincov línie SALK_69733. Bend v ľavom stĺpci o veľkosti viac ako 1000 bp označuje prítomnosť WT alely v genotype sledovaného jedinca. Bend v pravom stĺpci o veľkosti menej ako 1000 bp označuje prítomnosť mutantnej alely, a teda prítomnosť T-DNA inzertu. Col-0 bola využitá ako kontrola, no bola neúspešná z dôvodu chybných primerov. Podčiarknutie čísla daného jedinca značí, že sa jedná o požadovanú homozygotnú variantu genotypu vzhľadom na polohu bendov. M – marker veľkosti fragmentov (1 kb Plus DNA Ladder). Čísla značia jednotlivé rastlinné jedince z línie SALK_69733 z ktorých bola izolovaná DNA.



Obrázok 9 - Výsledný elektroforegram analýzy genotypu jedincov línie SALK_69733. Bend v ľavom stĺpci o veľkosti viac ako 1000 bp označuje prítomnosť WT alely v genotype sledovaného jedinca. Bend v pravom stĺpci o veľkosti menej ako 1000 bp označuje prítomnosť mutantnej alely, a teda prítomnosť T-DNA inzertu. Col-0 bola využitá ako kontrola, no bola neúspešná z dôvodu chybných primerov. M – marker veľkosti fragmentov (1 kb Plus DNA Ladder). Čísla značia jednotlivé rastlinné jedince z línie SALK_69733 z ktorých bola izolovaná DNA.

Následne bolo potrebné z každej línie vybrať jedného homozygótného jedinca a podrobiť ho opakovane amplifikácii (bližšie informácie o vybraných jedincoch - Tabuľka 13 Obrázok 16). A to z dôvodu, aby sa zabezpečil dostatočný objem materiálu, ktorý bol následne odoslaný na sekvenovanie pre kontrolu umiestnenia amplifikovaného inzertu. Výsledky ktoré sme obdržali ukázali, že línia SALK_69733 ako jediná obsahovala požadovaný T-DNA inzert v žiadanom mieste. A to za použitia primerových kombinácií LB1.3 a 101. Zvyšné dve línie (SALK_047002 a SALK_048701) však vykazovali amplifikovaný cudzí fragment, a teda nedošlo k zhode sekvencií detekovaného fragmentu a nášho génu pre lncRNA v týchto líniách. Ukázalo sa, že jedince obsahovali inzercie kaziet aj v iných častiach genómu, a preto bolo potrebné navrhnúť nové primerové kombinácie.

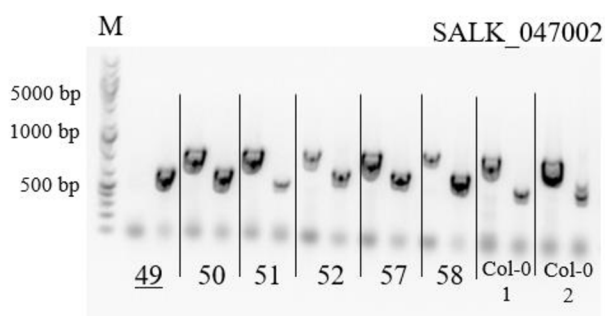
Tabuľka 13 - homozygótné jedince príslušných línií vyselektovaných pre sekvenovanie

Línia	Jedinec (č.)
SALK_69733	6
SALK_047002	49
SALK_048701	60

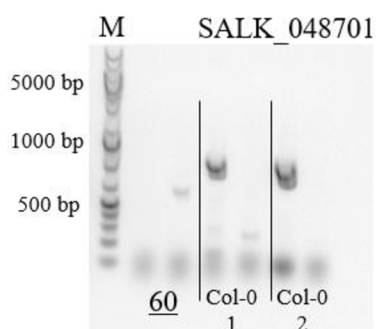
4.1.1 Genotypovanie mutantných línií *Arabidopsis thaliana* za použitia zmenenej kombinácie primerov

Vďaka výsledkom diskutovaným v predošlej časti nedošlo k potvrdeniu požadovaného umiestnenia inzertu do génu pre lncRNA-PIN1. Bola však potvrdená prítomnosť inzertovanej kazety vo vzdialenej časti genómu, a preto bolo potrebné amplifikovať izolovanú DNA z týchto línií za použitia iných kombinácií primerov. Jednalo sa o primery číslo 100 a 101 pre samotný úsek génu a primer LB1.3 pre amplifikáciu inzerovanej kazety (bližšie informácie o primeroch - Tabuľka 1). Vďaka dostupným dátam z predošlej sekvenácie sme uznali za vhodné využiť kombináciu primerov pre amplifikáciu fragmentu medzi inzertovanou kazetou a konečným úsekom génu pre líniu SALK_048701 v kombinácii primer 100 (LB) a LB1.3 (RB). Táto kombinácia bola využitá z dôvodu domnienky, že kazeta bola inzertovaná do úseku požadovaného génu v smere „antisense“. Takto navrhnutá PCR reakcia prebiehala na základe predom uvedeného postupu. Produkty PCR boli následovne podrobené elektroforetickej separácii podľa uvedených podmienok v predošlej časti práce. Výsledný gél bol vizualizovaný. Obrázok 11 - je viditeľný slabý bend pre detekciu mutantnej homozygótnej varianty

genómu s veľkosťou fragmentov menej ako 1000 bp. Konkrétne sa jednalo o jedinca číslo 60. Aj v prípade druhej línie (SALK_047002) dochádzalo k detekcii požadovanej kombinácie bendov (Obrázok 10). Konkrétne sa jednalo o jedinca číslo 49. No vzhľadom na výsledky kontrolných vzoriek, ktorými boli jedince Col-0 nedochádzalo v kombinácii primerov 100 + LB1.3 k tvorbe požadovanej kombinácie bendov (Obrázok 10). Čo však nie je správne pre potvrdenie pravdivosti výsledkov jednotlivých vzoriek, a preto by mali byť tieto získané výsledky irelevantné. A teda sme sa rozhodli aj napriek chybnéj kontrole pracovať so získanými informáciami.

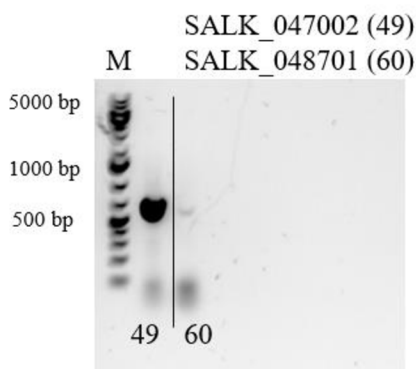


Obrázok 10 - Výsledný elektroforegram produktov PCR využitých na sekvenovanie – línia SALK_047002. Bend v ľavom stĺpci o viac ako takmer 1000 bp označuje prítomnosť WT alely v genotype sledovaného jedinca. Bend v pravom stĺpci o veľkosti menej ako 1000 bp označuje prítomnosť mutantnej alely, a teda prítomnosť T-DNA inzertu. Col-0 1, Col-0 2 boli využité ako kontrola. Podčiarknutie čísla daného jedinca značí, že sa jedná o požadovanú homozygótnu variantu genotypu. M – marker veľkosti fragmentov (1 kb Plus DNA Ladder). Čísla značia jednotlivé rastlinné jedince z línie SALK_047002 z ktorých bola izolovaná DNA.



Obrázok 11 - Výsledný elektroforegram produktov PCR využitých na sekvenovanie – línia SALK_048701. Bend v ľavom stĺpci o veľkosti viac ako 1000 bp označuje prítomnosť WT alely v genotype sledovaného jedinca. Bend v pravom stĺpci o veľkosti menej ako 1000 bp označuje prítomnosť mutantnej alely, a teda prítomnosť T-DNA inzertu. Col-0 1, Col-0 2 boli využité ako kontrola. Podčiarknutie čísla daného jedinca značí, že sa jedná o požadovanú homozygótnu variantu genotypu. M – marker veľkosti fragmentov (1 kb Plus DNA Ladder). Čísla značia jednotlivé rastlinné jedince z línie SALK_048701 z ktorých bola izolovaná DNA.

Tieto varianty teda boli vyhodnotené ako vhodné pre následnú amplifikáciu za použitia špecifickej PCR reakcie potrebnej pre amplifikáciu fragmentov pre nasledovné sekvenovanie. Reakcia prebiehala za dodržania postupu uvedeného v jednej z predchádzajúcich kapitol. Získané PCR produkty boli podrobené elektroforetickej separácii pre potvrdenie úspešnej amplifikácie požadovaných fragmentov. Na výslednom géli boli viditeľné bendy s požadovanou veľkosťou menej ako 1000 bp (Obrázok 12). Tieto produkty PCR reakcie boli následne prečistené, a to z dôvodu použitia PCR zmesi pre enzým Dream Taq s prímiesou pigmentovaného migračného pufru. Následne dochádzalo k čisteniu vzoriek. Prečistená a eluovaná DNA bola následne podrobená detekcii koncentrácie za použitia zariadenia NanoDrop. Prečistená DNA bola odoslaná na sekvenovanie pre objasnenie polohy inzertovanej kazety. Bolo potrebné dodať aj správne nariadené primery o požadovanej koncentrácii 5 μ M. Výsledky sekvenácie potvrdili prítomnosť T-DNA inzertnej kazety v sekvencii lncRNA-PIN1-1 a lncRNA-PIN1-2 u jedincov v líniiach SALK_047002, SALK_048701 a SALK_69733.

