

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Marko CHERSICOLA

**ANOTACIJA IN SEKVENČNA ANALIZA GENOV, UDELEŽENIH V  
POST-TRANSKRIPCISKEM UTIŠANJU PRI KROMPIRJU  
(*Solanum tuberosum* L.)**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**ANNOTATION AND SEQUENCE ANALYSIS OF GENES INVOLVED  
IN POST-TRANSCRIPTIONAL GENE SILENCING IN POTATO  
(*Solanum tuberosum* L.)**

GRADUATION THESIS  
University Studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija Biologije. Delo je bilo opravljeno v laboratoriju Nacionalnega inštituta za biologijo na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo.

Komisija za dodiplomski študij je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Kristino Gruden in za recenzentko doc. dr. Blagajano Herzog-Velikonja.

Komisija za oceno in zagovor:

- Predsednik: doc. dr. Jasna Dolenc Koce, univ. dipl. biol.  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Član: doc. dr. Blagajana Herzog-Velikonja, univ. dipl. biol.  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Član: prof. dr. Kristina Gruden, univ. dipl. biol.  
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

Datum zagovora: 21. 6. 2012

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Marko CHERSICOLA

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn  
DK UDK 582.926.2:577.21(043.2)=163.6  
KG utišanje RNA/ PTGS/krompir/virus PVY/sekvenčna analiza/analiza omrežja  
AV CHERSICOLA, Marko  
SA GRUDEN, Kristina (mentor)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo  
LI 2012  
IN ANOTACIJA IN SEKVENČNA ANALIZA GENOV, UDELEŽENIH V POST-TRANSKRIPCISKEM UTIŠANJU PRI KROMPIRJU (*Solanum Tuberosum L.*)  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP XI, 89 str., 11 pregl., 20 sl., 1 pril., 40 vir.  
IJ sl.  
JI sl./en.  
AI Krompir je ena najbolj dobičkonosnih poljščin na svetu. Ker je njegova udomačitev povzročila zmanjšano odpornost na patogene, skušajo znanstveniki razviti metode, s katerimi bi povečali odpornost krompirja. V ta namen se s pomočjo orodij systemske biologije skuša zbrati čim več informacij o mehanizmih same interakcije med rastlino in patogenom. Post-transkripcijsko utišanje genov (PTGS), je eden najpomembnejših mehanizmov zaščite rastlin pred virusnimi patogeni. Prva stopnja naše raziskave je bila zbiranje podatkov o genskih komponentah, vključenih v mehanizem PTGS. Sestavili smo ontologijo splošnega mehanizma utišanja RNA, kamor smo nato vključili različne komponente le tega. Zbrana zaporedja prepisov smo s pomočjo analize omrežij razvrstili v skupine na osnovi sekvenčne podobnosti. Študija je pokazala, da je sklepanje o sorodnosti zaporedij transkriptov zgolj na podlagi njihovih opisov lahko zmotno in da je za ta namen bolj primerna primerjava med samimi zaporedji, posebej če imamo opravka z velikim številom zaporedij. Povezava ontologije z ekspresijskimi podatki nam lahko pove, kaj se dogaja s komponentami PTGS med okužbo krompirja z virusom PVY. Najbolj diferencialno izraženi so bili prav homologni genovi AGO1, AGO2 ter AGO4 navadnega repnjakovca. Zaradi tega smo se odločili podrobneje analizirati ter klonirati le te. Število prepisov iz skupine AGO je bilo pri krompirju večje, v primerjavi z navadnim repnjakovcem. Le en transkript PGSC, skupaj z dvema unigenoma POI, je tvoril samostojno vejo na obrobju klada AGO4/AGO6/AGO9. Sekvenčna primerjava fragmentov z zaporedji krompirjevega genoma ni pokazala izrazite različnosti fragmenta gena AGO2 pri kultivarju Igor (99,3 % identičnosti z zaporedjem iz podatkovne baze PGSC), v primerjavi s fragmentom AGO2 iz kultivarja Desiree (99,9 % identičnosti z zaporedjem iz podatkovne baze PGSC).

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn  
DC UDC 582.926.2:577.21(043.2)=163.6  
CX RNA silencing/PTGS/potato/PVY/sequence analysis/network analysis  
AU CHERSICOLA, Marko  
AA GRUDEN, Kristina (supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Biology  
PY 2012  
TI ANNOTATION AND SEQUENCE ANALYSIS OF GENES INVOLVED IN  
POST-TRANSCRIPTIONAL GENE SILENCING IN POTATO (*Solanum  
Tuberosum* L.)  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO XI, 89 p., 11 tab., 20 fig., 1 ann., 40 ref.  
LA sl.  
AL sl./en.  
AB Potato is one of the most profitable crops in the world. Since its domestication resulted in reduced resistance against pathogens, scientists try to develop methods that would increase resistance of potato crops. For this purpose scientist, using the tools of systems biology, aim to collect as much information about the underlying mechanisms of interaction between plants and plant pathogens. In plants, posttranscriptional gene silencing (PTGS), is one of the most important mechanisms of defense against viral pathogens.  
The first stage of our study, was collecting the data on genetic components involved in PTGS. We constructed an ontology of the RNA silencing mechanism, in which we then integrate different components. We used a novel approach of network analysis to group the collected potato transcripts into categories based on sequence similarity. The study showed that sequence similarity cannot be inferred, just based on their descriptions, and that for this purpose, a direct comparison among the sequences is more appropriate, especially when we deal with a large number of sequences. The integration of expression data with our ontology, can tell us what is happening with the PTGS components, during infection with potato virus PVY. The most differentially expressed transcripts were homologues of *A. thaliana* AGO1, AGO2 and AGO4 genes. Therefore, we decided to clone them and analyze them in detail. The number of transcripts from the AGO group, was higher in potato compared to *A. thaliana*. Only one PGSC transcript, along with two POCI unigenes, formed an independent branch on the outskirts of the AGO4/AGO6/AGO9 klade. Sequence comparison of clonated fragments with the genome sequences of potato showed no marked differences between the AGO2 gene fragment from cultivar Igor (99.3 % identical to the sequence from the database PGSC), and the AGO2 gene fragment from cultivar Desireé (99.9 % identical to the sequence from the database PGSC ).

## KAZALO VSEBINE

	Ključna dokumentacijska informacija	III
	Key words documentation	IV
	Kazalo vsebine	V
	Kazalo preglednic	VII
	Kazalo slik	VIII
	Kazalo prilog	IX
	Okrajšave in simboli	X
1	<b>UVOD</b>	<b>1</b>
2	<b>PREGLED OBJAV</b>	<b>2</b>
2.1	INTERAKCIJE VIRUS - RASTLINA	2
2.1.1	<b>Replikacija virusov</b>	2
2.1.2	<b>Klasični obrambni mehanizmi rastlin proti virusnim patogenom</b>	2
2.2	UTIŠANJE RNA	3
2.2.1	<b>Nastanek vsiRNA</b>	6
2.2.2	<b>Modifikacije vsiRNA</b>	8
2.2.3	<b>Argonavti</b>	9
2.2.3.1	Funkcija Argonavtov	10
2.2.3.2	Domene proteinov AGO	11
2.2.3.3	Specifične funkcije posameznih Argonavtov	12
2.2.3.3.1	AGO1, miRNA ter sekundarna produkcija siRNA	12
2.2.3.4	Regulacija AGO proteinov	14
2.2.3.4.1	Transkripcijska regulacija	14
2.2.3.4.2	Post-transkripcijska regulacija	16
2.2.3.5	Vloga Argonavtov v interakciji virus-rastlina	16
2.2.4	<b>Komponente, ki sodelujejo v utišanju RNA</b>	17
2.3	KROMPIR IN PVY	18
3	<b>MATERIALI IN METODE</b>	<b>19</b>
3.1	MATERIALI	19
3.1.1	<b>Aparature uporabljene pri eksperimentalnem delu</b>	19
3.1.2	<b>Materiali uporabljeni pri eksperimentalnem delu</b>	19
3.1.3	<b>Programska oprema</b>	20
3.2	METODE	20
3.2.1	<b>Izbira ključnih besed ter iskanje po podatkovni bazi POCI</b>	20
3.2.1.1	Samodejni zajem nukleotidnih zaporedij iz baze POCI	21
3.2.2	<b>Bioinformatične analize nukleotidnih zaporedij</b>	21
3.2.2.1	Uporaba algoritma BLAST za iskanje dodatnih unigenov, vključenih v gensko utišanje	21
3.2.2.2	Uporaba algoritma BLAST in sekvenčne baze SwissProt za preverjanje anotacij	22
3.2.2.3	Uporaba algoritma BLAST in sekvenčne baze PGSC za pretvorbo unigenov v gene	22
	krompirja	23
3.2.3	<b>Analiza omrežij s programom Pajek</b>	23

3.2.3.1	Skupina AGO – kako so geni navadnega repnjakovca, predstavljeni v krompirju oziroma v podatkovnih bazah PGSC ter POCI	24
<b>3.2.4</b>	<b>Povezovanje ontologije izbranih genov s podatki o izražanju genov</b>	25
<b>3.2.5</b>	<b>Izbira genov na podlagi ekspresijskih podatkov</b>	25
<b>3.2.6</b>	<b>PCR – Verižna reakcija s polimerazo</b>	26
3.2.6.1	Izbira vzorcev z matrično DNA	26
3.2.6.2	Načrtovanje začetnikov za pomnoževanje AGO genov	26
3.2.6.3	Priprava reakcijskih mešanic	27
3.2.6.4	Programi PCR	28
<b>3.2.7</b>	<b>Agarozna elektroforeza</b>	29
3.2.7.1	Izolacija fragmentov DNA iz agaroznega gela	29
<b>3.2.8</b>	<b>Kloniranje fragmentov DNA krompirja v bakterijo <i>E. coli</i></b>	30
3.2.8.1	Čiščenje produktov PCR	30
3.2.8.2	Ligacija fragmentov v plazmid pJET	30
3.2.8.3	Transformacija kemijsko kompetentnih bakterij <i>E. coli</i>	31
3.2.8.4	Izolacija plazmidov	32
3.2.9	Določanje nukleotidnih zaporedij DNA krompirja	32
4	<b>REZULTATI</b>	33
4.1	ISKANJE KOMPONENT POST-TRANSKRIPCIJSKEGA UTIŠANJA PRI KROMPIRJU, NA PODLAGI KLJUČNIH BESED IZ LITERATURE	33
4.2	DODATNE KOMPONENTE PTGS, NAJDENE V SEKVENČNI BAZI POCI	34
4.3	PREGLED IN IZBOLJŠAVE ANOTACIJ, KOMPONENT PTGS	34
4.4	ZDRUŽEVANJE KOMPONENT PTGS V SKUPINE	35
4.5	IZRAŽANJE GENOV, KI SODELUJEJO PRI POST-TRANSKRIPCIJSKEM UTIŠANJU GENOV PRI KROMPIRJU PO OKUŽBI S PVY	46
4.6	PODROBNA SEKVENČNA ANALIZA SKUPINE ARGONAVTOV	55
4.7	KLONIRANJE FRAGMENTOV GENOV AGO1, AGO2 IN AGO4	59
<b>4.7.1</b>	<b>Načrtovanje začetnih oligonukleotidov</b>	59
<b>4.7.2</b>	<b>Kloniranje genov AGO1, AGO2 in AGO4</b>	67
<b>4.7.3</b>	<b>Zaporedja genov AGO2 in AGO4 iz različnih kultivarjev krompirja</b>	70
5	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	75
5.1	ISKANJE KOMPONENT PTGS PRI KROMPIRJU	75
5.2	PREVERJANJE ANOTACIJ ZBRANIH KOMPONENT PTGS	77
5.3	DOLOČANJE GENSKIH DRUŽIN KOMPONENT PTGS	77
5.4	EKSPRESIJSKA IN SEKVENČNA ANALIZA SKUPINE AGO	79
6	<b>POVZETEK</b>	83
7	<b>VIRI</b>	85

**ZAHVALA**  
**PRILOGE**

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Glavni proteini ter proteinske domene, ki se v literaturi pojavljajo v zvezi s PTGS. ....	17
Preglednica 2: Reakcijske mešanice za PCR s padajočo temperaturo prileganja. ....	27
Preglednica 3: Reakcijske mešanice za PCR na osnovi kolonije. ....	28
Preglednica 4: PCR programi. ....	29
Preglednica 5: Priprava ligacijska mešanice. ....	30
Preglednica 6: Ontologija komponent mehanizma RNA utišanja. ....	33
Preglednica 7: Povezava ontologije z analizo omrežij. ....	37
Preglednica 8: Ekspresijski podatki izbranih POCI unigenov, po okužbi krompirja s PVY. .	47
Preglednica 9: Transkripti AGO genov navadnega repnjakovca ter krompirja. ....	56
Preglednica 10: Sestava sosesk. ....	59
Preglednica 11: Lastnosti začetnikov za pomnoževanje fragmentov krompirjevih genov AGO. ....	60

## KAZALO SLIK

Slika 1: Shema glavnih regulatornih poti RNA utišanja pri navadnem repnjakovcu.....	6
Slika 2: Primerjava post-transkripcijskega in transkripcijskega genskega utišanja. ....	11
Slika 3: Primerjava utišanja RNA z 21 ter 22 nukleotidov dolgimi miRNA. ....	14
Slika 4: Shematski prikaz tvorbe skupin na podlagi rezultatov algoritma BLAST. ....	24
Slika 5: Shematska slika postavitve začetnikov na gen.....	26
Slika 6: Analiza omrežij POCI_vs_POCI.. ....	36
Slika 7: Analiza omrežij POCI_vs_DMT.....	37
Slika 8: Drevo poravnave transkriptov AGO. ....	58
Slika 9: Načrtovanje začetnikov za AGO1.....	61
Slika 10: Načrtovanje začetnikov za AGO2.....	64
Slika 11: Načrtovanje začetnikov za AGO4.....	66
Slika 12: Pomnoževanje AGO genov s PCR.....	67
Slika 13: Relativna kvantifikacija koncentracije očiščenih fragmentov. ....	68
Slika 14: Preverjanje prisotnosti fragmentov v plazmidih. ....	69
Slika 15: Preverjanje vseh vzorcev izoliranih plazmidov, za prisotnost fragmentov AGO2 in AGO4.. ....	70
Slika 16: Poravnava zaporedij gena AGO2 kultivarjev Igor in Desireé.....	72
Slika 17: Poravnava zaporedja gena AGO4 kultivarja Igor. ....	74



## KAZALO PRILOG

Zgoščenska

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

- AGO – Argonavt (ang. Argonaute)
- BLAST – Basic Local Alignment Search Tool
- CaLCuV – virus kodrastih listov zelja (cabbage leaf curl virus)
- CaMV – mozaični virus cvetače (ang. cauliflower mosaic virus)
- CDS – klodirajoča sekvenca (ang. coding sequence)
- CFP – cian fluorescentni protein (ang. cyan fluorescence protein)
- CIRV – »carnation italian ringspot virus«
- DCL – »dicer-like«
- DRB – dvoverižne RNA vezajoči protein (ang. double strand RNA binding protein)
- EST – oznaka izraženega zaporedja (ang. expressed sequence tag)
- GUS – beta glukoronidaza (ang. beta-glucuronidase)
- HcPro – »helper component protein«
- HEN – »hua enhancer«
- HR – preobčutljivostni odgovor (ang. hypersensitive response)
- HYL – hipostatični listi (ang. hypostatic leafs)
- KH – »K homology«
- LAR – lokalno pridobljena rezistenca (ang. local acquired resistance)
- logFC – »logaritmik fold change«
- NAT – naravno pojavljajoči se prepisi (ang. natural occurring transcripts)
- ORF – odprti bralni okvir (ang. open reading frame)
- PAZ – »Piwi and Zwiile«
- PGSC – »Potato Genome Sequencing Consortium«
- POCI – »Potato Oligo Chip Initiative«
- PTGS – post-transkripcijsko utišanje genov (ang. post-transcriptional gene silencing)
- PVX – krompirjev virus X (ang. potato virus X)
- PVY – krompirjev virus Y (ang. potato virus Y)
- RDR – od RNA odvisna RNA polimeraza (ang. RNA dependent RNA polymerase)
- RdRp – virusna od RNA odvisna RNA polimeraza (ang. viral RNA dependent RNA polymerase)
- RISC – z RNA induciran kompleks utišanja (ang. RNA induced silencing complex)

SAR – sistemsko pridobljena rezistenca (ang. systemic acquired resistance)

SDE – »silencing defective«

SGN – »SOL Genomics Network«

SGS – supresor genskega utišanja (ang. supressor of gene silencing)

SNP – polimorfizem posameznega nukleotida (ang. single nucleotide polymorphism)

TCV – zgubani virus repe (ang. turnip crinkle virus)

TGS – transkripcijsko utišanje genov (ang. transcriptional gene silencing)

TMV – mozaični virus tobaka (ang. tobacco mosaic virus)

VPg – na virusni genom vezan protein (ang. viral protein genom-linked)

YFP – rumeni fluorescentni protein (ang. yellow fluoesence protein)

## 1 UVOD

Post-transkripcijsko utišanje genov (PTGS) je v rastlinskem svetu, izredno pomemben mehanizem, ki omogoča transkripcijsko homeostazo znotraj rastlinske celice, vodi razvoj rastline ter omogoča zaščito proti virusnim patogenom. Kljub močnemu napredku znanosti na tem področju, je naše znanje o ključnih regulatornih komponentah ter mehanizmih, ki vodijo prepoznavo specifične vrste prepisa ter nadaljnje usmerjanje mehanizma genskega utišanja, še dokaj omejeno. Razpoložljivi podatki izvirajo predvsem iz raziskav, narejenih na navadnem repnjakovcu (*Arabidopsis thaliana* L.), kateri, kot modelni organizem seveda dobro služi namenu.

Čeprav so določeni procesi znotraj rastlinskega sveta zelo ohranjeni, so razlike med modelno rastlino ter rastlinami v komercialni uporabi lahko ogromne. Prav te razlike so običajno najbolj izrazite na ravni genoma.

Krompir (*Solanum tuberosum* L.) spada med najbolj uporabljene ter dobičkonosne poljščine na svetu in zaseda prvo mesto med dvokaličnicami. V primerjavi z njihovimi divjimi sorodniki, so današnje sorte veliko manj odporne na patogene, kot je na primer PVY (krompirjev virus Y), kar prinaša celo vrsto ekonomskih težav.

Zaradi tega smo se odločili, da bomo naredili raziskavo na krompirju, s katero bi nekoliko razširili obstoječe znanje glede PTGS pri tem organizmu, kar je pomembno za razumevanje interakcije med to poljščino in njenimi virusnimi patogeni.

Namen diplomskega dela je bil poiskati gene, udeležene v mehanizmu PTGS pri krompirju, jih na podlagi sestavljene ontologije smiselno razporediti v skupine glede na njihovo funkcijo, narediti podrobno sekvenčno analizo ene skupine ter klonirati nekatere predstavnike iz različnih krompirjevih kultivarjev za podrobnejše sekvenčne analize in nadaljnje funkcijske analize. Osredotočili smo se na gene iz skupine AGO (ang. Argonaute), saj smo pri njih opazili velike spremembe v izražanju po okužbi krompirja s PVY, ter zaradi njihove sredinske vloge v mehanizmu PTGS.

## **2 PREGLED OBJAV**

### **2.1 INTERAKCIJE VIRUS - RASTLINA**

Virusi so obvezni znotrajcelični zajedavci, ki se razmnožujejo s pomočjo struktur gostiteljske celice, od katere niso ločeni ne s posebno membrano ne s celično steno. Tako intimen odnos med gostiteljem in virusom sooča rastline z izzivi, ki so drugačni v primerjavi s celičnimi patogeni, kot so glive, oomicete ter bakterije. Prav ti izzivi so vplivali na ko-evolucijo rastlin in virusov na način, ki ni podoben nobenemu drugemu odnosu med rastlino in njenim patogenom (Lewsey et al., 2009).

#### **2.1.1 Replikacija virusov**

Večina rastlinskih virusov (npr. Potyvirusi ter Cucumovirusi) ima RNA genome, katerih večina je pozitivno usmerjenih enoverižnih molekul RNA. Replikacija teh virusov potrebuje aktivnost od RNA odvisne RNA polimeraze (v nadaljevanju RdRp), ki jo nudi replikazni kompleks, sestavljen tako iz virusnih kakor gostiteljskih proteinov. Replikacija poteka preko sinteze negativno usmerjene komplementarne molekule RNA. Za nekatere RNA viruse je potrebna pri iniciaciji sinteze komplementarne verige prisotnost kratke molekule RNA, ki deluje kot začetni oligonukleotid za virusno RdRp. Replikazni kompleksi se sestavijo na znotrajceličnih membranah, ki se modificirajo na tak način, da nudijo optimalne razmere za sintezo virusne genomske RNA ter mRNA. Modifikacija membran omogoča tudi zaščito pred gostiteljevimi nadzornimi ter zaščitnimi mehanizmi, posebej tistimi, ki delujejo na osnovi utišanja RNA. Nekateri rastlinski virusi imajo tudi DNA genome, med katerimi so najboljše preučeni geminivirusi ter caulimovirusi (Lewsey et al., 2009)

#### **2.1.2 Klasični obrambni mehanizmi rastlin proti virusnim patogenom**

Pred odkritjem utišanja RNA ter njegove vloge pri obrambi rastlin, so obravnavali odpornost proti virusom predvsem kot genetsko determiniran pojav. Take mehanizme obrambe lahko v splošnem delimo na »pasivne« ali že obstoječe ter »aktivne« oziroma inducibilne procese.

Pasivna odpornost je lahko posledica pomanjkanja enega ali več gostiteljevih faktorjev, potrebnih za virusno replikacijo ali premikanje. Druga možnost je, da obstaja fizična

prepreka, ki onemogoča inokulacijo (npr. celična stena, kutikola, listni laski) z mehansko poškodbo ali prenosom s pomočjo žuželk ter drugih vektorjev. V nasprotju pa se aktivni mehanizmi sprožijo ob infekciji s patogenom. Najbolje preučeni primer aktivne obrambe je preobčutljivostni odgovor ali HR (ang. hypersensitive response). V primeru preobčutljivostnega odziva na okužbo z virusom, ostane virus izoliran v začetno okuženih celicah, nakar pogosto, a ne vedno, sledi programirana celična smrt okuženih celic. HR poleg omejitve virusa na določeno področje, sproži tudi povečano odpornost tkiva v okolici lezije, kar imenujemo tudi lokalno pridobljena odpornost ali LAR, ali skozi celotno rastlino, čemur pravimo sistemsko pridobljena odpornost ali SAR. Rastline z LAR ali SAR kažejo manjše občutljivosti ne samo do patogena, ki je sprožil HR, ampak tudi v splošnem. Tako lahko na primer SAR, ki ga je sprožila gliva, nudi odpornost proti virusom in obratno.

Celična smrt ob HR ni bistvena za odpornost proti virusom. Dokazi za to vključujejo opazovanja, da izčrpavanje kisika inhibira celično smrt v tobaku, ki je posledica HR na inokulacijo s TMV ter, da pri omejitvi gibanja virusa PVX pri krompirju ni nikakršne celične smrti, povezane z rezistenčnim odgovorom. Kljub temu pa virus ostane omejen na območje primarne okužbe (Lewsey et al., 2009).

## 2.2 UTIŠANJE RNA

Prvi dokazi, da lahko umetno vnešene RNA molekule vplivajo na funkcijo endogenih genov nekega organizma so prišli iz študije, narejene na glisti *Caenorhabditis elegans*. Šele kasneje so pojav potrdili tudi na drugih organizmih in ker je imel predvsem inhibitoren učinek na ekspresijo genov, so pojav imenovali utišanje RNA oziroma »RNA silencing«.

Biokemijske ter genetske analize v zadnjih letih so pokazale, da je regulacija zaviranja genov na ravni utišanja RNA splošno razširjena med evkarionti. Tako utišanje genov lahko deluje na različnih ravneh, in sicer na ravni post-transkripcijske regulacije (v nadaljevanju PTGS), RNA-usmerjene DNA metilacije ter preoblikovanja kromatina. Neposredno vlogo v teh procesih imajo tako imenovane sRNA molekule (short RNAs), ki so oligonukleotidi RNA, dolgi od 19 do 25 baznih parov.

Na podlagi njihovega izvora, strukture, proteinov s katerimi se povezujejo ter njihove biološke vloge so jih razporedili v tri glavne skupine: kratke ovirajoče RNA (ang. short interfering RNAs, siRNAs), mikro RNA (miRNAs) in Piwi-interakcijske RNA (Piwi-interacting RNAs, piRNAs). siRNA ter miRNA so tako iz filogenetskega kakor tudi fiziološkega vidika močno razširjene med živalmi ter rastlinami. Poleg tega imajo značilne dvoverižne prekursorje, ki jih predstavniki piRNA nimajo. Le-ti so značilni le za živali, pri muhi *Drosophila melanogaster* imajo namreč regulatorno vlogo v somatskih celicah ter celicah klične linije. Poleg naštetih razlik se te tri skupine RNA molekul razlikujejo, tudi po različnih proteinih, s katerimi se povezujejo. Molekule siRNA in miRNA se povezujejo s proteini iz podskupine AGO, skupine Argonautov, molekule piRNA pa s proteini iz podskupine Piwi.

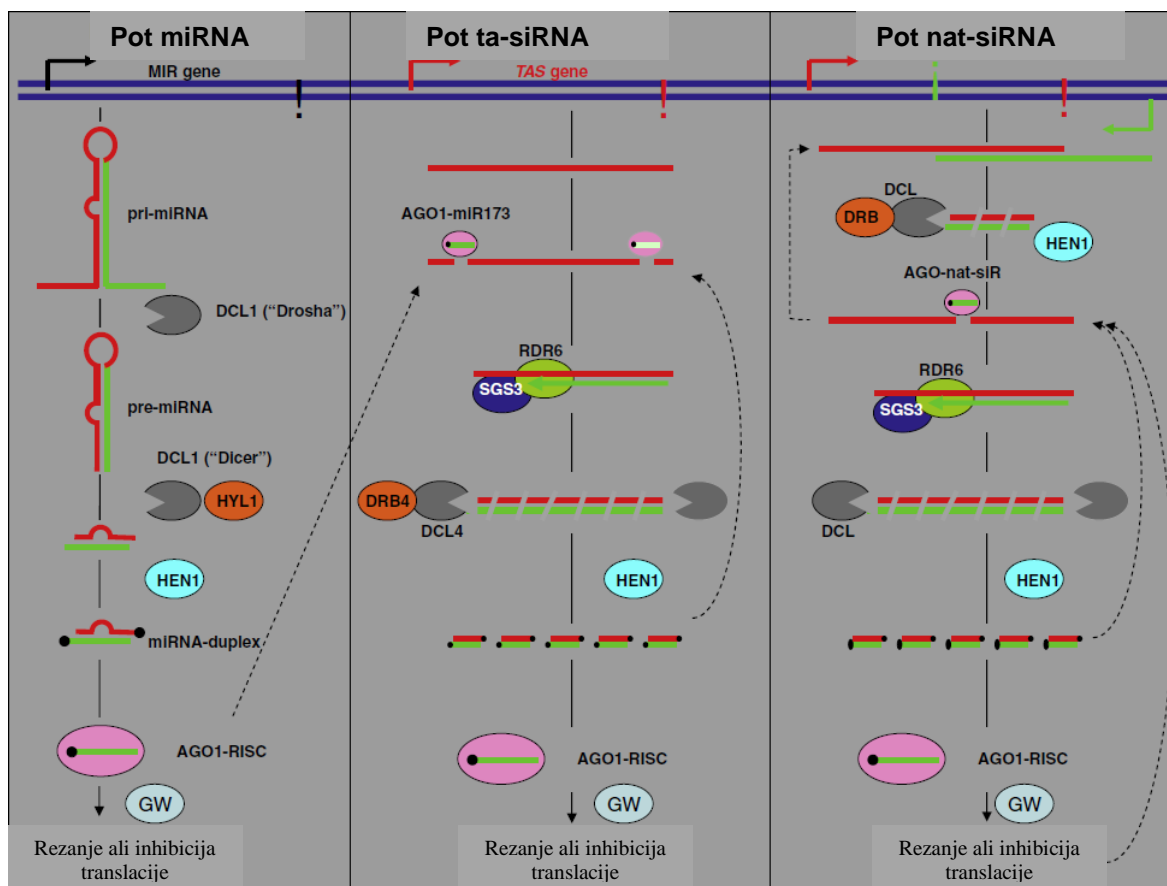
Na podlagi biogeneze ter njihove biološke vloge se pri rastlinah molekule siRNA dodatno delijo na podskupine, kot so: trans-delujoče siRNA (ang. trans-acting siRNA, ta-siRNAs), naravne cis-delujoče siRNA (ang. natural cis-acting siRNAs, nat-siRNAs) in heterokromatske siRNA (ang. heterocromatic siRNAs, hc-siRNAs, ki so udeležene v transkripcijskem utišanju genov). Zaradi analogije z endogenimi molekulami siRNA, so oligonukleotide virusnega izvora, ki nastanejo ob okužbi rastline z virusnim patogenom, poimenovali kar virusne kratke ovirajoče RNA ali s kratico vsiRNA (viral short interfering RNA) (Pantaleo, 2011).

Na sliki 1 je prikazana shematska predstavitev glavnih treh presnovnih poti utišanja RNA, ki nastopajo pri rastlinah: (i) pot miRNA, (ii) pot ta-siRNA ter (iii) pot nat-siRNA (Hohn Vazquez, 2011).

- (i) Pot miRNA: molekule miRNA kodirajo geni *MIR*, katerih produkt je zanka RNA (pri-miRNA). Zanko nato obdela protein DCL1, kateri s pomočjo dodatnih proteinov (HYL1, HEN1), izdelava dupleks RNA. Vodilna veriga tega dupleksa se nato vgradi v protein AGO1.

- (ii) Pot ta-siRNA: molekule ta-siRNA kodirajo geni *TAS*, katerih transkripti vsebujejo 5' kapo ter poliA rep. Ti transkripti predstavljajo tarčo za specifične molekule miRNA, katere v povezavi z AGO1 vodijo cepitev transkripta. Po cepitvi pride do vezave proteina SGS (ang. »Supressor of gene silencing«) ter proteinov RDR6 (od RNA odvisne RNA polimeraze), kateri poskrbijo za nastanek komplementarne verige RNA. Nato DCL4 razreže veliko dvoverižno molekulo na več majhnih duplesov RNA.
  
- (iii) Pot nat-siRNA: nat-siRNA molekule nastanejo s prekrivanjem dveh naravno protismernih transkriptov (NAT=natural antisense transcript). Dvoverižno strukturo lahko nato neposredno obdelajo proteini DCL tako, da ob tem nastanejo duplesi RNA. V povezavi s proteini AGO, vodilne verige duplesov RNA vodijo amplifikacijo signala utišanja, na podoben način, kakor pri poti ta-siRNA. Tako se ob izražanju protismernega transkripta, utiša izražanje pravilno usmerjenega.





Slika 1: Shema glavnih regulatornih poti RNA utišanja pri navadnem repnjakovcu. Shema prikazuje pot miRNA, ta-siRNA ter nat-siRNA. Krogec s črkama GW, predstavlja potencialni protein s katerim lahko AGO1 interagira. Za razlago ostalih kratic glej preglednico 1. Privzeto po Hohn & Vazquez, 2011

### 2.2.1 Nastanek vsiRNA

Pri rastlinah, je prvi korak virusno-induciranega genskega utišanja nastanek kratkih molekul RNA, katerih vir je prav virusna RNA. Ključ do nastanka takih oligonukleotidov RNA so rastlinski encimi DICER.

Slednji so endonukleaze tipa III, ki specifično cepijo dvovertično ter enoverično RNA, slednjo le v regijah, kjer zaradi zanke pride do nastanka dvovertične strukture (Hammond, 2005). Matrice za nastanek vsiRNA so običajno dvovertični intermediati RNA, nepopolne zanke, prekrivajoči se smerni/protismerni prepisi, nastali iz krožnih genomov enoveričnih DNA ter obsežna sekundarna struktura policistronske 35S RNA pri virusih z dvovertično DNA.

Genom navadnega repnjakovca (*Arabidopsis thaliana*) kodira štiri proteine Dicer-like (v nadaljevanju DCL), ki so vključeni tako v endogeno regulacijo, kakor tudi v protivirusno gensko utišanje. DCL1 sodeluje v produkciji 21 bp dolgih miRNA, medtem ko so DCL4, DCL2 in DCL3 vključeni v nastajanje 21, 22 oziroma 24 nukleotidov (nt) dolgih oligonukleotidov. Proteini DCL imajo pomembno vlogo v post-transkripcijski in transkripcijski regulaciji genov ter imajo tudi specifične substrate dvoverižne RNA. Rezultati številnih raziskav kažejo na to, da obstaja med naštetimi proteini DICER funkcionalna redundanca ter določena stopnja hierarhičnega delovanja, kar seveda odkriva veliko bolj zapleten sistem regulacije utišanja RNA, kot je bilo na začetku predpostavljeno (Pantaleo, 2011).

Podatki pridobljeni s kloniranjem in sekvenciranjem malih RNA (sRNA) kažejo na to, da so substrat za dejavnost DICER-jev večinoma sekundarne strukture znotraj enoverižne RNA virusnega genoma. Obstoj dolge dvoverižne oblike oz. intermediata namreč še ni bil dokazan *in vivo*.

Genetski pristopi so pokazali, da proteini DCL lahko med seboj kompenzirajo pomanjkanje določenega člana med produkcijo vsiRNA. Za oba razreda DNA virusov se zdi, da DCL1 sodeluje z drugimi DICER-ji pri izdelavi 21 nt dolgih vsiRNA. DCL1 učinkovito izdeluje 21 nt dolge vsiRNA tudi, ko DCL4 ni funkcionalen, v primeru CaMV-a pa celo moti akumulacijo vsiRNA, ki jih izdelujejo DCL4 in DCL3 iz 35S policistronske RNA. Pred kratkim so Rodríguez-Negrete in sodelavci predložili dokaze, da izvirajo 21 in 22 nt dolge siRNA iz kodirajočih regij, medtem ko 24 nt dolge siRNA izvirajo iz medgenskih regij virusa »Pepper golden mosaic geminivirus« (Rodríguez-Negrete et al., 2009).

Glavna vloga DCL4, manjša vloga DCL2 ter majhna oziroma manjkajoča aktivnost DCL3 in DCL1 v protivirusnem razkosavanju (ang. dicing), vsaj kar se tiče RNA virusov, potrebuje nadaljnje raziskave. Kljub temu, da vsi DCL-ji vsebujejo vse potrebne domene RNase III za izvajanje svoje dejavnosti, delujejo kot komponente večjih proteinskih kompleksov, v katerih kofaktorji, ki nosijo dsRNA vezavne domene, lahko močno vplivajo

na njihovo vezavno afiniteto do dvoverižnih struktur RNA na virusnem genomu (Pantaleo, 2011).

Pri navadnem repnjakovcu sta boljše poznana dva od štirih proteinov DRB (ang. dsRNA binding protein). Proteini DRB, posredujejo vezavo proteinov DCL na dvoverižno RNA, tako da se sami vežejo nanjo, nato pa nase vežejo protein DCL. DRB1 sodeluje z DCL1, DRB4 pa sodeluje z DCL4. DRB4 se nahaja v jedru celice, kjer naj bi bil vključen v protivirusne strategije rastline proti dvoverižnim DNA ter RNA virusom.

Različne afinitete DCL-jev do svojih dsRNA substratov, so lahko tudi posledica podobne subcelične namestitve obeh komponent. Poglavitna vloga DCL3 pri protivirusni dejavnosti v primeru okužbe z dvoverižnim DNA virusom, ki se razmnožuje v jedru, ter njegova obrobna vloga pri okužbi z virusi, ki se razmnožujejo v citoplazmi, dokazuje ravno to.