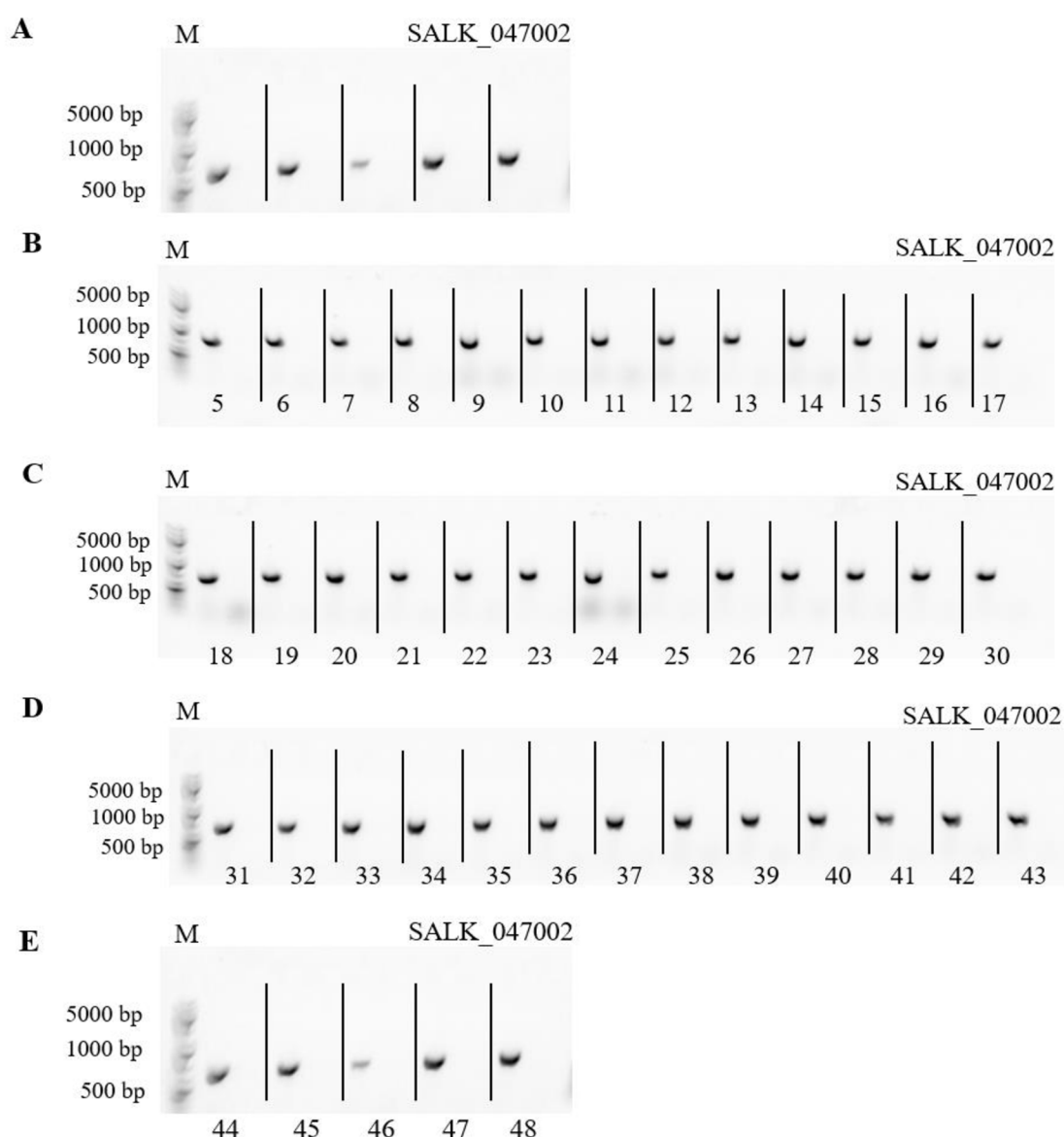


Obrázok 12 - Výsledný elektroforegram produktov PCR využitých na sekvenovanie – línie SALK_047002 a SALK_048701. Bend o veľkosti menej ako 1000 bp označuje prítomnosť mutantnej alely, a teda prítomnosť T-DNA inzertu. M – marker veľkosti fragmentov (1 kb Plus DNA Ladder). Čísla značia jednotlivé rastlinné jedince z línie SALK_047002 (49) a SALK_048701 (60) z ktorých bola izolovaná DNA.

4.1.2 Kontrolné genotypovanie SALK mutantov

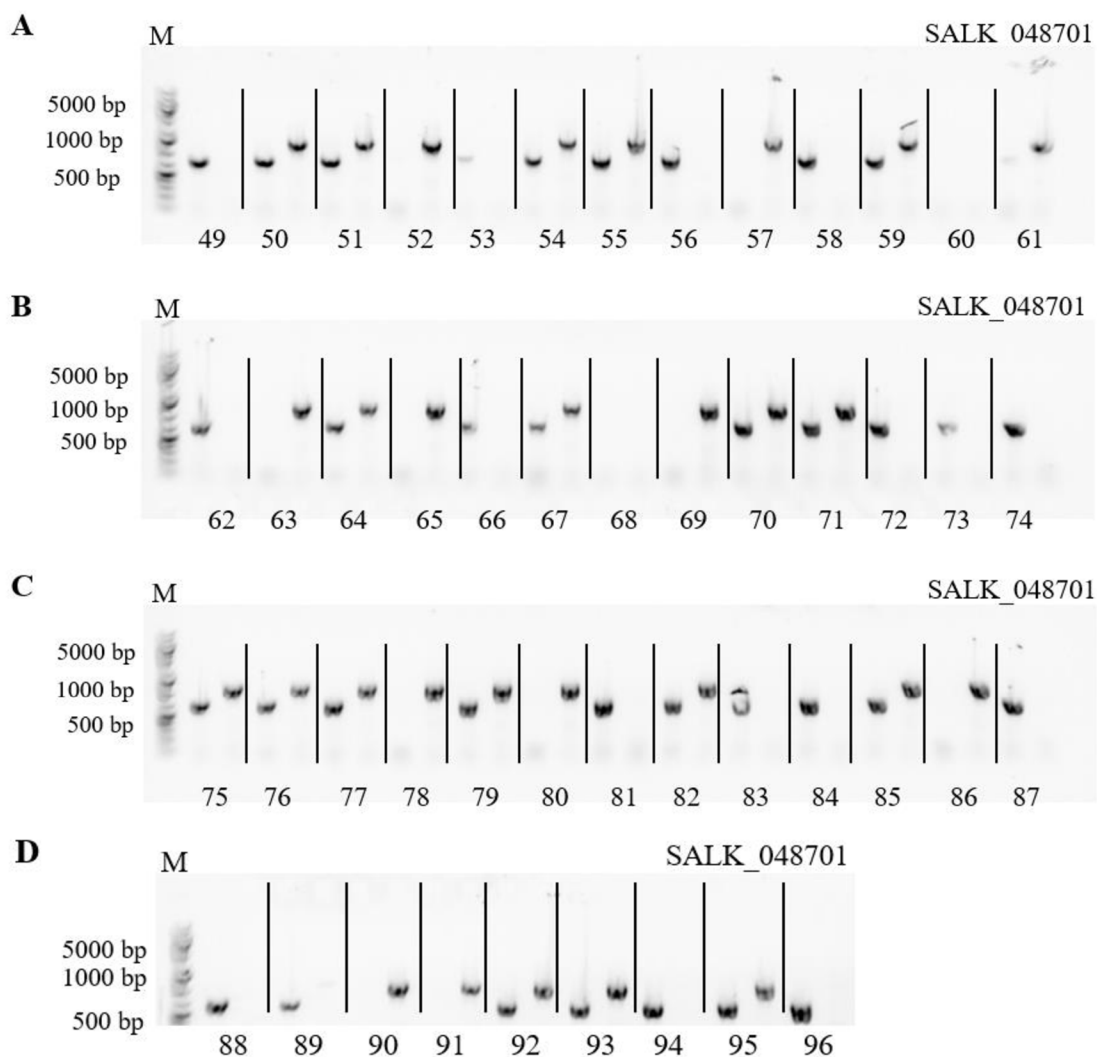
Prebiehalo s predom vyselektovanými homozygótnymi jedincami, ktoré boli prednostne krížené s ekotypom Col-0 pre zabezpečenie odstránenia prítomnosti viacnásobného zabudovania kazety do genómu jedinca. Pre detekciu pomocou amplifikácie za použitia PCR boli využité línie SALK_047002 (Obrázok 13), SALK_048701 (Obrázok 14) a SALK_69733 (Obrázok 15). Pre amplifikáciu boli v procese využité špecifické primerové kombinácie (Tabuľka 1). Pre líniu SALK_047002 to boli primerové kombinácie pre prvý stĺpec 108 + 115 a pre druhý stĺpec 114 + 115. Pre líniu SALK_048701 boli použité primery v kombinácii 108 + 113 (v prvom stĺpci) a 112 + 113 (v druhom stĺpci). U línie SALK_69733 boli využité zmesi pozostávajúce z čísiel 108 + 101 pre prvý stĺpec a 100 + 101 pre druhý stĺpec. Ako kontrola bola využitá izolovaná DNA z jedinca Col-0. Tu boli využité primery v kombináciách vyššie uvedených špecificky pre každú líniu. Pre správny výsledok kontroly bolo potrebné aby bola veľkosť zaznamenaného bendu väčšia ako pri detekcii inzertovanej kazety. Vzhľadom na získané elektroforegramy bola naša kontrola správna (Obrázok 15 - E). Homozygótny varianty v tomto prípade predstavovali lokalizáciu jediného (mutantného) bendu v prvom stĺpci o veľkosti zhruba menej ako 1000 bp. Heterozygótny varianty vykazovali prítomnosť bendov s rozličnou veľkosťou v oboch stĺpcoch a wild type (ďalej už len WT) sa vyznačovali vyššou polohou bendu v druhom stĺpci ako to bolo uvedené vyššie pri opise kontrolných vzoriek.

U línie SALK_047002 (Obrázok 13) sme zaznamenali prítomnosť čisto homozygótnych jedincov, pri ktorých ale veľkosť amplifikovaného fragmentu nevykazovala požadované hodnoty. V skutočnosti sa ale jednalo o jedince WT, a preto predpokladáme, že mohlo dôjsť k chybe pri krížení s ekotypom Col-0.



Obrázok 13 - Výsledný elektroforegram z procesu genotypovania – línia SALK_047002. Bend v ľavom stĺpci o veľkosti menej ako 1000 bp označuje prítomnosť mutantnej alely v genotype sledovaného jedinca. Bend v pravom stĺpci o veľkosti viac ako 1000 bp označuje prítomnosť WT. Jednotlivé označenia častí obrázku (A, B, C, D, E) charakterizujú samostatné získané gély v procese nanášania vzoriek pre uvedenú líniu. M – marker veľkosti fragmentov (1 kb Plus DNA Ladder). Čísla značia jednotlivé rastlinné jedince z línie SALK_047002 z ktorých bola izolovaná DNA.

Pri líniách SALK_048701 sme boli schopní získať homozygótne varianty konkrétne u 12 vzoriek (č. 49, 53, 53, 58, 62, 66, 72, 73, 74,81, 83, 84, 87) (Obrázok 14). U vzoriek č. 60 a 68 (Obrázok 14 - A a B) nedochádzalo k detekcii žiadneho signálu ani vo forme bendov a ani vo forme degradovanej DNA, a preto si dovoľíme tvrdiť, že sa nám u týchto vzoriek nepodarilo izolovať žiaden genetický materiál. Vzhľadom na získané elektroforegramy bola naša kontrola správna (Obrázok 15 - E).