Ni pa še jasno, zakaj so kljub temu, da se večina rastlinskih virusov razmnožuje v citoplazmi, vsi štirje proteini DCL pri repnjakovcu lokalizirani v jedru. Kako torej ti jedrni encimi pridejo do svojih substratov v citoplazmi, ostaja še vedno uganka. Ena od domnev je ta, da pride zaradi patoloških sprememb v organizaciji membran ter membranskega prometa med celičnimi organeli, do spremembe v lokalizaciji proteinov znotraj celice. V takem primeru bi bilo možno, da se Dicerji iz jedra premaknejo v citoplazmo, kjer so tudi njihovi virusni substrati (Pantaleo, 2011).

### **2.2.2 Modifikacije vsiRNA**

Produkti proteinov Dicer so majhne dvoverižne molekule RNA s 3'-2 nt prostimi konci na vsaki strani. Po cepitvi, so vse rastlinske sRNA podvržene metilaciji 3'-terminalnega nukleotida na 2'-hidroksilni skupini, ki jo posreduje protein HUA ENHACER 1 (HEN1). Specifično prepoznavo substratov sRNA in potek metilacije 3' konca so pred kratkim razvozlali s pomočjo kristalne strukture proteina HEN1 pri navadnem repnjakovcu. Metilacija miRNA ter siRNA zaščiti slednje pred uridilacijo 3' konca ter posledično 3'-proti-5' eksonukleazno razgradnjo. Metilacijski status sRNA lahko določimo s tretiranjem RNA z natrijevim periodatom ter nadaljnjo  $\beta$ -eliminacijo. Pri molekulah sRNA z 2' ter 3' prostimi hidroksilnimi skupinami pride po takem tretmaju do odstranitve zadnjega

nukleotida in posledične hitrejše migracije v gelu (Pantaleo, 2011). Akbergenov in kolegi so predložili prve dokaze, da HEN1 posreduje metilacijo vsiRNA pri navadnem repnjakovcu (Akbergenov et al., 2006). Rastline *hen1*, okužene s CaLCuV, so imele signifikantno manjšo akumulacijo 21, 22 in 24 nt dolgih vsiRNA, slednje pa so bile občutljive za  $\beta$ -eliminacijo. Zmanjšana akumulacija potrjuje domnevo o vlogi metilacije na večjo stabilnost duplesov RNA v celici.

Nekateri virusni proteini delujejo kot inhibitorji utišanja tako, da vežejo sRNA in zaradi strukturne ovire, onemogočijo njeno metilacijo. Taka proteina sta na primer HcPro pri Tobacco etch virus-u ter p19 pri virusu CIRV (Pantaleo, 2011).

### 2.2.3 Argonavti

Proteini iz družine »ARGONAUTE« (AGO) so velike molekule (približno 90 -100 kDa), ohranjene pri vseh evkariontih. Sestavljeni so iz variabilne N-terminalne regije ter konzervativne C- terminalne regije, v katerih so domene PAZ, MID ter PIWI. Domeni PAZ in MID vežeta 3' ter 5' fosfatni konec, medtem ko ima domena PIWI RNase H podobno endonukleazno aktivnost, ki cepi molekule ssRNA v regiji, komplementarni vodilni siRNA. Pri repnjakovcu je družina AGO sestavljena iz 10 članov, med katerimi je najboljše opisan AGO1 (Pantaleo, 2011).

Na podlagi njihovih funkcionalnih domen, lahko delimo evkariontske proteine ARGONAUTE v dve večji skupini: poddružini AGO ter PIWI. Ustanovni član skupine proteinov AGO pri navadnem repnjakovcu je AGO1, katerega so odkrili med preučevanjem genov, vključenih v rast in razvoj rastline. Zaradi posebne oblike listov pri mutantah *ago1*, ki so spominjali na lovke lignja argonavta, so tako imenovali tudi ta protein. Kmalu po njegovi karakterizaciji, je bila odkrita ključna vloga proteinov AGO v mehanizmu genskega utišanja, ki ga vodijo molekule sRNA, pri različnih organizmih. Število kodiranih proteinov AGO, je med organizmi zelo različno. Vsi rastlinski proteini AGO, so iz poddružine AGO. Filogenetska analiza desetih proteinov AGO pri navadnem repnjakovcu jih razvršča v tri večje veje. V eni veji so AGO1, AGO10 ter AGO5; v drugi AGO2, AGO3 in AGO7; v tretji pa AGO4, AGO6, AGO8 ter AGO9. Taka razdelitev je

bila narejena na podlagi podobnosti med proteini, kar pa še ne zagotavlja njihove funkcionalne podobnosti. (Mallory & Vaucheret, 2010)

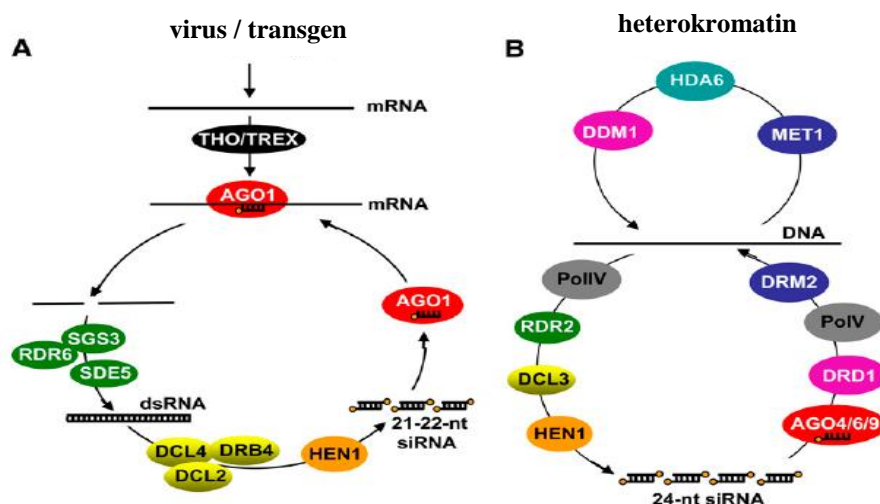
### 2.2.3.1 Funkcija Argonavtov

Dve komponenti sestavljata bistveni del od RNA odvisnega kompleksa utišanja. To sta majhna enoverižna molekula RNA (sRNA) ter protein AGO. Molekula RNA deluje kot specifično vodilo za protein AGO do komplementarnega ali semi-komplementarnega zaporedja, ki ga nato utiša oziroma regulira njegovo ekspresijo, bodisi z vezavo ali cepitvijo.

Zaradi običajno večje komplementarnosti med sRNA in tarčno dsRNA, ki jo kompleks nato cepi, kakor med sRNA in tarčno dsRNA, ki se nanj le veže, je bila predlagana domneva, po kateri naj bi specifičnost sRNA do svoje tarče določevala regulatorno pot, v katero se bo le ta vključila (Schwab & Voinnet, 2010).

Zaradi vedno večjega števila izjem pa se ta domneva nekako opušča. Zadnje raziskave namreč kažejo na to, da naj bi bil ključen signal sama dolžina sRNA, ki se veže na protein AGO, ter posledično spremeni njegovo konformacijo na bolj ali manj izrazit način. Pri navadnem repnjakovcu, katerega poti utišanja RNA so obsežno raziskane, so proteini AGO ter sRNA specifične dolžine (21 nt, 22 nt, 24 nt) vključeni tako v post-transkripcijsko kakor tudi transkripcijsko gensko utišanje (v nadaljevanju TGS) (slika 2).

Kompleksi, ki delujejo v okviru TGS, vključujejo AGO4, AGO6 ali AGO9 ter 24 nt dolge molekule sRNA. V nasprotnem primeru pa kompleksi, ki delujejo v okviru PTGS, vključujejo proteine AGO1 in AGO7 (oba sposobna cepitve RNA) ter njim pripadajoče 21 nt do 22 nt dolge sRNA. AGO10 je vključen v transkripcijsko kontrolo nekaterih tarč miRNA, med katerimi je tudi AGO1. Sam potek te kontrole še ni znan, saj za AGO10 še ni bilo dokazane kakršnekoli asociacije z molekulami sRNA (Mallory & Vaucheret, 2010).



Slika 2: Primerjava post-transkripcijskega in transkripcijskega genskega utišanja. Slika prikazuje regulacijske zanke utišanja RNA v primeru okužbe z virusom, ali utišanja gena na ravni kromatina. Za natančnejši opis komponent glej preglednico 1. Privzeto po Mallory & Vaucheret, 2010

### 2.2.3.2 Domene proteinov AGO

Proteini AGO so definirani s tremi glavnimi funkcionalnimi domenami. To so domene PAZ, MID in PIWI. N-terminalna regija je variabilna, kar omogoča lažjo separacijo dupleksa med sRNA in njeno tarčo po cepitvi, ter vsebuje domeno PAZ, ki dokazano veže 3' konec sRNA. C-terminalna regija vsebuje MID in domeno PIWI, ki lahko s pomočjo vezavnega žepa med njima vežeta 5' konec molekule sRNA. Skupaj vse tri domene sodelujejo pri vzpostavljanju pravilne orientacije molekule sRNA glede na njeno tarčo.

Struktura in katalitsko središče domene PIWI, močno spominja na katalitsko domeno RNase H pri bakteriji *Bacillus holodurans* (Song et al., 2004). Mutacijske analize, ki izključijo katalitsko središče DDH ali DDD v domeni PIWI, so pokazale, da je prav ta domena tista, ki omogoča cepitev tarče RNA. Poleg katalitskega središča imajo vpliv na učinkovitost cepitve tudi druge lastnosti domene PIWI, ki pripomorejo k stabilizaciji dupleksa RNA v povezavi s proteinom AGO. V študiji na hipomorfni mutantih *ago1*, katerim so zamenjali domeno MID-PIWI gena AGO1 z domeno MID-PIWI AGO10, v kateri oba proteina vsebujeta katalitsko središče DDH, ni prišlo do ponovne vzpostavitve cepitvene funkcije proteina AGO1. Rezultat te študije kaže na to, da je za funkcijo cepitve odgovornih več dejavnikov, kot le katalitsko središče DDH ter, da pri sami aktivnosti

proteinov AGO igrajo vlogo tudi dodatne lastnosti domene MID-PIWI (Mallory & Vaucheret, 2010).

### 2.2.3.3 Specifične funkcije posameznih Argonavtov

S pomočjo imunoprecipitacije so raziskovalci pokazali, da sta za asociacijo med AGO1, AGO2, AGO4, AGO5, AGO6, AGO7 in AGO9 ter molekulami sRNA navadnega repnjakovca, ključnega pomena dolžina ter identiteta 5'-končnega nukleotida (Kim, 2008). Večina sRNA, povezanih z AGO1, ima na 5'-koncu uracil in dolžino 21 in 22 nt, medtem ko so tiste povezane z AGO2 večinoma dolge 21 nt ter imajo na 5'-koncu nukleotid adenozin (Schwab & Voinnet, 2010). Prav tako imajo na 5'-koncu adenozin tudi sRNA, ki se povezujejo z AGO4, AGO6 in AGO9, le da so te dolge 24 nt. Nazadnje ostane še AGO5, kateri veže 24 nukleotidov dolge sRNA s 5' končnim citozionom. V podporo pomenu dolžine sRNA v določanju njihove povezave z različnimi proteini AGO, je tudi dejstvo, da lahko nekateri lokusi kodirajo različno dolge molekule sRNA. Kot funkcija te dolžine lahko represija genske ekspresije nato poteka v smeri PTGS ali TGS, odvisno od tega, s katerim proteinom AGO se sRNA poveže. Tak primer najdemo pri rižu, kjer premiR1850 ustvari tako DCL1-odvisno 21 nt dolgo miR1850 (imenovano kanonična miRNA) in DCL3-odvisno 24 nt dolgo miRNA (imenovana dolga miRNA), saj sta obe nameščeni v tandemu. Analiza distribucije teh različnih miRNA je pokazala, da se kanonične miRNA preferenčno vežejo v komplekse AGO1, kateri tipično vodijo PTGS, medtem ko se dolge miRNA vežejo večinoma v kompleksih AGO4, kateri tipično vodijo TGS (Mallory & Vaucheret, 2010).

#### 2.2.3.3.1 AGO1, miRNA ter sekundarna produkcija siRNA

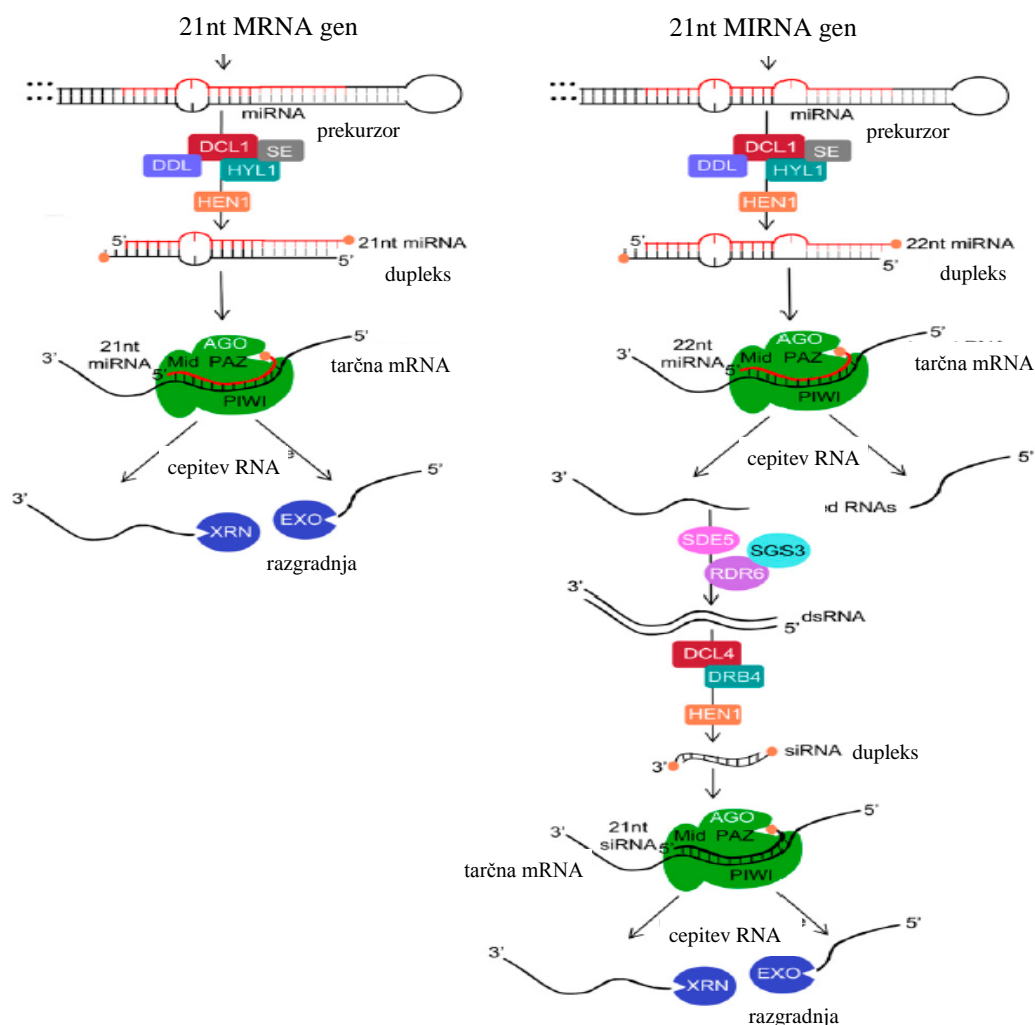
Večina miRNA je 21 nt dolgih, katere se prvotno vežejo na AGO1 ter tako vodijo cepitev komplementarne tarče RNA. Po cepitvi, eksoribonukleaze razgradijo tarčno RNA. Vendar se določene miRNA lahko procesirajo kot 22 nt dolge sRNA, za kar so v večini primerov odgovorne asimetrične krpe zank RNA, ki služijo kot prekurzorji. V poskusih, kjer so bile asimetrije odstranjene z mutagenozo, je prišlo do tvorbe 21 nt dolgih miRNA.

Tako kot 21 nt miRNA, se tudi 22 nt miRNA vežejo z AGO1 in vodijo cepitev tarčne RNA, a se le-ta ne razgradi, temveč delujejo kompleksi AGO1:22 nt miRNA kot edinstven

sprožilec produkcije od RDR6 (rastlinska od RNA odvisna RNA polimeraza) odvisnih siRNA. Tak primer je lahko povezava med AGO1 ter 22 nt dolgo sRNA miR173, ki vodi cepitev prekursorja TAS1c ter nadaljnjo RDR6-odvisno tvorbo 21 nt dolgih ta-siRNA. Če pa so MIR173 prekursor spremenili tako, da je tvoril 21 nt dolgo (namesto 22 nt) miR173, se je produkcija ta-siRNA močno zmanjšala, čeprav se je 21 nt dolga molekula še vedno lahko vezala na AGO1 in s tem vodila cepitev prekursorja TAS1c. To pomeni, da lahko dolžina molekule miRNA vpliva na izid cepitev, ki ga posreduje kompleks AGO1, čeprav točen mehanizem tega vpliva še ni znan.

Izjema pravilu je sRNA miR390, ki, kot 21 nt dolga molekula učinkovito vodi produkcijo ta-siRNA iz prekursorja TAS3 RNA (Montgomery et al., 2008). Poleg tega te ta-siRNA molekule izvirajo iz 5' produkta cepljenja TAS3 prekursorja, medtem ko tiste, katerih produkcijo inducira miR173, izvirajo iz 3' produkta cepitev TAS1c. Razlog, zakaj v tem primeru zadostuje le 21 nt dolga molekula, je mogoče ta, da se miR390 združi z AGO7 namesto z AGO1. To pomeni, da imajo tako 21 nukleotidne miRNA v povezavi z AGO7, kot 22 nukleotidne miRNA v povezavi z AGO1, sposobnost pritegniti RDR6. Kljub temu, edinstvene lastnosti, s katerimi lahko taki kompleksi učinkovito sprožijo produkcijo ta-siRNA, še niso znane (Mallory & Vaucheret, 2010).





Slika 3: Primerjava utišanja RNA z 21 ter 22 nukleotidov dolgimi miRNA. Slika prikazuje spremembo dejavnosti proteina AGO ob vezavi različno dolgih molekul miRNA. Za opis komponent glej preglednico 1. Privzeto po Mallory & Vaucheret, 2010

#### 2.2.3.4 Regulacija genov AGO

##### 2.2.3.4.1 Transkripcijska regulacija

Ekspresijska analiza desetih genov AGO navadnega repnjakovca, je pokazala spreminjajoče se ekspresijske vzorce. Dosledno s ključnimi vlogami v PTGS in TGS, je izražanje genov AGO1 in AGO4 konstitutivno, medtem ko so specifični ekspresijski profili za AGO5 in AGO9 v sosledju z defekti v gametah, izraženih pri riževih mutantah navadnega repnjakovca *ago5* ter *ago9*. Podatki torej kažejo, da specifično delovanje proteinov AGO ni le posledica dolžine sRNA in njene 5' identitete, temveč tudi omejenega področja izražanja nekaterih genov AGO (Mallory & Vaucheret, 2010).

Analize, ki so ji naredili s pomočjo reporterskih genov, so uporabili za primerjavo med ekspresijskimi vzorci genov AGO dveh različnih vej pri navadnem repnjakovcu: vejo AGO1/AGO5/AGO10 ter vejo AGO4/AGO6/AGO9. Reporterska konstrukta pAGO10:YFP-AGO10 in pAGO1:CFP-AGO1, ki rešita ustrezen razvojni defekt mutant tako, da kodirata funkcionalen protein, sta pokazala, da se gen AGO10 prvotno izraža v celotnem embriju, šele nato pa se omeji na provaskularne ter adaksialne dele kotiledonov globularne stopnje. AGO1 se izraža prav tako po celotnem embriju, od globularne do zgodnje torpedo stopnje. Tako se ekspresiji AGO1 ter AGO10 deloma prekrivata, s tem, da je ekspresijski vzorec AGO1 nekoliko širši. Analiza ekspresije pAGO1:GUS v odraslih transgenih rastlinah je pokazala, da se AGO1 izraža skozi celoten razvoj rastline, čeprav je njegovo izražanje večje v meristemskih ter vaskularnih tkivih, kot pa drugje po rastlini. Podobno kot pri AGO1, je analiza ekspresije pAGO4:GUS v transgenih rastlinah pokazala razširjeno ekspresijo v embrijih, listih ter cvetovih. Po drugi strani pa je ekspresija pAGO6:GUS omejena na področja rasti korenine ter poganjka, ter na vaskularna tkiva, ki ta področja povezujejo. Ekspresija pAGO9:GUS pa je omejena na apikalni del poganjka embrija ter na razvijajoče se ovule (Havecker et al., 2010).

Raziskave ekspresijskih profilov sRNA, vezanih na AGO4, AGO6 in AGO9 so pokazale, da se vsi trije povezujejo s 24 nt dolgimi siRNA, ki imajo na 5' koncu adozin in izvirajo iz heterokromatskih ter repetitivnih lokusov. Kakorkoli, vsak od naštetih proteinov AGO je pokazal preferenco do določenega lokusa, najverjetneje zaradi različnih ekspresijskih vzorcev. Da bi preverili to domnevo, so znanstveniki transformirali mutante *ago4* z geni AGO4, AGO6 in AGO9, katerih konstrukti so vsebovali promotor gena AGO4. Nato so analizirali profile siRNA vezanih na te proteine. Če sta bila AGO6 in AGO9 izražena s promotorjem AGO4, sta bila njihova profila vezanih siRNA močno podobna, a ne identična profilu proteina AGO4. Rezultati kažejo na to, da je povezava proteinov AGO z določenima siRNA odvisna od prostorske ekspresije genov AGO, poleg tega pa obstajajo še drugi odločilni dejavniki, ki vplivajo na njihovo medsebojno asociacijo (Mallory & Vaucheret, 2010).

#### 2.2.3.4.2 Posttranskripcijska regulacija

AGO1 in AGO2 sta edina gena AGO pri navadnem repnjakovcu, ki kodirata mRNA, katera se, kot tarča vključuje v regulatorno pot miRNA. mRNA AGO1 predstavlja tarčo za miR168, mRNA AGO2 pa za miR403. Obe molekuli miRNA se sicer povezujeta z AGO1, ki tako v enem primeru regulira ekspresijo AGO2, v drugem pa lastno ekspresijo.

Na AGO1 dodatno deluje s translacijsko represijo tudi AGO10, njegov najbližji ortolog. Medtem, ko ima AGO2 vlogo le v zaščiti rastline proti virusom, je homeostaza AGO1 zelo pomembna tudi za sam razvoj rastline. Le-ta pa je dosežena s številnimi regulatornimi zankami, ki omogočajo pravilno delovanje regulatornih poti siRNA in miRNA (Mallory & Vaucheret, 2010).

#### 2.2.3.5 Vloga Argonavtov v interakciji virus - rastlina

Poleg vloge v regulaciji endogene genske ekspresije preko miRNA, ima AGO1 tudi pomembno vlogo pri obrambi proti virusom. AGO1 veže vsiRNA ter oblikuje od RNA induciran kompleks utišanja (ang. RNA induced silencing complex, RISC). Mutante *ago1* so tako izredno občutljive na virusno okužbo. Indukcija akumulacije AGO1 mRNA je splošni odgovor rastlin po virusni okužbi, ki naj bi tako ojačale svojo odpornost proti samemu virusu. Kljub temu večina virusov lahko kljubuje taki zaščiti s pomočjo mehanizmov, ki so jih razvili skozi evolucijo. Nekateri virusi imajo sposobnost indukcije ekspresije miR168, katera nato sproži translacijsko represijo gena AGO1 s proteinom AGO10. Virusni supresorji utišanja RNA (VSR) lahko na različne načine inhibirajo protein AGO1. Na primer, CMV-jev protein 2b z vezavo na AGO1 inhibira njegovo encimsko aktivnost, medtem ko TCV-jev P38 in SPMMV-jev P1 vsebujeta motive GW (to so aminokislinski motivi za vezavo proteinov AGO (El-Shami et al., 2007)), ki jima omogočajo kompetitivno vezavo na AGO1 ter inhibicijo njegove aktivnosti. Virusov, kot sta PVX in BWYV pa kodirata proteine, ki s svojo vezavo označita AGO1 (ter druge proteine AGO) slednjega za razgradnjo (Mallory & Vaucheret, 2010). Nekateri VSR-ji pa nimajo kot tarčo proteine AGO, temveč vežejo duplekse siRNA, ki so jim namenjeni in tako posredno vplivajo na inhibicijo njihovega delovanja. Taki primeri so na primer P19, P21 ter proteini Hc-Pro (Mérai et al., 2006). Čeprav naj bi bilo kar nekaj proteinov AGO povezanih z zaščito proti virusom, so do nedavnega obstajali dokončni dokazi take

povezave le za AGO1. Harvey in sodelavci, so pred kratkim pokazali vlogo AGO2, ki naj bi deloval kot druga zaščitna raven pred virusno okužbo v primeru, ko virus kodira inhibitor AGO1. Ekspresijo AGO2 je namreč inhibira AGO1 z miR403, ki je komplementarna mRNA gena AGO2, katero nato AGO1 lahko cepi. V primeru inhibicije AGO1, se taka inhibicijska zanka sprosti in omogoči izražanje AGO2 in njegovo vključitev v protivirusno delovanje (Harvey et al., 2011).

#### 2.2.4 Komponente, ki sodelujejo v utišanju RNA

Ker nekaterih komponent, udeleženih v utišanje RNA nismo ali nismo dovolj dobro predstavili v uvodu, smo v ta namen izdelali preglednico 1. Med bolj »kriptične« proteine in proteinske domene spadajo na primer: XS-XH (proteinska domena), DEAD-DEAH (proteinska domena), KH (proteinska domena), SDE3 (RNA helikaza); SGS3 (nekarakteriziran protein), HYL1 (RNA vezavni protein) ter SERRATE (RNA vezavni protein).

Preglednica 1: Glavni proteini ter proteinske domene, ki se v literaturi pojavljajo v zvezi s PTGS

Ključna beseda	Opis	Referenca
XS-XH	RNA vezavne proteinske domene	(Bateman, 2002)
DEAD-DEAH	Proteinski domeni RNA helikaz	(Aubourg, Kreis, & Lecharny, 1999)
KH	»K-homology«; RNA vezavna proteinska domena	(García-Mayoral et al., 2007)
PAZ	»Piwi, Argonaute and Zwiile«; proteinska domena	(Jordan et al., 2000)
PIWI	Piwi; proteinska domena	(Jordan et al., 2000)
RDRP	»RNA dependent RNA polymerase«; protein	(Zong, Yao, Yin, Zhang, & Ma, 2009)
RNA HELICASE	Protein; sodelovanje z RdRp pri sintezi ds RNA	(Dalmay, Horsefield, Braunstein, & Baulcombe, 2001)
AGO	»Argonaute«	(Harvey et al., 2011)
*SDE3	»Silencing Defective 3«; protein, RNA helikaza	(Dalmay et al., 2001)
*SGS3	»Suppressor of Gene Silencing 3«; protein	(Mourrain et al., 2000)
RISC	»RNA Induced Silencing Complex«; proteinski kompleks	(Vaucheret, 2006)
DCL	Dicer-ju podoben protein	(Vaucheret, 2006)
HEN1	»Hua Enhancer 1«; RNA metiltransferaza	(Vazquez et al., 2003)
HYL1	»Hypostatic leaves 1«; protein, član družine DRB	(Han, Goud, Song, & Fedoroff, 2004)
SERRATE	RNA vezavni protein	(Machida, Chen, & Adam Yuan, 2011)
DRB	»dsRNA binding protein«; proteinska družina	(Xie & Qi, 2008)

### 2.3 KROMPIR IN PVY

Krompirjev virus Y je nitast in upogljiv delec. Njegov enoverižni, pozitivno usmerjeni genom RNA, velik približno 9.7 kb, kodira večji ORF ter manjšega, ki ga le-ta vsebuje. Na virusni genom povezan protein (VPg) je kovalentno vezan na 5' konec molekule RNA, na 3' koncu pa je poliA rep. PVY prenaša več kot 40 vrst listnih uši. PVY, ki so ga prvič opisali leta 1930, okužuje širok spekter gostiteljev, večinoma iz družine razhudikovk (*Solanaceae*) in je razširjen po celotnem svetu. Izolati PVY se lahko zelo razlikujejo, tako na biološki, serološki kot molekularni ravni. Raziskovalci so predlagali ločevanje v skupine na podlagi simptomov, ki jih izolati sprožijo med infekcijo. Tako so opisali na primer PVY<sup>o</sup> in PVY<sup>n</sup>. Izolati PVY<sup>o</sup> inducirajo mozaik in povešanje listov na krompirju in tobaku, medtem ko izolati PVY<sup>n</sup> inducirajo nekrozo listov gostitelja. V '80 letih so bile opisane različne obilke PVY pri krompirju, kot na primer PVY<sup>ntn</sup>, kateri inducira nekrozo gomoljev. PVY je znan že desetletja kot grožnja za semenski, jedilni ter predelani krompir. Krompir je četrta najbolj pomembna poljščina na svetu, z donosom 315 milijonov ton v letu 2006 (<http://www.potato2008.org>), ki se dodatno povečuje vsako leto za 4.5 %.

Zaradi pomanjkanja učinkovite rezistence proti škodljivim PVY je strategija za zmanjševanje incidence PVY osnovana predvsem na produkciji brezvirusnih semen. Kljub zadnjim izboljšavam v detekcijskih ter molekularnih metodah karakterizacije, rutinsko uporabljene metode ne omogočajo natančne karakterizacije izolatov, odgovornih za nekroze gomoljev. Posledično ni učinkovitega načina za obvladovanje tveganj, ki jih povzročajo epidemije novih nekrotičnih različic virusa. V kontekstu visoko kompetitivnega svetovnega trga s krompirjem, ki je vreden več milijard evrov, je pomanjkljivo znanje o interakcijah med PVY in njegovim gostiteljem ter pomanjkanje učinkovitih diagnostičnih orodij, pripeljalo do položaja, ko so lahko nekrotični izolati PVY še vedno potencialno odgovorni za ogromne agronomske in ekonomske izgube.

Poleg krompirja pa PVY predstavlja grožnjo tudi tobakovim poljščinam, kjer vpliva predvsem na količino pridelka in njegovo kemijsko sestavo. Med druge poljščine, ki jih PVY okužuje, spadata še paprika ter paradižnik, kjer nastajajoči sevi PVY povzročajo ogromno škode, tako v donosu kot kakovosti pridelka (Scholthof et al., 2011).

### **3 MATERIALI IN METODE**

#### **3.1 MATERIALI**

##### **3.1.1 Aparature, uporabljene pri eksperimentalnem delu**

- Vibracijski mešalnik, Vibromix 10, Tehnica
- Centrifuga, Mini spin plus, Eppendorf
- Centrifuga, 5417R, Eppendorf
- Tehnica, BP 310S, Sartorius
- Dvostopenjske pipete, Eppendorf
- Vodna kopel, Kambič
- Inkubator s stresalnikom, Kambič
- Inkubator s stresalnikom, Sanyo
- Elektroforeza, Power Pack 1000, BIO-RAD
- Transiluminator, Safe imager, Invitrogen
- Komora za vizualizacijo, GelDocMega
- Magnetno mešalo, RH basic 2, IKA
- NanoDrop, Thermo Scientific

##### **3.1.2 Materiali, uporabljeni pri eksperimentalnem delu**

- Deionizirana voda
- Agar, Agarose for routine use, Sigma
- Bacto Agar, BD
- Bacto Tryptone, BD
- Difco Yeast Extract, BD
- »Emsure NaCl for analysis«
- lestvica 1kb DNA, Fermentas
- dNTP-ji, Promega, Fitchburg
- komplet »CloneJET PCR Cloning Kit«, Fermentas
- komplet »pGEM-T Easy Vector System«, Promega
- komplet »Velocity DNA polymerase kit«, Bioline
- komplet »GoTaq DNA polymerase kit«, Promega

- komplet »Wizard *Plus* DNA Purification kit«, Promega
- komplet »PCR purification kit«, Millipore
- Vzorci krompirjeve DNA (kultivarji Igor in Desireé)

### 3.1.3 Programska oprema

- Windows 7 Home Premium, Service Pack 1, Microsoft Corporation
- Microsoft Office 2010, Microsoft corporation
- R verzija 2.12.2
- Pajek verzija 2.04
- Vector NTI verzija 9, Invitrogen
- ClustalX verzija 2.1
- MEGA verzija 5.0
- CLC Main Workbench verzija 6, CLC bio
- Primer 3
- BLAST, Ibis server
- CAP3

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Izbira ključnih besed ter iskanje po podatkovni bazi POCI

Za iskanje krompirjevih genov, udeleženih v PTGS, smo izbrali podatkovno bazo POCI (Potato Oligo Chip Initiative). Pred objavo krompirjevega genoma (PGSC) je bila podatkovna baza POCI najbolj obširna zbirka krompirjevih unigenov. Skupek, narejen iz zaporedij 246,182 EST (Expressed Sequence Tag), je ustvaril 46,345 unigenov, katerih zaporedja in anotacije so dostopne na spletni strani <http://pgrc.ipk-gatersleben.de/poci> (Kloosterman et al., 2008).

Kot ključne besede smo izbrali imena ter kratice genov, genskih družin, proteinov ter proteinskih domen, ki se v literaturi pojavljajo v zvezi z genskim utišanjem, ter na podlagi zbrane literature sestavili ontološko drevo.

V iskalniku, ki je prisoten na spletni strani podatkovne baze POCI, smo nato poiskali unigene, katerim se v anotaciji pojavi izbrana ključna beseda. Spisek le teh smo združili in odstranili le podvojene unigene POCI.

### 3.2.1.1 Samodejni zajem nukleotidnih zaporedij iz baze POCI

Naslednja naloga je bila pridobiti nukleotidna zaporedja vseh izbranih unigenov. Zaradi količine unigenov ter ročnega dela ob uporabi metode Kopiraj in Prilepi, smo se odločili ustvariti skripta v programskem okolju R (R Development Core Team, 2012), ki bi proces pridobivanja zaporedij avtomatizirala.

Skripta deluje tako, da vanjo najprej vnesemo datoteko s spiskom naših unigenov ter datoteko z zaporedji. Skripta nato datoteko z zaporedij filtrira tako, da ohrani le zaporedja unigenov, ki so v našem spisku. Izpis skripta je dokument v obliki FASTA, v katerem so zbrana zaporedja unigenov iz našega spiska.

## 3.2.2 Bioinformatične analize nukleotidnih zaporedij

### 3.2.2.1 Uporaba algoritma BLAST za iskanje dodatnih unigenov, vključenih v gensko utišanje

»Basic Local Alignment Search Tool« (BLAST) je algoritem, ki se pogosto uporablja za iskanje podobnih oziroma sorodnih zaporedij (Altschul, 1990). V našem primeru smo želeli poiskati zaporedja, ki smo jih ob iskanju na podlagi ključnih besed zgrešili. Do tega lahko pride, bodisi ker so anotacije zgrešene ali pa, ker jih preprosto ni. Takih zaporedij žal ni mogoče najti z iskanjem preko ključnih besed.

Algoritem smo pognali lokalno na strežniku Nacionalnega Inštituta za Biologijo. Sam program je na strežniku implementiran tako, da omogoča iskanje po sekvenčnih bazah, ki so na njem shranjene, omogoča določitev mejne vrednosti E za zadetek ter ima možnost izpisa rezultatov v pregledni obliki datoteke TSV, ki jo lahko nadaljnjo obdelujemo s programom MS Excel.

Algoritem smo tako zagnali prvič na zaporedjih, ki smo jih pridobili z R-ovo skripta. Kot mejno vrednost smo izbrali  $9.0 \times 10^{-10}$ , saj je to meja za potencialno funkcionalno sorodnost



genov (Rotter, Usadel, Baebler, Stitt, & Gruden, 2007). Kot sekvenčno bazo, s katero smo primerjali naš nabor unigenov, smo uporabili bazo unigenov POCI. Na ta način smo želeli pridobiti čim več homologov že najdenih unigenov.

V datoteki, ki jo dobimo kot izpis programa BLAST, imamo v stolpcu »QUERY« imena unigenov iz našega spiska, v stolpcu »TARGET« pa imena zadetkov algoritma BLAST. Imena v tem stolpcu sestavljajo tako rekoč pare »QUERY-TARGET«, za katere imamo v ostalih stolpcih še dodatne informacije, kot so dolžina, podobnost ter vrednost E. Zanimalo nas je torej, kateri unigeni POCI se pojavijo v stolpcu »TARGET« ne pa v stolpcu »QUERY«. Taki unigeni nam predstavljajo nova zaporedja, ki jih je algoritem našel. Zanimalo nas je tudi, čigav homolog je novi unigen ter kateri skupini pripada. Za slednje smo uporabili različne funkcije programa MS Excel, kar nam je v veliki meri olajšalo delo.

Zgoraj opisani proces smo nato ponovili še trikrat z višjo mejo za pozitivni zadetek, ki je znašala v tem primeru  $9.0 \times E^{-30}$ . Višjo mejo smo izbrali, da bi zmanjšali nabor lažno pozitivnih zadetkov. S ponavljanjem pa smo želeli zaključiti skupino izbranih genov, to pomeni, da ob naslednji uporabi algoritma BLAST, ne bi prišlo do pojava unigenov, ki niso v našem spisku.

### 3.2.2.2 Uporaba algoritma BLAST in sekvenčne baze SwissProt za preverjanje anotacij

Da bi preverili, ali imajo unigeni, poiskani s pomočjo algoritma BLAST, res kakšno povezavo z metabolizmom molekul RNA, smo v sekvenčni bazi SwissProt poiskali njihove homologe, ter pregledali njihove anotacije. Bazo SwissProt smo izbrali zato, ker so v njej le zaporedja katerih anotacije so bile pregledane ročno in so potemtakem tudi bolj zanesljive. Izbrana meja za vrednost E je bila  $9.0 \times E^{-10}$ , v resnici pa nas je zanimal le najboljši zadetek za posamezen unigen. Na podlagi anotacije le-tega smo se namreč odločili ali naj unigen ostane v spisku ali naj bo odstranjen.

Po opravljenem zagonu algoritma BLAST, smo datoteko TSV filtrirali tako, da so nam ostali le najboljši zadetki za posamezno zaporedje POCI. V tabelo povezav smo dodali tudi anotacije POCI, ki jih drugače v osnovni TSV ni. Tako smo lahko ročno pregledovali razlike v anotacijah med zaporedjema »query« in »target«.

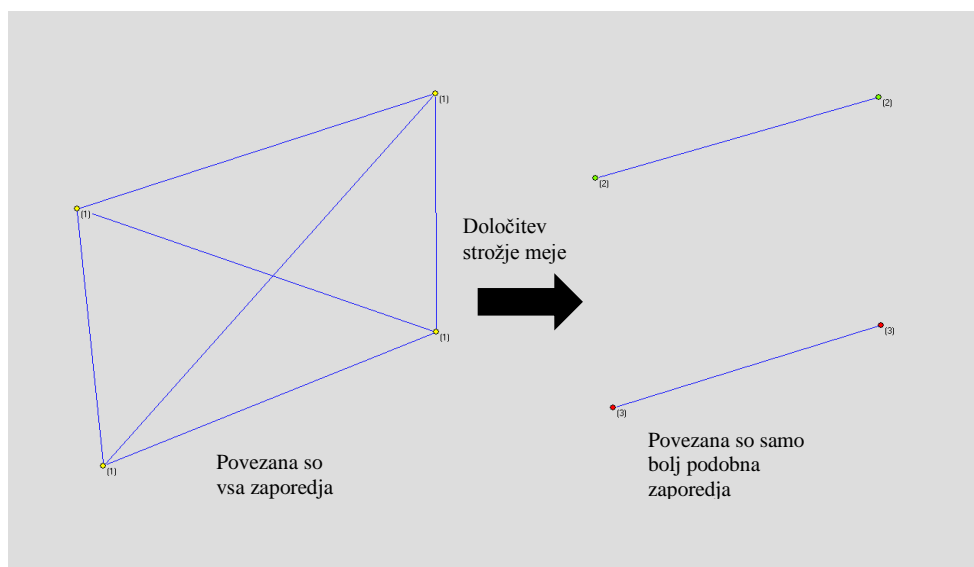
### 3.2.2.3 Uporaba algoritma BLAST in sekvenčne baze PGSC za pretvorbo unigenov v gene krompirja

Ker je bil med časom diplome objavljen krompirjev genom (Xu et al., 2011), smo želeli, unigene POCI pretvoriti v gene krompirja iz baze PGSC (Potato Genome Sequencing Consortium). Število slednjih bi bilo seveda manjše in tako bi tudi zmanjšali nabor zaporedij, s katerimi je bilo treba delati. Za pretvorbo smo ponovno uporabili primerjavo zbranih zaporedij z zaporedji v bazi PGSC z algoritmom BLAST. Tokrat je bila mejna vrednost  $E 9.0 \times 10^{-30}$ . Čeprav se običajno homologija sklepa že pri nižjih vrednostih, smo se zaradi slabe kakovosti zaporedij unigenov odločili, da bomo mejo nekoliko dvignili.

### 3.2.3 Analiza omrežij s programom Pajek

Ročno razvrščanje novih kandidatov v skupine je bilo preveč dolgotrajno zaradi naraščajočega nabora unigenov. Zato smo se odločili, da bomo z mrežno analizo določili skupine znotraj našega nabora genov. Analiza omrežij nam lahko pove, kateri geni so med seboj podobni ter koliko je ta podobnost velika, vse skupaj pa predstavi na razumljiv grafični način.

Če predpostavimo, da so vsa zaporedja v neki podatkovni bazi povezana z določeno mero podobnosti (nad določeno mejo), dobimo mrežo, v kateri so vsa zaporedja povezana z vsemi. Če določimo neko mejo za podobnost, ki lahko še povezuje dve zaporedji v mreži, posledično začnejo v mreži nastajati skupki bolj podobnih zaporedij, saj manj podobne povezave tako odstranimo (glej sliko 4).



Slika 4: Shematski prikaz tvorbe skupin na podlagi rezultatov algoritma BLAST

Skupine smo v mreži določili tako, da smo v programu izrisali posamezne particije. Particijo predstavlja skupina točk, povezanih med seboj, a ločenih od ostalih točk v mreži. V sliki 4 lahko vidimo, kako iz ene mreže nastaneta dve ločeni particiji, če odstranimo 4 povezave. Preprosta analiza omrežij je bila torej narejena na spisku parov »query-target«, ki ga dobimo s strežnika Ibis po uporabi algoritma BLAST.

Algoritem BLAST smo pognali dvakrat ločeno. Prvič z vsemi unigeni POCI, ki smo jih ohranili za nadaljnje delo (299 zaporedij), na katerih smo uporabili algoritem BLAST proti sekvenčni bazi POCI, pri mejni vrednosti  $9.0 \times 10^{-30}$ . Drugič pa proti podatkovni bazi transkriptov PGSC, pri enaki mejni vrednosti. Iz rezultatov algoritma BLAST smo nato odstranili vse vrstice, v katerih so se kot tarče pojavili novi unigeni. Tako smo dobili zaprto skupino unigenov, ter povezave med njimi. Nato smo iz posamezne datoteke TSV naredili datoteko NET, ter v programu Pajek izrisali mreže z particijami.

### 3.2.3.1 Skupina AGO – kako so geni navadnega repnjakovca, predstavljeni v krompirju oziroma v podatkovnih bazah PGSC ter POCI

Zanimalo nas je, ali smo z metodo zaporednih zagonov algoritma BLAST, našli vse unigene, ki naj bi spadali v skupino krompirjevih Argonavtov. V ta namen smo zbrali zaporedja vseh 10 genov AGO repnjakovca. S pomočjo algoritma BLAST smo poiskali podobna zaporedja v bazi transkriptov PGSC. Rezultat analize smo nato filtrirali, tako da

smo ohranili vse zadetke z vrednostjo E, manjšo od  $9 \times 10^{-30}$ . Transkripte smo nato prevedli v gene, da bi dobili pravo število genov v krompirju. Pri vsakem genu smo nato upoštevali reprezentativno zaporedje ter jih z algoritmom BLAST primerjali s sekvenčno bazo POCI. Meja za pozitiven zadetek je v tem primeru znašala tudi  $9 \times 10^{-30}$ . Zaporedja PGSC izvirajo namreč iz vrste krompirja *Solanum tuberosum* skupine Phureja, ki se nekoliko razlikuje od komercialno dostopnega krompirja. Uporabili smo transkripte PGSC namesto genov, ker nam tako zaporedja intronov ne povzročajo nepotrebnih težav pri uporabi algoritma BLAST. Lokalna poravnava na nekodirajočih zaporedjih nam lahko namreč povzroči pojavljanje večjega števila lažno pozitivnih zadetkov, še posebej, ko je tarča algoritma baza zaporedij unigenov.

### 3.2.4 Povezovanje ontologije izbranih genov s podatki o izražanju genov

Našo ontološko razvrstitev unigenov POCI, smo želeli povezati z ekspresijskimi podatki, pridobljenimi s hibridizacijo na mikromrežah POCI. S funkcijo VLOOKUP smo s programom MS Excel poiskali za vsak unigen POCI v naši ontologiji, njemu pripadajoče ekspresijske podatke, ter le te združili z ontologijo v skupno tabelo.

### 3.2.5 Izbira genov na podlagi ekspresijskih podatkov

Po sestavi skupin s pomočjo Pajka smo izbrali eno od skupin in sicer AGO, za nadaljnje delo. Skupina je bila sestavljena iz približno 30 unigenov. Dejstvo, da smo na ta način našli vse unigene, ki predstavljajo krompirjeve Argonaute, smo želeli potrditi tako, da smo na 10 arabidopsisovih genih AGO uporabili algoritem BLAST proti krompirjevemu genomu. Na najboljših zadetkih krompirjevega genoma pa uporabili BLAST proti sekvenčni bazi POCI, s programom tblastx ter mejno vrednost E  $9.0 \times 10^{-30}$ .

Zanimali so nas predvsem unigeni, ki so kazali dobro diferencialno izraženost v okviru narejenih poskusov. Le-te smo izolirali od ostalih, ter jim poiskali homologe v krompirjevem genomu, na podlagi katerih bi v naslednjem koraku izdelalizičetne oligonukleotide. Odločili smo se, da bomo poskusili izolirati 3 gene AGO krompirja, in sicer AGO1, AGO2 ter AGO4. Za slednje smo se odločili deloma zaradi diferencialne ekspresije, deloma pa zato, ker smo na ta način pokrili glavne poti utišanja pri rastlinah.

### 3.2.6 PCR – Verižna reakcija s polimerazo

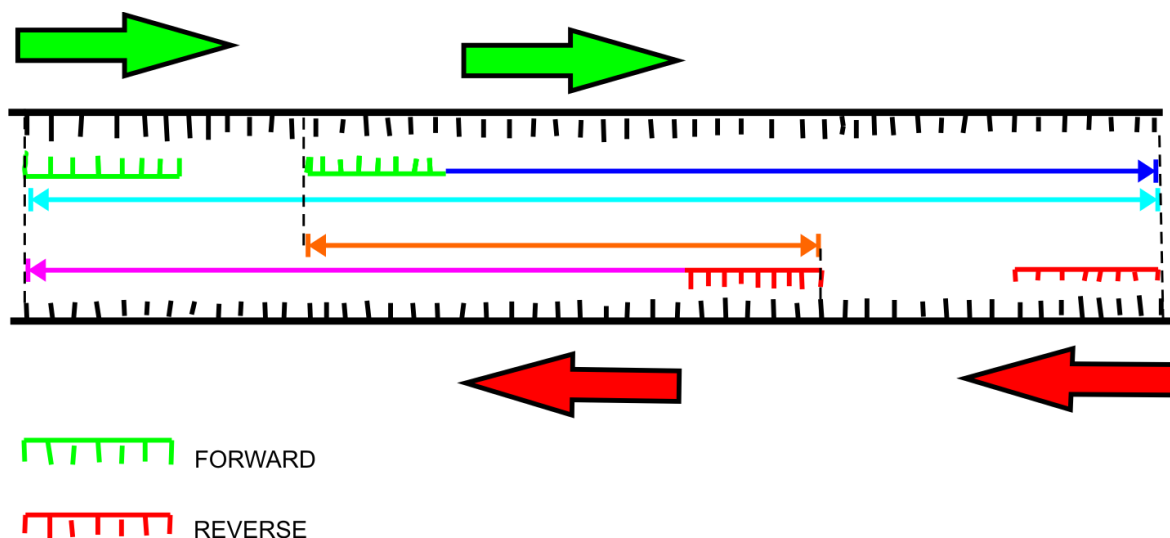
#### 3.2.6.1 Izbira vzorcev z matrično DNA

Kot vir matrične DNA smo izbrali vzorce, ki so izvirali iz predhodno narejene izolacije RNA iz listov krompirja. Vzorci niso bili obdelani z DNazo (zadnji korak pri izolaciji RNA) in so zato vsebovali dovolj DNA za nadaljnje poskuse.

Izbrali smo vzorce dveh različnih kultivarjev krompirja in sicer Igor ter Desireé.

#### 3.2.6.2 Načrtovanje začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje AGO genov

Vsem trem genom AGO krompirja, smo najprej poiskali pravi bralni okvir, ter na ta način tudi »start« in »stop« kodon. Zaradi dokaj dolgih zaporedij (cca. 6000 bp) smo želeli začetne oligonukleotide oblikovati kar se da blizu začetka in konca CDS, ter nekje v sredini posameznega gena (slika 5). Tako bi imeli več možnosti pomnoževanja krajših zaporedij, ki bi združena nato vsebovala celotno zaporedje gena.



Slika 5: Shematska slika postavitve začetnih oligonukleotidov (kakor načrtovano pri oblikovanju). Puščice različnih barv v notranjosti ponazarjajo možne produkte pomnoževanja. Večje puščice (rdeče, zelene) prikazujejo namestitev ter smer podaljšanja začetnih oligonukleotidov.

Za oblikovanje začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje izbranih genov smo uporabili internetni program Primer3 Plus (Untergasser et al., 2007).

Začetni oligonukleotidi so bili oblikovani tako, da je bila njihova dolžina med 28 in 33 bp, Tm nad 60 stopinj Celzija, tvorili pa naj bi čim manj sekundarnih struktur, tako sami s

seboj kakor med sabo. Specifičnost zaporedji začetnih oligonukleotidov smo preverili z pomočjo algoritma BLAST proti krompirjevemu genomu (sekvenčna baza PGSC). Poravnali smo jih tudi z zaporedji pripadajočih genov ter unigenov iz raznih podatkovnih baz (SGN, TC, POCI in TA), da bi preverili pojavljanje SNP-jev na delu zaporedja, kjer naj bi prilegal začetni oligonukleotid. Za lažje manipuliranje z zaporedji, smo večje število unigenov iz različnih baz združili v soseske. Soseske so bile sestavljene s programom CAP3 (Huang & Madan, 1999), pri privzetih nastavitvah. Ob prisotnosti SNP-jev v tem delu zaporedja smo začetni oligonukleotid po potrebi premaknili nekoliko navzgor oziroma navzdol. Končna zaporedja začetnih oligonukleotidov smo nato naročili pri podjetju Eurofins OPERON.

### 3.2.6.3 Priprava reakcijskih mešanic

Mešanica kemikalij za verižno reakcijo s polimerazo močno vpliva na potek ter izid same reakcije. Kemikalije morajo biti kakovostne, mešanica pa mora imeti pravo razmerje med kemikalijami, če želimo uspešen potek reakcije.

Med laboratorijskim delom smo se srečali z dvema kar podobnima mešanicama, ki pa sta bili uporabljeni v bistveno različnih reakcijah. Preglednica 2 vsebuje spisek vseh uporabljenih kemikalij, dodanih volumnov ter končnih koncentracij mešanice, uporabljene za PCR s padajočo temperaturo prileganja. V preglednici 3 pa so navedeni enaki podatki za PCR na osnovi kolonije. Reakciji se med seboj razlikujeta predvsem v reakcijskih pogojih oziroma programu, ter v uporabi različnih encimov. Medtem ko je bila verižna reakcija s polimerazo na osnovi kolonij le kontrolna reakcija, kjer smo sledili navodilom proizvajalca kompleta pJET, je bilo treba mešanico za verižno reakcijo s polimerazo s padajočo temperaturo prileganja optimizirati.

Preglednica 2: Reakcijske mešanice za PCR s padajočo temperaturo prileganja. Dodani volumni ter končne koncentracije posameznih komponent reakcijske mešanice, uporabljene pri PCR s padajočo temperaturo prileganja

PCR s padajočo T	Dodan volumen [ $\mu$ l]	Končna koncentracija
Voda	9,50	47,50 %
Pufer 5x Hi-fi	4,00	1x
»dNTP mix« (2.5 mM vsakega)	2,00	1 mM
FP (10 $\mu$ M)	1,00	0,5 mM
RP (10 $\mu$ M)	1,00	0,5 mM

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 2. Reakcijske mešanice za PCR s padajočo temperaturo prileganja

PCR s padajočo T	Dodan volumen [μl]	Končna koncentracija
Velocity (2 u/μl)	0,50	0,05 u/μl
Matrična DNA	2,00	-
Mg <sup>2+</sup>	-	2 mM
DMSO	-	-

Legenda: FP – forward primer; RP – reverse primer; Velocity – DNA-polimeraza

Preglednica 3: Reakcijske mešanice za PCR na osnovi kolonije. Dodani volumni ter končne koncentracije posameznih komponent reakcijske mešanice uporabljene pri PCR na osnovi kolonije

PCR na osnovi kolonije	Dodan volumen [μl]	Končna koncentracija
Voda	11,60	58,00 %
Pufer 10x Taq	2,00	1x
»dNTP mix« (2,0 mM vsakega)	2,00	0,8 mM
FP (10 μM)	0,50	0,5 mM
RP (10 μM)	0,50	0,5 mM
Taq (5 u/μl)	0,20	0,05 u/μl
Matrična DNA	2,00	-
Mg <sup>2+</sup> (25 mM)	1,20	1,5 mM
DMSO	-	-

Legenda: FP – forward primer; RP – reverse primer; Taq– DNA-polimeraza

#### 3.2.6.4 Programi PCR

Pravilen program PCR, je poleg dobro pripravljene reakcijske mešanice, eden najpomembnejših dejavnikov za uspešno verižno reakcijo s polimerazo. S programom namreč lahko določamo specifičnost prileganja, dolžino produkta ter njegovo količino. Če reakcijo PCR uporabljamo za kontrolo, in imamo ob tem v reakciji začetne oligonukleotide z visoko specifičnostjo ter nekompleksno matrično DNA (npr. plazmidi), je ponavadi dovolj, če upoštevamo navodila proizvajalca encima ali kompleta. Če pa imamo opravka s kompleksno matrično DNA (kromosomska DNA), ter začetnimi oligonukleotidi, ki smo jih sami oblikovali ter zanje ne vemo do kakšne mere so specifični (saj ne poznamo še pravega zaporedja v našem vzorcu), moramo program prilagoditi našim potrebam.

V preglednici 4 sta navedena dva različna programa, uporabljena v laboratorijskem delu. Program v stolpcu »PCR na osnovi kolonije«, je bil izveden po navodilih prisotnih v kompletu »CloneJET<sup>TM</sup>. PCR cloning kit« podjetja Fermentas.

Drugi program, v stolpcu »PCR s padajočo temperaturo«, pa ima v prvih petnajstih ciklih padajočo temperaturo prileganja, kar omogoča najbolj specifično prileganje začetnih

oligonukleotidov, v primeru slabega poznavanja tarčnega zaporedja ter s tem točne talilne temperature začetnih oligonukleotidov.

Preglednica 4: Programi PCR, uporabljeni pri verižni reakciji s polimerazo

PCR program					
PCR s padajočo temperaturo			PCR na osnovi kolonije		
3 min	98 °C		2 min	95 °C	
45 s	98 °C	15x	30 s	95 °C	25x
45 s	60 °C*		30 s	60 °C	
1 min 45 s	72 °C		2 min	72 °C	
30 s	98 °C	25x			
30 s	50 °C				
1 min 45 s	72 °C				
7 min	72 °C		5 min	72 °C	
*vsak cikel se T zmanjša za 1 °C					

### 3.2.7 Agarozna elektroforeza

Prisotnost produktov po verižni reakciji s polimerazo smo preverjali z agarozno gelsko elektroforezo. Zaradi slabih izkoristkov PCR s padajočo temperaturo prileganja, smo v žepke v gelu vnašali polovico volumna reakcijske mešanice (10 µl), v primeru PCR na osnovi kolonije pa le 2 µl. Agarozni gel smo v primerni banjici potopili v pufer 1x TBE, vzorce pa pred vnosom v žepke obarvali z nanašalnim pufrom. Kot standardno DNA smo uporabili lestvico 1 kb DNA proizvajalca Fermentas. Po vnosu vzorcev v žepke smo gel izpostavili napetosti 5 V/cm za 30 minut. Nato smo si gel ogledali pod UV lučjo in ga po potrebi slikali.

#### 3.2.7.1 Izolacija fragmentov DNA iz agaroznega gela

Če je bila PCR uspešna, in smo v gelu videli fragmente pričakovane velikosti, smo elektroforezo ponovili z ostalim volumnom vzorcev. Pufer TBE smo tokrat zamenjali z modificiranim pufrom TBE, v katerem je veliko manjša količina EDTA. Zato je primernejši za izolacijo fragmentov ter nadaljnje delo z le-temi. EDTA ima namreč inhibitoren učinek na reakcijo ligacije. Iz gela, narejenega z modificiranim pufrom TBE,



smo torej po končani elektroforezi previdno izrezali lise pričakovanih velikosti. Pomagali smo si s skalpelom ter osvetlilvijo gela s transiluminatorjem.

Produkte PCR smo nato očistili iz koščkov agaroze s pomočjo kompleta »Millipore PCR purification kit«.

### 3.2.8 Kloniranje fragmentov DNA krompirja v bakterijo *E. coli*

Za kloniranje fragmentov DNA v bakterijo *E. coli* smo uporabili komplet »CloneJET™ PCR cloning kit«.

#### 3.2.8.1 Čiščenje produktov PCR

Raztopine s fragmenti, ki smo jih izolirali iz gela smo pred začetkom dela dodatno očistili s kompletom »Wizard Plus DNA Purification kit«. Čiščenje smo opravili po protokolu, ki ga nudi proizvajalec kompleta, razen zadnjega koraka, kjer smo namesto 50 µl vode za elucijo uporabili le 20 µl. Ta korak smo spremenili zato, da bi vzorce nekoliko skoncentrirali pred začetkom kloniranja.

#### 3.2.8.2 Ligacija fragmentov v plazmid pJET

Ker nam je encim, uporabljen pri PCR, sintetiziral produkte s topimi konci, nam pred ligacijo ni bilo treba opraviti dodatnih reakcij. Plazmid pJet1.2/blunt ima v odprti obliki namreč tope konce.

Kar se tiče postopka samega ligacijskega poskusa, smo se držali navodil proizvajalca kompleta. Podaljšali smo le čas inkubacije ligacijske mešanice iz 5 minut na 1 uro.

Preglednica 5: Priprava ligacijske mešanice. Komponente in volumni reakcijske mešanice, predlagane v protokolu kompleta »CloneJET PCR cloning kit«

Komponenta	Volumen [µl]
2x reakcijski pufer	10
Produkt PCR	x
pJET1.2/blunt (50 ng/µl)	1
Voda	do 20
T4 DNA ligaza (5 u/µl)	1
Skupaj	20

V preglednici 5 so predstavljene komponente ligacijske mešanice in njihovi volumni. »x« v primeru produkta PCR pomeni, da lahko uporabnik določi volumen gleda na koncentracijo svojih vzorcev ter želenim razmerjem med insertom in vektorjem.

V našem primeru smo zaradi premajhne koncentracije vzorcev (približno 5 ng/ $\mu$ l), lahko dosegli le približno 40 ng celokupnega produkta v reakcijski mešanici, saj smo imeli brez dodatka vode na razpolago 8  $\mu$ l za svoj vzorec. Ker smo poznali maso dodanega vektorja (50 ng), njegovo dolžino ter dolžino naših produktov PCR (približno 1400 in 1700 bp) smo lahko izračunali razmerje I/V, ki je znašalo približno 1,6.

Običajno potekajo ligacijske reakcije v razmerjih I/V med 1/3 in 3. Priporočljivo je imeti veliko več inserta v reakciji, saj je tako verjetnost, da se vektor zapre sam vase, manjša.

### 3.2.8.3 Transformacija kemijsko kompetentnih bakterij *E. coli*

Po končani ligacijski reakciji smo 2  $\mu$ l ligacijske mešanice posameznega konstrukta dodali k 50  $\mu$ l kulture kemijsko kompetentne bakterije *E. coli* »One Shot TOP10« podjetja Invitrogen. Vse skupaj smo na rahlo premešali in postavili na led za pol ure. Nato smo mešanico izpostavili toplotnem šoku za 42 sekund (42 °C), nato pa jo hladili na ledu za 2 minuti. Po dveh minutah smo bakterijam dodali medij SOC (ang. Super Optimal Broth with Catabolite repression) (250  $\mu$ l) ter jih inkubirali 1 h pri 37 °C s stresanjem.

Po končani inkubaciji smo mešanico posamezne epice odpipetirali na dve ločeni petrijevki z gojiščem LB z dodanim ampicilinom, ter tekočino razmazali do suhega. Na vsako petrijevko je prišlo približno 150  $\mu$ l bakterijske raztopine. Petrijevke smo inkubirali čez noč pri 37 °C, naslednji dan pa preverili rezultate.

Selekcija na gojišču v primeru pJET1.2/blunt deluje v dveh točkah. Prva selekcijska stopnja je prisotnost samega plazmida v bakteriji, saj le-ta vsebuje gen za odpornost proti ampicilinu. Druga stopnja je prisotnost inserta. V regiji, kjer se vgradi insert, zaprt plazmid kodira namreč letalni gen, ki bakterijo ubije, če se izrazi. To naj bi pomenilo, da so kolonije, ki zrastejo na gojišču, kolonije bakterijskih klonov.

Naslednji dan smo torej iz vsake petrijevke, na kateri so bile vidne kolonije, vzeli po tri največje in lepo izolirane bakterijske kolonije ter jih resuspendirali v 50  $\mu$ l vode. Od tega smo 2  $\mu$ l resuspendiranih bakterij uporabili kot vzorec za matrično DNA za PCR na osnovi kolonije, ostalo pa zlili v falkonko s tekočim gojiščem LB z dodanim ampicilinom (5 ml). Vzorce smo čez noč inkubirali pri 37 °C.

#### 3.2.8.4 Izolacija plazmidov

Iz prekonočnih kultur, kjer so se bakterije čez noč razmnožile do mere, da je tekoče gojišče postalo motno, smo izolirali plazmide s pomočjo kompleta »Wizard *Plus* SV Minipreps DNA purification system«. Uporabili smo protokol za elucijo s pomočjo centrifuge, ki ga s kompletom nudi proizvajalec. Protokola smo se tokrat popolnoma držali. Po končni eluciji plazmidov iz kolone smo vzorce označili ter spravili pri -20 °C.

### 3.2.9 Določanje nukleotidnih zaporedij DNA krompirja

Za določitev zaporedja DNA smo poslali v podjetje Macrogen 9 vzorcev plazmidne DNA (3 vzorce za vsak konstrukt) z najvišjo koncentracijo (približno 60 ng/ $\mu$ l).

Zaporedja, ki smo jih dobili, smo za posamezen konstrukt združili in po potrebi popravili. Poravnali smo jih s pomočjo programa »CLC Main Workbench« podjetja CLC bio, na osnovno zaporedje, ki je bilo uporabljeno za oblikovanje začetnih oligonukleotidov. Pri poravnah smo vedno uporabljali privzete nastavitve programa.

Popravili smo tehnične napake sekvenciranja, kot so napačno določeni nukleotidi na podlagi fluorescentnega signala. Ostale razlike, ki niso bile posledica vidnih tehničnih napak (npr. kjer je bil signal spektra dovolj močen in razločen, določen nukleotid pa pravilen), smo v zaporedjih ohranili. Skupno zaporedje za vsak konstrukt smo določili na podlagi večine nukleotidov v poravnavi. Iz tako sestavljenih skupnih zaporedij smo nato izrezali intronske dele le teh. Ostanke zaporedij smo nato poravnali proti transkriptom genov, prav tako pri privzetih nastavitvah programa, ter poravnavo prevedli v aminokislinsko zaporedje. Na podlagi aminokislinskih zaporedij smo določili podobnosti in razlike med kultivarjema krompirja Igor ter Desirée, ter krompirjem katerega genom so sekvencirali.

## 4 REZULTATI

### 4.1 ISKANJE KOMPONENT POST-TRANSKRIPCIJSKEGA UTIŠANJA PRI KROMPIRJU, NA PODLAGI KLJUČNIH BESED IZ LITERATURE

Pred začetkom iskanja smo vse ključne besede, ki smo jih identificirali v pregledu literature, uredili v ontologijo, zamišljeno na sami funkciji določene komponente, proteina ali domene. Sestava same ontologije na podlagi informacij iz literature, je bila ključna za razvrstitev najdenih unigenov v skupine. Skupine smo označili z eno od iskanih ključnih besed, običajno z najbolj pogostim sinonimom za dano skupino (npr. DCL za vse unigene, ki imajo v opisu sinonime dcl, dicer ali dicer-like). V preglednici 6 je predstavljena struktura same ontologije z vsemi skupinami, ki smo jih sestavili. Z iskanjem s pomočjo tako pripravljene nabora ključnih besed, smo identificirali 142 potencialnih komponent utišanja RNA.

Preglednica 6: Ontologija komponent mehanizma utišanja RNA. Preglednica prikazuje sestavljeno ontologijo, opis posamezne komponente ter ključne besede, uporabljene pri iskanju genov. V stolpcu 0 so prikazana števila unigenov, najdenih na podlagi ključnih besed, posamezne skupine. V stolpcih od 1 do 4, so prikazana števila najdenih zaporedij s pomočjo algoritma BLAST. V stolpcu Skupaj so sešeta vsa najdena zaporedja posamezne ontološke skupine

Ontologija	Opis	Ključne besede	0	1	2	3	4	Skupaj
<b>1</b>	<b>Procesiranje RNA-nastanek sRNA</b>							
1.1	DCL	dicer, dcl, dicer-like	5	4	0	0	0	9
1.1.1/2.2.1	PAZ	paz, "piwi, argonaute and zwille"	2	3	1	0	0	6
1.2/2.3	DRB	dsRNA binding protein, drb, hyl, hypostatic leaves	3	0	0	0	0	3
1.3	SERRATE	Serrate	2	0	0	0	0	2
1.4	HEN	hen, HUA enhancer, RNA methyltransferase	2	1	1	0	0	4
1.4.1	KH	kh, K homology	23	42	26	29	164	284
<b>2</b>	<b>Vezave sRNA v kompleks RISC</b>							
2.1	RNA HELICASE	RNA helicase, ATP-dependent rna helicase like protein	64	106	37	55	41	303
2.1.1	DEAH-DEAD	deah/dead	11	0	0	0	0	11
2.2	AGO	ago, argonaute	16	32	17	27	56	148
1.1.1/2.2.1	PAZ	Paz	2	3	1	0	0	6
2.2.2	PIWI	Piwi	0	0	0	0	0	0
1.2/2.3	DRB	Drb	2	0	0	0	0	0
<b>3</b>	<b>Ojačanje (ang. Transitivity)</b>							
3.1	RDRP	rdrp, RNA dependent RNA polymerase, sde, silencing defective	6	2	1	0	0	9
3.2	SGS	sgs, supressor of gene silencing	3	1	0	0	0	4
3.2.1	XH-XS	xh-xs	4	3	1	0	0	8

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 6. Ontologija komponent mehanizma RNA utišanja

Ontologija	Opis	Ključne besede	0	1	2	3	4	Skupaj
4	Metilacija DNA							
4.1	DNA METHYLASE	DNA methylase	1	30	12	3	0	46
Skupaj			142	224	96	114	261	837

#### 4.2 DODATNE KOMPONENTE PTGS, NAJDENE V SEKVENČNI BAZI POCI

S pomočjo algoritma BLAST smo v bazi sekvenčnih podatkov poiskali dodatne kandidate aparata utišanja RNA pri krompirju. V preglednici 7 lahko vidimo v stolpcih, označenih z »1«, »2«, »3« in »4«, število dodatnih unigenov, najdenih s pomočjo algoritma BLAST, pri vsaki skupini ontologije. Zaporedne številke od 1 do 4 predstavljajo zaporedje zagonov algoritma BLAST, po dodatku novih unigenov, ki so se pojavili pri prejšnjem. Ponavljanje zagona algoritma BLAST smo uporabili, da poiščemo potencialne homologe, kateri v samem opisu nimajo prisotnega nobenega od sinonimov, oziroma opis zanje sploh ni na voljo. Tako ponavljanje nam omogoča torej najti vedno nova zaporedja, dokler obstajajo še dovolj podobna zaporedja v podatkovni bazi. V trenutku, ko ne najdemo več novih zaporedij (pri določeni mejni vrednosti E), lahko sklepamo, da je določena skupina fiksna (za tisto vrednost E). Na koncu štirih ponovitev, je nabor najdenih unigenov znašal kar 837 zaporedij.

Nekatere skupine (RNA HELICASE; KH, AGO in DNA METILAZE), niso postale fiksne in so se začele po drugi ponovitvi ponovno širiti. Poleg tega smo opazili, da so se že pri tretjem zagonu algoritma BLAST, pojavljala zaporedja, katerih anotacija ne nakazuje nobene povezave z genskim utišanjem, na primer proteinazni inhibitorji, različne proteinske kinaze, šaperoni itd. Zato smo se odločili, da bomo unigenom, najdenih na podlagi iskanja ključnih besed, dodali zraven le tista zaporedja, najdena ob prvih dveh zagonih algoritma. Končen nabor komponent aparata utišanja RNA iz baze POCI je obsegal 462 unigenov.

#### 4.3 PREGLED IN IZBOLJŠAVE ANOTACIJ, KOMPONENT PTGS

Zbrana zaporedja krompirjevih transkriptov smo primerjali s proteinskimi zaporedji v bazi SwissProt. S tem smo preverili pravilnost nabora unigenov ter izboljšali njihove anotacije. Na podlagi teh podatkov smo unigene POCI razvrstili v 3 skupine: skupino tistih, ki jih anotiramo kot komponente utišanja RNA, skupino tistih, ki jih ne vključimo ter skupino za

katere nismo prepričani ali sodijo v skupino komponent mehanizma utišanja. Skupina ohranjenih je tako znašala 299 unigenov, skupina zavrženih 103, skupina »nedorečenih« pa 60. Ker je šla velika večina unigenov v skupino tistih, ki smo jih ohranili, smo se na koncu odločili, da za nadaljnje delo skupine »nedorečenih« ne upoštevamo. Smo jo pa ohranili kot ločeno skupino za kasnejše natančno ročno pregledovanje.

V skupini ohranjenih genov ni bilo dovolj izrazitih razlik med anotacijami POCI ter SwissProt, da bi zaradi tega preuredili ontološke skupine. Tisti unigeni POCI, ki so bili brez anotacije, običajno niso imeli zadetka v sekvenčni bazi SwissProt, ali pa anotacija tarčnega zaporedja ni bila dovolj specifična, za premeščanje unigena iz ene skupine v drugo. Vendar pa so se anotacije razlikovale v podrobnostih, kar bomo lahko uporabili pri kasnejših, podrobnejših analizah funkcij posameznih predstavnikov skupin.