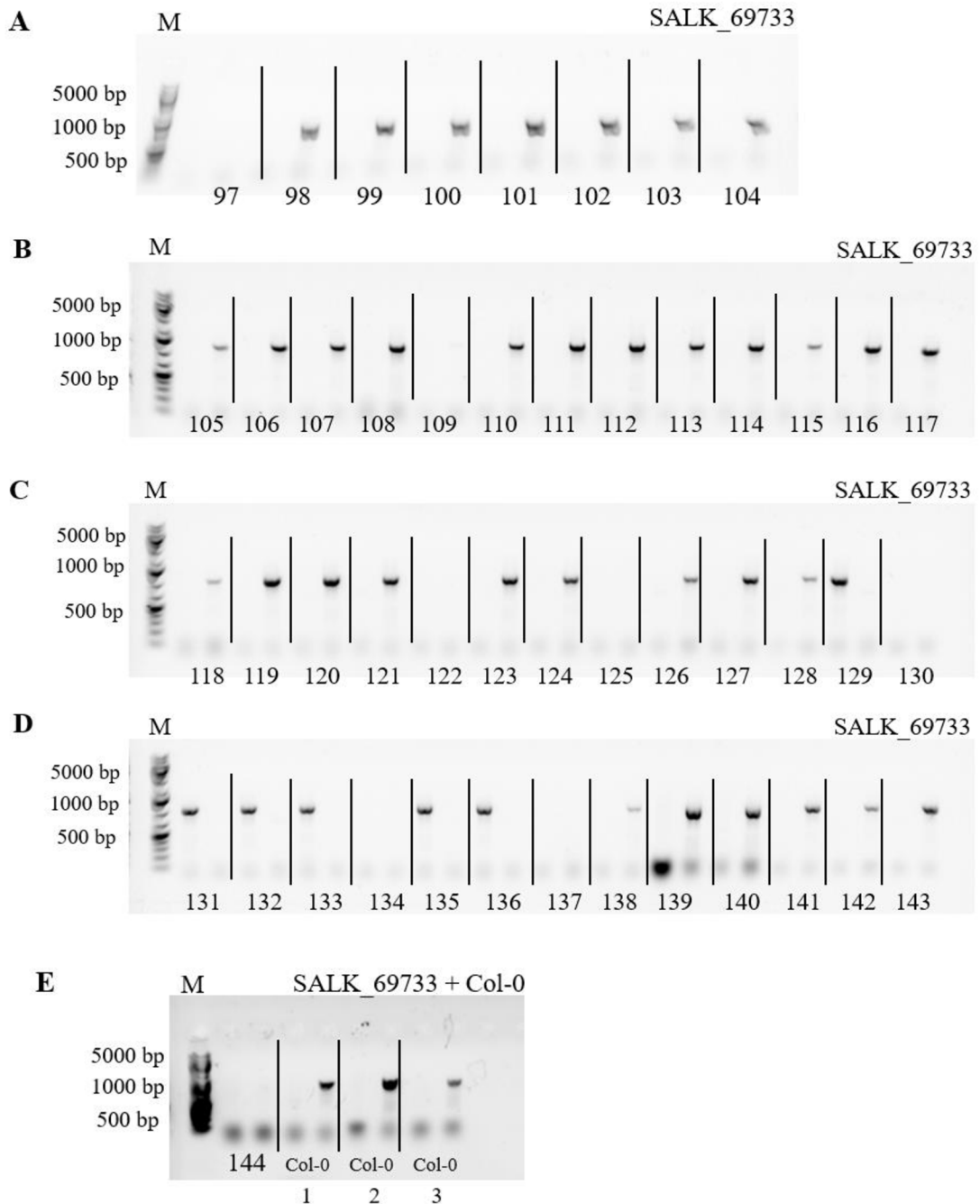


Obrázok 14 - Výsledný elektroforegram z procesu genotypovania – línia SALK_048701. Bend v ľavom stĺpci o veľkosti menej ako 1000 bp označuje prítomnosť mutantnej alely v genotype sledovaného jedinca. Bend v pravom stĺpci o veľkosti viac ako 1000 bp označuje prítomnosť WT. Jednotlivé označenia častí obrázku (A, B, C, D) charakterizujú samostatné získané gély v procese nanášania vzoriek pre uvedenú líniu. M – marker veľkosti fragmentov (1 kb Plus DNA Ladder). Čísla značia jednotlivé rastlinné jedince z línie SALK_048701 z ktorých bola izolovaná DNA.

Finálne v tejto časti práce dochádzalo ku genotypovaniu jedincov SALK_69733 (Obrázok 15), a to tiež za použitia predom uvedených špecifických primerových kombinácií. Nanášanie vzoriek na gél bolo rovnaké ako v predošlej časti práce a preto bolo v prípade požadovaného homozygota získať bend v prvom stĺpci s veľkosťou menej ako 1000 bp. Ako kontrola bola využívaná DNA izolovaná z jedincov ekotypu Col-0 a pre jej správnosť bolo potrebné získať bend o veľkosti viac ako 1000 bp v druhom stĺpci. Podarilo sa nám získať niekoľko homozygotných jedincov. Jednalo sa o čísla 129, 131, 132, 133, 135 a 136 (Obrázok 15 – C a D). Treba ale dodať, že veľkosť bendov u mutantných homozygotov bola príliš veľká, a preto bolo potrebné previesť kontrolné

genotypovanie. Na tomto géli boli nanesené aj kontrolné vzorky, nie len pre líniu SALK_69733, ale aj pre zvyšné dve línie (SALK_047002, SALK_048701) (Obrázok 15 - E). Kontrolné výsledky pre všetky línie boli správne, a preto je možné tvrdiť že genotypovanie prebehlo taktiež správne.

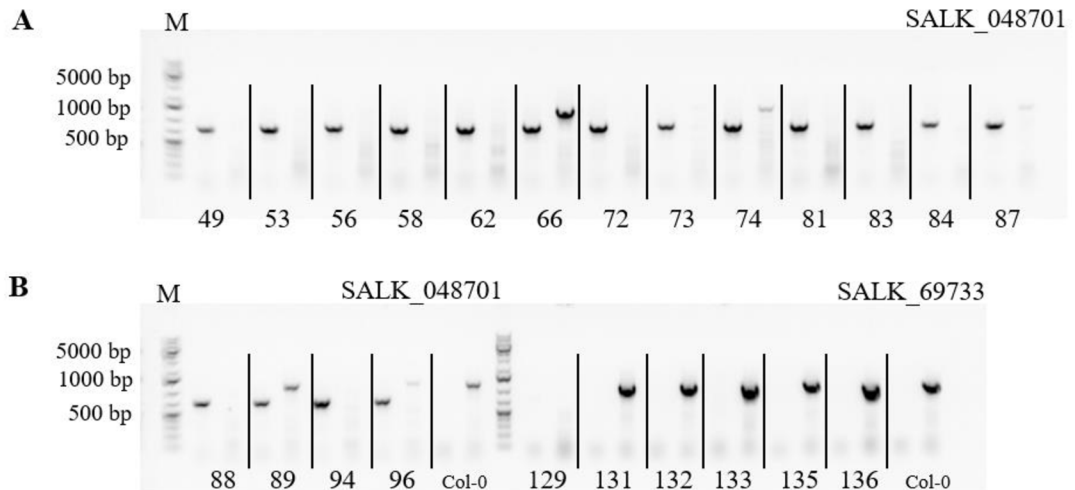
Vzhľadom na veľkosť amplifikovaných fragmentov línie SALK_69733 sa domnievame, že aj v tomto prípade došlo k chybe v procese získavania homozygótnych jedincov s jednonásobným inzertom a tieto genotypované jedince môžu predstavovať WT.



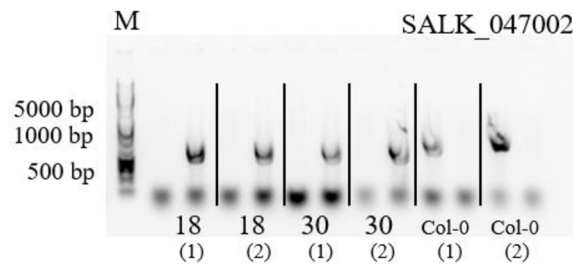
Obrázok 15 – Výsledný elektroforegram z procesu genotypovania – línia SALK_69733. Bend v ľavom stĺpci o veľkosti menej ako 1000 bp označuje prítomnosť mutantnej alely v genotype sledovaného jedinca. Bend v pravom stĺpci o veľkosti viac ako 1000 bp označuje prítomnosť WT. Jednotlivé označenia častí obrázku (A, B, C, D, E) charakterizujú samostatné získané gély v procese nanášania vzoriek pre uvedenú líniu. M – marker veľkosti fragmentov (1 kb Plus DNA Ladder). Čísla značia jednotlivé rastlinné jedince z línie SALK_69733 z ktorých bola izolovaná DNA. Ako kontrola bola využitá DNA izolovaná z ekotypu Col-0. Kontrola č. 1 (Col-0 (1)) predstavuje kontrolu pre líniu SALK_047002, kontrola č. 2 (Col-0 (2)) predstavuje kontrolnú vzorku línie SALK_48701 a finálne kontrola č. 3 (Col-0 (3)) je kontrolnou vzorkou pre líniu SALK_69733.

4.1.3 Kontrolné genotypovanie jedincov SALK

Kontrolné genotypovanie prebiehalo na základe predošlého procesu genotypovania SALK mutantov pre overenie správnosti predošlých výsledkov. Dochádzalo ku genotypovaniu všetkých línií uvedených v predchádzajúcej výsledkovej časti. Ako kontrolná vzorka bol využívaný genetický materiál z rastlín *A. thaliana* ekotyp Col-0. U línie SALK_047002 (Obrázok 17) boli v využité primery s kombináciou 114 + 115 v prvom stĺpci pre detekciu prítomnosti alely WT a primery 8 + 115 v druhom stĺpci pre amplifikáciu inzertovanej kazety. V prípade kontrolnej vzorky bol postup pipetovania rovnaký. U línie SALK_048701 (Obrázok 16 – A) dochádzalo k využitiu primerových kombinácií v prvom stĺpci na detekciu prítomnosti alely s T-DNA inzertom (8 + 113) a v druhom stĺpci pre detekciu alely WT (112 + 113). Aj kontrola bola pipetovaná na gél v rovnakom poradí. A finálne u línie SALK_69733 (Obrázok 16 - B) vzorka v prvom stĺpci obsahovala primery 8 + 101 (T-DNA inzert) a v druhom stĺpci 100 + 101 (alela WT). Kontrola bola pipetovaná v rovnakom poradí. Bolo potrebné pozorovať veľkosť bendov v prípade homozygótnej kombinácie. Tá mala vykazovať veľkosť menej ako 1000 bp. Alela WT predstavovala bend vo veľkosti viac ako 1000 bp. U línie SALK_047002 sme boli schopní detekovať iba prítomnosť požadovaných homozygótnych mutantných jedincov. U tejto línie následne prebiehalo genotypovanie pôvodného mutantu, na základe čoho bolo zistené, že počas kríženia s ekotypom Col-0 došlo k chybe a jedince genotypované v tomto kroku (Obrázok 17) sú WT. U línie SALK_48701 sme taktiež detekovali mutantné homozygótne varianty (č. 49, 53, 56, 58, 72, 73, 81, 83, 84, 88, a 94). U línie SALK_69733 sa nám bohužiaľ nepodarilo získať požadovaný genotyp ani u jedného zo sledovaných jedincov.



Obrázok 16 – Výsledný elektroforegram z procesu kontrolného genotypovania – línii SALK_048701 a SALK_69733. Bend v ľavom stĺpci o veľkosti menej ako 1000 bp označuje prítomnosť mutantnej alely v genotype sledovaného jedinca. Bend v pravom stĺpci o veľkosti viac ako 1000 bp označuje prítomnosť WT. M – marker veľkosti fragmentov (1 kb Plus DNA Ladder). Čísla značia jednotlivé rastlinné jedince z línii SALK_048701 a SALK_69733 z ktorých bola izolovaná DNA.



Obrázok 17 - Výsledný elektroforegram z procesu kontrolného genotypovania – línie SALK_047002. Bend v ľavom stĺpci o veľkosti viac ako 1000 bp označuje prítomnosť alely WT v genotype sledovaného jedinca. Bend v pravom stĺpci o veľkosti menej ako 1000 bp označuje prítomnosť T-DNA inzertnej kazety. M – marker veľkosti fragmentov (1 kb Plus DNA Ladder). Čísla značia jednotlivé rastlinné jedince z línie SALK_047002 z ktorých bola izolovaná DNA.

4.1.4 Mikroskopická analýza lncRNA-PIN1-1 a lncRNA-PIN1-2

Úlohou tejto mikroskopickej analýzy bola detekcia rozdielu intenzity sily ofarbenia medzi dvomi lncRNA (lncRNA-PIN1-1 a lncRNA-PIN1-2). Na prácu boli teda využívané jedince *Arabidopsis thaliana* s fúziou NLS-GFP-GUS značenia s proteínom PIN1 (*plncRNA-PIN1-1::NLS-GFP-GUS* a *lncRNA-PIN1-2::NLS-GFP-GUS*). Detekcia prebiehala na základe detekcie produktu vznikajúceho pri farbení GUS (podmienky uvedené v kapitole 3.2). Viditeľný signál v nadzemných aj podzemných častiach bol

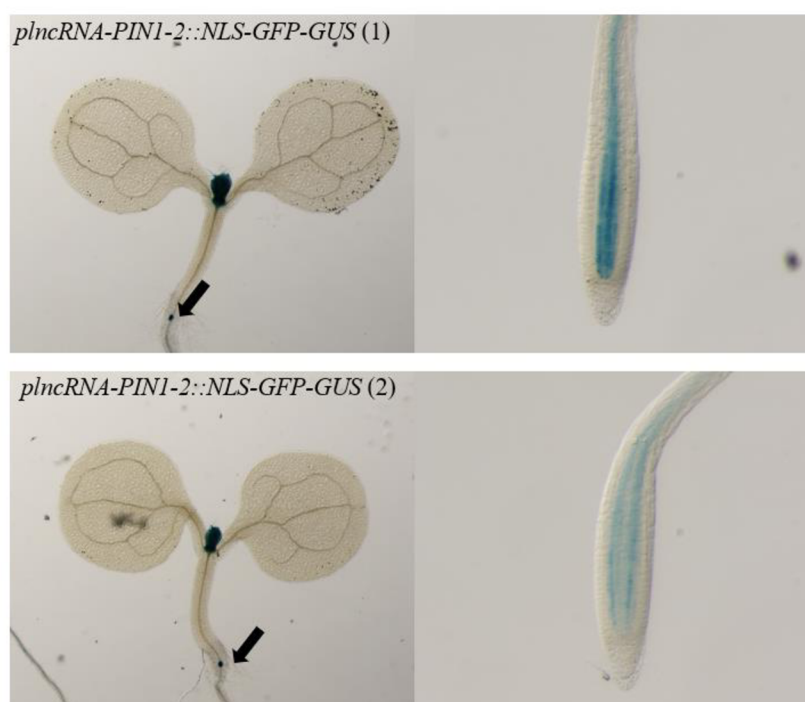
detekovateľný u oboch variantov (Obrázok 18, Obrázok 19). U jedincov *plncRNA-PINI-1::NLS-GFP-GUS* (1) bolo ofarbenie prítomné v nadzemnej časti v oblasti prvých pravých listov (Obrázok 18). U tej istej varianty ale druhej línie nebol signál detekovaný (Obrázok 18). Koreňový signál bol u línie *plncRNA-PINI-1::NLS-GFP-GUS* viditeľný taktiež iba u typu *plncRNA-PINI-1::NLS-GFP-GUS* (1) (Obrázok 18), kedy bol signál badateľný u viac ako 50 % pozorovaných jedincov. Signál bol lokalizovaný primárne v deliacej zóne hlavného koreňa.



Obrázok 18 - Preparát transformovaných jedincov *A. thaliana* s konštruktom *plncRNA-PINI-1::NLS-GFP-GUS*, vizualizovaných pomocou stereomikroskopu Olympus SZX16. Vľavo - nadzemné časti jedincov. Vpravo - špičky koreňov. Prítomnosť GUS signálu v prvých pravých listoch a deliacej zóne koreňa u línie *plncRNA-PINI-1::NLS-GFP-GUS* (1). Línia *plncRNA-PINI-1::NLS-GFP-GUS* (2) nevykazovala GUS signál.

U jedincov s konštruktom *plncRNA-PINI-2::NLS-GFP-GUS* sme boli schopní detekovať signál v nadzemných aj pozemných častiach sledovaných jedincov, a to s vyššou intenzitou ale aj s vyššou mierou výskytu (Obrázok 19). V nadzemných častiach bol signál detekovaný prevažne v novovznikajúcich pravých listoch a v koreňovej sústave v hlavnom koreni a konkrétne v jeho deliacej časti. Signál bol viditeľný aj u laterálnych koreňov s dostatočne vysokou mierou (Obrázok 19 – čierna šípka). Je potrebné poznamenať, že lokalizácia expresie sledovaných lncRNA je takmer totožná s lokalizáciou expresie PIN1 proteínu. Preto je možné tvrdiť, že lncRNA-PINI-1

a lncRNA-PIN1-2 vykazujú nejakú biologickú funkciu a nejedná sa len o takzvaný transkripčný šum.

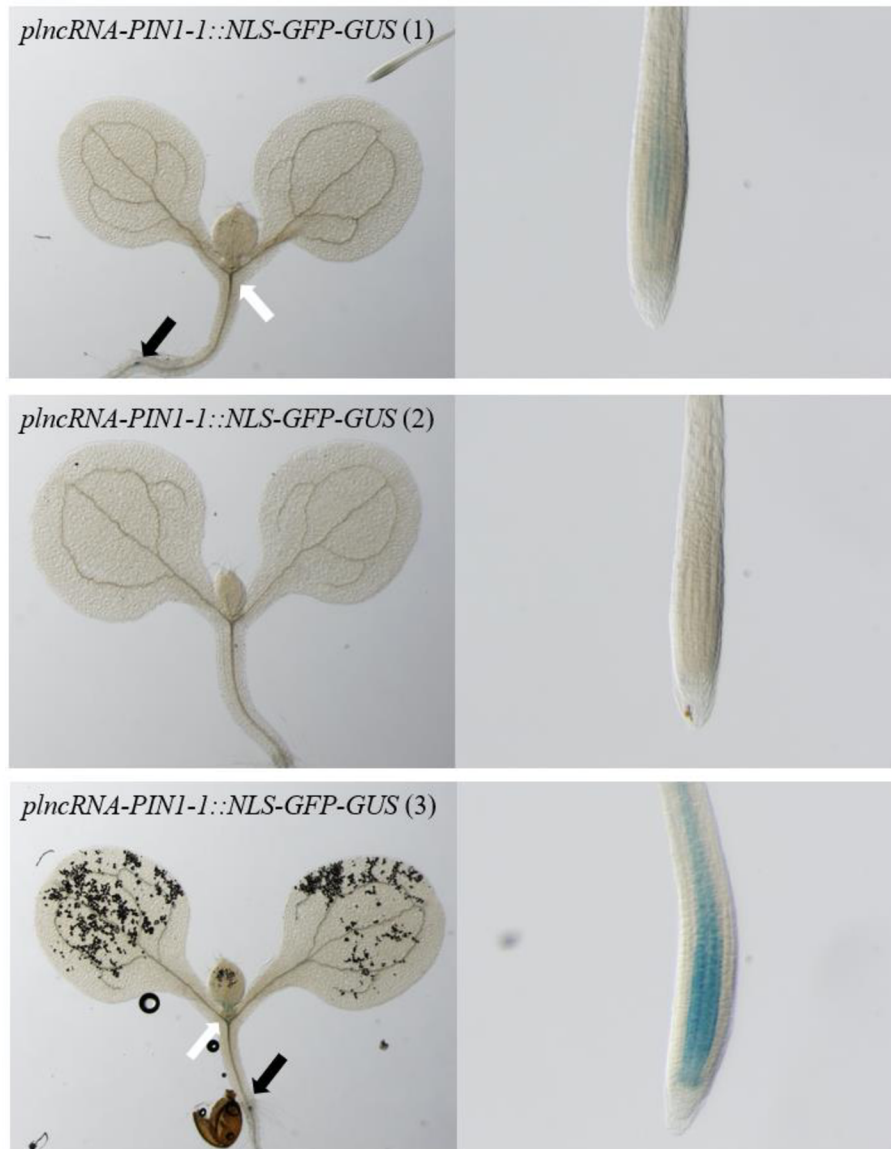


Obrázok 19 - Preparát transformovaných jedincov *A. thaliana* s konštruktom *plncRNA-PIN1-2::NLS-GFP-GUS*, vizualizovaných pomocou stereomikroskopu Olympus SZX16. Vľavo - nadzemné časti jedincov. Vpravo – špičky koreňov. Prítomnosť GUS signálu v prvých pravých listoch, deliacej zóne koreňa a vo vznikajúcich laterálnych koreňoch (čierna šípka) u oboch línií *plncRNA-PIN1-2::NLS-GFP-GUS* (1) a *plncRNA-PIN1-2::NLS-GFP-GUS* (2).