Tabela z zgoraj opisanimi podatki je na razpolago kot priloga na zgoščenki, v obliki MS Excel-ovega delovnega zvezka, na naslovu »Priloge/swissprot\_annotacije.xls«

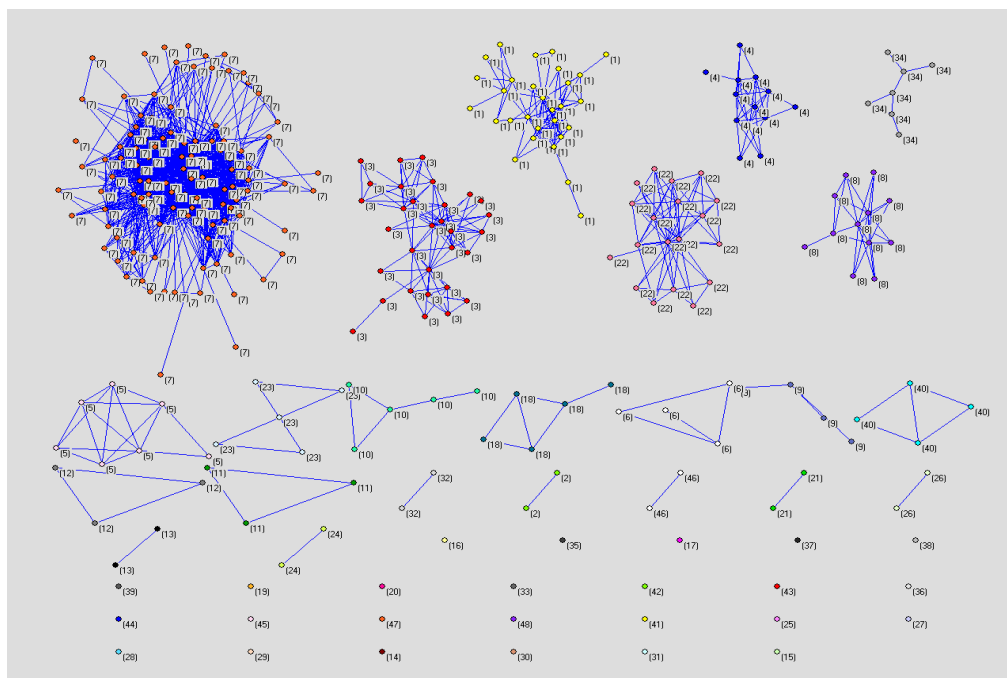
#### 4.4 ZDRUŽEVANJE KOMPONENT PTGS V SKUPINE

Ker so anotacije pridobljenih zaporedij premalo natančne, smo želeli iz podatkov o podobnosti zaporedij določiti skupine/družine genov s podobnimi lastnostmi. Zaporedja izbranih unigenov POCI smo najprej primerjali med sabo, poleg tega, smo izbrana zaporedja primerjali s sekvenčno bazo transkriptov, določenih v projektu sekvenciranja homozigotne oblike krompirja (Xu et al., 2011).

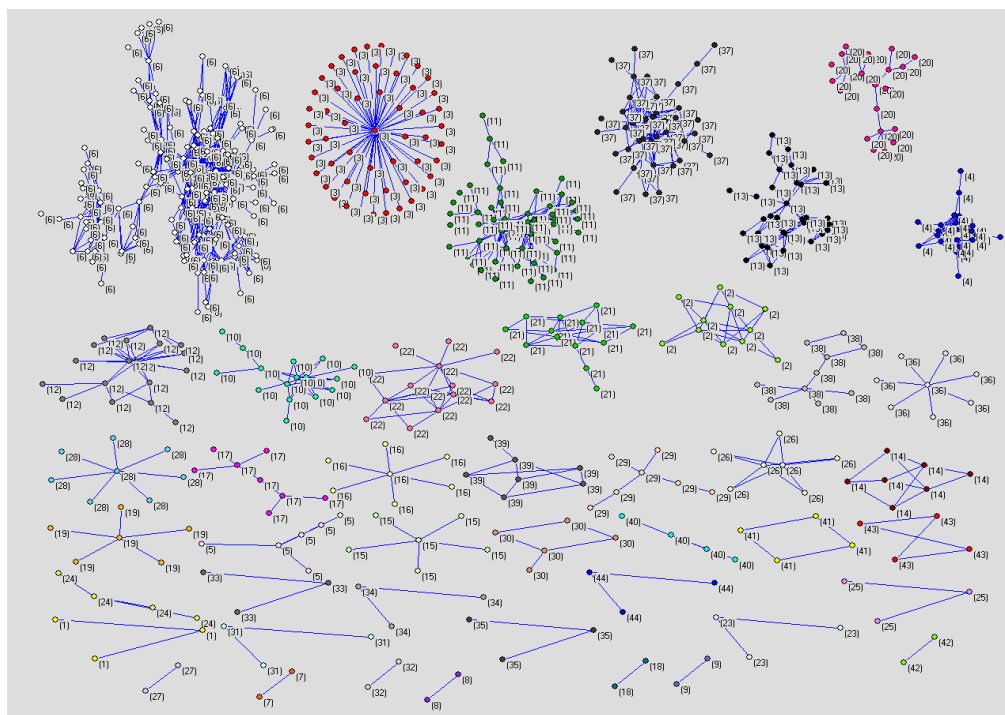
Odločili smo se izkoristiti dejstvo, da algoritem BLAST uporablja metodo lokalne poravnave za iskanje podobnih zaporedij, poleg tega pa poda še statistično vrednost za verjetnost take poravnave. Tako imamo možnost iskanja podobnih zaporedij, hkrati pa lahko določimo tudi, koliko med seboj podobna zaporedja naj algoritem sploh išče.

Vsaka pika na slikah 5 in 6, predstavlja določeno zaporedje črte pa predstavljajo povezave med zaporedji (dejstvo, da ima določeno zaporedje podobnost z drugim zaporedjem, je v sliki predstavljeno s črto, ki povezuje dve piki). Številke poleg pik predstavljajo številko particije, kakor je nato zapisana v preglednici 7.

V preglednici 7 smo rezultate omrežne analize predstavili v tabelarni obliki z nekaj dodatnimi informacijami. Poleg stolpca z naštetimi homologi PGSC, ki jih predstavljajo najboljše zadetki v sekvenčni bazi PGSC, ki jih je algoritem BLAST našel, smo dodali tudi stolpec s pripadajočimi vrednostmi E. Vrednosti E nam namreč opiše stopnjo podobnosti med dvema zaporedjema.



Slika 6: Analiza omrežij POCI\_vs\_POCI. V omrežje so vključeni samo unigeni POCI. Pike na sliki predstavljajo unigene POCI. Črte med pikami predstavljajo podobnost med zaporedji. Pike so obarvane z naključnimi barvami, njihova razporeditev je prav tako naključna. Številke ob pikah predstavljajo številko particije, kateri pika (unigen/transkript/zaporedje) pripada



Slika 7: Analiza omrežij POCI\_vs\_DMT. V omrežje so vključeni unigeni POCI in transkripti PGSC (označeni tukaj kot DMT). Črte med pikami predstavljajo podobnost med zaporedji. Pike so obarvane z naključnimi barvami, njihova razporeditev je prav tako naključna. Številke ob pikah predstavljajo številko particije, kateri pika (unigen/transkript/zaporedje) pripada. Particija, označena s številko 3, predstavlja vse unigene POCI brez zadetka v bazi PGSC. Zaradi lažje obdelave podatkov smo jih prikazali kot ločeno particijo, kjer imajo vsa zaporedja POCI en sam zadek »UNKNOWN«

Preglednica 7: Povezava ontologije z analizo omrežij. V preglednici je predstavljen spisek unigenov POCI (POCI\_id) ter pripadajočih homologov PGSC (PGSC\_homolog, vrednost 0 v tem stolpcu predstavlja pomankanje zadetka algoritma BLAST), razvrščen na podlagi naše ontologije (stolpec O). Stolpec E vrednost\_poci\_vs\_dmt prikazuje vrednost E za posamezen par POCI-PGSC. V stolpcu B so prikazane številke zaporednih zagonov algoritma BLAST, ob katerih so bili unigeni najdeni. Številka 0 v stolpcu B predstavlja iskanje unigenov na podlagi ključnih besed. V stolpcu »Particije\_poci\_vs\_poci\_e-30« so številke particij, nastalih z mrežno analizo rezultatov algoritma BLAST, zagnanem na zaporedjih POCI, proti bazi POCI (glej tudi sliko 5). V stolpcu »Particije\_poci\_vs\_dmt\_e-30« pa števila particij, nastalih z mrežno analizo rezultatov algoritma BLAST proti bazi PGSC (glej tudi sliko 6)

B	O	Skupina	POCI_id	PGSC_homolog	Particij e_poci_vs_poci	Particij e_poci_vs_dmt	Evrednost _poci_vs_dmt
1	1.1	DCL	MICRO.15150.C1	PGSC0003DMT400042918	5	20	3E-74
1	1.1	DCL	MICRO.15150.C2	PGSC0003DMT400042918	5	20	2E-52
1	1.1	DCL	MICRO.15199.C1	PGSC0003DMT400033487	5	20	1E-104
0	1.1	DCL	MICRO.16182.C1	0	12	3	
0	1.1.1	PAZ	ACDA00524D08.T3m.scf	PGSC0003DMT400069461	1	11	4E-45
1	1.1.1	PAZ	SSBN003H08u.scf	PGSC0003DMT400025295	5	20	1E-48
2	1.1.1	PAZ	MICRO.16034.C1	PGSC0003DMT400037378	5	20	2E-46
0	1.1.1	PAZ	bf_suspxxxx_0022B02.t3m.scf	PGSC0003DMT400029301	5	20	1E-144
1	1.1.1	PAZ	MICRO.6147.C1	PGSC0003DMT400001810	5	20	3E-93
1	1.2	DRB	POAB595TP	PGSC0003DMT400036822	12	26	1E-112
1	1.2	DRB	MICRO.14682.C1	PGSC0003DMT400036824	12	26	1E-126

se nadaljuje



nadaljevanje preglednice 7. Povezava ontologije z analizo omrežij

B	O	Skupina	POCI_id	PGSC_homolog	Particij e_poci_ vs_poci	Particij e_poci_ vs_dmt	Evrednost _poci_vs_ dmt
2	1.4	HEN	TBSK00866FA02t3m.scf	0	3	3	
1	1.4	HEN	MICRO.8584.C3	PGSC0003DMT400074198	3	13	1E-42
0	1.4	HEN	MICRO.9671.C2	PGSC0003DMT400041750	3	13	1E-173
0	1.4.1	KH	MICRO.14858.C1	0	3	3	
0	1.4.1	KH	MICRO.17367.C1	0	3	3	
1	1.4.1	KH	MICRO.2460.C1	0	3	3	
1	1.4.1	KH	MICRO.842.C3	0	3	3	
1	1.4.1	KH	MICRO.842.C4	0	3	3	
0	1.4.1	KH	ACDA03797E05.T3m.scf	PGSC0003DMT400046406	3	12	2E-56
0	1.4.1	KH	MICRO.15837.C1	PGSC0003DMT400046406	3	12	1E-167
0	1.4.1	KH	MICRO.2522.C1	PGSC0003DMT400046406	3	12	1E-142
0	1.4.1	KH	MICRO.8094.C1	PGSC0003DMT400076105	3	12	0
1	1.4.1	KH	MICRO.6363.C2	PGSC0003DMT400051261	3	12	2E-98
1	1.4.1	KH	MICRO.1374.C1	PGSC0003DMT400051670	3	12	1E-119
1	1.4.1	KH	MICRO.1374.C2	PGSC0003DMT400051670	3	12	1E-113
1	1.4.1	KH	MICRO.14182.C1	PGSC0003DMT400087680	3	13	1E-151
0	1.4.1	KH	MICRO.10105.C1	PGSC0003DMT400047372	3	13	0
1	1.4.1	KH	MICRO.1780.C1	PGSC0003DMT400064701	3	13	1E-149
1	1.4.1	KH	bf_cswbxxxx_0048c08.t3m.scf	PGSC0003DMT400003370	3	13	3E-86
0	1.4.1	KH	154H04AF.esd	PGSC0003DMT400041750	3	13	1E-146
0	1.4.1	KH	MICRO.6367.C1	PGSC0003DMT400041751	3	13	1E-139
0	1.4.1	KH	MICRO.9671.C1	PGSC0003DMT400041751	3	13	1E-145
0	1.4.1	KH	MICRO.14608.C1	PGSC0003DMT400083770	3	13	2E-76
0	1.4.1	KH	MICRO.3159.C1	PGSC0003DMT400083772	3	13	1E-135
1	1.4.1	KH	cSTD19P14TH	PGSC0003DMT400047666	3	14	2E-91
1	1.4.1	KH	MICRO.11173.C1	PGSC0003DMT400047666	3	14	1E-147
1	1.4.1	KH	MICRO.3888.C1	PGSC0003DMT400047666	3	14	1E-163
1	1.4.1	KH	SDBN006O11u.scf	PGSC0003DMT400097703	3	15	1E-83
0	1.4.1	KH	MICRO.11819.C1	PGSC0003DMT400012623	3	23	4E-80
0	1.4.1	KH	MICRO.2790.C1	PGSC0003DMT400012623	3	23	1E-135
1	1.4.1	KH	MICRO.6108.C1	PGSC0003DMT400076798	3	25	0
2	1.4.1	KH	SDBN006B03u.scf	0	4	3	
1	1.4.1	KH	MICRO.1623.C4	PGSC0003DMT400057306	4	4	0
1	1.4.1	KH	MICRO.1623.C1	PGSC0003DMT400057307	4	4	0
1	1.4.1	KH	MICRO.1623.C6	PGSC0003DMT400057307	4	4	1E-146
2	1.4.1	KH	bf_arrayxxx_0078a11.t3m.scf	PGSC0003DMT400057306	4	4	2E-68
2	1.4.1	KH	MICRO.1623.C3	PGSC0003DMT400057307	4	4	5E-53
0	1.4.1	KH	bf_arrayxxx_0058f12.t7m.scf	PGSC0003DMT400064021	4	4	1E-64
1	1.4.1	KH	MICRO.6779.C2	PGSC0003DMT400064107	4	4	1E-173
1	1.4.1	KH	MICRO.6779.C1	PGSC0003DMT400064021	4	4	2E-86
2	1.4.1	KH	cPRO8L12TH	PGSC0003DMT400064107	4	4	2E-47
1	1.4.1	KH	MICRO.7386.C1	PGSC0003DMT400071249	4	4	1E-164

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 7. Povezava ontologije z analizo omrežij

B	O	Skupina	POCI_id	PGSC_homolog	Particij e_poci_ vs_poci	Particij e_poci_ vs_dmt	Evrednost _poci_vs_ dmt
1	1.4.1	KH	MICRO.195.C6	PGSC0003DMT400071249	4	4	0
1	1.4.1	KH	MICRO.7267.C1	PGSC0003DMT400078305	4	4	0
0	1.4.1	KH	MICRO.11970.C2	PGSC0003DMT400047374	10	13	1E-163
1	1.4.1	KH	MICRO.11970.C1	PGSC0003DMT400047375	10	13	1E-173
0	1.4.1	KH	MICRO.17037.C1	PGSC0003DMT400003371	10	13	5E-93
1	1.4.1	KH	bf_suspxxxx_0032a04.t3m.scf	PGSC0003DMT400003371	10	13	1E-130
1	1.4.1	KH	SSBN001K10u.scf	PGSC0003DMT400003371	10	13	4E-69
0	1.4.1	KH	MICRO.5525.C1	PGSC0003DMT400078300	11	24	0
0	1.4.1	KH	TBSK03243FG03.t3m.scf	PGSC0003DMT400078300	11	24	1E-49
1	1.4.1	KH	ACDA01310F02.T3m.scf	PGSC0003DMT400078300	11	24	7E-40
2	1.4.1	KH	MICRO.842.C6	0	38	3	
2	1.4.1	KH	MICRO.13680.C2	PGSC0003DMT400018681	39	5	1E-157
0	1.4.1	KH	BF_LBCHXXXX_0001H07_T3 M.SCF	PGSC0003DMT400047375	46	13	1E-139
0	1.4.1	KH	MICRO.11971.C1	PGSC0003DMT400047372	46	13	1E-142
1	1.4.1	KH	TBSK03427FF07.t3m.scf	0	47	3	
0	2.1	RNA HELICASE	ACDA03578C02.T3m.scf	0	7	3	
1	2.1	RNA HELICASE	ACDA04258C10.T3m.scf	0	7	3	
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.6861.C5	0	7	3	
1	2.1	RNA HELICASE	bf_mxlfxxxx_0017d02.t3m.scf	0	7	3	
0	2.1	RNA HELICASE	BPL112E18TH	0	7	3	
0	2.1	RNA HELICASE	BPL113A16TH	0	7	3	
1	2.1	RNA HELICASE	ACDA04219H07.T3m.scf	0	7	3	
0	2.1	RNA HELICASE	bf_stolxxxx_0037c10.t3m.scf	0	7	3	
1	2.1	RNA HELICASE	POCCF04TP	0	7	3	
0	2.1	RNA HELICASE	MICRO.4273.C2	0	7	3	
0	2.1	RNA HELICASE	MICRO.4273.C4	0	7	3	
0	2.1	RNA HELICASE	MICRO.4273.C5	0	7	3	
0	2.1	RNA HELICASE	MICRO.4812.C1	0	7	3	
0	2.1	RNA HELICASE	SDBN006D14u.scf	0	7	3	
1	2.1	RNA HELICASE	POCBC96TP	0	7	3	
1	2.1	RNA HELICASE	bf_jvrootxx_0042d02.t3m.scf	0	7	3	
1	2.1	RNA HELICASE	POCB976TP	0	7	3	
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.11947.C1	0	7	3	
1	2.1	RNA HELICASE	POCBB52TV	0	7	3	
1	2.1	RNA HELICASE	POCC196TV	0	7	3	
2	2.1	RNA HELICASE	MICRO.4623.C2	0	7	3	

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 7. Povezava ontologije z analizo omrežij

B	O	Skupina	POCI_id	PGSC_homolog	Particij e_poci_ vs_poci	Particij e_poci_ vs_dmt	Evrednost _poci_vs_ dmt
2	2.1	RNA HELICASE	MICRO.135.C8	0	7	3	
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.4623.C3	PGSC0003DMT400054337	7	6	0
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.6356.C1	PGSC0003DMT400054337	7	6	0
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.6356.C2	PGSC0003DMT400054337	7	6	0
2	2.1	RNA HELICASE	MICRO.6356.C3	PGSC0003DMT400054337	7	6	1E-135
2	2.1	RNA HELICASE	MICRO.6356.C4	PGSC0003DMT400054337	7	6	1E-103
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.9998.C2	PGSC0003DMT400057607	7	6	1E-57
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.9998.C1	PGSC0003DMT400057607	7	6	7E-33
0	2.1	RNA HELICASE	067A05AF.esd	PGSC0003DMT400057607	7	6	6E-40
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.14217.C1	PGSC0003DMT400046824	7	6	1E-175
0	2.1	RNA HELICASE	MICRO.3580.C1	PGSC0003DMT400046823	7	6	0
0	2.1	RNA HELICASE	MICRO.3580.C2	PGSC0003DMT400046823	7	6	0
0	2.1	RNA HELICASE	MICRO.1092.C1	PGSC0003DMT400046822	7	6	1E-104
0	2.1	RNA HELICASE	MICRO.13824.C1	PGSC0003DMT400001391	7	6	1E-34
0	2.1	RNA HELICASE	MICRO.6861.C1	PGSC0003DMT400080614	7	6	5E-75
0	2.1	RNA HELICASE	MICRO.6861.C2	PGSC0003DMT400080614	7	6	1E-81
0	2.1	RNA HELICASE	MICRO.6861.C3	PGSC0003DMT400046822	7	6	1E-139
0	2.1	RNA HELICASE	MICRO.6861.C4	PGSC0003DMT400080614	7	6	9E-77
0	2.1	RNA HELICASE	SDBN002C24u.scf	PGSC0003DMT400080614	7	6	6E-47
0	2.1	RNA HELICASE	STMJF58TH	PGSC0003DMT400080614	7	6	1E-56
1	2.1	RNA HELICASE	bf_mxlfxxxx_0007g08.t3m.scf	PGSC0003DMT400071932	7	6	3E-38
0	2.1	RNA HELICASE	MICRO.218.C1	PGSC0003DMT400071859	7	6	3E-98
0	2.1	RNA HELICASE	MICRO.218.C3	PGSC0003DMT400071859	7	6	4E-81
0	2.1	RNA HELICASE	POABN75TV	PGSC0003DMT400071859	7	6	2E-84
1	2.1	RNA HELICASE	bf_mxlfxxxx_0013e05.t3m.scf	PGSC0003DMT400071859	7	6	5E-33
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.623.C1	PGSC0003DMT400024026	7	6	0
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.15422.C1	PGSC0003DMT400024026	7	6	1E-132
2	2.1	RNA HELICASE	MICRO.623.C2	PGSC0003DMT400009555	7	6	0
2	2.1	RNA HELICASE	MICRO.623.C4	PGSC0003DMT400024026	7	6	1E-121
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.6198.C1	PGSC0003DMT400036663	7	6	0
2	2.1	RNA HELICASE	MICRO.1758.C1	PGSC0003DMT400036663	7	6	4E-97
0	2.1	RNA HELICASE	MICRO.1331.C2	PGSC0003DMT400000610	7	6	1E-122
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.1331.C1	PGSC0003DMT400000611	7	6	0

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 7. Povezava ontologije z analizo omrežij

B	O	Skupina	POCI_id	PGSC_homolog	Particij e_poci_ vs_poci	Particij e_poci_ vs_dmt	Evrednost _poci_vs_ dmt
2	2.1	RNA HELICASE	bf_stolxxxx_0016d04.t7m.scf	PGSC0003DMT400000610	7	6	3E-55
2	2.1	RNA HELICASE	MICRO.17918.C1	PGSC0003DMT400000610	7	6	2E-36
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.4640.C1	PGSC0003DMT400004438	7	6	0
2	2.1	RNA HELICASE	cSTD12H24TH	PGSC0003DMT400004438	7	6	1E-135
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.1526.C1	PGSC0003DMT400081850	7	6	1E-152
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.9869.C3	PGSC0003DMT400010920	7	6	1E-162
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.14843.C1	PGSC0003DMT400002828	7	6	0
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.9869.C1	PGSC0003DMT400081850	7	6	0
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.1978.C4	PGSC0003DMT400002828	7	6	0
1	2.1	RNA HELICASE	bf_arrayxxx_0072a03.t3m.scf	PGSC0003DMT400002828	7	6	1E-121
2	2.1	RNA HELICASE	MICRO.3768.C1	PGSC0003DMT400010920	7	6	1E-157
0	2.1	RNA HELICASE	MICRO.912.C3	PGSC0003DMT400053568	7	6	1E-61
0	2.1	RNA HELICASE	cSTS11F3TH	PGSC0003DMT400053567	7	6	1E-40
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.912.C1	PGSC0003DMT400053567	7	6	1E-70
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.912.C5	PGSC0003DMT400052757	7	6	2E-47
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.912.C4	PGSC0003DMT400052757	7	6	4E-57
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.14384.C1	PGSC0003DMT400043101	7	6	0
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.14385.C1	PGSC0003DMT400043101	7	6	0
1	2.1	RNA HELICASE	bf_suspxxxx_0005B10.t3m.scf	PGSC0003DMT400024330	7	6	9E-92
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.7498.C1	PGSC0003DMT400023277	7	6	0
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.13508.C1	PGSC0003DMT400081898	7	6	0
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.7073.C1	PGSC0003DMT400057202	7	6	0
1	2.1	RNA HELICASE	cSTD16J7TH	PGSC0003DMT400057202	7	6	1E-141
0	2.1	RNA HELICASE	MICRO.3179.C1	PGSC0003DMT400011665	7	6	1E-178
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.9470.C1	PGSC0003DMT400011665	7	6	0
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.15131.C1	PGSC0003DMT400029241	7	6	0
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.6647.C1	PGSC0003DMT400022137	7	6	0
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.4936.C1	PGSC0003DMT400029241	7	6	1E-55
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.4936.C2	PGSC0003DMT400045695	7	6	1E-54
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.6982.C1	PGSC0003DMT400063252	7	6	0
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.1629.C1	PGSC0003DMT400025551	7	6	1E-173
0	2.1	RNA HELICASE	MICRO.17829.C1	PGSC0003DMT400083875	7	6	9E-81
0	2.1	RNA HELICASE	MICRO.851.C1	PGSC0003DMT400083875	7	6	1E-137

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 7. Povezava ontologije z analizo omrežij

B	O	Skupina	POCI_id	PGSC_homolog	Particij e_poci_ vs_poci	Particij e_poci_ vs_dmt	Evrednost _poci_vs_ dmt
0	2.1	RNA HELICASE	MICRO.851.C2	PGSC0003DMT400046824	7	6	1E-132
0	2.1	RNA HELICASE	MICRO.4273.C1	PGSC0003DMT400012518	7	6	5E-36
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.17540.C1	PGSC0003DMT400011665	7	6	1E-111
1	2.1	RNA HELICASE	SDBN006M18u.scf	PGSC0003DMT400001391	7	6	9E-42
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.3828.C1	PGSC0003DMT400054337	7	6	1E-156
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.10805.C1	PGSC0003DMT400088289	7	6	2E-40
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.4273.C3	PGSC0003DMT400075339	7	6	6E-83
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.14148.C1	PGSC0003DMT400019782	7	6	2E-43
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.10177.C1	PGSC0003DMT400029241	7	6	1E-33
0	2.1	RNA HELICASE	MICRO.4535.C1	PGSC0003DMT400007864	7	31	1E-149
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.11134.C1	PGSC0003DMT400007864	7	31	0
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.13901.C1	PGSC0003DMT400079640	7	32	7E-52
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.87.C1	PGSC0003DMT400059671	7	33	0
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.4095.C2	PGSC0003DMT400054570	7	34	1E-129
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.4095.C1	PGSC0003DMT400054570	7	34	1E-146
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.2576.C1	PGSC0003DMT400003801	7	35	5E-38
0	2.1	RNA HELICASE	MICRO.13061.C1	PGSC0003DMT400023224	7	41	2E-58
0	2.1	RNA HELICASE	bf_mxlfxxxx_0006d03.t3m.scf	PGSC0003DMT400023224	7	41	4E-45
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.3164.C14	0	8	3	
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.3164.C6	PGSC0003DMT400025237	8	6	2E-62
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.3164.C1	PGSC0003DMT400026065	8	6	1E-39
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.3164.C8	PGSC0003DMT400057607	8	6	3E-51
2	2.1	RNA HELICASE	cSTB46J20TH	PGSC0003DMT400037025	8	6	1E-37
2	2.1	RNA HELICASE	MICRO.3164.C9	PGSC0003DMT400056008	8	6	7E-99
2	2.1	RNA HELICASE	MICRO.3164.C15	PGSC0003DMT400037025	8	6	9E-33
2	2.1	RNA HELICASE	SDBN004A12u.scf	PGSC0003DMT400070320	8	6	1E-161
2	2.1	RNA HELICASE	POCCI25TP	PGSC0003DMT400007425	8	7	1E-132
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.3164.C7	PGSC0003DMT400052114	8	18	0
1	2.1	RNA HELICASE	cSTB29O1TH	PGSC0003DMT400052548	9	22	1E-103
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.10732.C1	PGSC0003DMT400035614	9	22	0
2	2.1	RNA HELICASE	cSTB30O8TH	PGSC0003DMT400052548	9	22	2E-96
2	2.1	RNA HELICASE	MICRO.4041.C1	PGSC0003DMT400053368	9	22	8E-98
0	2.1	RNA HELICASE	MICRO.3919.C1	PGSC0003DMT400034439	16	27	0

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 7. Povezava ontologije z analizo omrežij

B	O	Skupina	POCI_id	PGSC_homolog	Particij e_poci_ vs_poci	Particij e_poci_ vs_dmt	Evrednost _poci_vs_ dmt
0	2.1	RNA HELICASE	cSTA17A4TH	0	17	3	
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.1876.C2	PGSC0003DMT400068120	18	29	0
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.15073.C1	PGSC0003DMT400050763	18	36	1E-170
0	2.1	RNA HELICASE	MICRO.6227.C1	PGSC0003DMT400042056	18	43	0
0	2.1	RNA HELICASE	MICRO.10604.C1	0	21	3	
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.10604.C2	0	21	3	
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.2360.C1	0	22	3	
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.144.C2	PGSC0003DMT400023283	22	37	7E-99
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.144.C1	PGSC0003DMT400023283	22	37	0
0	2.1	RNA HELICASE	POABL93TV	PGSC0003DMT400039876	22	37	1E-159
0	2.1	RNA HELICASE	cSTA2L17TH	PGSC0003DMT400018531	22	37	6E-89
1	2.1	RNA HELICASE	POABL93TP	PGSC0003DMT400039876	22	37	0
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.2754.C1	PGSC0003DMT400018531	22	37	0
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.16008.C1	PGSC0003DMT400018533	22	37	8E-87
0	2.1	RNA HELICASE	MICRO.9532.C1	PGSC0003DMT400063369	22	37	0
1	2.1	RNA HELICASE	cPRO27C4TH	PGSC0003DMT400063369	22	37	1E-155
0	2.1	RNA HELICASE	MICRO.16421.C1	PGSC0003DMT400046188	22	37	1E-123
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.1761.C1	PGSC0003DMT400046188	22	37	1E-133
1	2.1	RNA HELICASE	bf_suspxxxx_0034a08.t3m.scf	PGSC0003DMT400000297	22	37	1E-106
0	2.1	RNA HELICASE	MICRO.11475.C1	PGSC0003DMT400009842	22	37	1E-158
0	2.1	RNA HELICASE	MICRO.15752.C1	PGSC0003DMT400055518	22	37	7E-82
0	2.1	RNA HELICASE	MICRO.2254.C1	PGSC0003DMT400084916	22	37	0
0	2.1	RNA HELICASE	cSTA26O3TH	PGSC0003DMT400038623	22	37	1E-42
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.1936.C1	PGSC0003DMT400002418	22	38	1E-58
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.9603.C1	PGSC0003DMT400055091	22	38	6E-65
1	2.1	RNA HELICASE	ACDA03610E10.T3m.scf	0	23	3	
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.2921.C1	PGSC0003DMT400078070	23	39	1E-124
0	2.1	RNA HELICASE	MICRO.805.C3	PGSC0003DMT400078069	23	39	9E-82
0	2.1	RNA HELICASE	MICRO.805.C2	PGSC0003DMT400078069	23	39	5E-31
1	2.1	RNA HELICASE	cSTA14K3TH	PGSC0003DMT400078070	23	39	7E-65
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.11732.C1	0	24	3	
0	2.1	RNA HELICASE	cSTA44N20TH	PGSC0003DMT400055057	24	38	1E-49
0	2.1	RNA HELICASE	083A04AF.esd	PGSC0003DMT400059139	25	40	5E-35

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 7. Povezava ontologije z analizo omrežij

B	O	Skupina	POCI_id	PGSC_homolog	Particij e_poci_ vs_poci	Particij e_poci_ vs_dmt	Evrednost _poci_vs_ dmt
0	2.1	RNA HELICASE	BF_LBCHXXXX_0024C06_T3 M.SCF	0	26	3	
0	2.1	RNA HELICASE	MICRO.3760.C2	PGSC0003DMT400076476	26	42	4E-61
0	2.1	RNA HELICASE	MICRO.16688.C1	0	27	3	
0	2.1	RNA HELICASE	bf_acdaxxxx_0064h12.t3m.scf	PGSC0003DMT400056692	28	37	1E-114
0	2.1	RNA HELICASE	cSTB31O16TH	0	29	3	
0	2.1	RNA HELICASE	cSTS30C5TH	PGSC0003DMT400063369	30	37	2E-90
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.6415.C1	0	40	3	
2	2.1	RNA HELICASE	cPRO3N8TH	0	40	3	
1	2.1	RNA HELICASE	MICRO.8023.C2	PGSC0003DMT400051401	40	17	5E-60
2	2.1	RNA HELICASE	cPRO2P21TH	PGSC0003DMT400023387	41	8	1E-155
2	2.1	RNA HELICASE	bf_mxlfxxxx_0011h05.t3m.scf	PGSC0003DMT400081294	42	9	1E-47
0	2.1	RNA HELICASE	MICRO.6507.C1	PGSC0003DMT400042584	48	16	1E-134
0	2.1.1	DEAH-DEAD	MICRO.5675.C1	0	7	3	
0	2.1.1	DEAH-DEAD	MICRO.10176.C1	PGSC0003DMT400071932	7	6	0
0	2.1.1	DEAH-DEAD	bf_suspxxxx_0055h02.t3m.scf	PGSC0003DMT400053568	7	6	4E-43
0	2.1.1	DEAH-DEAD	MICRO.2892.C1	PGSC0003DMT400080123	8	30	0
0	2.1.1	DEAH-DEAD	MICRO.2892.C2	PGSC0003DMT400080123	8	30	0
0	2.1.1	DEAH-DEAD	MICRO.11316.C1	PGSC0003DMT400024528	18	28	0
0	2.1.1	DEAH-DEAD	MICRO.13006.C1	PGSC0003DMT400050973	18	29	6E-98
0	2.1.1	DEAH-DEAD	MICRO.13525.C1	PGSC0003DMT400080123	19	30	1E-137
0	2.1.1	DEAH-DEAD	MICRO.7078.C1	PGSC0003DMT400050972	20	29	3E-32
0	2.1.1	DEAH-DEAD	MICRO.8023.C1	PGSC0003DMT400051401	40	17	6E-70
1	2.2	AGO	bf_arrayxxx_0068h05.t3m.scf	0	1	3	
1	2.2	AGO	ACDA03406D10.T3m.scf	0	1	3	
0	2.2	AGO	POCAH54TV	0	1	3	
1	2.2	AGO	bf_mxlfxxxx_0036g08.t3m.scf	0	1	3	
1	2.2	AGO	BF_LBCHXXXX_0003H09_T3 M.SCF	0	1	3	
0	2.2	AGO	MICRO.3496.C1	PGSC0003DMT400054669	1	11	0
1	2.2	AGO	MICRO.3496.C2	PGSC0003DMT400054669	1	11	0
1	2.2	AGO	POCCN36TP	PGSC0003DMT400054669	1	11	8E-86
1	2.2	AGO	bf_arrayxxx_0078a03.t3m.scf	PGSC0003DMT400054669	1	11	4E-83
0	2.2	AGO	MICRO.3525.C1	PGSC0003DMT400069313	1	11	1E-174
0	2.2	AGO	MICRO.978.C1	PGSC0003DMT400069313	1	11	0
0	2.2	AGO	MICRO.978.C3	PGSC0003DMT400079716	1	11	0
0	2.2	AGO	POAB803TV	PGSC0003DMT400069313	1	11	2E-83
0	2.2	AGO	bf_mxlfxxxx_0048b04.t3m.scf	PGSC0003DMT400079721	1	11	1E-124
1	2.2	AGO	MICRO.5353.C1	PGSC0003DMT400077569	1	11	0
1	2.2	AGO	MICRO.4751.C1	PGSC0003DMT400077569	1	11	1E-130
1	2.2	AGO	SDBN006O22u.scf	PGSC0003DMT400036995	1	11	2E-96

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 7. Povezava ontologije z analizo omrežij

B	O	Skupina	POCI_id	PGSC_homolog	Particij e_poci_ vs_poci	Particij e_poci_ vs_dmt	Evrednost _poci_vs_ dmt
2	2.2	AGO	MICRO.978.C6	PGSC0003DMT400036995	1	11	2E-68
0	2.2	AGO	MICRO.1031.C1	PGSC0003DMT400058471	1	11	0
0	2.2	AGO	MICRO.1031.C2	PGSC0003DMT400058471	1	11	0
0	2.2	AGO	MICRO.1031.C3	PGSC0003DMT400058471	1	11	1E-166
0	2.2	AGO	MICRO.1202.C1	PGSC0003DMT400069460	1	11	1E-158
0	2.2	AGO	MICRO.1202.C2	PGSC0003DMT400069460	1	11	0
0	2.2	AGO	MICRO.6498.C1	PGSC0003DMT400069460	1	11	0
0	2.2	AGO	cSTA33L9TH	PGSC0003DMT400058471	1	11	2E-47
0	2.2	AGO	MICRO.4663.C1	PGSC0003DMT400069313	1	11	0
1	2.2	AGO	MICRO.14254.C1	PGSC0003DMT400018362	1	11	1E-133
0	2.2	AGO	MICRO.5302.C2	PGSC0003DMT400069460	1	11	0
1	2.2	AGO	cSTA21P10THB	PGSC0003DMT400058471	1	11	8E-69
2	2.2	AGO	MICRO.10678.C2	PGSC0003DMT400028754	35	1	2E-75
1	3.1	RDRP	MICRO.518.C1	PGSC0003DMT400080319	6	21	0
2	3.1	RDRP	bf_mxflxxxx_0027g02.t3m.scf	PGSC0003DMT400080319	6	21	4E-70
0	3.1	RDRP	MICRO.11471.C1	PGSC0003DMT400080319	6	21	5E-83
0	3.1	RDRP	MICRO.11471.C2	PGSC0003DMT400080295	6	21	2E-51
1	3.1	RDRP	MICRO.15587.C1	PGSC0003DMT400080295	13	21	1E-165
0	3.1	RDRP	MICRO.10788.C1	PGSC0003DMT400080295	13	21	4E-65
0	3.1	RDRP	MICRO.11470.C1	0	14	3	
0	3.1	RDRP	bf_stolxxxx_0068c01.t3m.scf	PGSC0003DMT400060673	15	21	1E-147
0	3.1	RDRP	MICRO.2706.C1	PGSC0003DMT400042056	31	43	1E-172
1	3.1	RDRP	BF_CSCHXXXX_0034E02.T3 M.SCF	0	32	3	
0	3.2	SGS	MICRO.6709.C1	PGSC0003DMT400079573	32	44	3E-95
0	3.2	SGS	MICRO.6709.C2	PGSC0003DMT400079573	33	44	3E-37
1	3.2.1	XH-XS	MICRO.7627.C1	PGSC0003DMT400060232	34	10	1E-177
2	3.2.1	XH-XS	cSTB3N9TH	PGSC0003DMT400062666	34	10	2E-39
0	3.2.1	XH-XS	BF_TUBSXXXX_0010F07_T3 M.SCF	PGSC0003DMT400036803	34	10	1E-100
0	3.2.1	XH-XS	MICRO.1746.C1	PGSC0003DMT400036803	34	10	0
0	3.2.1	XH-XS	MICRO.1746.C2	PGSC0003DMT400036803	34	10	0
0	3.2.1	XH-XS	MICRO.1746.C3	PGSC0003DMT400036803	34	10	2E-61
1	3.2.1	XH-XS	MICRO.15287.C1	PGSC0003DMT400034577	34	19	1E-116
2	4.1	DNA METHYLASE	MICRO.6544.C1	PGSC0003DMT400075959	2	2	0
2	4.1	DNA METHYLASE	MICRO.7918.C1	PGSC0003DMT400075959	2	2	5E-59
2	4.1	DNA METHYLASE	bf_mxflxxxx_0051d03.t3m.scf	PGSC0003DMT400067668	36	2	1E-129
2	4.1	DNA METHYLASE	MICRO.10710.C1	PGSC0003DMT400075959	37	2	1E-54
1	4.1	DNA METHYLASE	cSTB36J24TH	0	43	3	
1	4.1	DNA METHYLASE	POACK30TV	0	44	3	
1	4.1	DNA METHYLASE	bf_arrayxxx_0073c11.t7m.scf	PGSC0003DMT400075959	45	2	2E-52



#### 4.5 IZRAŽANJE GENOV, KI SODELUJEJO PRI POST-TRANSKRIPCIJSKEM UTIŠANJU GENOV PRI KROMPIRJU PO OKUŽBI S PVY

Želeli smo ugotoviti, ali se komponente PTGS aktivno odzivajo na okužbo s PVY. Zato smo naš nabor unigenov povezali s podatki o izražanju genov.