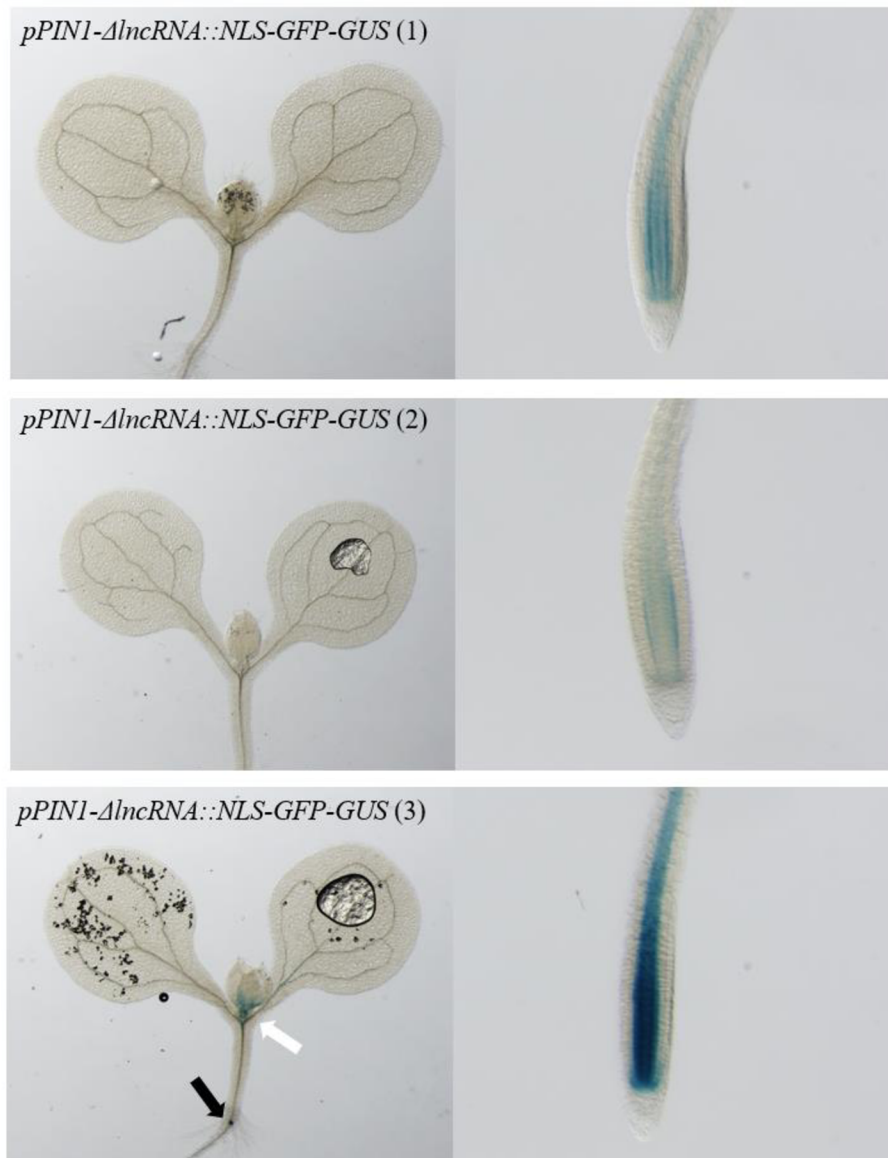
4.1.5 Mikroskopická analýza delečných mutantov

V tejto časti práce boli využívané rastlinné jedince *Arabidopsis thaliana* s obsahom konštruktu NLS-GFP-GUS, fúzovaného s PIN1 promótorom, kde došlo k delícii oboch lncRNA-PIN1 (*pPIN1-ΔlncRNA::NLS-GFP-GUS*). Bol využívaný aj konštrukt kompletnej promótorovej sekvencie fúzovanej s NLS-GFP-GUS. V prípade, že by sledovaná lncRNA vykazovala aktivitu, ktorá by mala negatívny vplyv na prítomnosť a fungovanie PIN1, odhadovali sme, že u delečných mutantov by dochádzalo k vyššej expresii PIN1 a tým pádom aj k silnejšiemu signálu. Naše tvrdenie že sledovaná lncRNA by mala mať negatívny vplyv na expresiu PIN1 mala byť doplnená aj výsledkami získanými v procese analýzy pomocou qPCR metódy. Počas mikroskopického sledovania boli teda pozorované predom uvedené varianty jedincov ktoré pred samotným sledovaním museli byť podrobené procesu farbenia GUS podľa postupu uvedeného

v kapitole 3.2. Vďaka získaným výsledkom je možné konštatovať, že expresia PIN1 bola u delečného mutantu vyššia a lepšie viditeľná, a to najmä v koreňovej časti (Obrázok 20, Obrázok 21). Nadzemné časti pri oboch variantoch mutantov nevykazovali vysoký signál v celej svojej časti. U transgéennej línie *pPIN1-ΔlncRNA::NLS-GFP-GUS* (3) dochádzalo k veľmi nízkej intenzite ofarbenia v oblasti hypokotylu, a to v mieste bázy kľúčnych listov (Obrázok 21). Badateľný signál bol najmä v hlavnom koreni. Presnejšie sa jednalo o oblasti deliacej zóny koreňa u všetkých línií okrem jednej – *plncRNA-PIN1-1::NLS-GFP-GUS* (2) (Obrázok 20). Dostatočne silné ofarbenie sme mohli pozorovať či už u vznikajúcich alebo u starších laterálnych koreňov (Obrázok 20, Obrázok 21 – čierna šípka). Po porovnaní s analýzou qPCR je možné konštatovať, že intenzita ofarbenia je vyššia u delečných mutantov (*pPIN1-ΔlncRNA::NLS-GFP-GUS*), čo korešponduje so spomínanými výsledkami. Dá sa teda tvrdiť, že v neprítomnosti sledovanej lncRNA dochádza k nárastu abundancie PIN1 proteínu, z čoho je možné vyvodiť, že sledované lncRNA majú skôr aktivitu utlmovaciu ako indukčnú.



Obrázok 20 - Preparát transformovaných jedincov *A. thaliana* s konštruktom *plncRNA-PIN1-1::NLS-GFP-GUS* vizualizovaných pomocou stereomikroskopu Olympus SZX16. Vľavo – nadzemné časti jedincov. Vpravo – špičky koreňov. Prítomnosť slabého GUS signálu v na báze prvých pravých listov u línie *lncRNA-PIN1-1* (3) (biela šípka), a u vznikajúcich laterálnych koreňov u línie *plncRNA-PIN1-1::NLS-GFP-GUS* (1)/(3) (čierna šípka). Prítomnosť slabého signálu GUS v deliacej zóne koreňa línie *plncRNA-PIN1-1::NLS-GFP-GUS* (1) a výrazného signálu v rovnakej časti u línie *plncRNA-PIN1-1::NLS-GFP-GUS* (3).



Obrázok 21 - Preparát transformovaných jedincov *A. thaliana* s konštruktom *pPIN1-ΔlncRNA::NLS-GFP-GUS*, vizualizovaných pomocou stereomikroskopu Olympus SZX16. Vľavo – nadzemné časti jedincov. Vpravo – špičky koreňov. Prítomnosť GUS signálu v na báze prvých pravých listov u línie *pPIN1-ΔlncRNA::NLS-GFP-GUS* (3) (biela šípka), a u vznikajúcich laterálnych koreňov u línie *pPIN1-ΔlncRNA::NLS-GFP-GUS* (3) (čierna šípka). Prítomnosť slabého signálu GUS v deliacej zóne koreňa línie *pPIN1-ΔlncRNA::NLS-GFP-GUS* (2) a výrazného signálu v rovnakej časti u línií *pPIN1-ΔlncRNA::NLS-GFP-GUS* (1)/(3).

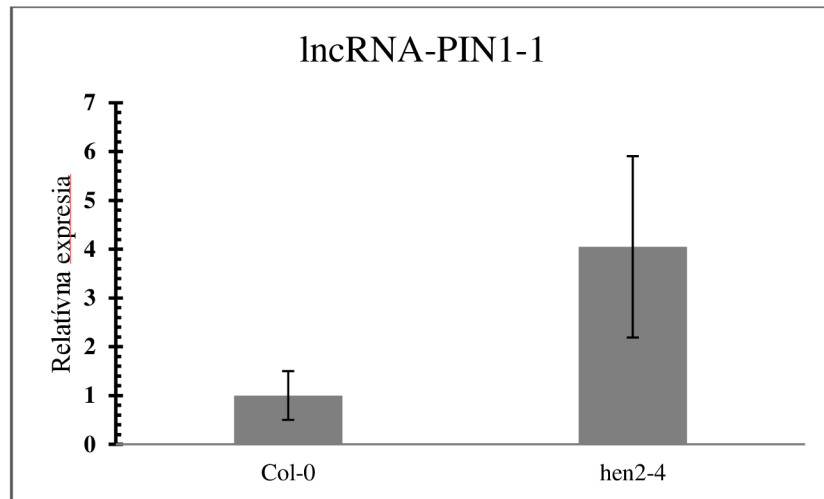
4.1.6 qPCR analýza

Metóda qPCR bola využívaná v našej práci pre detekciu množstva expresie lncRNA-PIN1 a PIN1 u rozličných variantov mutantov *Arabiopsis thaliana*. Ako referenčný gén bola využitý PP2A. Výsledné hodnoty boli spracované formou $\Delta\Delta C_t$ a vytvorené grafy sú uvedené v nasledujúcich podkapitolách nižšie.

4.1.6.1 qPCR pre detekciu lncRNA u *hen2-4* mutantov

Keďže ako už bolo v teoretickej časti spomenuté, *hen2-4* jedince obsahujú mutáciu v géne HEN2 kódujúci RNA helikasu zapojenú do RNA exosomálneho komplexu. Tento variant mutanta bol zvolený pre analýzu z dôvodu, že primárne bolo cieľom sledovať lncRNA-PIN1-1 a lncRNA-PIN1-2 u jedincov ekotypu Col-0. To bohužiaľ nebolo možné vďaka nízkej stabilite sledovaných lncRNA v tomto variante jedincov. Preto boli využité mutantné jedince *hen2-4* u ktorých nedochádza k degradácii polyadenylovaných lncRNA, a preto by mala byť analýza možná. Počas analýzy qPCR sa nám podarilo amplifikovať iba jednu zo sledovaných lncRNA (lncRNA-PIN1-1). Ako kontrola bol využívaný genetický materiál izolovaný z jedincov *A. thaliana* ekotyp Col-0. V procese amplifikácie pri samotnej analýze sme testovali aj rozdielne primerové kombinácie pre detekciu páru s najlepšimi vlastnosťami (výsledné spracované grafické vyhodnotenia pre všetky primerové kombinácie nie sú priložené). Priložený reprezentatívny Graf 1 predstavuje analýzu za použitia primerovej kombinácie 31 + 32. Vznikajúce rozdiely v množstve amplifikácie u testovaných vzoriek mohli byť zapríčinené samotnou štruktúrou študovaných lncRNA. Tie totiž obsahujú vysoké množstvo repetitívnych úsekov, a preto navrhovanie rozličných primerov s vysokou mierou špecifickej amplifikácie je zložité. Často teda dochádza k nerovnomernej miere amplifikácie.