Podatke smo potrebovali predvsem iz dveh razlogov: (i) da bi dobili pregled nad splošno dinamiko ekspresije zbranih genov in (ii) da bi imeli neko podlago za izbiro kandidatov za delo v laboratoriju.

Ekspresijska analiza, je bila narejena na dveh različnih kultivarjih krompirja, in sicer PW ter Rywal. PW je predstavljal v tem poskusu primer skrajno rezistentnega kultivarja krompirja (ER ali extreme resistance), medtem ko je Rywal predstavljal primer odziva HR (hypersensitive response) rastline na okužbo z PVY. Poleg tega, je bil v poskus vključen še transgeni kultivar Rywal nahG s poslabšano signalizacijo s salicilno kislino, kot primer na okužbo občutljive rastline. Vzorce rastlin smo odvzeli 1, 3 ter 6 dni po inokulaciji krompirja s PVY in analizirali smo genska ekspresijo v okviru količine posameznega transkripta v vzorcih.

Ekspresijski podatki so podani, kot logaritem razmerja ekspresije med zdravo (neokuženo) ter okuženo paralelko. Prikazane so samo vrednosti vzorcev, za katere je bila izračunana p-vrednost manj kot 0,05.

V preglednici 8, so zbrani podatki izražanja izbranih genov ob okužbi krompirja s PVY. Ker je podatkov preveč, da bi lahko komentirali izražanje posameznega gena, se raje osredotočimo na splošne vzorce izražanja genov, ki jih lahko opazimo v preglednici 8.

Kultivar krompirja PW (stolpci PW1, PW3 in PW6) ne kaže nikakršnih ekstremnih sprememb v izražanju komponent PTGS. Opazno je le povišanje izražanja ( $\log_{FC} > 2$ ) nekaterih specifičnih genov znotraj posamezne skupine (npr. MICRO.3768.C1, ACDA00524D08.T3m.scf, itd.).

Pri kultivarju Rywal (stolpci R1, R3 in R6), lahko opazimo, da v splošnem je prišlo do zmanjšanja izražanja genov, udeleženih v PTGS. Predvsem v skupini AGO ter PAZ smo zaznali gene (unigene/transkripte), z izredno zmanjšanim izražanjem ( $\log_{2}FC > -4$ ).

V primeru kultivarja Rywal nahG pa se je vzorec izražanja nekoliko razlikoval od drugih dveh. Močno diferencialno izraženi geni ( $\log_{2}FC > 2$  ali  $\log_{2}FC < -2$ ) so imeli ob prvem dnevu po inokulaciji zmanjšano izraženo, ob šestem dnevu pa povečano. V teh primerih, je bila p vrednost za vrednost ob tretjem dnevu po inokulaciji večja od 0,05, zato podatki niso prisotni v preglednici 8 in ne moremo reči, kaj se je takrat dogajalo z izražanjem genov.

Preglednica 8: Ekspresijski podatki izbranih unigenov POCI, po okužbi krompirja s PVY. Preglednica prikazuje spisek unigenov POCI, razvrščenih na podlagi ontologije. Tako razvrstitev smo povezali z ekspresijskimi podatki. Stolpci z ekspresijskimi podatki so označeni z začetnico krompirjevega kultivarja (PW= kultivar PW, R=Rywal, RnahG=Rywal nahG). Izražanje genov smo primerjali 1, 3 in 6 dni po okužbi. Ekspresijske vrednosti so podane kot logaritem razmerja surove ekspresijske vrednosti določenega gena, med okuženo ter zdravo rastlino ( $\log_{2}$  fold change ali  $\log_{2}FC$ ). Vrednosti so obarvane z barvno skalo, kjer so manjša oz. negativna števila obarvana bolj rdeče, večja pa zeleno. Vrednosti za katere je bila p vrednost t-testa večja od 0,05, v preglednici niso prikazane, njihova polja pa obarvana sivo.

Ontologija	Skupina	POCI_id	PW1	PW3	PW6	R1	R3	R6	RnahG 1	RnahG 3	RnahG 6
1.1	DCL	MICRO.15150.C1				0,60					-0,78
1.1	DCL	MICRO.15150.C2		-0,65	-0,85	0,77	0,90				-0,87
1.1	DCL	MICRO.15199.C1			-0,95	0,77	1,51	0,69	0,77	0,52	1,10
1.1	DCL	MICRO.16182.C1					0,67	-0,47	0,48	-0,61	-0,91
1.1.1	PAZ	ACDA00524D08.T3m.scf	1,50	1,97	2,40	-4,69	-4,93		-3,51		2,03
1.1.1	PAZ	SSBN003H08u.scf	-0,47	-0,40			0,57		0,58	-0,42	-0,51
1.1.1	PAZ	MICRO.16034.C1	0,64		0,77	-1,81	-1,85		-0,70		1,33
1.1.1	PAZ	bf_suspxxxx_0022B02.t3m.scf		0,46	0,75	-1,21	-1,28		-0,33	-0,61	
1.1.1	PAZ	MICRO.6147.C1							0,59		-0,71
1.2	DRB	POAB595TP									
1.2	DRB	MICRO.14682.C1									
1.4	HEN	MICRO.8584.C3	-0,30			-0,49	-0,39	-0,46		-0,38	-0,32
1.4	HEN	TBSK00866FA02t3m.scf									
1.4	HEN	MICRO.9671.C2									0,47
1.4.1	KH	MICRO.14182.C1	0,52	0,81	0,57	-2,43	-2,45	-0,61	-1,11		1,21
1.4.1	KH	ACDA03797E05.T3m.scf									
1.4.1	KH	MICRO.15837.C1			-0,31	0,49	0,54				-0,30
1.4.1	KH	MICRO.2522.C1	0,39	0,58	0,39	-0,91	-1,23		-1,15		1,00
1.4.1	KH	MICRO.10105.C1			0,48		-0,41		-0,57	0,40	0,62
1.4.1	KH	MICRO.1780.C1		0,75	1,10	-1,68	-1,82		-1,56		1,56
1.4.1	KH	bf_cswbxxxx_0048c08.t3m.scf									
1.4.1	KH	cSTD19P14TH	0,99	1,45		-2,07	-2,69		-1,75		2,08
1.4.1	KH	MICRO.11173.C1	-0,27	-0,45	-0,60	0,63	1,05	0,42	0,33		-0,54
1.4.1	KH	MICRO.3888.C1	0,44	0,89	0,95	-1,16	-1,51		-1,09		1,20
1.4.1	KH	SDBN006O11u.scf				-0,53	-0,60				
1.4.1	KH	154H04AF.esd		0,52	0,56	-0,70	-0,96			0,72	1,41
1.4.1	KH	MICRO.6367.C1		0,65	0,66	-2,32	-2,14		-0,99	0,82	2,29

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 8. Ekspresijski podatki izbranih POCI unigenov, po okužbi krompirja s PVY

Ontologija	Skupina	POCI_id	PW1	PW3	PW6	R1	R3	R6	RnahG 1	RnahG 3	RnahG 6
1.4.1	KH	MICRO.9671.C1		-0,37	-0,38		0,53		0,83		
1.4.1	KH	MICRO.11819.C1		0,26					0,31		
1.4.1	KH	MICRO.2790.C1		0,99	1,54	-2,12	-2,79		-1,72		1,92
1.4.1	KH	MICRO.14608.C1						0,55			
1.4.1	KH	MICRO.3159.C1		0,48	0,79	-1,37	-1,80		-0,93		1,02
1.4.1	KH	MICRO.8094.C1	0,50				-0,52				
1.4.1	KH	MICRO.6108.C1				0,63		-0,67		-0,30	-0,60
1.4.1	KH	MICRO.6363.C2	-0,50				-0,37				
1.4.1	KH	MICRO.1374.C1		0,50	0,41	-0,74	-0,63				
1.4.1	KH	MICRO.1374.C2			0,46	-0,77	-1,51		-0,76		
1.4.1	KH	MICRO.14858.C1			-0,32		0,51				
1.4.1	KH	MICRO.17367.C1		0,65	0,68	-1,48	-1,62		-0,83		2,07
1.4.1	KH	MICRO.2460.C1	1,01	1,59	1,44	-2,59	-3,29		-1,92		2,00
1.4.1	KH	MICRO.842.C3	-0,31		-0,34						-0,62
1.4.1	KH	MICRO.842.C4		0,60		-0,59	-1,34		-1,13		1,10
1.4.1	KH	MICRO.1623.C4	-0,28				0,36		0,34		
1.4.1	KH	MICRO.1623.C1					0,37	0,64		0,50	1,45
1.4.1	KH	MICRO.1623.C6									
1.4.1	KH	bf_arrayxxx_0078a11.t3m.scf					0,53	-0,33	0,37		
1.4.1	KH	MICRO.1623.C3									
1.4.1	KH	bf_arrayxxx_0058f12.t7m.scf									
1.4.1	KH	MICRO.6779.C2	-0,40		0,39		-0,40	-0,73			
1.4.1	KH	MICRO.6779.C1			-0,52	0,68	0,89		0,55		
1.4.1	KH	cPRO8L12TH			0,50	-0,46	-0,50				0,48
1.4.1	KH	MICRO.7386.C1	-0,55	-0,81	-1,37	1,82	1,48		0,71		-0,74
1.4.1	KH	MICRO.195.C6			-0,38	0,36	0,53	-0,41			
1.4.1	KH	MICRO.7267.C1		-0,21	-0,34	0,26	0,31	-0,63	0,20		-0,38
1.4.1	KH	SDBN006B03u.scf									
1.4.1	KH	MICRO.11970.C2		0,36		-0,24	-0,38	0,62	-0,45	0,33	0,36
1.4.1	KH	MICRO.11970.C1									
1.4.1	KH	MICRO.17037.C1									
1.4.1	KH	bf_suspxxxx_0032a04.t3m.scf	0,51	0,32		-0,25					0,53
1.4.1	KH	SSBN001K10u.scf									
1.4.1	KH	MICRO.5525.C1			-0,52		1,05	0,57		0,90	
1.4.1	KH	TBSK03243FG03.t3m.scf	-0,97								
1.4.1	KH	ACDA01310F02.T3m.scf		-1,22				-0,61	0,78	-1,04	-1,36
1.4.1	KH	MICRO.842.C6									-0,45
1.4.1	KH	MICRO.13680.C2									
1.4.1	KH	BF_LBCHXXXX_0001H07_T3M.SCF								-0,47	-0,87
1.4.1	KH	MICRO.11971.C1				-0,63			0,58	-0,81	-1,33
1.4.1	KH	TBSK03427FF07.t3m.scf	0,77					-0,83		-1,35	-2,18
2.1	RNA HELICASE	ACDA03578C02.T3m.scf									
2.1	RNA HELICASE	MICRO.4623.C3			1,16	-1,45	-2,84		-0,92		
2.1	RNA HELICASE	MICRO.6356.C1	0,76	1,39	1,20	-2,29	-2,59		-1,29		0,74
2.1	RNA HELICASE	MICRO.6356.C2		1,58	1,24	-1,74	-2,67		-1,09		
2.1	RNA HELICASE	MICRO.6356.C3									-0,70
2.1	RNA HELICASE	MICRO.6356.C4		1,24	0,81	-1,15	-1,60		-0,67		
2.1	RNA HELICASE	MICRO.9998.C2		0,60	0,57	-1,74	-1,83	-0,60	-1,50	0,47	1,70

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 8. Ekspresijski podatki izbranih POCI unigenov, po okužbi krompirja s PVY

Ontologija	Skupina	POCI_id	PW1	PW3	PW6	R1	R3	R6	RnahG 1	RnahG 3	RnahG 6
2.1	RNA HELICASE	MICRO.9998.C1	-0,73	-0,35		-0,58					0,25
2.1	RNA HELICASE	067A05AF.esd			0,41	-1,46	-1,34		-1,07		1,06
2.1	RNA HELICASE	MICRO.14217.C1	0,74	1,34	1,18	-2,46	-2,43		-2,05		1,77
2.1	RNA HELICASE	ACDA04258C10.T3m.scf			0,84	-0,86	-1,20	-0,66		-1,03	-0,67
2.1	RNA HELICASE	MICRO.3580.C1		0,50	0,98	-1,76	-1,90		-0,55	-0,69	
2.1	RNA HELICASE	MICRO.3580.C2				0,40	0,89		0,56		
2.1	RNA HELICASE	MICRO.6861.C5	-0,42	0,46	1,03	-1,13	-1,87		-0,71		0,40
2.1	RNA HELICASE	bf_mxlfxxxx_0017d02.t3m.scf	-1,00			0,87					
2.1	RNA HELICASE	BPLI12E18TH									
2.1	RNA HELICASE	BPLI13A16TH	0,50		0,47		-0,69	0,44	-0,50		0,55
2.1	RNA HELICASE	MICRO.1092.C1		0,62	1,24	-1,04	-1,94		-0,79		
2.1	RNA HELICASE	MICRO.13824.C1		0,88		-1,31	-1,88		-1,00		
2.1	RNA HELICASE	MICRO.6861.C1		-0,39		0,77	0,31		-0,32		0,52
2.1	RNA HELICASE	MICRO.6861.C2			-0,43	0,36	0,84	0,31	0,68	-0,57	-0,27
2.1	RNA HELICASE	MICRO.6861.C3		0,65	0,40		-0,52			-0,74	-0,51
2.1	RNA HELICASE	MICRO.6861.C4		1,74	1,54	-2,72	-3,42		-1,63		1,30
2.1	RNA HELICASE	SDBN002C24u.scf									
2.1	RNA HELICASE	STMJF58TH		1,42	1,20	-1,76	-2,83		-1,21		0,93
2.1	RNA HELICASE	bf_mxlfxxxx_0007g08.t3m.scf		0,27			-0,29				-0,51
2.1	RNA HELICASE	MICRO.218.C1		1,00	1,00	-1,79	-2,58		-0,94		0,76
2.1	RNA HELICASE	MICRO.218.C3	-1,17	-0,71	-0,63	0,97	0,64	-0,60	0,61	-0,89	-1,69
2.1	RNA HELICASE	POABN75TV		0,31					0,37		-0,88
2.1	RNA HELICASE	MICRO.13901.C1		0,33	0,62		-0,35	-0,47			-0,42
2.1	RNA HELICASE	bf_mxlfxxxx_0013e05.t3m.scf							0,38		-0,54
2.1	RNA HELICASE	ACDA04219H07.T3m.scf		-1,13	-0,73			-0,66	0,99	-1,03	-1,38
2.1	RNA HELICASE	MICRO.623.C1							0,32		
2.1	RNA HELICASE	MICRO.15422.C1		0,65	0,84	-1,49	-1,89		-1,52		1,07
2.1	RNA HELICASE	MICRO.623.C2						-0,53			
2.1	RNA HELICASE	MICRO.623.C4					0,41				-0,38
2.1	RNA HELICASE	MICRO.6198.C1		0,36	0,56	-0,36	-0,78	-0,56	-0,35	-0,46	
2.1	RNA HELICASE	MICRO.1758.C1			0,55	-0,94	-1,31		-1,10		0,93
2.1	RNA HELICASE	MICRO.1331.C2	0,97	0,78	1,33	-0,98	-1,38		-1,10		
2.1	RNA HELICASE	MICRO.1331.C1				0,85	0,68				-1,33

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 8. Ekspresijski podatki izbranih POCI unigenov, po okužbi krompirja s PVY

Ontologija	Skupina	POCI_id	PW1	PW3	PW6	R1	R3	R6	RnahG 1	RnahG 3	RnahG 6
2.1	RNA HELICASE	bf_stolxxxx_0016d04.t7m.scf									
2.1	RNA HELICASE	MICRO.17918.C1		0,43		-0,43	-0,80		-0,72		
2.1	RNA HELICASE	MICRO.4640.C1									-0,56
2.1	RNA HELICASE	cSTD12H24TH									
2.1	RNA HELICASE	MICRO.1526.C1	1,27	1,49	1,48	-2,23	-2,68		-1,62		2,12
2.1	RNA HELICASE	MICRO.9869.C3	0,63	0,87	0,91	-0,54	-0,96	-0,39	-0,61	-0,59	
2.1	RNA HELICASE	MICRO.14843.C1		-0,29							-0,23
2.1	RNA HELICASE	MICRO.9869.C1	0,32			-0,38					0,45
2.1	RNA HELICASE	MICRO.1978.C4		0,81		-1,70	-2,77	1,03	-1,58		1,74
2.1	RNA HELICASE	bf_arrayxxx_0072a03.t3m.scf									
2.1	RNA HELICASE	MICRO.3768.C1	1,58	2,41	2,22	-3,35	-3,83		-2,84		2,25
2.1	RNA HELICASE	MICRO.912.C3		0,54	0,57	-1,27	-1,47		-1,10		1,23
2.1	RNA HELICASE	bf_stolxxxx_0037c10.t3m.scf	-1,07	-0,63	0,47		-0,70		-0,79		1,05
2.1	RNA HELICASE	cSTS11F3TH									
2.1	RNA HELICASE	MICRO.912.C1	-0,22			0,48	0,28	0,40			
2.1	RNA HELICASE	MICRO.912.C5			0,41	-0,65	-1,00		-0,46		0,49
2.1	RNA HELICASE	MICRO.912.C4	0,27	0,39		-0,42	-0,44	0,27	-0,34		
2.1	RNA HELICASE	MICRO.14384.C1		0,82	1,38	-2,03	-2,27		-1,47		1,65
2.1	RNA HELICASE	MICRO.14385.C1		0,24				0,37			0,40
2.1	RNA HELICASE	bf_suspxxxx_0005B10.t3m.scf				-0,70					0,55
2.1	RNA HELICASE	MICRO.7498.C1		0,73	0,97	-1,80	-1,89		-0,90		0,93
2.1	RNA HELICASE	MICRO.13508.C1		-0,55	-0,87		0,73		0,64	-0,57	-1,10
2.1	RNA HELICASE	MICRO.4535.C1			0,88	-1,28	-2,26		-1,51		
2.1	RNA HELICASE	MICRO.11134.C1		-0,58		1,13				-0,68	-1,78
2.1	RNA HELICASE	MICRO.7073.C1									
2.1	RNA HELICASE	cSTD16J7TH		0,61		-1,90	-2,08		-2,07	0,58	1,24
2.1	RNA HELICASE	MICRO.3179.C1		0,99	1,18	-1,63	-1,46	-0,49	-1,27		1,09
2.1	RNA HELICASE	MICRO.9470.C1	-0,36	-0,46	-0,29	0,37	0,84			-0,37	-0,48
2.1	RNA HELICASE	MICRO.15131.C1		0,34	0,65	-0,83	-0,73		-1,08	0,36	1,22
2.1	RNA HELICASE	MICRO.87.C1		0,80	0,92	-1,04	-1,86		-1,06		
2.1	RNA HELICASE	MICRO.6647.C1			-0,46	0,66	1,10	0,97	0,46	0,65	0,63
2.1	RNA HELICASE	MICRO.4936.C1				-0,45	-0,54				
2.1	RNA HELICASE	MICRO.4936.C2	1,02	1,11	0,77	-1,63	-1,94		-0,95		1,20

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 8. Ekspresijski podatki izbranih POCI unigenov, po okužbi krompirja s PVY

Ontologija	Skupina	POCI_id	PW1	PW3	PW6	R1	R3	R6	RnahG 1	RnahG 3	RnahG 6
2.1	RNA HELICASE	MICRO.6982.C1		0,89	0,91	-1,51	-1,61		-1,29	0,70	1,26
2.1	RNA HELICASE	POCCF04TP		1,35	1,75	-2,91	-3,16		-1,40		0,97
2.1	RNA HELICASE	MICRO.1629.C1	1,14	1,52	0,92	-1,96	-2,59		-2,87		2,48
2.1	RNA HELICASE	MICRO.4095.C2			0,64	-0,62	-1,22		-1,09	0,44	1,05
2.1	RNA HELICASE	MICRO.4095.C1				-0,84	-1,21		-1,22	0,79	1,10
2.1	RNA HELICASE	MICRO.2576.C1	0,98			-1,53	-2,12		-1,78		1,65
2.1	RNA HELICASE	MICRO.13061.C1			-0,34	0,65	0,34	-0,57		-0,70	-1,80
2.1	RNA HELICASE	bf_mxlfxxx_0006d03.t3m.scf					-0,77	-0,55			-1,26
2.1	RNA HELICASE	MICRO.17829.C1				0,28			0,30		
2.1	RNA HELICASE	MICRO.851.C1		0,64	0,66	-1,52	-1,84		-0,71		1,07
2.1	RNA HELICASE	MICRO.851.C2		0,46	0,37	-0,56	-1,10	0,43	-0,52		0,84
2.1	RNA HELICASE	MICRO.4273.C1		-0,37	-0,57	0,50	1,15	0,54	0,65		
2.1	RNA HELICASE	MICRO.4273.C2	-0,30	-0,33				-0,30			
2.1	RNA HELICASE	MICRO.4273.C4			-0,26		0,57	0,41			0,30
2.1	RNA HELICASE	MICRO.4273.C5									
2.1	RNA HELICASE	MICRO.4812.C1									-1,64
2.1	RNA HELICASE	SDBN006D14u.scf					-0,53		-0,51		-1,59
2.1	RNA HELICASE	MICRO.17540.C1									
2.1	RNA HELICASE	SDBN006M18u.scf									
2.1	RNA HELICASE	MICRO.3828.C1								-0,36	-1,17
2.1	RNA HELICASE	MICRO.10805.C1				-0,53	-1,10		-1,60		1,08
2.1	RNA HELICASE	MICRO.4273.C3				0,44	0,42				
2.1	RNA HELICASE	MICRO.14148.C1	0,69	1,20	1,14	-2,02	-1,92	0,61	-0,89		1,32
2.1	RNA HELICASE	MICRO.10177.C1			-0,40	0,63	0,52				-0,32
2.1	RNA HELICASE	POCBC96TP				-2,21	-2,68		-2,02		1,05
2.1	RNA HELICASE	bf_ivrootxx_0042d02.t3m.scf			-0,76				0,52		-0,57
2.1	RNA HELICASE	POCB976TP			0,69	-1,53	-1,50		-0,68		1,84
2.1	RNA HELICASE	MICRO.11947.C1	0,97	1,20	1,45	-2,46	-2,44		-1,61		1,89
2.1	RNA HELICASE	POCBB52TV									0,38
2.1	RNA HELICASE	POCC196TV	-0,79		-0,82	0,62	0,77	-0,54		-0,60	-1,17
2.1	RNA HELICASE	MICRO.4623.C2					-0,24				-0,74
2.1	RNA HELICASE	MICRO.135.C8	-2,01	-0,92	-1,11	0,63	0,73	-0,90		-1,50	-3,08
2.1	RNA HELICASE	MICRO.3164.C6			0,77	-1,43	-1,35	-1,10	-1,05	-0,58	

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 8. Ekspresijski podatki izbranih POCI unigenov, po okužbi krompirja s PVY

Ontologija	Skupina	POCI_id	PW1	PW3	PW6	R1	R3	R6	RnahG 1	RnahG 3	RnahG 6
2.1	RNA HELICASE	MICRO.3164.C7		-0,90	-1,04	1,21	0,43	0,63	0,99		-0,66
2.1	RNA HELICASE	MICRO.3164.C1									
2.1	RNA HELICASE	MICRO.3164.C14	-0,46	-1,28	-1,19	1,05	1,03				-0,79
2.1	RNA HELICASE	MICRO.3164.C8				1,19			-1,02		1,21
2.1	RNA HELICASE	cSTB46J20TH	0,66	1,08	1,98	-2,14	-2,83		-1,59	-0,70	1,23
2.1	RNA HELICASE	MICRO.3164.C9			-0,55	1,03	0,82		-0,48	0,46	0,54
2.1	RNA HELICASE	MICRO.3164.C15				1,23	0,95		0,63	-0,42	-0,70
2.1	RNA HELICASE	SDBN004A12u.scf			-0,68						
2.1	RNA HELICASE	POCCI25TP	-0,84	-0,75		1,34					
2.1	RNA HELICASE	cSTB29O1TH		1,10	1,35	-1,80	-2,78	-0,90	-1,54		1,02
2.1	RNA HELICASE	MICRO.10732.C1				0,73	0,97	0,45	0,38		-0,51
2.1	RNA HELICASE	cSTB30O8TH			0,26	-0,70	-0,84		-0,40	-0,46	
2.1	RNA HELICASE	MICRO.4041.C1			-0,39					-0,38	-1,00
2.1	RNA HELICASE	MICRO.3919.C1				-1,80	-2,17		-1,85		0,99
2.1	RNA HELICASE	cSTA17A4TH				-1,35	-1,46		-1,20		
2.1	RNA HELICASE	MICRO.15073.C1			-0,63	0,40	0,92				
2.1	RNA HELICASE	MICRO.1876.C2		-0,32	-0,48					-0,70	-0,72
2.1	RNA HELICASE	MICRO.6227.C1		0,35	0,42	-0,53	-0,58		-0,41		0,31
2.1	RNA HELICASE	MICRO.10604.C1			-0,35	0,36	0,58				-0,76
2.1	RNA HELICASE	MICRO.10604.C2			-0,44	0,89	0,80	0,59			-0,79
2.1	RNA HELICASE	MICRO.144.C2							0,32		
2.1	RNA HELICASE	MICRO.144.C1	0,48	0,86	1,20	-2,27	-2,10	-0,50	-0,94		0,94
2.1	RNA HELICASE	POABL93TV	0,58		0,40						0,81
2.1	RNA HELICASE	cSTA2L17TH		1,31	1,81	-2,29	-2,73		-1,47		1,31
2.1	RNA HELICASE	POABL93TP		0,98	1,63	-2,14	-2,31	-0,85	-1,42		1,39
2.1	RNA HELICASE	MICRO.2754.C1			-0,33		0,88			-0,40	-0,42
2.1	RNA HELICASE	MICRO.16008.C1	0,99	1,41	2,18	-2,91	-3,28		-2,75		2,42
2.1	RNA HELICASE	MICRO.1936.C1		0,57	0,96	-1,54	-2,14	-0,55	-0,89	-0,45	
2.1	RNA HELICASE	MICRO.9532.C1			-0,77	1,21	1,84		0,41		-0,59
2.1	RNA HELICASE	cPRO27C4TH			0,63		-0,61	0,45		-0,36	
2.1	RNA HELICASE	MICRO.16421.C1				0,44	0,39	-0,53			-0,59
2.1	RNA HELICASE	MICRO.1761.C1	0,89	1,31	1,27	-1,84	-2,50		-1,75		1,76
2.1	RNA HELICASE	bf_suspxxxx_0034a08.t 3m.scf	0,72	0,71	1,14	-1,11	-1,18		-1,29		1,35

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 8. Ekspresijski podatki izbranih POCl unigenov, po okužbi krompirja s PVY

Ontologija	Skupina	POCl_id	PW1	PW3	PW6	R1	R3	R6	RnahG 1	RnahG 3	RnahG 6
2.1	RNA HELICASE	MICRO.9603.C1	0,99		1,04	-1,23	-1,14		-0,72		0,99
2.1	RNA HELICASE	MICRO.11475.C1	-0,63	-0,66	-0,85	1,05	1,00				-0,30
2.1	RNA HELICASE	MICRO.15752.C1			0,44	-0,77	-1,16		-0,71		1,06
2.1	RNA HELICASE	MICRO.2254.C1									
2.1	RNA HELICASE	cSTA26O3TH	1,72	1,50	1,18	-2,75	-2,97		-2,13		2,16
2.1	RNA HELICASE	MICRO.2360.C1									
2.1	RNA HELICASE	MICRO.2921.C1	0,70	1,42	1,94	-2,48	-2,76		-1,76		1,67
2.1	RNA HELICASE	MICRO.805.C3	-0,35		0,53	-0,65					1,10
2.1	RNA HELICASE	MICRO.805.C2	0,48			-0,39					1,21
2.1	RNA HELICASE	ACDA03610E10.T3m.scf		0,92	1,39	-1,69	-1,30		-1,10		2,05
2.1	RNA HELICASE	cSTA14K3TH		0,77	1,17	-2,20	-1,40		-1,30		2,13
2.1	RNA HELICASE	cSTA44N20TH	0,44	0,47	0,35	-0,68	-0,63			-0,70	-1,14
2.1	RNA HELICASE	MICRO.11732.C1		-0,62	-0,78	0,68	1,23		0,55	-0,77	-0,76
2.1	RNA HELICASE	083A04AF.esd			0,53	-1,06	-1,33		-0,88		0,82
2.1	RNA HELICASE	BF_LBCHXXXX_0024C06_T3M.SCF									
2.1	RNA HELICASE	MICRO.3760.C2				-1,13	-0,78				0,71
2.1	RNA HELICASE	MICRO.16688.C1					1,04		0,35		0,59
2.1	RNA HELICASE	bf_acdaxxxx_0064h12.t3m.scf		1,31	1,84	-3,78	-3,56		-2,67		3,44
2.1	RNA HELICASE	cSTB31O16TH		0,52	0,74	-0,94	-1,58		-0,90		
2.1	RNA HELICASE	cSTS30C5TH			0,61	-1,55	-1,73		-1,54		0,97
2.1	RNA HELICASE	MICRO.8023.C2			-0,75	1,14	1,16			-0,58	-0,74
2.1	RNA HELICASE	MICRO.6415.C1			1,59	-2,97	-3,16		-2,61		2,21
2.1	RNA HELICASE	cPRO3N8TH		1,15	1,54	-2,15	-2,65		-1,77		1,81
2.1	RNA HELICASE	cPRO22P21TH									
2.1	RNA HELICASE	bf_mxlfxxxx_0011h05.t3m.scf		0,75		1,52	0,90	0,98			-2,65
2.1	RNA HELICASE	MICRO.6507.C1			0,82	-0,94	-1,34	-0,66	-0,38	-0,64	-0,35
2.1.1	DEAH-DEAD	MICRO.10176.C1		-0,48	-0,75	1,00	1,51	0,51	0,64		
2.1.1	DEAH-DEAD	bf_suspxxxx_0055h02.t3m.scf		0,33	0,39	-0,36	-0,62	-0,38	-0,61		0,86
2.1.1	DEAH-DEAD	MICRO.5675.C1		0,74	0,94	-1,90	-2,63		-1,47		1,04
2.1.1	DEAH-DEAD	MICRO.2892.C1				-0,48	-0,53			0,59	
2.1.1	DEAH-DEAD	MICRO.2892.C2									-0,53
2.1.1	DEAH-DEAD	MICRO.11316.C1	0,49	0,99	1,31	-1,80	-2,24		-0,92		1,19
2.1.1	DEAH-DEAD	MICRO.13006.C1			-0,31	0,91	0,27	0,28	0,26	-0,26	-0,55

se nadaljuje



nadaljevanje preglednice 8. Ekspresijski podatki izbranih POCI unigenov, po okužbi krompirja s PVY

Ontologija	Skupina	POCI_id	PW1	PW3	PW6	R1	R3	R6	RnahG1	RnahG3	RnahG6
2.1.1	DEAH-DEAD	MICRO.13525.C1	1,15	0,93	1,08	-2,76	-3,12		-2,00		2,14
2.1.1	DEAH-DEAD	MICRO.7078.C1	0,67	0,65		-1,11	-1,52	0,53	-1,19		1,26
2.1.1	DEAH-DEAD	MICRO.8023.C1	0,90	0,74		-0,96	-1,49		-1,66	0,44	1,65
2.2	AGO	MICRO.3496.C1		1,11	2,52	-5,31	-5,10		-3,11		4,94
2.2	AGO	MICRO.3496.C2				-1,06				0,85	1,45
2.2	AGO	POCCN36TP				-0,94	-1,21				0,54
2.2	AGO	bf_arrayxxx_0078a03.t3m.scf		0,93		-1,48			0,74	0,89	1,34
2.2	AGO	MICRO.3525.C1			1,52	-3,73	-4,21	-0,90	-2,84		1,24
2.2	AGO	MICRO.978.C1			-0,69						
2.2	AGO	MICRO.978.C3	-0,55								-0,60
2.2	AGO	POAB803TV	-0,68					-0,68			-0,75
2.2	AGO	bf_mxflxxxx_0048b04.t3m.scf					-0,54				
2.2	AGO	MICRO.5353.C1				0,53	0,48	-0,88		-0,83	-1,91
2.2	AGO	MICRO.4751.C1			0,85	-0,88	-1,51		-1,18	-0,68	
2.2	AGO	SDBN006O22u.scf		-0,72	-0,51	0,45	0,76		0,54		-0,69
2.2	AGO	MICRO.978.C6							0,68	-0,61	-0,82
2.2	AGO	MICRO.1031.C1								-0,40	-0,54
2.2	AGO	MICRO.1031.C2									
2.2	AGO	MICRO.1031.C3		1,20	0,84						
2.2	AGO	MICRO.1202.C1		0,44	0,57		-0,49			-0,85	-1,64
2.2	AGO	MICRO.1202.C2		0,39	0,47	-0,30	-0,41			-0,94	-1,70
2.2	AGO	MICRO.6498.C1		1,54	1,80	-3,10	-3,97		-2,06		0,73
2.2	AGO	cSTA33L9TH				-1,37	-2,54		-1,64		1,61
2.2	AGO	bf_arrayxxx_0068h05.t3m.scf									
2.2	AGO	ACDA03406D10.T3m.scf									
2.2	AGO	POCAH54TV									
2.2	AGO	MICRO.4663.C1		-0,88		1,54	1,96				-0,88
2.2	AGO	MICRO.14254.C1		0,58							0,77
2.2	AGO	MICRO.5302.C2		-0,79	-0,60	0,90	1,54	0,51			-0,64
2.2	AGO	cSTA21P10THB	0,95	0,69	0,79	-1,27	-1,39	0,48	-1,15		0,80
2.2	AGO	bf_mxflxxxx_0036g08.t3m.scf									
2.2	AGO	BF_LBCHXXXX_0003H09_T3M.SCF									
2.2	AGO	MICRO.10678.C2				1,10	0,71	-0,61	0,57	-0,77	-1,24
3.1	RDRP	MICRO.518.C1	-0,67			-1,02				-0,78	-1,07
3.1	RDRP	bf_mxflxxxx_0027g02.t3m.scf	-0,69			-0,71			0,48	-0,77	-1,22
3.1	RDRP	MICRO.11471.C1		0,60	0,90	-1,24	-1,44				0,55
3.1	RDRP	MICRO.11471.C2			0,46		-0,58				
3.1	RDRP	MICRO.15587.C1			0,96	-2,45	-2,20		-1,11		0,77
3.1	RDRP	MICRO.10788.C1		1,18	1,25	-2,23	-2,42		-1,38		1,47
3.1	RDRP	MICRO.11470.C1			0,90	-2,21	-2,61		-2,06		1,45
3.1	RDRP	bf_stolxxxx_0068c01.t3m.scf									
3.1	RDRP	MICRO.2706.C1		0,84		-2,11	-2,55	0,58	-1,97		2,13
3.1	RDRP	BF_CSCHXXXX_0034E02.T3M.SCF	-0,41		0,42			-0,28	0,31	-0,29	-0,24
3.2	SGS	MICRO.6709.C1		-0,32	-0,31		0,56	0,38			
3.2	SGS	MICRO.6709.C2	1,10	1,20	0,98	-1,98	-2,55		-1,74		2,31
3.2.1	XH-XS	MICRO.7627.C1	-0,57	-0,66		0,74	0,98	-0,57	0,56	-0,84	-1,42
3.2.1	XH-XS	cSTB3N9TH									
3.2.1	XH-XS	BF_TUBSXXXX_0010F07_T3M.SCF		-0,23		-0,21	-0,66	-0,44	-0,47	-0,30	
3.2.1	XH-XS	MICRO.1746.C1	0,59	0,64	0,85	-1,02	-2,10	-0,64	-1,50		0,93
3.2.1	XH-XS	MICRO.1746.C2			-0,50	0,79	0,94			-0,27	-0,54

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 8. Ekspresijski podatki izbranih POCI unigenov, po okužbi krompirja s PVY

Ontologija	Skupina	POCI_id	PW1	PW3	PW6	R1	R3	R6	RnahG 1	RnahG 3	RnahG 6
3.2.1	XH-XS	MICRO.1746.C3	-0,95	-0,35	-0,64	0,59	0,43	-0,53		-0,55	-1,40
3.2.1	XH-XS	MICRO.15287.C1	0,87	0,41	0,76	-1,81	-2,26		-1,10		1,29
4.1	DNA METHYLASE	MICRO.6544.C1					-0,74	1,00	-0,49		2,12
4.1	DNA METHYLASE	MICRO.7918.C1				-0,78	-1,26				1,79
4.1	DNA METHYLASE	bf_mxflxxxx_0051d03.t3m.scf		0,57		-0,99	-1,34				
4.1	DNA METHYLASE	MICRO.10710.C1	0,62			-0,65					1,28
4.1	DNA METHYLASE	cSTB36J24TH		0,67	1,03	-1,85	-2,27		-0,92		0,76
4.1	DNA METHYLASE	POACK30TV									
4.1	DNA METHYLASE	bf_arrayxxx_0073c11.t7m.scf				-0,72	-0,50				0,97

#### 4.6 PODROBNA SEKVENČNA ANALIZA SKUPINE ARGONAVTOV

Skupina Argonautov je zanimiva zaradi raznolikega odziva v izražanju genov po okužbi z virusom PVY. Zato smo naredili podrobnejše sekvenčne analize.

Skupino AGO iz naše ontologije, predstavlja 30 unigenov POCI, ki so bili poiskani deloma s pomočjo ključnih besed v anotaciji, deloma z algoritmom BLAST. Za 10 genov navadnega repnjakovca smo v krompirju našli 12 različnih genov (za vsak gen smo vzeli zaporedje njegovega reprezentativnega genskega modela). Za iskanje krompirjevih homologov smo se odločili za mejo  $9 \times 10^{-30}$ , saj se je ob uporabi višjih mej začelo pojavljati večje število transkriptov, katerih anotacija ni bila povezana s PTGS. Treba je dodati, da se število različnih krompirjevih genov, ki jih najdemo z algoritmom BLAST spreminja glede na mejno vrednost E.

Krompirjevim genom smo nato poiskali homologe v bazi POCI. Na ta način smo ponovno dobili 30 unigenov, a trije med njimi niso bili prisotni v naši skupini AGO iz ontologije. Nova zaporedja smo torej dodali v zbirko potencialnih zaporedij genov AGO pri krompirju. Tako smo skupno imeli 33 unigenov POCI. Vsa zbrana zaporedja navadnega repnjakovca in krompirja, smo poravnali med seboj in na podlagi te poravnave sestavili drevo (slika 8).

Slika 8 prikazuje drevo poravnave vseh najdenih zaporedij genov AGO pri repnjakovcu, ter v dveh sekvenčnih bazah krompirja, t. j. POCI ter PGSC. Lahko opazimo, da je zaporedij POCI bistveno več. To pa zato, ker so pogosto nepopolna, zaradi alelne

variabilnosti in običajno jih več skupaj pokrije določen gen. Tudi določena mera redundance je prisotna, saj so nekatera zaporedja le fragmenti daljših. V preglednici 9 je spisek vseh poravnanih zaporedij, njihovih anotacij ter dolžin.

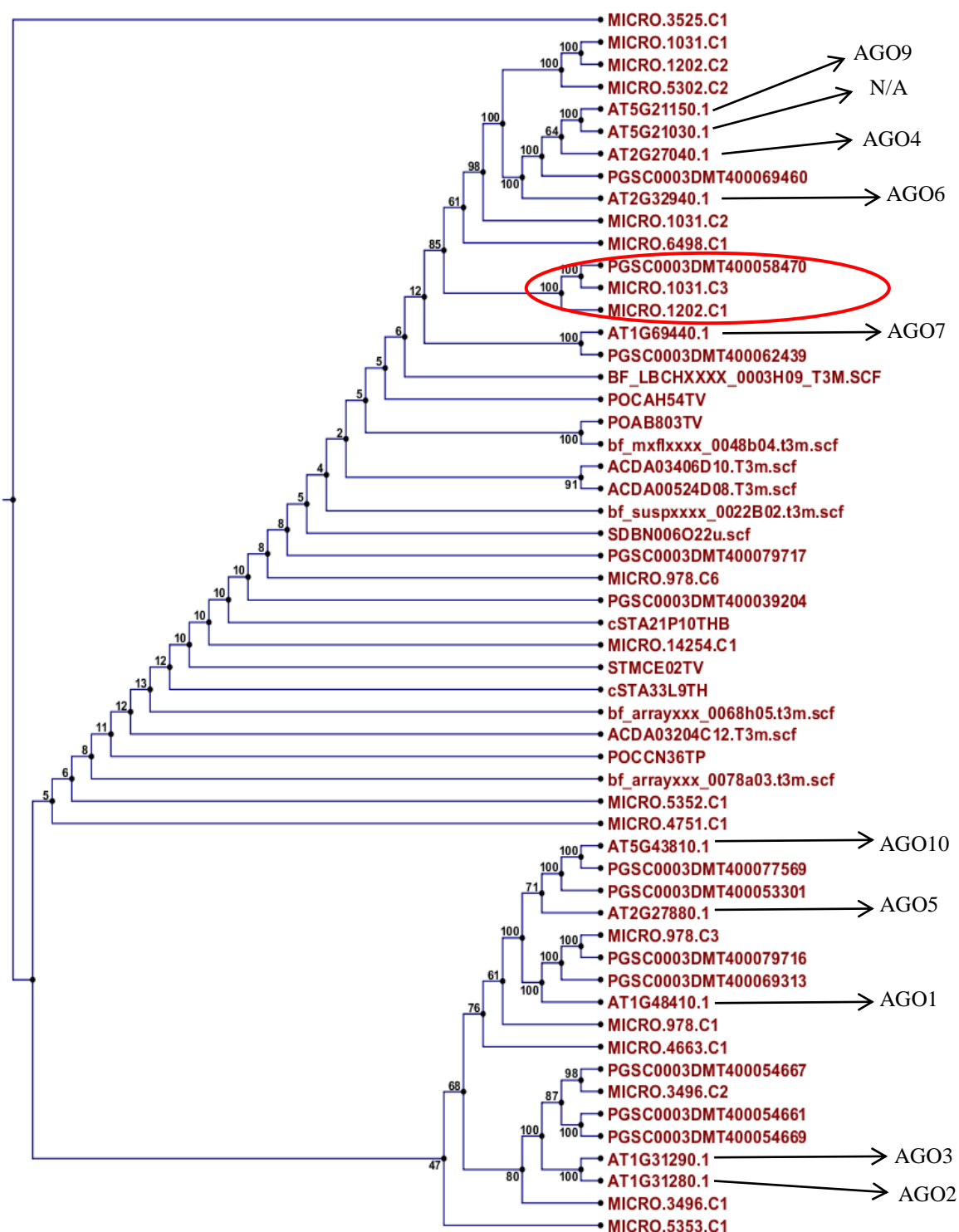
Preglednica 9: Transkripti genov AGO navadnega repnjakovca ter krompirja. V preglednici je prikazan spisek vseh transkriptov genov AGO navadnega repnjakovca ter njihovih homologov v krompirju (POCI in PGSC). V stolpcu Ime so navedene identifikacijske šifre, v stolpcu Simbol so navedene (če obstajajo) oznake posameznih transkriptov, v stolpcu Opis pa opisi oz. anotacije posameznih transkriptov. Kjer je namesto opisa prisotna šifra NA pomeni, da opis ni bil na voljo. V zadnjem stolpcu so navedene še dolžine zaporedij

Ime	Simbol	Opis	Določina (bp)
AT1G31280.1	AGO2	Argonaute family protein	3343
AT1G31290.1	AGO3	ARGONAUTE 3	3585
AT1G48410.1	AGO1	Stabilizer of iron transporter SufD / Polynucleotidyl transferase	3501
AT1G69440.1	AGO7, ZIP	Argonaute family protein	3161
AT2G27040.1	AGO4, OCP11	Argonaute family protein	3170
AT2G27880.1	AGO5	Argonaute family protein	3176
AT2G32940.1	AGO6	Argonaute family protein	2997
AT5G21030.1	N/A	PAZ domain-containing protein / piwi domain-containing protein	2553
AT5G21150.1	AGO9	Argonaute family protein	3018
AT5G43810.1	ZLL, PNH, AGO10	Stabilizer of iron transporter SufD / Polynucleotidyl transferase	3330
MICRO.3496.C2	-	AAF24585: T19E23.7 [Arabidopsis thaliana]	1906
MICRO.3496.C1	-	NP_174413: AGO2 [Arabidopsis thaliana]	1172
MICRO.978.C3	-	ABC61503: AGO1-2 [Nicotiana benthamiana]	3898
MICRO.978.C1	-	ABC61502: AGO1-1 [Nicotiana benthamiana]	4339
bf_arrayxxx_0078a03.t3m.scf	-	AAF24585: T19E23.7 [Arabidopsis thaliana]	673
POCCN36TP	-	NA	911
MICRO.1031.C1	-	ABC61505: AGO4-2 [Nicotiana benthamiana]	2306
MICRO.4663.C1	-	AAO37538: putative argonaute protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	1772
MICRO.1202.C2	-	ABC61504: AGO4-1 [Nicotiana benthamiana]	1819
MICRO.5302.C2	-	BAC84805: putative ARGONAUTE9 protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	1696
MICRO.5353.C1	-	NP_199194: ZLL (ZWILLE) [Arabidopsis thaliana]	955
MICRO.1031.C3	-	ABC61505: AGO4-2 [Nicotiana benthamiana]	828
STMCE02TV	-	NA	199
MICRO.1202.C1	-	ABC61504: AGO4-1 [Nicotiana benthamiana]	728
ACDA03204C12.T3m.scf	-	NA	515
MICRO.4751.C1	-	NP_199194: ZLL (ZWILLE) [Arabidopsis thaliana]	609
MICRO.5352.C1	-	NA	495
MICRO.3525.C1	-	ABC61502: AGO1-1 [Nicotiana benthamiana]	945
MICRO.14254.C1	-	NP_001048621: Os02g0831600 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	934
MICRO.6498.C1	-	ABC61504: AGO4-1 [Nicotiana benthamiana]	1377
POAB803TV	-	ABC61502: AGO1-1 [Nicotiana benthamiana]	573
MICRO.1031.C2	-	ABC61505: AGO4-2 [Nicotiana benthamiana]	1490
bf_mxflxxxx_0048b04.t3m.scf	-	ABL63484: argonaute 1 [Pisum sativum]	702
POCAH54TV	-	BAB96814: AGO1 homologous protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	513
SDBN006O22u.scf	-	AAM29184: CDPK-like protein [Solanum tuberosum]	816
cSTA21P10THB	-	EAZ39354: hypothetical protein OsJ_022837 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	504
ACDA00524D08.T3m.scf	-	ABE82627: Argonaute and Dicer protein, PAZ; Stem cell self-renewal protein Piwi [Medicago truncatula]	419
cSTA33L9TH	-	ABC61505: AGO4-2 [Nicotiana benthamiana]	329
ACDA03406D10.T3m.scf	-	NA	547
bf_arrayxxx_0068h05.t3m.scf	-	NA	698

nadaljevanje preglednice 9. Transkripti AGO genov navadnega repnjakovca ter krompirja

Ime	Simbol	Opis	Določina (bp)
MICRO.978.C6	-	NA	825
BF_LBCHXXXX_0003H09_T3M.SCF	-	NA	269
bf_suspxxxx_0022B02.t3m.scf	-	ABD32724: Helicase, C-terminal; Argonaute and Dicer protein, PAZ; Ribonuclease III, bacterial [Medicago truncatula]	685
PGSC0003DMT400054669	-	Argonaute protein group	3607
PGSC0003DMT400054667	-	Argonaute protein group	2456
PGSC0003DMT400054661	-	Argonaute protein group	2943
PGSC0003DMT400077569	-	Eukaryotic translation initiation factor 2c	3570
PGSC0003DMT400053301	-	Protein argonaute PNH1	2763
PGSC0003DMT400069313	-	ARGONAUTE 1	3550
PGSC0003DMT400079716	-	AGO1-1	3958
PGSC0003DMT400062439	-	Eukaryotic translation initiation factor 2c	3260
PGSC0003DMT400069460	-	AGO4-1	3269
PGSC0003DMT400058470	-	AGO4-2	794
PGSC0003DMT400079717	-	Argonaute 1	728
PGSC0003DMT400039204	-	Eukaryotic translation initiation factor 2c	630

Skupno število unigenov POCI v končni analizi je bilo torej 33, transkriptov navadnega repnjakovca smo zbrali 10 za skupno 10 genov (za vsak gen smo izbrali le reprezentativni transkript), transkriptov PGSC pa 12 za skupno 12 genov (za vsak gen smo izbrali le reprezentativni transkript).



Slika 8: Drevo poravnave transkriptov AGO. Številke na drevesnih vozlih so »bootstrap« vrednosti v odstotkih za 100 ponovitev. Transkripte navadnega repnjakovca smo opremili s pripadajočimi simboli za preglednost. Rdeča elipsa obkroža edino samostojno vejo, ki je ne sestavljajo transkripti navadnega repnjakovca in je poleg tega bolj podprta s strani testa »bootstrap« (85 %)

Slika 8 prikazuje drevo poravnave vseh zgoraj naštetih zaporedij. Na sliki smo posebej označili transkripte navadnega repnjakovca, za večjo preglednost kladov. Po pričakovanjih so se transkripti navadnega repnjakovca, porazdelili v tri glavne veje oziroma klade. Dvajset unigenov POCI ter dva transkripta PGSC pa se v nasprotju, ni povežalo z nobenim kladom navadnega repnjakovca ali tvorilo samostojno vejo. Le en transkript PGSC je, z dvema unigenoma POCI tvoril samostojno vejo na obrobju klada AGO4/AGO6/AGO9. Veja je na sliki označena z rdečo elipso.

#### 4.7 KLONIRANJE FRAGMENTOV GENOV AGO1, AGO2 IN AGO4

##### 4.7.1 Načrtovanje začetnih oligonukleotidov

Oligonukleotide za verižno reakcijo s polimerazo smo načrtovali na homologih PGSC genov AGO1, AGO2 in AGO4 navadnega repnjakovca PGSC0003DMT400069313, PGSC0003DMT400054669 ter PGSC0003DMT400069460. Imena sosesk ter unigenov, ki jih sestavljajo, so navedena v preglednici 10.

Preglednica 10: Sestava sosesk. V preglednici so naštetih unigeni različnih krompirjevih sekvenčnih baz (SGN, TC in TA), s katerimi smo sestavili soseske, uporabljene v poravnava pri načrtovanju začetnih oligonukleotidov. V prvi vrstici, so z odebeljeno pisavo naštetih geni, za katere smo želeli izdelati začetne oligonukleotide. V drugi vrstici pa so s poševno pisavo naštetih soseske, ki smo jih izdelali s pomočjo programa CAP3 pri privzetih nastavitvah

<b>AGO1</b>	<b>AGO2</b>		<b>AGO4</b>
<i>Contig 3</i>	<i>contig1ago2</i>	<i>contig2ago2</i>	<i>Contig2</i>
DN588948	BG593219	CK255691	DN939232
TA23094_4113	TC179953	TA38537_4113	CN462881
TC163685	DN941099	TC192343	CK852215
TC164849	BG590661	SGN-U270898	CK852215
DR034981	CV502197	TA38536_4113	BII77490
SGN-U284074	TC176513	TC190240	SGN-U275185
TC182013	TA31913_4113		TA35225_4113
SGN-U280009	SGN-U287976		TC166679
DR034980	SGN-U270897		BM109510
CK852478	TA31914_4113		SGN-U292955
SGN-U278547	DN941098		BF459848
CN462256	TC178167		TC188681
			CK861714
			CV431650
			TA27883_4113
			TA27885_4113
			TC167674
			CV286577
			SGN-U271128
			TA27884_4113

Lastnosti in dolžina začetnih oligonukleotidov, uporabljenih pri verižni reakciji s polimerazo, z namenom namnoževanja fragmentov genov AGO1, AGO2 in AGO4 pri krompirjevih sortah Igor in Desiree, so navedeni v preglednici 11.

Preglednica 11: Lastnosti začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje fragmentov krompirjevih genov AGO

IME	Vsebnost GC [%]	Tm	Zaporedje (5'->3')	Dolžina [bp]
ago1notranjifp	50	66.6	TTGCCTATGGAGGTCTGCAAGATTGTGG	28
ago1notranjirp	50	66.6	TTGTCAAGCAGCATTGCGAGACAATGCC	28
ago2rvreverse	50	68.1	TGGTCTGACGGGGAAGATGTTAAGTTACGC	30
ago2fpreverse	57	69.5	CACAGGAAGTCGACTTTGACCGCCTAGC	28
ago4revrp	42	63.7	GTGCAGACTTCAGAAGTGACAGTTTATG	28
ago4revfp	35	62.9	ATTGATCTTAAGGAGAAGGTTTGTGAGATAC	31

Poravnave fragmentov PGSC, unigenov POCI, sosesk ter začetnih oligonukleotidov za krompirjeve gene AGO1, AGO2 in AGO4 so prikazane na slikah 9, 10 in 11, v tem zaporedju.

		1601		1650
Contig 3	(1472)	GTTGCCTTGTCTTCAAGTTGGAAATACACAAAGGCCAAATTATTTGCCTA		
MICRO.978.C1	(136)	GTTGCCTTGTCTTCAAGTTGGAAATACACAAAGGCCAAATTATTTGCCTA		
PGSC0003DMT400069313	(1586)	GTTGCCTTGTCTTCAAGTTGGAAATACACAAAGGCCAAATTATTTGCCTA		
ago1notranjifp	(1)	-----TTGCCTA		
ago1notranjirp	(1)	-----		
		1651		1700
Contig 3	(1522)	TGGAGGTCTGCAAGATTGTGGAGGGGCAGAGGTACTCCAAGCGCTTGAAT		
MICRO.978.C1	(186)	TGGAGGTCTGCAAGATTGTGGAGGGGCAGAGGTACTCCAAGCGCTTGAAT		
PGSC0003DMT400069313	(1636)	TGGAGGTCTGCAAGATTGTGGAGGGGCAGAGGTACTCCAAGCGCTTGAAT		
ago1notranjifp	(8)	TGGAGGTCTGCAAGATTGTGG		
ago1notranjirp	(1)	-----		
		1701		1750
Contig 3	(1572)	GAGAGGCAGATAACAGCACTTCTGAAAGTGACCTGCCAGCGTCTCAAGA		
MICRO.978.C1	(236)	GAGAGGCAGATAACAGCACTTCTGAAAGTGACCTGCCAGCGTCTCAAGA		
PGSC0003DMT400069313	(1686)	GAGAGGCAGATAACAGCACTTCTGAAAGTGACCTGCCAGCGTCTCAAGA		
ago1notranjifp	(29)	-----		
ago1notranjirp	(1)	-----		
		1751		1800
Contig 3	(1622)	GAGAGAGAATGACATTCTTCAGACTGTTTCGTCACAATGCTTATGCTGATG		
MICRO.978.C1	(286)	GAGAGAGAATGACATTCTTCAGACTGTTTCGTCACAATGCTTATGCTGATG		
PGSC0003DMT400069313	(1736)	GAGAGAGAATGACATTCTTCAGACTGTTTCGTCACAATGCTTATGCTGATG		
ago1notranjifp	(29)	-----		
ago1notranjirp	(1)	-----		
		1801		1850
Contig 3	(1672)	ACCCATATGCGAGGGAATTTGGTATTAAGATTAGCGAGAAGCTTGCTCAA		
MICRO.978.C1	(336)	ACCCATATGCGAGGGAATTTGGTATTAAGATTAGCGAGAAGCTTGCTCAA		
PGSC0003DMT400069313	(1786)	ACCCATATGCGAGGGAATTTGGTATTAAGATTAGCGAGAAGCTTGCTCAA		
ago1notranjifp	(29)	-----		
ago1notranjirp	(1)	-----		
		1851		1900
Contig 3	(1722)	GTTGAGGCTCGCATTTTGCCTGCACCTTGGCTTAAATACCATGATACAGG		
MICRO.978.C1	(386)	GTTGAGGCTCGCATTTTGCCTGCACCTTGGCTTAAATACCATGATACAGG		
PGSC0003DMT400069313	(1836)	GTTGAGGCTCGCATTTTGCCTGCACCTTGGCTTAAATACCATGATACAGG		
ago1notranjifp	(29)	-----		
ago1notranjirp	(1)	-----		

nadaljevanje slike 9. Načrtovanje začetnikov za AGO1

		1901		1950
Contig 3	(1772)	TCGAGAAAAAGACTGTCTGCCACAAGTGGGCCAGTGAATATGATGAATA		
MICRO.978.C1	(436)	TCGAGAAAAAGACTGTCTGCCACAAGTGGGCCAGTGAATATGATGAATA		
PGSC0003DMT400069313	(1886)	TCGAGAAAAAGACTGTCTGCCACAAGTGGGCCAGTGAATATGATGAATA		
ago1notranjifp	(29)	-----		
ago1notranjirp	(1)	-----		
		1951		2000
Contig 3	(1822)	AGAAAATGGTTAATGGAGGAACAGTGAACAACTGGATCTGTATAAACTTT		
MICRO.978.C1	(486)	AGAAAATGGTTAATGGAGGAACAGTGAACAACTGGATCTGTATAAACTTT		
PGSC0003DMT400069313	(1936)	AGAAAATGGTTAATGGAGGAACAGTGAACAACTGGATCTGTATAAACTTT		
ago1notranjifp	(29)	-----		
ago1notranjirp	(1)	-----		
		2001		2050
Contig 3	(1872)	TCTCGCAATGTGCAAGACAGTGTTCACGGGGATTCTGTTCTGAGCTTGC		
MICRO.978.C1	(536)	TCTCGCAATGTGCAAGACAGTGTTCACGGGGATTCTGTTCTGAGCTTGC		
PGSC0003DMT400069313	(1986)	TCTCGCAATGTGCAAGACAGTGTTCACGGGGATTCTGTTCTGAGCTTGC		
ago1notranjifp	(29)	-----		
ago1notranjirp	(1)	-----		
		2051		2100
Contig 3	(1922)	ACAAATGTGCATGATATCGGGCGTGATCTTCAACCCGAATCCTGTTCTAC		
MICRO.978.C1	(586)	ACAAATGTGCATGATATCGGGCGTGATCTTCAACCCGAATCCTGTTCTAC		
PGSC0003DMT400069313	(2036)	ACAAATGTGCATGATATCGGGCGTGATCTTCAACCCGAATCCTGTTCTAC		
ago1notranjifp	(29)	-----		
ago1notranjirp	(1)	-----		
		2101		2150
Contig 3	(1972)	CACCAGTGAGTGCTCGCCCTGATCAAGTTGAGAGAGTCTTGAAAACTCGA		
MICRO.978.C1	(636)	CACCAGTGAGTGCTCGCCCTGATCAAGTTGAGAGAGTCTTGAAAACTCGA		
PGSC0003DMT400069313	(2086)	CACCAGTGAGTGCTCGCCCTGATCAAGTTGAGAGGGTCTTGAAAACTCGA		
ago1notranjifp	(29)	-----		
ago1notranjirp	(1)	-----		
		2151		2200
Contig 3	(2022)	TTTCATGATGCTATGACGAAGTTGCAGCCGAATGGGAGGGAGCTCGATCT		
MICRO.978.C1	(686)	TTTCATGATGCTATGACGAAGTTGCAGCCGAATGGGAGGGAGCTCGATCT		
PGSC0003DMT400069313	(2136)	TTTCATGATGCTATGACGAAGTTGCAGCCGAATGGGAGGGAGCTCGATCT		
ago1notranjifp	(29)	-----		
ago1notranjirp	(1)	-----		
		2201		2250
Contig 3	(2072)	GTTGATCGTCATATTGCCCGACAATAATGGCTCCCTTTATGGTGATCTAA		
MICRO.978.C1	(736)	GTTGATCGTCATATTGCCCGACAATAATGGCTCCCTTTATGGTGATCTAA		
PGSC0003DMT400069313	(2186)	GTTGGTGTGTCATATTGCCCGACAATAATGGCTCCCTTTATGGTGATCTAA		
ago1notranjifp	(29)	-----		
ago1notranjirp	(1)	-----		
		2251		2300
Contig 3	(2122)	AACGGATTTGTGAAACTGATCTTGGCATTGTCTCGCAATGCTGCTTGACA		
MICRO.978.C1	(786)	AACGGATTTGTGAAACTGATCTTGGCATTGTCTCGCAATGCTGCTTGACA		
PGSC0003DMT400069313	(2236)	AACGGATTTGTGAAACTGATCTTGGCATTGTCTCGCAATGCTGCTTGACA		
ago1notranjifp	(29)	-----		
ago1notranjirp	(1)	-----		<b>GGCATTGTCTCGCAATGCTGCTTGACA</b>
		2301		2350
Contig 3	(2172)	AAACATGTGTTTAAGATGAGCAAGCAGTATTTAGCCAATGTGTCCTTAA		
MICRO.978.C1	(836)	AAACATGTGTTTAAGATGAGCAAGCAGTATTTAGCCAATGTGTCCTTAA		
PGSC0003DMT400069313	(2286)	AAACATGTGTTTAAGATGAGCAAGCAGTATTTAGCCAATGTGTCCTTAA		
ago1notranjifp	(29)	-----		
ago1notranjirp	(28)	<b>A</b> -----		

Slika 9: Načrtovanje začetnih oligonukleotidov za AGO1. Slika prikazuje poravnavo zaporedij za načrtovanje začetnih oligonukleotidov za gen AGO1 pri krompirju. V poravnavi je prisotno poleg krompirjevega gena AGO1 (PGSC0003DMT400069313) še zaporedje soseske homolognih unigenov različnih krompirjevih sekvenčnih baz (Contig 3), homologa iz baze POCI (MICRO.978.C1) ter obeh začetnih oligonukleotidov (ago1notranjifp in ago1notranjirp)



		1201		1250
contig1ago2	(1)	-----	-----	-----
PGSC0003DMT400054669	(982)	GTTCAACTTCCTACTGGGTGTTTTGCTGTGGAAGTGGTCTGACGGGGAAGA		
contig2ago2	(1138)	GTTCAACTTCCTACTGGGTGTTTTGCTGTGGAAGTGGTCTGACGGGGAAGA		
ago2rvreverse	(1)	-----	TGGTCTGACGGGGAAGA	-----
ago2fpreverse	(1)	-----	-----	-----
		1251		1300
contig1ago2	(1)	-----	-----	-----
PGSC0003DMT400054669	(1032)	TGTTAAGTTACGCTCTTATGACATTACCATCAAGCTTGTGTGTAATTAA		
contig2ago2	(1188)	TGTTAAGTTACGCTCTTATGACATTACCATCAAGCTTGTGTGTAATTAA		
ago2rvreverse	(18)	TGTTAAGTTACGC	-----	-----
ago2fpreverse	(1)	-----	-----	-----
		1301		1350
contig1ago2	(1)	-----	-----	-----
PGSC0003DMT400054669	(1082)	AACTTTGCAAGTTGAAAGAATATTTGAGTGGGAAAGCCTATCACATATTCCT		
contig2ago2	(1238)	AACTTTGCAAGTTGAAAGAATATTTGAGTGGGAAAGCCTATCACAAATTCCT		
ago2rvreverse	(31)	-----	-----	-----
ago2fpreverse	(1)	-----	-----	-----
		1351		1400
contig1ago2	(1)	-----	-----	-----
PGSC0003DMT400054669	(1132)	CGTGATATACTACAAGGAATGGAGTTGGTTATGAAAGAAAATCCTAC---		
contig2ago2	(1288)	CGTGATATACTACAAGGAATGGAGTTGGTTATGAAAGATAAATGCAAAACT		
ago2rvreverse	(31)	-----	-----	-----
ago2fpreverse	(1)	-----	-----	-----
		1401		1450
contig1ago2	(1)	-----	-----	-----
PGSC0003DMT400054669	(1179)	TAGGTGCAGGACTTCTGTAGGTCGTTGTTTCTACTCTAATGAGCACCTGG		
contig2ago2	(1338)	TGGGGGCAGCAATATGGAACCTATGGATAGACTCCCTAATTTTGGAAAGTG		
ago2rvreverse	(31)	-----	-----	-----
ago2fpreverse	(1)	-----	-----	-----
		1451		1500
contig1ago2	(1)	-----	-----	-----
PGSC0003DMT400054669	(1229)	CTGACCATGACTTTCGTTTTGGTGTGCTGCATATAGAGGTTTTTCAGCAG		
contig2ago2	(1388)	CAGACAATGCATGTTTCATTGGAGCTGATGTTAATCATCCTGCTGCAAAG		
ago2rvreverse	(31)	-----	-----	-----
ago2fpreverse	(1)	-----	-----	-----
		1501		1550
contig1ago2	(1)	-----	-----	-----
PGSC0003DMT400054669	(1279)	AGCCTAAAGCCTACATCTGGAGGGCTTGCCTGTGCTTAGATTACTCAGT		
contig2ago2	(1438)	AATGTGACATGTCCATCCATAGCGGCT--GTTGTTGCCACCGTCAACTGG		
ago2rvreverse	(31)	-----	-----	-----
ago2fpreverse	(1)	-----	-----	-----
		1551		1600
contig1ago2	(1)	-----	-----	-----
PGSC0003DMT400054669	(1329)	CTTGGCACTCCGGAAACCAATGCCAGTGCTAGATTTTCTGAAGGAATATT		
contig2ago2	(1486)	CCAG---CTGCTAATAGATATGC---TGCTAGAGTTTGTCTCC--AGGTC		
ago2rvreverse	(31)	-----	-----	-----
ago2fpreverse	(1)	-----	-----	-----
		1601		1650
contig1ago2	(1)	-----	-----	-----
PGSC0003DMT400054669	(1379)	TAGGAGAATCTAACGAAAATACTTTCAGGAACAACATTCGAGCTGCAAAG		
contig2ago2	(1528)	CATCAGACTGAGAAGATTCTAAATTTGGTAG--CATGTGTGC-----		
ago2rvreverse	(31)	-----	-----	-----
ago2fpreverse	(1)	-----	-----	-----
		1651		1700
contig1ago2	(1)	-----	-----	-----
PGSC0003DMT400054669	(1429)	GGTGCATTGGTTGGTTTGAAGTCAGGGTAATTCATCGTCGTACAAGCCA		
contig2ago2	(1569)	-----	-----	-----
ago2rvreverse	(31)	-----	-----	-----
ago2fpreverse	(1)	-----	-----	-----