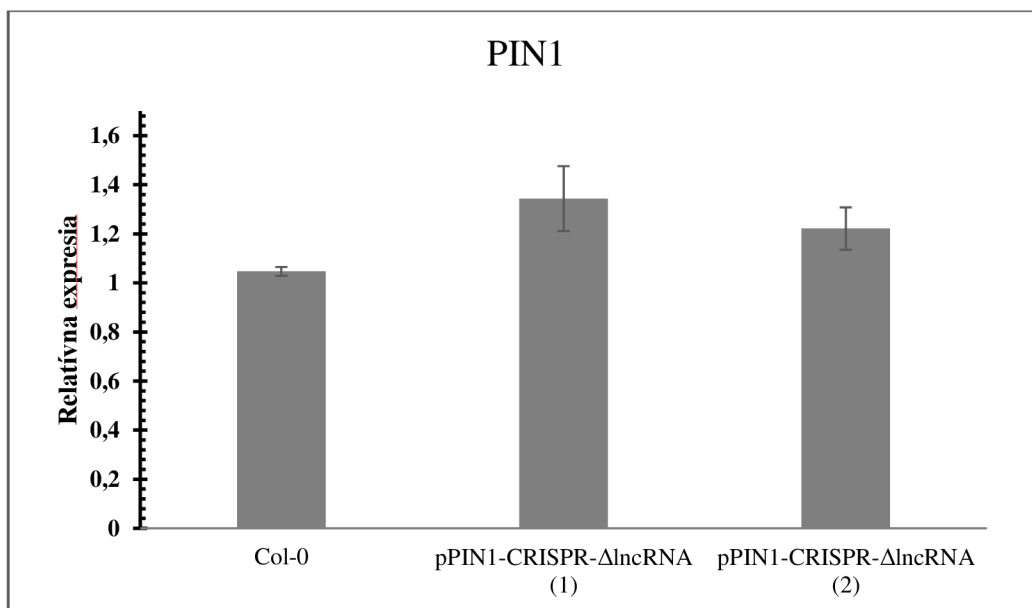
Na základe získaných výsledkov (vyššia hodnota relatívnej expresie lncRNA-PIN1-1) (Graf 1) je možné konštatovať, že zníženie hodnôt nami sledovaných lncRNA môže byť s vysokou pravdepodobnosťou dôsledkom ich nízkej stability a rýchleho procesu degradácie.



Graf 1 - Výsledné grafické vyhodnotenie analýzy qPCR pre detekciu množstva amplifikácie lncRNA-PIN1-1 u mutantných jedincov *Arabidopsis thaliana* *hen2-4*. amplifikácia prebiehala za použitia špecifickej primerovej kombinácie (31 + 32). Na osi X sú vynesené pomenovania jednotlivých vzoriek. Na osi Y sú uvedené hodnoty relatívnej expresie. V grafoch sú vyobrazené aj štandardné chybové úsečky.

4.1.6.2 qPCR pre analýzu aktivity PIN1 pri absencii lncRNA-PIN1-1/2

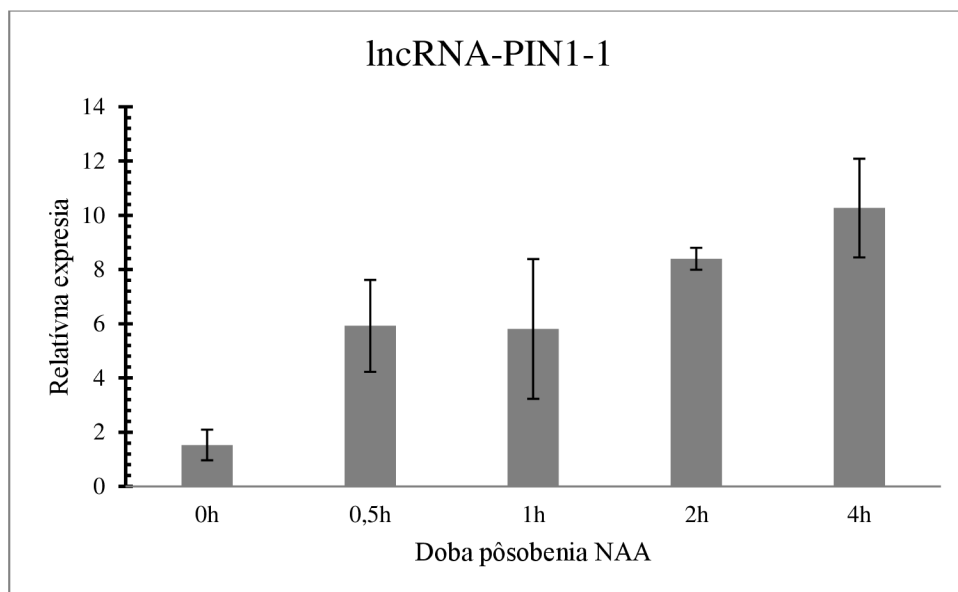
Hlavným cieľom tejto časti práce bolo zistenie, či sledované lncRNA naozaj ovplyvňujú aktivitu auxín - responzívneho a auxín - prenášačového proteínu PIN1 ako sme sa domnievali. Pre samotnú analýzu boli využité Crispr/CAS9 mutanty *A. thaliana* s vyňatou sekvenciou pre lncRNA-PIN1-1 a lncRNA-PIN1-2, ktoré pripravil profesor Hogler Puchta (Nemecko). Jednalo sa o jedince s názvom *pPIN1-CRISPR-ΔlncRNA*. Ako kontrola bol využívaný genetický materiál získaný z rastlín *Arabidopsis thaliana* Col-0. V procese detekcie boli využívané primerové kombinácie pre detekciu proteínu PIN1 (9 + 10). Pri samotnej detekcii boli využívané 3 biologické replikáty a 3 technické replikáty. Intenzita expresie PIN1 u mutantov bola vyššia oproti kontrolnej vzorke (Graf 2). Z čoho vyplýva, že sledované lncRNA-PIN1-1 a lncRNA-PIN1-2 vykazujú vplyv na proteín PIN1 a v prípade ich neprítomnosti je jeho relatívna expresia nižšia, a preto môžeme tvrdiť že majú skôr utlmovací vplyv z hľadiska génovej expresie.



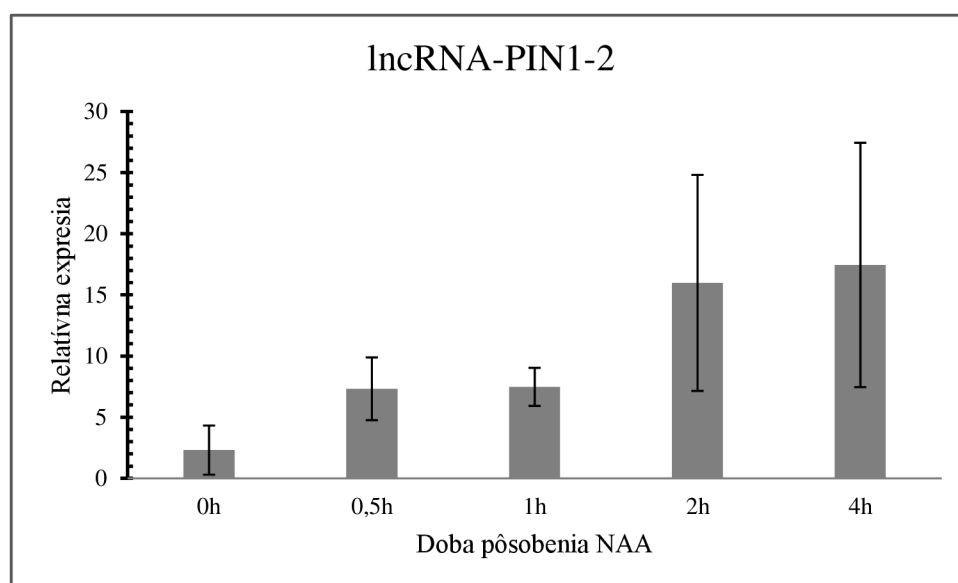
Graf 2 - Výsledné grafické vyhodnotenie analýzy qPCR pre detekciu množstva amplifikácie lncRNA-PIN1-1 (graf A) a PIN1 (graf B) u mutantných jedincov *Arabidopsis thaliana* pPIN1-CRISPR- Δ lncRNA. Graf vyobrazuje amplifikáciu za použitia primerových kombinácií 9 + 10 pre detekciu PIN1. Na osi X sú vynesené jednotlivé vzorky. Na osi Y sú uvedené hodnoty relatívnej expresie. V grafoch sú vyobrazené aj štandardné chybové úsečky.

4.1.6.3 qPCR pre detekciu množstva amplifikácie lncRNA-PIN1-1/2 u mutantov *hen2-4* za aplikácie exogénneho NAA

Analýza prebiehala z dôvodu nutnosti detekcie možného vplyvu fytohormónu na detekovanú lncRNA-PIN1-1. Keďže spomenutá lncRNA sa nachádza v promótorovej sekvencii génu pre auxín transportný proteín (PIN1) bolo dôležité zistiť, či samotná lncRNA-PIN1-1 vykazuje auxín - rezponzívne vlastnosti. Pred samotnou analýzou qPCR bol na jednotlivé vzorky aplikovaný NAA o 1 μ M koncentrácii. Jednotlivé vzory boli podrobené jeho pôsobeniu po rozličnú dobu trvania (0,5h , 1h, 2h, 4h). Ako negatívna kontrola boli využité jedince ktoré boli ponorené v $\frac{1}{2}$ MS⁻ tekutom médiu po dobu 4h. Amplifikácia prebiehala za použitia primerových kombinácií 31 + 32 (lncRNA-PIN1-1) a 37 + 38 (lncRNA-PIN1-2) (Tabuľka 1). Pre analýzu boli využité 3 biologické replikáty a pre každú biologickú vzorku 3 technické replikáty. Získané výsledky boli pretvorené do grafickej podoby. Výsledné hodnoty obsahujú znázornené aj úsečky pre štandardnú chybu. Na zaznamenaných výsledkoch - Graf 3 a Graf 4 je viditeľný nárast relatívnej expresie lncRNA-PIN1-1 a lncRNA-PIN1-2 oproti kontrolným vzorkám. Rast nie je konštantný, no je badateľný. Je možné teda tvrdiť, že exogénny NAA indukuje hodnoty relatívnej expresie lncRNA-PIN1-1 a lncRNA-PIN1-2 v pozitívnom zmysle.



Graf 3 - Výsledné grafické vyhodnotenie analýzy qPCR pre detekciu množstva amplifikácie lncRNA-PIN1-1 u mutantných jedincov *Arabidopsis thaliana hen2-4* po aplikácii exogénneho NAA s rozličnou dobou pôsobenia. Boli využitie primerové kombinácie 37 + 38 pre detekciu lncRNA-PIN1-1. Na osi X sú vynesené hodnoty doby pôsobenia exogénneho NAA. Na osi Y sú uvedené hodnoty relatívnej expresie. V grafoch sú vyobrazené aj štandardné chybové úsečky.



Graf 4 – Výsledné grafické vyhodnotenie analýzy qPCR pre detekciu množstva amplifikácie lncRNA-PIN1-2 u mutantných jedincov *Arabidopsis thaliana hen2-4* po aplikácii exogénneho NAA s rozličnou dobou pôsobenia. Boli využitie primerové kombinácie 33 + 34 pre detekciu lncRNA-PIN1-2. Na osi X sú vynesené hodnoty doby pôsobenia exogénneho NAA. Na osi Y sú uvedené hodnoty relatívnej expresie. V grafoch sú vyobrazené aj štandardné chybové úsečky.

5 DISKUSIA

Naším primárnym cieľom práce bolo pozorovať a analyzovať spomínané lncRNA. Vďaka prvotnej analýze, ktorou bolo mikroskopické pozorovanie sme boli schopní detekovať lokalizáciu sledovaných lncRNA ktorá bola podobná lokalizácii samotného PIN1 proteínu. Tento fakt bol pozorovaný už počas našej predošlej práce a na jeho existencii sa zakladala hypotéza, že lncRNA-PIN1-1 a lncRNA-PIN1-2 nesú funkciu ktorá súvisí s PIN1 proteínom. U oboch sledovaných línií (Obrázok 18, Obrázok 19) sme boli schopní detekovať dominantnú a výraznú lokalizáciu v nadzemných častiach a konkrétne vo vznikajúcich pravých listoch, to môže byť spôsobené faktom, že PIN1 je zapojený do vývoja listov aj v skorších štádiách (Scarpella & Helariutta, 2010) . No je významný aj v prípade regulácie tvorby novej žilnatiny v týchto orgánoch. Sila zafarbenia však neumožňovala presnú lokalizáciu vzhľadom na typ pletiva. Aj v koreňovom systéme dochádzalo k lokalizácii sledovaných lncRNA (Obrázok 18, Obrázok 19). V hlavnom koreni bolo možné detekovať sfarbenie v oblasti špičky koreňa a konkrétne v jeho deliacej zóne. Aj tu sa expresia PIN1 a lncRNA-PIN1-1, lncRNA-PIN1-2 stretáva. Jedná sa taktiež o typickú lokalizáciu PIN1 v koreňovom systéme (Obrázok 1), ktorej úlohou je transport auxínu regulovaným smerom (Wu et al., 2021). Druhým krokom bola analýza relatívnej expresie sledovaných lncRNA pomocou qPCR. Primárny experiment ale poukázal na fakt, že sledované lncRNA vysoko nestabilné. Pre ďalšiu prácu boli teda využité jedince druhu *Arabidopsis thaliana hen2-4*. V prípade qPCR analýzy sa nám podarilo detekovať iba jednu zo sledovaných lncRNA, ktorou bola lncRNA-PIN1-1 (Graf 1). V spomínanom mutantnom variante sme detekovali vyššiu relatívnu expresiu ako u jedincov ekotypu Col-0, a preto môžeme tvrdiť, že exosomálny komplex vykazuje vplyv na sledovanú lncRNA-PIN1-1.

V ďalšom kroku práce sme vďaka mikroskopickej analýze detekovali vplyv lncRNA na PIN1. U jedincov *pPIN1-ΔlncRNA::NLS-GFP-GUS* sme boli schopní detekovať vyššie intenzity farbenia, čo by mohlo naznačovať aj vyššiu abundanciu samotného PIN1 (Obrázok 21) a to tiež u väčšieho počtu sledovaných jedincov oproti líniám, ktoré lncRNA-PIN1-1 a lncRNA-PIN1-2 obsahovali (Obrázok 20). Domnienku vyššej abundancie sme sa rozhodli potvrdiť taktiež metódou qPCR. Kedy boli domnienky pravdivé a hodnoty relatívnej expresie PIN1 proteínu boli vyššie u jedincov *pPIN1-CRISPR-ΔlncRNA* ako u ekotypu Col-0 (Graf 2).

Keďže sme v predchádzajúcich častiach práce potvrdili existenciu vplyvu lncRNA na PIN1, ktorý je regulovaný auxínom, bolo potrebné zistiť, či aj samotné lncRNA môžu byť auxínom modulované. Na to slúžila detekcia relatívnej expresie lncRNA-PIN1-1 a lncRNA-PIN1-2 u jedincov, ktoré boli vystavené exogénemu NAA počas rozličnej doby pôsobenia. Relatívne hodnoty expresie v najkratšej a najdlhšej dobe inkubácie s fytohormónom vykazovali markantný nárast (Graf 3 a Graf 4). Čo ukazuje, že exogénna NAA má indukčný vplyv na hodnoty relatívnej expresie lncRNA-PIN1-1 a lncRNA-PIN1-2.

6 ZÁVER

Počas našej práce sa nám podarilo splniť požadované ciele, medzi ktoré patrila príprava rastlinného materiálu a následne štúdium lokalizácie a expresie lncRNA-PIN1-1 a lncRNA-PIN1-2 u rozličných línií rastlín druhu *Arabidopsis thaliana*. Za použitia genetických a mikroskopických metód sme boli schopní potvrdiť prítomnosť biologickej funkcie študovaných lncRNA. Presná charakteristika ako účel a typ tejto aktivity ale pre nás ostáva záhadou a je skôr predmetom ďalších analýz, kde by bolo potrebné definovať akým spôsobom sledované lncRNA naozaj interagujú. Či ich aktivita vykazuje interakcie s efektorovými proteínmi, alebo či sledované dlhé nekódujúce RNA majú teda skôr tendenciu interakcie s cieľovou DNA. A taktiež aké iné vedľajšie faktory majú schopnosť modelovať tento proces.

7 REFERENCIE

- Ariel, F., Jegu, T., Latrasse, D., Romero-Barrios, N., Christ, A., Benhamed, M., & Crespi, M. (2014). Noncoding transcription by alternative rna polymerases dynamically regulates an auxin-driven chromatin loop. *Molecular Cell*, *55*(3), 383–396. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.06.011>
- AT1G73590(PIN1)*. (n.d.). Retrieved April 27, 2024, from <https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=30683&type=locus>
- Aydın, E., Saus, E., Chorostecki, U., & Gabaldón, T. (2023). A hybrid approach to assess the structural impact of long noncoding RNA mutations uncovers key NEAT1 interactions in colorectal cancer. *IUBMB Life*, *75*(7), 566–579. <https://doi.org/10.1002/iub.2710>
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, *21*(3), 381–395. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>
- Beaulieu, Y. B., Kleinman, C. L., Landry-Voyer, A. M., Majewski, J., & Bachand, F. (2012). Polyadenylation-Dependent Control of Long Noncoding RNA Expression by the Poly(A)-Binding Protein Nuclear 1. *PLoS Genetics*, *8*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003078>
- Bell. (2017). 2018_Pnas_Si_Spe. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *120*(49), 2017. <https://doi.org/10.1073/pnas>
- Bennett, T., Brockington, S. F., Rothfels, C., Graham, S. W., Stevenson, D., Kutchan, T., Rolf, M., Thomas, P., Wong, G. K. S., Leyser, O., Glover, B. J., & Harrison, C. J. (2014). Paralogous radiations of PIN proteins with multiple origins of noncanonical PIN structure. *Molecular Biology and Evolution*, *31*(8), 2042–2060. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu147>
- Bilanovičová, V., Rýdza, N., Koczka, L., Hess, M., Feraru, E., Friml, J., & Nodzyński, T. (2022). The Hydrophilic Loop of Arabidopsis PIN1 Auxin Efflux Carrier Harbors Hallmarks of an Intrinsically Disordered Protein. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(11), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms23116352>
- Bridges, M. C., Daulagala, A. C., & Kourtidis, A. (2021). LNCcation: lncRNA localization and function. *Journal of Cell Biology*, *220*(2), 1–17. <https://doi.org/10.1083/JCB.202009045>
- Budak, H., Kaya, S. B., & Cagirici, H. B. (2020). Long Non-coding RNA in Plants in the Era of Reference Sequences. *Frontiers in Plant Science*, *11*(March), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00276>
- Cao, H., & Kapranov, P. (2022). Methods to Analyze the Non-Coding RNA Interactome—Recent Advances and Challenges. *Frontiers in Genetics*, *13*(March), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.857759>
- Cao, X., Yang, H., Shang, C., Ma, S., Liu, L., & Cheng, J. (2019). The roles of auxin biosynthesis YUCCA gene family in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(24), 8–10. <https://doi.org/10.3390/ijms20246343>
- Chen, L., Zhu, Q. H., & Kaufmann, K. (2020). Long non-coding RNAs in plants: emerging modulators of gene activity in development and stress responses. *Planta*, *252*(5), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03480-5>
- Cheng, S., & Wang, Y. (2022). Subcellular trafficking and post-translational modification regulate PIN polarity in plants. *Frontiers in Plant Science*, *13*(July), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.923293>
- Chujo, T., & Hirose, T. (2017). Nuclear bodies built on architectural long noncoding RNAs: Unifying principles of their construction and function. *Molecules and Cells*, *40*(12), 889–896. <https://doi.org/10.14348/molcells.2017.0263>