Slika 10: Načrtovanje začetnikov za AGO2

se nadaljuje

nadaljevanje slike 10. Načrtovanje začetnikov za AGO2

		1701		1750
	contig1ago2	(1)	-----	
PGSC0003DMT400054669	(1479)	GAAGTTTCTTATTAAGCAGCTAACTGACTGCAAGACTCGTGAAATTACTT		
	contig2ago2	(1569)	-----	
	ago2rvreverse	(31)	-----	
	ago2fpreverse	(1)	-----	
		1751		1800
	contig1ago2	(1)	-----	
PGSC0003DMT400054669	(1529)	TTCCCCTTGAAGATCCAGAAGGCAAAGATCCCCCAAGGGATGTTTATCTT		
	contig2ago2	(1569)	-----	
	ago2rvreverse	(31)	-----	
	ago2fpreverse	(1)	-----	
		1801		1850
	contig1ago2	(1)	-----	
PGSC0003DMT400054669	(1579)	GTTGACTACTTCAGGGATAAATATCAGCGGGAGATTAGGTTCAAGGATTT		
	contig2ago2	(1569)	-----	
	ago2rvreverse	(31)	-----	
	ago2fpreverse	(1)	-----	
		1851		1900
	contig1ago2	(1)	-----	
PGSC0003DMT400054669	(1629)	TCCTTCATTAGATATTGGAAAAGGTAATAAGAAAACATATGTCCCGATGG		
	contig2ago2	(1569)	-----	
	ago2rvreverse	(31)	-----	
	ago2fpreverse	(1)	-----	
		1901		1950
	contig1ago2	(1)	-----GGTTGAGGGACAACGGTATCCTAAGGAGGATTTGGAT	
PGSC0003DMT400054669	(1679)	AATTCTGTGTCTTGGTTGAGGGACAACGGTATCCTAAGGAGGATTTGGAT		
	contig2ago2	(1569)	-----	
	ago2rvreverse	(31)	-----	
	ago2fpreverse	(1)	-----	
		1951		2000
	contig1ago2	(38)	AAGGATACTGCCTTGTTTTTGAAGAACATATCACTAGCTCGACCCCAAGA	
PGSC0003DMT400054669	(1729)	AAGGATACTGCCTTGTTTTTGAAGAACATATCACTAGCTCGACCCCAAGA		
	contig2ago2	(1569)	-----	
	ago2rvreverse	(31)	-----	
	ago2fpreverse	(1)	-----	
		2001		2050
	contig1ago2	(88)	GAGAAGGGAGGCAATTTGTGAAATGGTACGGGCTGAAGATGGCCCGTGCG	
PGSC0003DMT400054669	(1779)	GAGAAGGGAGGCAATTTGTGAAATGGTACGGGCTGAAGATGGCCCGTGCG		
	contig2ago2	(1569)	-----	
	ago2rvreverse	(31)	-----	
	ago2fpreverse	(1)	-----	
		2051		2100
	contig1ago2	(138)	GGGATATCACCCGTAATTTTGGAGATTGGAGTTGATAGGAACATGACCCGT	
PGSC0003DMT400054669	(1829)	GGGATATCACCCGTAATTTTGGAGATTGGAGTTGATAGGAACATGACCCGT		
	contig2ago2	(1569)	-----	
	ago2rvreverse	(31)	-----	
	ago2fpreverse	(1)	-----	
		2101		2150
	contig1ago2	(188)	GTTCCGGGTCGTATTCTTCCTCCCCCTGATTGAAGCTAGGCGGTCAAAG	
PGSC0003DMT400054669	(1879)	GTTCCGGGTCGTATTCTTCCTCCCCCTGATTGAAGCTAGGCGGTCAAAG		
	contig2ago2	(1569)	-----	
	ago2rvreverse	(31)	-----	
	ago2fpreverse	(1)	-----GCTAGGCGGTCAAAG	

Slika 10: Načrtovanje začetnikov za AGO2

se nadaljuje

nadaljevanje slike 10. Načrtovanje začetnikov za AGO2

		2151	2200
contig1ago2	(238)	TCGACTTCCTGTGAATGATAAATGCCAGTGGAAATCTTGTGGGAAATCTG	
PGSC0003DMT400054669	(1929)	TCGACTTCCTGTGAATGATAAATGCCAGTGGAAATCTTGTGGGAAATCTG	
contig2ago2	(1569)	-----	
ago2rvreverse	(31)	-----	
ago2fpreverse	(16)	TCGACTTCCTGTG-----	

Slika 10: Načrtovanje začetnih oligonukleotidov za AGO2. Slika prikazuje poravnavo zaporedij za načrtovanje začetnih oligonukleotidov za gen AGO2 pri krompirju. V poravnavi je prisotno poleg krompirjevega gena AGO2 (PGSC0003DMT400054669) še zaporedje soseske homolognih unigenov različnih krompirjevih sekvenčnih baz (contig1ago2 in contig2ago2), ter obeh začetnih oligonukleotidov (ago2fpreverse in ago2rvreverse)

		1151	1200
MICRO.6498.C1	(1106)	AGAGGAGCAAAGATGAGGATGGTGAAGTGCAGACTTCAGAAGTGACAGTT	
PGSC0003DMT400069460	(1148)	AGAGGAGCAAAGATGAGGATGGTGAAGTGCAGACTTCAGAAGTGACAGTT	
MICRO.1202.C2	(1)	-----	
Contig2	(1108)	AGAGGAGCAAAGATGAGGATGGTGAAGTGCAGACTTCAGAAGTGACAGTT	
revfp	(1)	-----	
revrp	(1)	-----GTGCAGACTTCAGAAGTGACAGTT	
		1201	1250
MICRO.6498.C1	(1156)	TATGATTACTTTGTTAATCATCGTAACATAGACTTGCATATTTCTGCTGA	
PGSC0003DMT400069460	(1198)	TATGATTACTTTGTTAATCATCGTAACATAGACTTGCATATTTCTGCTGA	
MICRO.1202.C2	(1)	-----	
Contig2	(1158)	TATGATTACTTTGTTAATCATCGTAACATAGACTTGCATATTTCTGCTGA	
revfp	(1)	-----	
revrp	(25)	TATG-----	
		1251	1300
MICRO.6498.C1	(1206)	TTTGCCGTGCCTCAATGGTGGAAAGCCTAAACGTCCCACCTATTTCCCCA	
PGSC0003DMT400069460	(1248)	TTTGCCGTGCCTCAATGGTGGAAAGCCTAAACGTCCCACCTATTTCCCCA	
MICRO.1202.C2	(1)	-----	
Contig2	(1208)	TTTGCCGTGCCTCAATGGTGGAAAGCCTAAACGTCCCACCTATTTCCCCA	
revfp	(1)	-----	
revrp	(29)	-----	
		1301	1350
MICRO.6498.C1	(1256)	TTGAGCTCTGCACTTTGGTCTCATTGCAAAGGTACACAAAAGCCTTGTC	
PGSC0003DMT400069460	(1298)	TTGAGCTCTGCACTTTGGTCTCATTGCAAAGGTACACAAAAGCCTTGTC	
MICRO.1202.C2	(1)	-----	
Contig2	(1258)	TTGAGCTCTGCACTTTGGTCTCATTGCAAAGGTACACAAAAGCCTTGTC	
revfp	(1)	-----	
revrp	(29)	-----	
		1351	1400
MICRO.6498.C1	(1306)	ACCTTTCAGAGGGCTTCCTTGGTGGAGAAGTCTAAGCAAAGCCTCAGGA	
PGSC0003DMT400069460	(1348)	ACCTTTCAGAGGGCTTCCTTGGTGGAGAAGTCTAAGCAAAGCCTCAGGA	
MICRO.1202.C2	(1)	-----CGAGG-AAAAGCCTCAGGA	
Contig2	(1308)	ACCTTTCAGAGGGCTTCCTTGGTGGAGAAGTCTAAGCAAAGCCTCAGGA	
revfp	(1)	-----	
revrp	(29)	-----	
		1401	1450
MICRO.6498.C1	(1356)	GAGAATGGAAATTTTGAGTAAT-----	
PGSC0003DMT400069460	(1398)	GAGAATGGAAATTTTGAGTAATGCTCTCAAAATCAACAATTATGATGCTG	
MICRO.1202.C2	(19)	GAGAATGGAAATTTTGAGTAATGCTCTCAAAATCAACAATTATGATGCTG	
Contig2	(1358)	GAGAATGGAAATTTTGAGTAATGCTCTCAAAATCAACAATTATGATGCTG	
revfp	(1)	-----	
revrp	(29)	-----	
		1451	1500
MICRO.6498.C1	(1378)	-----	
PGSC0003DMT400069460	(1448)	AGCCTCTGCTTCGTTCTTGTGGCGTCTCAATCAGTAGCAACTTCACACAG	
MICRO.1202.C2	(69)	AGCCTCTGCTTCGTTCTTGTGGTGTCTCAATCAGTAGCAACTTCACACAG	
Contig2	(1408)	AGCCTCTGCTTCGTTCTTGTGGTGTCTCAATCAGTAGCAACTTCACACAG	
revfp	(1)	-----	
revrp	(29)	-----	

Slika 11: Načrtovanje začetnikov za AGO4

se nadaljuje

nadaljevanje slike 11. Načrtovanje začetnikov za AGO4

		1501	1550
MICRO.6498.C1	(1378)	-----	-----
PGSC0003DMT400069460	(1498)	GTTGAAGGGCGTGTGCTGCCTGCTCCTAAGTTGAAGGCAGGAAATGGAGA	
MICRO.1202.C2	(119)	GTTGAAGGGCGTGTGCTGCCTGCTCCTAAGTTGAAGGCAGGAAATGGAGA	
Contig2	(1458)	GTTGAAGGGCGTGTGCTGCCTGCTCCTAAGTTGAAGGCAGGAAATGGAGA	
revfp	(1)	-----	-----
revrp	(29)	-----	-----
		1551	1600
MICRO.6498.C1	(1378)	-----	-----
PGSC0003DMT400069460	(1548)	TGACCTTTTCACCCGAAATGGCAGGTGGAACCTTAATAATAAGAGATTCT	
MICRO.1202.C2	(169)	TGACCTTTTCACCCGAAATGGCAGGTGGAACCTTAATAATAAGAGATTCT	
Contig2	(1508)	TGACCTTTTCACCCGAAATGGCAGGTGGAACCTTAATAATAAGAGATTCT	
revfp	(1)	-----	-----
revrp	(29)	-----	-----
		1601	1650
MICRO.6498.C1	(1378)	-----	-----
PGSC0003DMT400069460	(1598)	TTGATCCAGCAAAGGTAGAGCGTTGGGCTGTTGTGAACCTTTCTGCACGC	
MICRO.1202.C2	(219)	TTGATCCAGCAAAGGTAGAGCGTTGGGCTGTTGTGAACCTTTCTGCACGC	
Contig2	(1558)	TTGATCCAGCAAAGGTAGAGCGTTGGGCTGTTGTGAACCTTTCTGCACGC	
revfp	(1)	-----	-----
revrp	(29)	-----	-----
		1651	1700
MICRO.6498.C1	(1378)	-----	-----
PGSC0003DMT400069460	(1648)	TGTGACCTCC---GTGGCCTAGTCAGAGATTTGACAAGACTTGGAGAGAC	
MICRO.1202.C2	(269)	TGTGACCTCC---GTGGCCTGGTCAGAGATTTGACAAGACTTGGAGAGAC	
Contig2	(1608)	TGTGACCTCCCGTGGGGCCTAGTCAGAGATTTGACAAGACTTGGAGAGAC	
revfp	(1)	-----	-----
revrp	(29)	-----	-----
		1701	1750
MICRO.6498.C1	(1378)	-----	-----
PGSC0003DMT400069460	(1695)	TAAAGGAATTAGTGTGGAA-GCTCCATTTGAA-GTGTTTGAAGAG---TC	
MICRO.1202.C2	(316)	GAAAGGAATTAGTGTGGAA-GCTCCATTTGAA-GTGTTTGAAGAG---TC	
Contig2	(1658)	GAAAGGAATTAGTGTGGAAAGCTCCATTTGAAAGTGTTTGAAAGAAGTTC	
revfp	(1)	-----	-----
revrp	(29)	-----	-----
		1751	1800
MICRO.6498.C1	(1378)	-----	-----
PGSC0003DMT400069460	(1740)	TCCACAGCTTAGAAGGGC--TCCACCTGTTGT-CAGAGTTGACAAAATGT	
MICRO.1202.C2	(361)	TCCACAGCTTAGAAGGGC--TCCACCTGTTGT-CAGAGTTGACAAAATGT	
Contig2	(1708)	TCCACAGCTTAGAAGGGCTTCCACCTGTTGTTCAGAGTTGACAAAATGT	
revfp	(1)	-----	-----
revrp	(29)	-----	-----
		1801	1850
MICRO.6498.C1	(1378)	-----	-----
PGSC0003DMT400069460	(1787)	TTGAAGAGA-TCCAGTCAAACTTCCTGGTGCCCC-GAAGTTTCTTCTCT	
MICRO.1202.C2	(408)	TTGAAGAGA-TCCAGTCAAACTTCCTGGTGCCCC-GAAGTTTCTTCTCT	
Contig2	(1758)	TTGAAGAGAATCCAGTCAAACTTCCTGGTGCCCCGAAGTTTCTTCTCT	
revfp	(1)	-----	-----
revrp	(29)	-----	-----
		1851	1900
MICRO.6498.C1	(1378)	-----	-----
PGSC0003DMT400069460	(1835)	GTCTTCTTCCTGAGAGGAAAAATTGTGACATATATGGACCATGGAAGCGG	
MICRO.1202.C2	(456)	GTCTTCTTCCTGAGAGGAAAAATTGTGACATATATGGACCATGGAAGCGG	
Contig2	(1808)	GTCTTCTTCCCGAGAGGAAAAATTGTGACATATATGGACCATGGAAGCGG	
revfp	(1)	-----	-----
revrp	(29)	-----	-----

Slika 11: Načrtovanje začetnikov za AGO4

se nadaljuje

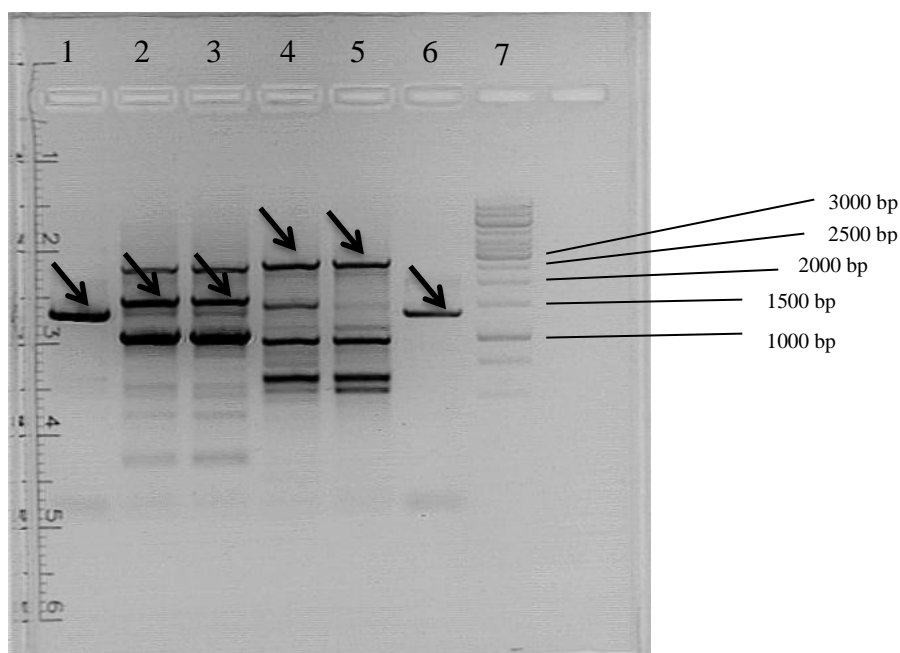
nadaljevanje slike 11. Načrtovanje začetnikov za AGO4

		1901	-----	1950
MICRO.6498.C1	(1378)	-----	-----	-----
PGSC0003DMT400069460	(1885)	AAAAATCTGGCTGATCATGGTATAGTAACCCAATGCTTGGCTCCTGGAAG	-----	-----
MICRO.1202.C2	(506)	AAAAATCTGGCTGATCATGGTATAGTAACCCAATGCTTGGCTCCTGGAAG	-----	-----
Contig2	(1858)	AAAAATCTGGCTGATCATGGTATAGTAACCCAATGCTTGGCTCCTGGAAG	-----	-----
revfp	(1)	-----	-----	-----
revrp	(29)	-----	-----	-----
		1951	-----	2000
MICRO.6498.C1	(1378)	-----	-----	-----
PGSC0003DMT400069460	(1935)	AGTTAATGATCAGTATCTCACAACCTTCTCCTTAAGATCAATGCTAAGC	-----	-----
MICRO.1202.C2	(556)	AGTTAATGATCAGTATCTCACAACCTTCTCCTTAAGATCAATGCTAAGC	-----	-----
Contig2	(1908)	AGTTAATGATCAGTATCTCACAACCTTCTCCTTAAGATCAATGCTAAGC	-----	-----
revfp	(1)	-----GTATCTCACAACCTTCTCCTTAAGATCAAT-----	-----	-----
revrp	(29)	-----	-----	-----

Slika 11: Načrtovanje začetnih oligonukleotidov za AGO4. Slika prikazuje poravnavo zaporedij za načrtovanje začetnih oligonukleotidov za gen AGO4 pri krompirju. V poravnavi je prisotno poleg krompirjevega gena AGO4 (PGSC0003DMT400069460) še zaporedje soseske homolognih unigenov različnih krompirjevih sekvenčnih baz (Contig2), homologa iz baze POI (MICRO.6498.C1 in MICRO.1202.C2) ter obeh začetnih oligonukleotidov (revfp in revrp)

#### 4.7.2 Kloniranje genov AGO1, AGO2 in AGO4

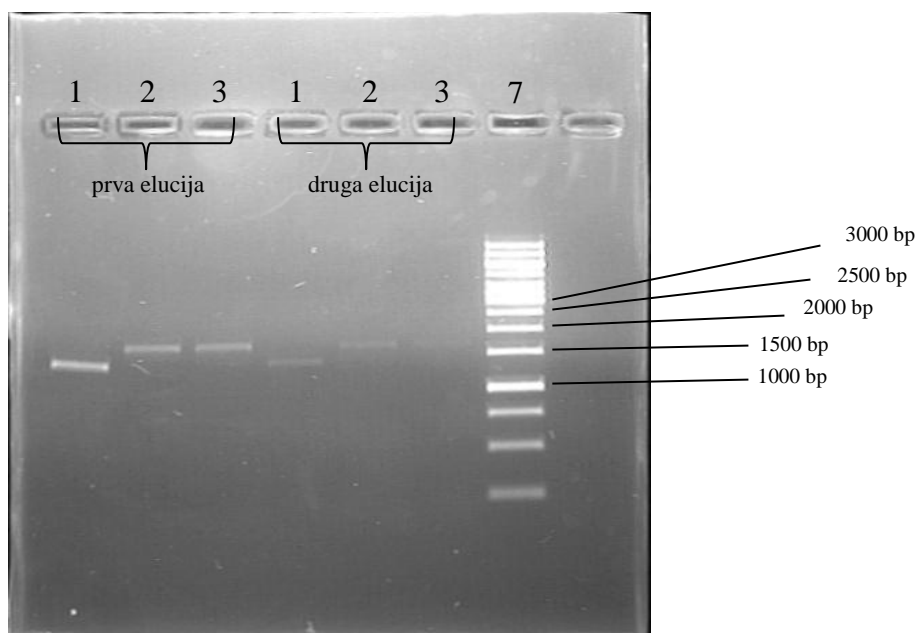
Po uspešni optimizaciji PCR s padajočo temperaturo prileganja ter ob uporabi le notranjega para začetnih oligonukleotidov, smo uspešno namnožili 15 fragmentov, dolgih med 300 in 3000 bp (slika 8). Med fragmenti so bili tudi taki, katere dolžine smo pričakovali (fragmenti oznčeni s puščico). Na sliki 12 lahko vidimo označene s števkami od 1 do 6, naslednje potencialne fragmente genov: (1) AGO4 iz krompirjevega kultivarja Igor (pričakovana dolžina 1395 bp), (2) AGO2 iz kultivarja Desireé (pričakovana dolžina 1719 bp), (3) AGO2 iz kultivarja Igor (pričakovana dolžina 1719 bp), (4) AGO1 iz kultivarja Desireé (pričakovana dolžina 2964 bp), (5) AGO1 iz kultivarja Igor (pričakovana dolžina 2964 bp) ter (6) AGO4 iz kultivarja Desireé (pričakovana dolžina 1395 bp).



Slika 12: Pomnoževanje genov AGO s PCR. Lise predstavljajo namnožene fragmente po PCR s padajočo temperaturo prileganja. S puščico so označene lise pričakovane velikosti. Standardna lestvica DNA je v stolpcu 7, označene so lise od 3000 bp do 1000 bp. V žepke označene z 1 do 6 so bili nanoseni vzorci PCR za AGO1, AGO2 ter AGO4 kultivarjev Igor in Desireé (za podrobnosti glej besedilo)

Zaradi višje koncentracije po čiščenju fragmentov iz agaroze ter zaradi nekoliko primernejše velikosti za kloniranje, smo za nadaljnje delo, od šestih izoliranih fragmentov izbrali le tri. To so bili fragmenti iz vzorcev 1, 2 ter 3, katere smo dodatno očistili s kompletom za čiščenje produktov PCR. Vzorce fragmentov smo v končnem koraku protokola za čiščenje eluirali v dveh fazah (prvič z 20  $\mu$ l, nato še s 30  $\mu$ l vode), da bi na ta

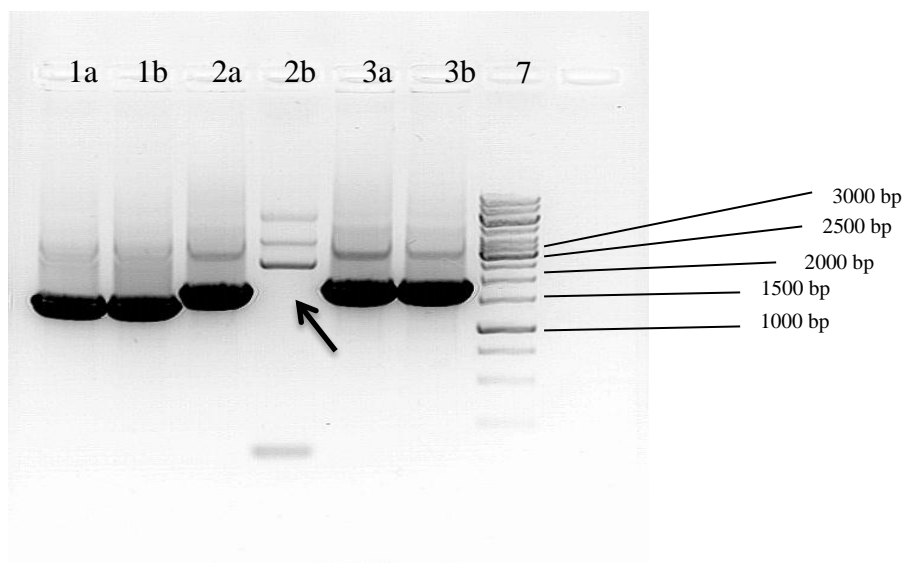
način nekoliko povečali koncentracijo. Nato smo vzorce vnesli v gel, da bi jim določili relativno koncentracijo, saj so spektrofotometrične metode določanja koncentracije pri nizkih koncentracijah vzorca lahko precej nenatančne. Slike 13 prikazuje rezultat elektroforeze fragmentov vzorcev 1, 2 ter 3 pri prvi ter drugi eluciji.



Slika 13: Relativna kvantifikacija koncentracije očiščenih fragmentov. Slika prikazuje gel, na katerem lise predstavljajo vzorce 1, 2 in 3 iz slike 12. Ker smo očiščene vzorce dvakrat eluirali (za razlago glej besedilo) so na sliki označeni kot prva in druga elucija. Standardna lestvica DNA je v stolpcu 7, označene so lise od 3000 bp do 1000 bp

Povprečna koncentracija DNA v vzorcih je znašala 5 ng/ $\mu$ l, pri tem je bila najvišja tista iz vzorca AGO4 kultivarja Igor, ki je bila 10 ng/ $\mu$ l. Nato smo fragmente vzorcev 1, 2 ter 3, vstavili v plazmid pJET1.2/blunt in klonirali v bakterijo *E. coli*. Transformacijsko mešanico smo razdelili v dve petrijevki z gojiščem LB. Preko noči je na gojišču zraslo med 15 do 20 kolonij, med katerimi so bile tudi satelitske kolonije.

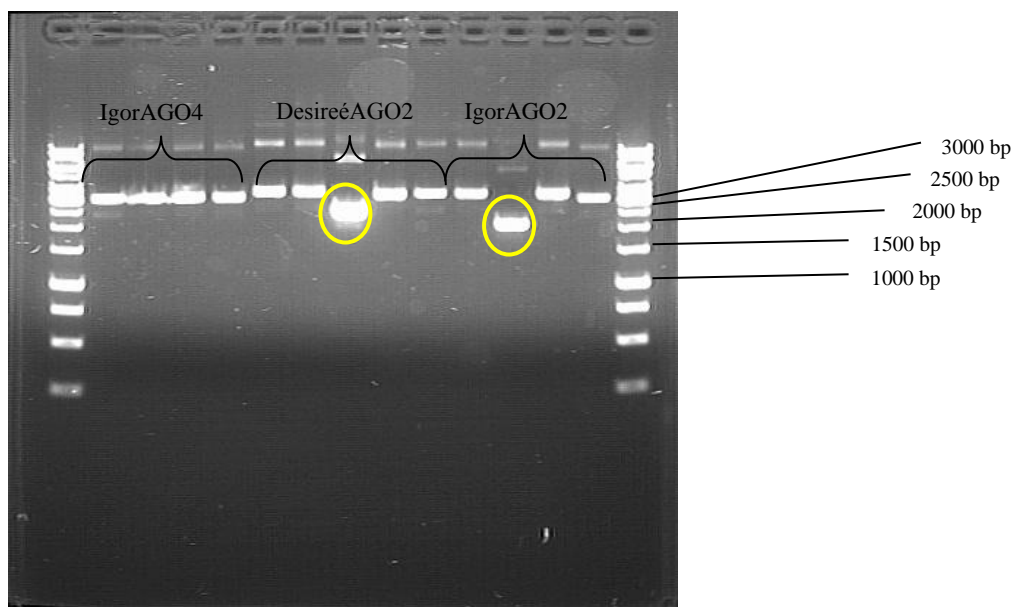
Iz prekonočnih bakterijskih kultur smo izolirali plazmidno DNA in izbrali po dva vzorca (a in b) za posamezen konstrukt, ki smo jo uporabili za PCR. Tako smo preverili prisotnost fragmenta krompirjeve DNA v plazmidu. Na sliki 14 je prikazan gel elektroforeze produktov PCR. Od šestih vzorcev je bilo 5 pozitivnih, en pa negativen (vzorec 2b).



Slika 14: Preverjanje prisotnosti fragmentov v plazmidih. Lise predstavljajo fragmente, namnožene s PCR. Kot matrično DNA smo uporabili izolirano plazmidno DNA. Standardna lestvica DNA je v stolpcu 7, označene so lise od 3000 bp do 1000 bp. V stolpcih, označenih z 1a in 1b (a in b predstavljata različne vzorce istega konstrukta oz. bakterijske kolonije iz katerih je bil plazmid izoliran), lahko vidimo namnožena fragmenta AGO4 iz kultivarja Desireé. Fragment AGO2 pri kultivarju Desireé smo v enem vzorcu namnožili (2a) v drugem pa ne (2b). V stolpcih 3a in 3b pa so vidni namnoženi fragmenti AGO2 kultivarja IGOR

Ker smo opazili, da je koncentracija plazmida dovolj visoka za vizualizacijo v agaroznem gelu, ni bilo treba ponoviti PCR še z ostalimi vzorci, ampak smo jih vnesli neposredno v elektroforezni gel. Ker so prazni nerekombinantni plazmidi v povprečju 1500 bp krajši od polnih rekombinantnih, se razlika zazna na prepotovani dolžini lise. Na ta način smo hitro izključili vzorce, kjer ligacijska reakcija ni uspela, bakterijske kolonije pa so vseeno zrasle. Na sliki 15 lahko vidimo z rumeno barvo obkrožene lise, ki predstavljajo prazne plazmide.





Slika 15: Preverjanje vseh vzorcev izoliranih plazmidov, za prisotnost fragmentov AGO2 in AGO4. V gel smo nanegli raztopino plazmidne DNA iz posameznega vzorca, da bi preverili, kateri vsebujejo prazne plazmide. Z rumenimi krogi so obkroženi prazni plazmidi. Na sliki je označeno, kateremu kultivarju pripadajo vzorci ter fragment katerega gena je prisoten. Standardna lestvica DNA je nanescena v skrajno desni in skrajno levi žepek gela.