- Dobrev, P. I., Ružička, K., & Petrášek, J. (2024). *ER-located PINs generate potent auxin sinks driven by the IAA decarboxylation pathway*.
- Engelhard, H. H., Koshy, M., & Lakka, S. S. (2018). Histone Deacetylase Inhibitors as Therapeutic Agents for Patients with Brain Tumors. *Handbook of Brain Tumor Chemotherapy, Molecular Therapeutics, and Immunotherapy: Second Edition*, 383–396. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812100-9.00029-2>
- Geisler, M., Luschnig, C., Petrášek, J., Nodzyński, T., Zwiewka, M., Bilanovičová, V., & Seifu, W. (2019). *The Nuts and Bolts of PIN Auxin Efflux Carriers*. 10, 985. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00985>
- Glanc, M., Van Gelderen, K., Hoermayer, L., Tan, S., Naramoto, S., Zhang, X., Domjan, D., Včelařová, L., Hauschild, R., Johnson, A., de Koning, E., van Dop, M., Rademacher, E., Janson, S., Wei, X., Molnár, G., Fendrych, M., De Rybel, B., Offringa, R., & Friml, J. (2021). AGC kinases and MAB4/MEL proteins maintain PIN polarity by limiting lateral diffusion in plant cells. *Current Biology*, 31(9), 1918–1930.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.02.028>
- Gomes, G. L. B., & Scortecci, K. C. (2021). Auxin and its role in plant development: structure, signalling, regulation and response mechanisms. *Plant Biology*, 23(6), 894–904. <https://doi.org/10.1111/plb.13303>
- Grewal, S. I. S., & Moazed, D. (2003). Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science*, 301(5634), 798–802. <https://doi.org/10.1126/science.1086887>
- Guo, C. J., Xu, G., & Chen, L. L. (2020). Mechanisms of Long Noncoding RNA Nuclear Retention. *Trends in Biochemical Sciences*, 45(11), 947–960. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.07.001>
- Hajný, J., Tan, S., & Friml, J. (2022). Auxin canalization: From speculative models toward molecular players. *Current Opinion in Plant Biology*, 65, 102174. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2022.102174>
- Han, P., & Chang, C. P. (2015). Long non-coding RNA and chromatin remodeling. *RNA Biology*, 12(10), 1094–1098. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1063770>
- Hawkes, E. J., Hennelly, S. P., Novikova, I. V., Irwin, J. A., Dean, C., & Sanbonmatsu, K. Y. (2016). COOLAIR Antisense RNAs Form Evolutionarily Conserved Elaborate Secondary Structures. *Cell Reports*, 16(12), 3087–3096. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.045>
- Histones factory, Buy good quality Histones Products from China*. (n.d.). Retrieved April 27, 2024, from https://www.ks-vpeptide.com/histones?gad_source=1&gclid=CjwKCAjw7-SvBhB6EiwAwYdCATFZvOQ9rom0CUUpg4aMrLJytjcK4CAbh1erqu4O5W_iFW7ZFpGz4RoCdhQQAvD_BwE.
- Karakas, D., & Ozpolat, B. (2021). The role of lncRNAs in translation. *Non-Coding RNA*, 7(1), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ncrna7010016>
- Křeček, P., Skůpa, P., Libus, J., Naramoto, S., Tejos, R., Friml, J., & Zažímalová, E. (2009). Protein family review The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters - Křeček et al. - 2009 - Genome Biology.pdf. *GenomeBiology, Figure 1*, 1–11.
- Křeček, Pavel, 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>
- Lange, H., Zuber, H., Sement, F. M., Chicher, J., Kuhn, L., Hammann, P., Brunaud, V., Bérard, C., Bouteiller, N., Balzergue, S., Aubourg, S., Martin-Magniette, M. L., Vaucheret, H., & Gagliardi, D. (2014). The RNA Helicases AtMTR4 and HEN2 Target Specific Subsets of Nuclear Transcripts for Degradation by the Nuclear Exosome in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genetics*, 10(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004564>
- Leyser, O. (2018). Auxin signaling. *Plant Physiology*, 176(1), 465–479.

<https://doi.org/10.1104/pp.17.00765>

- Li, L., Eichten, S. R., Shimizu, R., Petsch, K., Yeh, C. T., Wu, W., Chettoor, A. M., Givan, S. A., Cole, R. A., Fowler, J. E., Evans, M. M. S., Scanlon, M. J., Yu, J., Schnable, P. S., Timmermans, M. C. P., Springer, N. M., & Muehlbauer, G. J. (2014). Genome-wide discovery and characterization of maize long non-coding RNAs. *Genome Biology*, *15*(2), 1–15. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r40>
- Li, S. B., Xie, Z. Z., Hu, C. G., & Zhang, J. Z. (2016). A review of auxin response factors (ARFs) in plants. *Frontiers in Plant Science*, *7*(FEB2016), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00047>
- LncRNA Transcriptional Control of Inflammatory Responses – lncRNA Blog*. (n.d.). Retrieved April 27, 2024, from <https://www.lncrnablog.com/lncrna-transcriptional-control-of-inflammatory-responses/>
- Lucero, L., Fonouni-Farde, C., Crespi, M., & Ariel, F. (2020). Long noncoding RNAs shape transcription in plants. *Transcription*, *11*(3–4), 160–171. <https://doi.org/10.1080/21541264.2020.1764312>
- Lucibelli, F., Valoroso, M. C., & Aceto, S. (2022). Plant DNA Methylation: An Epigenetic Mark in Development, Environmental Interactions, and Evolution. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(15). <https://doi.org/10.3390/ijms23158299>
- Luschnig, C., & Vert, G. (2014). The dynamics of plant plasma membrane proteins: PINs and beyond. *Development (Cambridge)*, *141*(15), 2924–2938. <https://doi.org/10.1242/dev.103424>
- Malakar, P., Shukla, S., Mondal, M., Kar, R. K., & Siddiqui, J. A. (2024). The nexus of long noncoding RNAs, splicing factors, alternative splicing and their modulations. *RNA Biology*, *21*(1), 1–20. <https://doi.org/10.1080/15476286.2023.2286099>
- Marques, S., & Outeiro, T. F. (2013). Epigenetics: Development and Disease. In *Epigenetics: Development and Disease*, (Vol. 61). <https://doi.org/10.1007/978-94-007-4525-4>
- Mateo-Bonmatí, E., Casanova-Sáez, R., & Ljung, K. (2019). Epigenetic regulation of auxin homeostasis. *Biomolecules*, *9*(10), 1–12. <https://doi.org/10.3390/biom9100623>
- Matsumoto, A., Pasut, A., Matsumoto, M., Yamashita, R., Fung, J., Monteleone, E., Saghatelian, A., Nakayama, K. I., Clohessy, J. G., & Pandolfi, P. P. (2017). mTORC1 and muscle regeneration are regulated by the LINC00961-encoded SPAR polypeptide. *Nature*, *541*(7636), 228–232. <https://doi.org/10.1038/nature21034>
- 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. *Molecular Plant*, *14*(6), 937–948. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.03.008>
- Nambara, E., & Van Wees, S. C. M. (2021). Plant hormone functions and interactions in biological systems. *Plant Journal*, *105*(2), 287–289. <https://doi.org/10.1111/tpj.15151>
- 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>
- Oyoshi, T., & Kurokawa, R. (2012). Structure of noncoding RNA is a determinant of function of RNA binding proteins in transcriptional regulation. *Cell and Bioscience*, *2*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-2-1>
- 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>
- Parsons, K. J., McWhinnie, K., Pilakouta, N., & Walker, L. (2020). Does phenotypic plasticity

- initiate developmental bias? *Evolution and Development*, 22(1–2), 56–70.
<https://doi.org/10.1111/ede.12304>
- Perrot-Rechenmann, C., & Napier, R. M. (2005). Auxins. *Vitamins and Hormones*, 72(04), 203–233. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(04\)72006-3](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(04)72006-3)
- Rahman, A., Takahashi, M., Shibasaki, K., Wu, S., Inaba, T., Tsurumi, S., & Baskin, T. I. (2010). Gravitropism of *Arabidopsis thaliana* roots requires the polarization of PIN2 toward the root tip in meristematic cortical cells. *Plant Cell*, 22(6), 1762–1776.
<https://doi.org/10.1105/tpc.110.075317>
- Rashid, F., Shah, A., & Shan, G. (2016). Long Non-coding RNAs in the Cytoplasm. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 14(2), 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.03.005>
- Salehi, S., Taheri, M. N., Azarpira, N., Zare, A., & Behzad-Behbahani, A. (2017). State of the art technologies to explore long non-coding RNAs in cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 21(12), 3120–3140. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13238>
- Sauer, M., & Grebe, M. (2021). Plant cell biology: PIN polarity maintained. *Current Biology : CB*, 31(9), R449–R451. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.03.070>
- Scarpella, E., & Helariutta, Y. (2010). Vascular Pattern Formation in Plants. *Current Topics in Developmental Biology*, 91(C), 221–265. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(10\)91008-9](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(10)91008-9)
- Scarpella, E., Marcos, D., Friml, J., & Berleth, T. (2006). Control of leaf vascular patterning by polar auxin transport. *Genes and Development*, 20(8), 1015–1027.
<https://doi.org/10.1101/gad.1402406>
- Schmitz, S. U., Grote, P., & Herrmann, B. G. (2016). Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(13), 2491–2509. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2174-5>
- Simon, S., Skůpa, P., Viaene, T., Zwiewka, M., Tejos, R., Klíma, P., Čarná, M., Rolčík, J., De Rycke, R., Moreno, I., Dobrev, P. I., Orellana, A., Zažímalová, E., & Friml, J. (2016). PIN6 auxin transporter at endoplasmic reticulum and plasma membrane mediates auxin homeostasis and organogenesis in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 211(1), 65–74.
<https://doi.org/10.1111/nph.14019>
- Sisi, N. A., & Růžička, K. (2020). Er-localized pin carriers: Regulators of intracellular auxin homeostasis. *Plants*, 9(11), 1–10. <https://doi.org/10.3390/plants9111527>
- Strohm, A., Baldwin, K., & Masson, P. H. (2013). Gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition* (Vol. 3). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00662-8>
- Sun, Y., Li, J., Zhang, L., & Lin, R. (2023). Regulation of chloroplast protein degradation. *Journal of Genetics and Genomics*, 50(6), 375–384.
<https://doi.org/10.1016/j.jgg.2023.02.010>
- Teras, L. R. (2017). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(10), 139–148. <https://doi.org/10.1177/1099800412444785>.Epigenetic
- Ung, K. L., Winkler, M., Schulz, L., Kolb, M., Janacek, D. P., Dedic, E., Stokes, D. L., Hammes, U. Z., & Pedersen, B. P. (2022). Structures and mechanism of the plant PIN-FORMED auxin transporter. *Nature*, 609(7927), 605–610. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04883-y>
- Wang, H., Wang, W., & Fan, S. (2022). Emerging roles of lncRNA in Nasopharyngeal Carcinoma and therapeutic opportunities. *International Journal of Biological Sciences*, 18(7), 2714–2728. <https://doi.org/10.7150/ijbs.70292>
- Wierzbicki, A. T., Blevins, T., & Swiezewski, S. (2021). Long Noncoding RNAs in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 72, 245–271. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-093020-035446>

- Wu, L., Wang, J. L., Li, X. F., & Guo, G. Q. (2021). Cytokinin-controlled gradient distribution of auxin in arabidopsis root tip. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8). <https://doi.org/10.3390/ijms22083874>
- Yang, X., Yang, M., Deng, H., & Ding, Y. (2018). New era of studying RNA secondary structure and its influence on gene regulation in plants. *Frontiers in Plant Science*, 9(May), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00671>
- Zhao, Z., Zang, S., Zou, W., Pan, Y. B., Yao, W., You, C., & Que, Y. (2022). Long Non-Coding RNAs: New Players in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms23169301>
- 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

ARF – transkripčné faktory

CM – cytoplazmatická membrána

DNA – deoxyribonukleová kyselina

eRNA – enhancerová RNA

GFP - zelený fluorescenčný proteín

GUS – β -glukuronidasa

IAA – kyselina indol-3-octová

LB – ľavý primer (F)

lncRNA – dlhá nekódujúca RNA

MS – Murashige – Skoog

NAA – kyselina 1-nafytloctová

ncRNA – nekódujúca RNA

NLS – nukleárny lokalizačný signál

PAT – polárny auxínový transport

PIN - PIN-FORMED proteíny

RB – pravý primer (R)

RNA – ribonukleová kyselina