#### 4.7.3 Zaporedja genov AGO2 in AGO4 iz različnih kultivarjev krompirja

Ob poravnavi zaporedij kloniranih fragmentov oziroma njihovih skupnih zaporedij z zaporedjem krompirjevih genov smo lahko le te med sabo primerjali. Med genom AGO4 krompirja iz baze PGSC in kloniranim fragmentom gena AGO4 kultivarja Igor (dolžina brez intronov je 804 bp), smo odkrili tri točkovne mutacije, od katerih je bila le ena tiha. Vse tri mutacije so bile potrjene z obojestranskim branjem zaporedja. V poravnavi gena AGO2 krompirja s fragmenti AGO2 iz kultivarjev Igor in Desireé (dolžina brez intronov je 927 bp) smo opazili nekoliko več razlik, posebej pri fragmentu gena AGO2, kloniranega iz kultivarja Igor. Zaporedje le tega se je razlikovalo v 7 mestih glede na transkript PGSC gena AGO2. Od tega so bile tri tihe mutacije, štiri pa take, ki vodijo v spremembo aminokislina. Žal pa nobene od sedmih razlik nismo potrdili z branji iz obeh verig DNA. Pri fragmentu gena AGO2 kultivarja Desireé, pa smo opazili le dve točkovni mutaciji, kateri vodita v zamenjavo aminokislina. Eno smo potrdili z branji iz obeh verig DNA, drugo pa ne. Na slikah 16 in 17, so prikazane poravnave fragmentov gena AGO2 oziroma AGO4, pri različnih kultivarjih krompirja, s transkripti homologov genov AGO2 in AGO4 navadnega repnjakovca iz podatkovne baze PGSC

```

PGSC0003DMT400054669 rev TATCATTACACAGGAAGTCGACTTTGACCGCCTAGCTTCAAATCAGGGGG 49
Translation -2 D N V P L R S Q G G L K L D P P
ConsensusAGO2d_trimmed - - - - -CACAGGAAGTCGACTTTGACCGCCTAGCTTCAAATCAGGGGG 42
Translation -2 V P L R S Q G G L K L D P P
ConsensusAGO2l_trimmed - - - - -TACAGGAAGTCGACTTTGACCGCCTAGCTTCAAATCAGGGGG 42
Translation -2 V P L R S Q G G L K L D P P

PGSC0003DMT400054669 rev AGGAAGAATACGACCCGGAACACGGGTCATGTTCTCATCAACTCCAATC 98
Translation -2 P L I R G P V R T M N R D V G I
ConsensusAGO2d_trimmed AGGAAGAATACGACCCGGAACACGGGTCATGTTCTCATCAACTCCAATC 91
Translation -2 P L I R G P V R T M N R D V G I
ConsensusAGO2l_trimmed AGGAAGAATACGACCCGGAACACGGGTCATGTTCTCATCAACTCCAATC 91
Translation -2 P L I R G P V R T M N R D V G I

PGSC0003DMT400054669 rev TCAA AATTACGGGTGATATCCCGCACGGCCCATCTTCAGCCCGTACCA 147
Translation -2 E F N R T I D G C P G D E A R V M
ConsensusAGO2d_trimmed TCAA AATTACGGGTGATATCCCGCACGGCCCATCTTCAGCCCGTACCA 140
Translation -2 E F N R T I D G C P G D E A R V M
ConsensusAGO2l_trimmed TCAA AATTACGGGTGATATCCCGCACGGCCCATCTTCAGCCCGTACCA 140
Translation -2 E F N R T I D G C P G D E A R V M

PGSC0003DMT400054669 rev TTTTCAA AATTGCCTCCCTTCTCTTTGGGGTCGAGCTAGTGATATGTT 196
Translation -2 E C I A E R R E Q P R A L S I N
ConsensusAGO2d_trimmed TTTTCAA AATTGCCTCCCTTCTCTTTGGGGTCGAGCTAGTGATATGTT 189
Translation -2 E C I A E R R E Q P R A L S I N
ConsensusAGO2l_trimmed TTTTCAA AATTGCCTCCCTTCTCTTTGGGGTCGAGCTAGTGATATGTT 189
Translation -2 E C I A E R R E Q P R A L S I N

PGSC0003DMT400054669 rev CTTCAA AACAAGGCAGTATCCTTATCAA AATCCTCCTTAGGATACCGT 245
Translation -2 K L F L A T D K D L D E K P Y R
ConsensusAGO2d_trimmed CTTCAA AACAAGGCAGTATCCTTATCAA AATCCTCCTTAGGATACCGT 238
Translation -2 K L F L A T D K D L D E K P Y R
ConsensusAGO2l_trimmed CTTCAA AACAAGGCAGTATCCTTATCAA AATCCTCCTTAGGATACCGT 238
Translation -2 K L F L A T D K D L D E K P Y R

PGSC0003DMT400054669 rev TGTCCCTCAACCAAGACACAGAATTCATCGGGACATAGTTTTTCTTAT 294
Translation -2 Q G E V L V C F E M P V Y N K K N
ConsensusAGO2d_trimmed TGTCCCTCAACCAAGACACAGAATTCATCGGGACATAGTTTTTCTTAT 287
Translation -2 Q G E V L V C F E M P V Y N K K N
ConsensusAGO2l_trimmed TGTCCCTCAACCAAGACACAGAATTCATCGGGACATAGTTTTCTTAT 287
Translation -2 Q G E V L V C F E M P V Y N K K N

PGSC0003DMT400054669 rev TACCTTTTCAA AATATCTAATGAAGGAAAAATCCTTGAACCTAATCTCCCG 343
Translation -2 G K G I D L S P F D K F R I E R
ConsensusAGO2d_trimmed TACCTTTTCAA AATATCTAATGAAGGAAAAATCCTTGAACCTAATCTCCCG 336
Translation -2 G K G I D L S P F D K F R I E R
ConsensusAGO2l_trimmed TACCTTTTCAA AATATCTAATGAAGGAAAAATCCTTGAACCTAATCTCCCG 336
Translation -2 G K G I D L S P F D K F R I E R

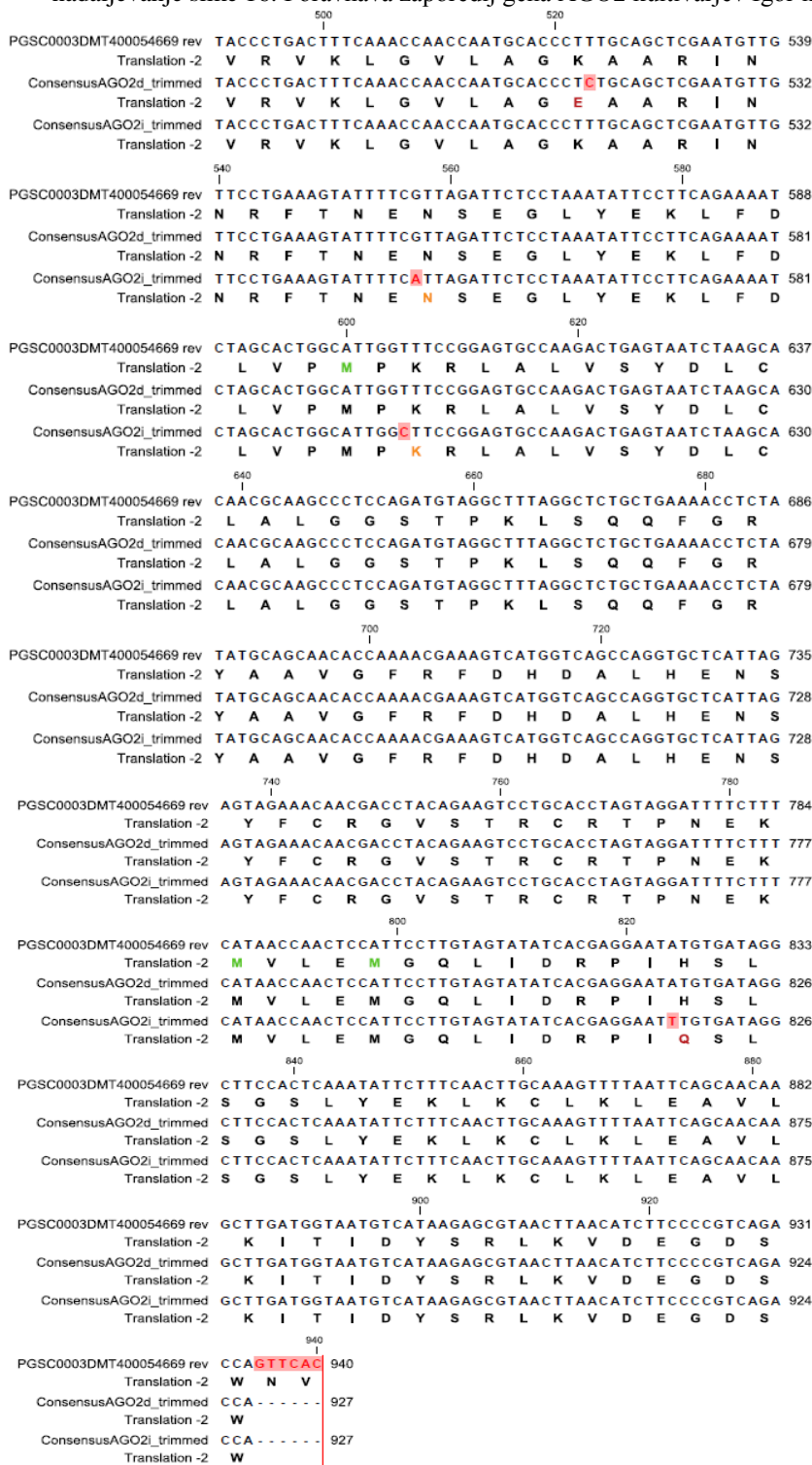
PGSC0003DMT400054669 rev CTGATATTTATCCCTGAAGTAGTCAACAAGTAAACATCCCTTGGGGGA 392
Translation -2 Q Y K D R F Y D V L Y V D R P P
ConsensusAGO2d_trimmed CTGATATTTATCCCTGAAGTAGTCAACAAGAAAAACATCCCTTGGGGGA 385
Translation -2 Q Y K D R F Y D V L F V D R P P
ConsensusAGO2l_trimmed CTGATATTTATCCCTGAAGTAGTCAACAAGAAAAACATCCCTTGGGGGA 385
Translation -2 Q Y K D R F Y D V L F V D R P P

PGSC0003DMT400054669 rev TCTTTGCCTTCTGGATCTTCAAGGGGAAAAGTAATTTACGAGTCTTGC 441
Translation -2 D K G E P D E L P F T I E R T K C
ConsensusAGO2d_trimmed TCTTTGCCTTCTGGATCTTCAAGGGGAAAAGTAATTTACGAGTCTTGC 434
Translation -2 D K G E P D E L P F T I E R T K C
ConsensusAGO2l_trimmed TCTTTGCCTTCTGGATCTTCAAGGGGAAAAGTAATTTACGAGTCTTGC 434
Translation -2 D K G E P D E L P F T I E R T K C

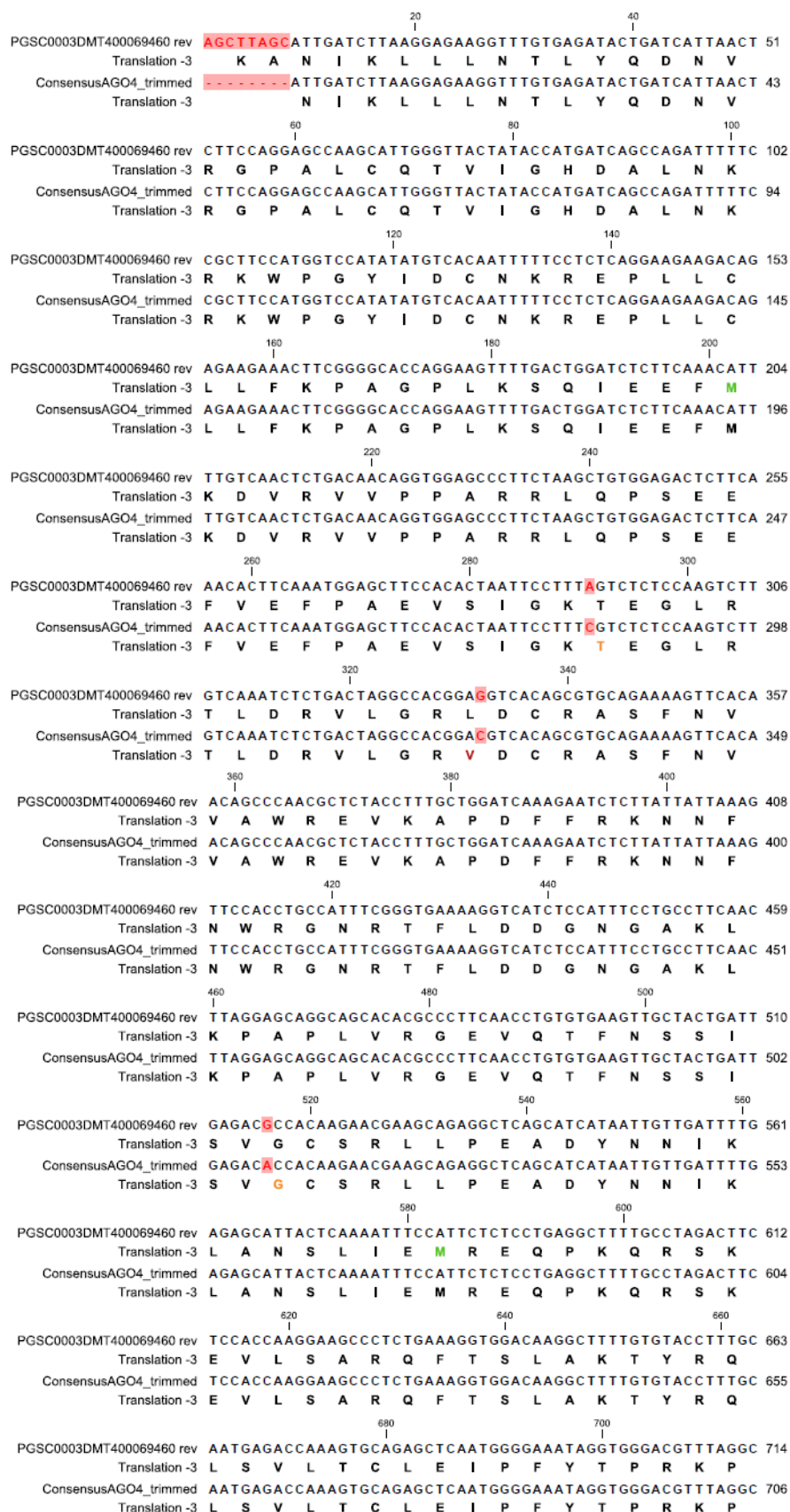
PGSC0003DMT400054669 rev AGTCAGTTAGCTGCTTAATAAGAAACTTCTGGCTTGACGACGATGAAT 490
Translation -2 D T L Q K I L F K Q S T R R H I
ConsensusAGO2d_trimmed AGTCAGTTAGCTGCTTAATAAGAAACTTCTGGCTTGACGACGATGAAT 483
Translation -2 D T L Q K I L F K Q S T R R H I
ConsensusAGO2l_trimmed AGTCAGTTAGCTGCTTAATAAGAAACTTCTGGCTTGACGACGATGAAT 483
Translation -2 D T L Q K I L F K Q S T R R H I
    
```

Slika 16: Poravnava zaporedja gena AGO2 kultivarja Igor in Desireé se nadaljuje

nadaljevanje slike 16. Poravnava zaporedij gena AGO2 kultivarjev Igor in Desireé



Slika 16: Poravnava zaporedij gena AGO2 kultivarjev Igor in Desireé. Na sliki je prikazana poravnava skupnih zaporedij fragmentov gena AGO2 iz kultivarja Igor (Consensus AGO2i\_trimmed) in iz kultivarja Desireé (Consensus AGO2d\_trimmed) s fragmentom transkripta PGSC (PGSC0003DMT400054669rev). Transkript PGSC je bil pred poravnavo skrajšan do mesta prileganja začetnih oligonukleotidov. Pod vsakim zaporedjem je prisoten še prevod tripletov v aminokislino. Z rdečo barvo so označene spremenjene aminokislino, z oranžno pa aminokislino v primeru tihe mutacije. Razlike v nukleotidih so označene z rožnatim okvirjem



Slika 17: Poravnava zaporedja gena AGO4 kultivarja Igor se nadaljuje

nadaljevanje slike 17. Poravnava zaporedij gena AGO4 kultivarja Igor

```

              720              740              760
PGSC0003DMT400069460 rev TTTCCAACATTGAGGCACGGCAAATCAGCAGAATATCGCAAGTCTATGTTA 765
Translation -3 K G V N L C P L D A S Y R L D I N
ConsensusAGO4_trimmed TTTCCAACATTGAGGCACGGCAAATCAGCAGAATATCGCAAGTCTATGTTA 757
Translation -3 K G V N L C P L D A S Y R L D I N

              780              800
PGSC0003DMT400069460 rev CGATGATTAACAAAGTAATCATAAACTGTCACCTTCTGAAGTCTGCAC TTCA 816
Translation -3 R H N V F Y D Y V T V E S T Q V E
ConsensusAGO4_trimmed CGATGATTAACAAAGTAATCATAAACTGTCACCTTCTGAAGTCTGCAC --- 804
Translation -3 R H N V F Y D Y V T V E S T Q V

              820
PGSC0003DMT400069460 rev C C A T 820
Translation -3 G
ConsensusAGO4_trimmed - - - 804
Translation -3
```

Slika 17: Poravnava zaporedja gena AGO4 kultivarja Igor. Na sliki je prikazana poravnava skupnega zaporedja fragmenta gena AGO4 iz kultivarja Igor (ConsensusAGO4\_trimmed) s fragmentom transkripta PGSC (PGSC0003DMT400069460rev). Transkript PGSC je bil pred poravnavo skrajšan do mesta prileganja začetnih oligonukleotidov. Pod vsakim zaporedjem je prisoten še prevod tripletov v aminokislino. Z rdečo barvo so označene spremenjene aminokislino, z oranžno pa aminokislino v primeru te mutacije. Razlike v nukleotidih so označene z rožnatim okvirjem

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 ISKANJE KOMPONENT PTGS PRI KROMPIRJU

Ob nepoznavanju zaporedja celotnega genoma organizma je naslednji najboljši vir informacij zbirka zaporedij, ki jim pravimo unigeni. Unigeni predstavljajo soseske zaporedij EST (expressed sequence tags), ki so bila združena s pomočjo različnih algoritmov. Ker zaporedje EST običajno predstavlja fragment celotne mRNA, njihovo združevanje lahko pomeni sestavo zaporedja delov ali celotne molekule mRNA. Ob tem pa pogosto pride tudi do napak. Zato je sekvenčna analiza takih zaporedij lahko težavna. S tem v mislih smo se lotili iskanja ključnih besed komponent PTGS v opisih sekvenčne baze POCI. Za slednjo smo se odločili deloma zato, ker naj bi bila popolnejša in manj redundantna od ostalih baz unigenov krompirja, deloma zato, ker so na njej osnovane mikromreže POCI za ekspresijske analize.

Pred kratkim so objavili tudi zaporedje genoma krompirja *S. tuberosum* (group Phureja)(Xu et al., 2011). Čeprav se ta organizem precej razlikuje od komercialno uporabljenega krompirja, nam je bila objava sekvenčne baze podatkov v veliko pomoč, tako pri oblikovanju začetnih oligonukleotidov, kot pri sami sekvenčni analizi.

Najprej smo izdelali ontologijo in slovar sopomenk komponent PTGS, na osnovi informacij iz literature (glej preglednici 6 in 1). Komponente smo razdelili na osnovi njihove funkcije v mehanizmu utišanja, na tri ločene procese, na katerih temelji PTGS: (i) procesiranje RNA in nastanek sRNA, (ii) vezava RNA v kompleks RISC, (iii) ojačanje PTGS (ang. Transitivity).

Iskanje po ključnih besedah (glej preglednico 6) je bilo dokaj preprosto in v kratkem času smo imeli zbranih 142 različnih zaporedij. Edina večja težava so bili sinonimi v anotacijah in manj specifične ključne besede (npr. RNA helicase in KH), ki so zelo povečali začetno število zbranih sekvenc, predvsem zaradi podvajanja.

Ker je bilo v zbirki POCI veliko unigenov, brez anotacije ali je bila le ta napačna, smo nabor komponent PTGS dopolnili še z iskanjem preko sekvenčnih podobnosti. Odločili

smo se za poskus z zaporednimi zagoni algoritma BLAST, saj le-ta išče zaporedja, ki so podobna našim. Predpostavili smo tudi, da se po določenem številu zagonov, ne da več identificirati novih zaporedij, in skupine komponent postanejo fiksne. Število zagonov pa mora biti v povezavi z mejo za pozitivni zadetek, saj višja, kot je mejna vrednost E, več ponovitev potrebujemo za zaključitev skupin. Treba je bilo torej določiti tako mejno vrednost, ki omogoča iskanje vseh članov določene skupine, kljub temu pa omeji število lažno pozitivnih zadetkov.

Na osnovi raziskave, ki so jo izvedli Rotter in sodelavci (Rotter et al., 2007), smo se odločili, da bomo za prvi zagon algoritma uporabili nekoliko višjo mejno vrednost, in sicer  $9 \times 10^{-10}$ , za vse nadaljnje pa nižjo mejno vrednost  $9 \times 10^{-30}$  za pozitivni zadetek (glej sekciji 3.2.2 in 3.2.3).

Skupno smo algoritem BLAST pognali štirikrat in s tem pridobili 695 dodatnih zaporedij. Skupaj smo torej imeli 837 zaporedij, katerih večina je bila porazdeljena predvsem v tri skupine: AGO, RNA HELICASE ter KH. Te skupine so bile tudi razlog, zaradi katerega smo proces ponovnih zagonov algoritma ustavili, saj se je zgodilo nekaj, česar nismo predvideli. Pri vseh treh se je ob tretjem zagonu algoritma BLAST začelo povečevati število novih zadetkov, ter je bilo po četrtem še večje (glej preglednico 6). Pri ostalih skupinah pa se po tretjem zagonu niso več pojavili novi zadetki. Tudi anotacije novih zadetkov so bile nepričakovane, saj niso bile povezane z našo ontologijo komponent PTGS (npr. proteinazni inhibitorji). Kaj je bil razlog za ponovno razširjanje naštetih skupin, nam trenutno ni znano. Obstajata dve domnevi: (i) možno je, da se je v danem trenutku pri teh skupinah pojavil lažno pozitivni zadetek, ki je zaradi preveč ohlapne meje povzročil ekspanzijo skupine ob naslednjem zagonu algoritma ali, (ii) da so pri sestavi unigenov, zaradi napak v pripravi knjižnic cDNA (ligacija multiplih insertov v en plazmid), nastali hibridi dveh transkriptov in smo nato iskali tudi homologe dela hibridnega zaporedja, ki nima nobene povezave z PTGS.

Zato smo vse nadaljnje analize delali le na zaporedjih, ki smo jih našli z iskanjem ključnih besed, ter s tistimi iz prvega in drugega zagona algoritma BLAST, kar je skupaj znašalo 462 zaporedji unigenov.



## 5.2 PREVERJANJE ANOTACIJ ZBRANIH KOMPONENT PTGS

Ker smo želeli preveriti anotacije najdenih unigenov, predvsem tistih, ki opisa sploh niso imeli, smo si pomagali z anotacijo najbolj podobnega zaporedja v bazi SwissProt, ker poleg drugih zaporedij vsebuje tudi genom repnjakovca. Mejna vrednost, uporabljena ob zagonu algoritma BLAST proti bazi SwissProt, je bila v tem primeru  $9 \times 10^{-10}$ .

Kljub temu, da smo zadnja dva zagona algoritma BLAST zavrgli, smo od 462 unigenov izbrali za nadaljnje delo le 299, katerih anotacija ter smiselnost zadetka v sekvenčni bazi SwissProt, sta nas prepričali, da gre za komponento v okviru genskega utišanja. Tu je treba povedati, da odstranjeni unigeni niso izvirali le iz prvega ali drugega zagona algoritma BLAST, ampak tudi iz iskanja na podlagi ključnih besed. V preglednici 7 se v prvem stolpcu, označenim z »B« nahaja zaporedno število zagona algoritma BLAST, iz katerega unigen izhaja. To pomeni, da so imela nekatera zaporedja od samega začetka napačno anotacijo ter posledično tudi skupino, kar dodatno poudarja pomen ročnega pregledovanja zaporedij ter njihovih anotacij.

## 5.3 DOLOČANJE GENSKIH DRUŽIN KOMPONENT PTGS

Ontologija, ki smo jo za to raziskovalno delo sestavili, temelji na podatkih iz literature, ter na domnevi, da so anotacije, preko katerih smo začeli zaporedja iskati, pravilne. Ker smo opazili, da ni nujno tako (glej delovni zvezek na zgoščenki »Priloge/swissprot\_anotacije.xls«), je bila pod vprašajem celotna struktura ontologije. Možno je, da smo ob ročnem iskanju genov v skupine vključili zaporedja unigenov, ki nimajo nikakršne povezave s PTGS. Poleg tega smo z iskanjem s pomočjo algoritma BLAST take napake še dodatno namnožili.

Da bi preverili, do kakšne mere so si zaporedja dejansko podobna v posamezni skupini, ne da bi ob tem porabili ure sedenja za računalnikom ob poravnava, smo potrebovali novo metodo. Ideja je prišla naključno, med delom in iskanjem rešitve. In sicer iz popolnoma drugače stroke: Analize socialnih mrež (Batagelj, Mrvar, & Nooy, 2008).

Tako smo na osnovi rezultatov algoritma BLAST pri določeni mejni vrednosti E ter s pomočjo programa za vizualizacijo in manipulacijo mrež Pajek, lahko določili skupine med seboj podobnih zaporedij, ter jih združili v particije.



V preglednici 7 lahko vidimo, kako se skupine (particije) narejene na podlagi omrežne analize, ujemajo ali ne s samo ontologijo. Manjše skupine, kot so HEN, XH-XS, DCL PAZ ali DRB še veliko bolje ujemajo s particijami, kakor pa večje skupine. Izjema je le skupina RDRP, katere člani se delijo na kar 6 particij. Zanimivo pa je, da je pri navadnem repnjakovcu prisotnih prav šest različnih genov RDR.

Če pogledamo ontološko skupino RNA HELICASE, lahko opazimo, da se v sami skupini pojavlja več particij, kar najverjetneje pomeni, da je sama definicija skupine nekoliko preširoka (npr. če je iskalna beseda proteinska domena ali posplošena definicija proteina). Podrobnejša analiza bi bila potrebna, da bi določili, ali gre za podskupine, ali so v skupini RNA HELICASE prisotni lažno pozitivni unigeni, torej taki, ki niso del aparata PTGS. Enako velja za druge večje skupine, kot so KH (KH je okrajšava za K homology, to je proteinska domena, prisotna pri proteinu HEN), ter DNA METHYLASE.

Že na začetku preglednice 7 lahko opazimo, kako združevanje zaporedij v skupine na podlagi anotacij in brez ročnega pregledovanja zaporedij, vodi do napak. Če pogledamo particije članov podskupine PAZ, lahko opazimo, da se pri unigenu ACDA00524D08.T3m.scf le te ne ujemajo s particijami ostalih članov. Omenjeni unigen namreč pripada particiji 1 in 11, kakor unigeni skupine AGO. Proteini ARGONAUTE tudi vsebujejo domeno PAZ (Hutvagner & Simard, 2008), sicer značilno za proteine DICER, v našem zaporedju, po kateri je unigen dobil svoj opis. Tako smo na podlagi pomanjkljivega opisa, potencialen protein AGO vstavili v podskupino PAZ. Ta primer nakazuje dejstvo, da moramo biti previdni pri interpretiranju rezultatov na podlagi *in silico* dodeljenih opisov, saj lahko storimo napako tako zaradi napačnih opisov kot zaradi nepopolnih.

Če specifično primerjamo razporeditev skupin oziroma particij (preglednica 7) ontološke skupine AGO s filogenetsko analizo genov AGO (slika 8), lahko opazimo, da z mrežno analizo ni prišlo do zelo specifičnega ločevanja znotraj skupine AGO. Zaporedja so se namreč razporedila večinoma v isto particijo tako pri mreži, ki je vsebovala le zaporedja POCI (particija 1), kot pri mreži, ki je vsebovala tako transkripte POCI kot PGSC (particija 11). Izjema je bil le transkript MICRO.10678.C2, ki je tvoril v obeh primerih ločeno

particijo. Možno je, da bi ob postavitvi strožje meje prišlo do ločevanja znotraj skupine AGO. Tako ločevanje pa bi po vsej verjetnosti odražalo filogenetsko analizo skupine AGO oziroma veje drevesa na sliki 8.

Naša analiza omrežij je torej informativna glede genskih družin, s postavljanjem strožje ali bolj ohlapne mejne vrednosti E pa lahko dobimo bolj ali manj podrobne informacije o odnosih med zaporedji.

Če primerjamo nekaj informacij o številu posameznih komponent mehanizma PTGS (kot so DCL, AGO, RDR, itd) pri navadnem repnjakovcu (Hohn & Vazquez, 2011), in število transkriptov POCI, ki smo jih zbrali za posamezno skupino, lahko zaključimo dvoje: (i) komponent v krompirju je za posamezno ontološko skupino bistveno več (npr. 8 potencialnih transkriptov gena DCL proteinov proti 4 genom DCL navadnega repnjakovca), ali (ii) da je med transkripti POCI prisotna določena mera redundance, saj je članov določenih skupin preveč za posamezno gensko družino (30 unigenov v skupini AGO proti 10 genom AGO navadnega repnjakovca).

#### 5.4 EKSPRESIJSKA IN SEKVENČNA ANALIZA SKUPINE AGO

Ker do današnjega dne pri krompirju ni bila opisana še nobena od komponent, vključenih v mehanizem PTGS, smo hoteli nekoliko podrobneje raziskati vsaj eno od skupin v svoji ontologiji. Odločili smo se, da bomo skupino izbrali glede na zbrane podatke o ekspresiji. Zaradi izrazite diferencialne ekspresije nekaterih unigenov iz skupine AGO v različnih kultivarjih krompirja, okuženih s PVY (preglednica 8), zaradi njene primerne velikosti ter samega pomena proteinov AGO v mehanizmu post-transkripcijskega genskega utišanja, smo se odločili podrobneje analizirati to skupino.

Predvsem trije unigeni iz ontološke skupine AGO so bili močno utišani v kultivarju krompirja Rywal ( $\log_{FC} < -2$ ,  $p < 0,05$ ), inducirani pa v kultivarjih PW in Rywal nahG (preglednica 8). MICRO.3496.C1, katerega homolog v krompirjevem genomu (preglednica 7) je tudi homolog gena AGO2 v navadnem repnjakovcu (slika 8). MICRO.3525.C1 in MICRO.6498.C1 pa sta krompirjeva homologa gena AGO1 oziroma AGO4.

V raziskavi, opravljeni na rižu (*Oryza sativa*) so Kapoor in sodelavci odkrili, da se homolog gena AGO 2 navadnega repnjakovca v rižu (OsAGO2) odziva predvsem na abiotski stres. Le ta je bil namreč močnejše izražen, če so bile rastline izpostavljene nizkim temperaturam, višji slanosti ali suši (Kapoor et al., 2008). Pri navadnem repnjakovcu so vlogo gena AGO2 povezali z zaščito proti bakterijskim patogenom (Zhang et al., 2011) ter virusnim patogenom (Jaubert et al., 2011). Zaščitna vloga proti virusnim patogenom je bila dokazana tudi v primeru homologa gena AGO2 navadnega repnjakovca pri tobaku (*Nicotiana benthamiana*, NtAGO2)(Scholthof et al., 2011).

Gen AGO2 navadnega repnjakovca ter njegovi ortologi, igrajo ključno vlogo v regulaciji utišanja molekul RNA pri rastlinah, izpostavljenih tako biotskemu kot abiotskemu stresu. Po pričakovanjih so se pojavili trije kladi arabidopsisovih genov AGO (Kim, Eamens, & Waterhouse, 2006). Zanimalo pa nas je predvsem, kako se bodo vanje vključili krompirjevi geni PGSC ter unigeni POCI. Ali bo morda nastala kakšna nova veja gena/ov, ki v navadnem repnjakovcu niso prisotni.

Kot je iz slike 8 razvidno, se 22 zaporedij POCI ni vključilo v nobeno od glavnih vej drevesa. Večina transkriptov PGSC pa se je vključila, z nekaterimi zaporedji POCI, v glavne tri veje proteinov AGO navadnega repnjakovca. Pojavila se je le ena (slika 8), ne preveč jasno ločena, dodatna veja, ki je vsebovala nekaj med seboj zelo podobnih krompirjevih zaporedij (slika 8). Podrobnejši vpogled v zaporedja transkriptov bi bil v tem primeru potreben, da bi določili ali gre za pravo samostojno vejo, ali za slabo poravnana zaporedja transkriptov, ki sodijo v vejo AGO4/AGO6/AGO9.

Razlog za slabo poravnavo zaporedij podatkovne baze POCI je verjetno slabša kakovost zaporedij. Njihovo število pa verjetno izvira iz redundance med zaporedji, kjer sta dva dela istega transkripta pogosto označena kot dva ločena transkripta.

Število najdenih genov AGO v podatkovni bazi PGSC (12) je bilo primerljivo s številom genov AGO pri navadnem repnjakovcu (10). Ostaja pa vprašanje, ali je res samo 12 genov AGO v krompirju. Od mejne vrednosti E, ki jo uporabimo ob zagonu algoritma BLAST, je sicer odvisno število najdenih homologov. V našem primeru je meja znašala  $9,0 \times 10^{-30}$ , kar

je precej visoka meja glede na to, da gre za različni vrsti. Tako smo ob poskusu zmanjšanja količine lažno pozitivnih zadetkov verjetno izgubili tudi kakšnega resnično pozitivnega. Ker je ob zagonu algoritma BLAST proti bazi POCI, bila meja nekoliko nižja (želeli smo mejo, ki bi prinesla približno toliko različnih zadetkov, kakor je unigenov v ontološki skupini AGO), je mogoče tudi to razlog za njihovo večje število (33).

V primerjavi z navadnim repnjakovcem se mogoče zdi število unigenov POCI prevelika. V primerjavi z rižem, pri katerem so našli 19 genov AGO (Kapoor et al., 2008), pa ta razlika ni več tako očitna. Poleg tega je treba poudariti, da v nasprotju s transkripti PGSC, ki izvirajo iz monoploidne sorte krompirja (Xu et al., 2011), zaporedja baze POCI izhajajo iz komercialno uporabljenih kultivarjev krompirja, ki so tetraploidni heterozigoti (Kloosterman et al., 2008).

Da bi izvedeli kaj več o samih razlikah med zaporedji genov AGO iz monoploidne sorte krompirja, ter komercialno uporabljenih sort, smo se odločili tudi sami klonirati tri različne gene AGO. Za poizkus kloniranja krompirjevih genov iz kultivarjev Igor ter Desireé, smo izbrali homologe genov AGO1, AGO2 ter AGO4 navadnega repnjakovca. Deloma zato, ker so se le ti diferencialno izražali po okužbi z virusom PVY, deloma zato, ker so prav ti proteini pri navadnem repnjakovcu ključnega pomena pri delovanju post-transkripcijskega utišanja in povezani z obrambo proti virusnim patogenom.

Prvi poskusi pomnoževanja izbranih genov pri krompirju so nas dokaj razočarali. Iz zbirke cDNA krompirjevih kultivarjev PW in Rywal nam nikakor ni uspelo namnožiti pričakovanih produktov. Šele po optimizaciji PCR ter zamenjavi vzorcev cDNA genomske DNA kultivarjev Igor in Desireé, smo uspeli pomnožiti zelene produkte. Kljub temu, da se je dolžina produktov skoraj podvojila zaradi prisotnosti nekodirajoče DNA, smo uspešno namnožili celo najdaljšega od pričakovanih produktov AGO1 (2964 bp). Izkoristek reakcije je sicer bil nekoliko nižji, kot pri ostalih dveh fragmentih. Zaradi tega ter zaradi možnih zapletov ob ligaciji tako velikih fragmentov v plazmide, smo se odločili nadaljevati poskuse le s fragmenti AGO2 in AGO4.

Na sliki 12 so na gelu vidni dodatni fragmenti, dolgi nekaj manj kot 1000 bp. Poleg tega so v vzorcih AGO2 vidni tudi fragmenti enake dolžine kot AGO1. Zaradi podobnosti med zaporedjema je najverjetneje prišlo do nespecifične reakcije začetnih oligonukleotidov za AGO2, kar pa nismo preverili *in silico*.

Po uspešnem kloniranju fragmentov genov AGO2 iz kultivarjev Igor in Desireé ter AGO4 iz kultivarja Igor, smo sestavili skupna zaporedja, jih poravnali s transkripti PGSC ter določili aminokislinsko zaporedje. Vir razlik v zaporedjih so lahko: (i) raznovrstnost genov v različnih genotipih krompirja, ali (ii) tehnične napake polimeraze. Le na področjih, kjer se branja začetnih oligonukleotidov z ene in druge strani prekrivajo, lahko trdimo, da gre za razliko v zaporedju nukleotidov samega gena.

Pri fragmentu AGO4 kultivarja Igor smo tako našli 3 potrjene točkovne mutacije, od katerih sta bili tihi dve. Med fragmenti gena AGO2 pri kultivarjih Igor in Desireé smo našli 7 točkovnih mutacij, od katerih je bilo 4 tihih. V splošnem izgleda zaporedje fragmenta iz kultivarja Desireé bolj podobno zaporedju monoploidnega krompirja iz baze PGSC, med katerima sta bili le dve razliki, ena od dveh celo potrjena z branji iz obeh smeri. Enako bi lahko rekli za fragment AGO4 kultivarja Igor. Kljub temu so vsi fragmenti zelo podobni genom v podatkovni bazi PGSC, saj je stopnja identičnosti fragmenta AGO2 kultivarja Igor enaka v 99,3 %, fragmenta AGO2 iz kultivarja Desireé enaka v 99,9 % ter fragmenta AGO4 pri kultivarju Igor enaka v 99,6 %.

## 6 POVZETEK

Krompir je ena najbolj dobičkonosnih poljščin na svetu. Njena udomačitev je povzročila zmanjšano odpornost na patogene, kot je virus PVY. Zaradi tega skušajo znanstveniki razviti metode, s katerimi bi omogočili večjo odpornost krompirja. V ta namen se s pomočjo orodij sistemske biologije skuša zbrati čim več informacij o mehanizmih same interakcije med rastlino in patogenom. Post-transkripcijsko utišanje genov (PTGS), je eden najpomembnejših mehanizmov zaščite rastlin pred virusnimi patogeni, zaradi tega smo želeli sam mehanizem pri krompirju podrobneje raziskati.

Prva stopnja je bila zbiranje podatkov o genskih komponentah, vključenih v mehanizem PTGS. Na podlagi obstoječega znanja iz literature smo sestavili ontologijo splošnega mehanizma utišanja RNA, kamor smo nato vključili komponente, zbrane iz podatkovne baze POCI. Skupno smo zbrali 299 zaporedij unigenov, razdeljenih v 13 skupin.

Zbrana zaporedja smo s pomočjo analize omrežij razvrstili v skupine na osnovi sekvenčnih podobnosti. Pri manjših skupinah, kot so XH-XS, DRB, RDRP ali AGO je analiza omrežij potrdila naše razvrščanje na podlagi opisa, medtem ko je pri večjih skupinah, kot sta RNA HELICASE ali KH, prišlo do tvorbe podskupin znotraj le teh. Študija je torej pokazala, da je sklepanje o sorodnosti zaporedij transkriptov, zgolj na podlagi njihovih opisov, lahko zmotno in da je za ta namen bolj primerna primerjava med samimi zaporedji, posebej če imamo opravka z velikim številom zaporedij.

Povezava ontologije z ekspresijskimi podatki nam je omogočila pregledno predstavo o tem, kaj se dogaja s posameznimi komponentami PTGS med okužbo krompirjevih kultivarjev PW in Rywal z virusom PVY. Najbolj diferencialno izraženi so bili prav homologni genovi AGO1, AGO2 ter AGO4 navadnega repnjakovca, pri kultivariju Rywal, ob prvem in tretjem dnevu po inokulaciji. Zaradi tega smo se odločili podrobneje analizirati prav to ontološko skupino, ter klonirati tri njene predstavnike.

Število transkriptov iz skupine AGO je bilo pri krompirju večje (33 unigenov POCI ter 12 genov PGSC) v primerjavi z navadnim repnjakovcem (10 genov), a smo kljub temu opazili

podobno filogenetsko razporeditev znotraj skupine. Le en transkript PGSC, skupaj z dvema unigeni POCL, je tvoril samostojno vejo na obrobju klada AGO4/AGO6/AGO9. Uspešno smo klonirali fragmente homologov AGO2 in AGO4 pri krompirjevih kultivarjih Igor in Desireé. Sekvenčna primerjava fragmentov z zaporedji krompirjevega genoma ni pokazala izrazite različnosti fragmenta gena AGO2 pri kultivarju Igor (99,3 % identičnosti z zaporedjem iz podatkovne baze PGSC), v primerjavi s fragmentom AGO2 iz kultivarja Desireé (99,9 % identičnosti z zaporedjem iz podatkovne baze PGSC).

## 7 VIRI

- Akbergenov, R., Si-Ammour, A., Blevins, T., Amin, I., Kutter, C., Vanderschuren, H., Zhang, P. 2006. Molecular characterization of geminivirus-derived small RNAs in different plant species. *Nucleic acids research*, 34, 2: 462-471
- Altschul, S. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3): 403-410
- Aubourg, S., Kreis, M., Lecharny, A. 1999. The DEAD box RNA helicase family in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic acids research*, 27, 2: 628-636  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=148225&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Batagelj, V., Mrvar, A., Nooy, W. de. 2008. Exploratory social network analysis with Pajek. 2nd edition. Cambridge, Cambridge University Press: 442 str.  
<http://eprints.pascal-network.org/archive/00008190/>
- Bateman, A. 2002. The SGS3 protein involved in PTGS finds a family. *BMC bioinformatics*, 3: 21  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=119857&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Boutet, S., Vazquez, F., Liu, J., Fagard, M., Gratias, A., Morel, J.-benoit, Chen, X., Ascq, V. 2003. *Arabidopsis* HEN1 : A Genetic Link between Endogenous miRNA Controlling Development and siRNA Controlling Transgene Silencing and Virus Resistance. *Current Biology*, 13: 843-848
- Dalmay, T., Horsefield, R., Braunstein, T. H., Baulcombe, D. C. 2001. SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *The EMBO journal*, 20, 8: 2069-2078
- El-Shami, M., Pontier, D., Lahmy, S., Braun, L., Picart, C., Vega, D., Hakimi, M.-A. 2007. Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes & development*, 21, 20: 2539-2544
- García-Mayoral, M. F., Hollingworth, D., Masino, L., Díaz-Moreno, I., Kelly, G., Gherzi, R., Chou, C.-F. 2007. The structure of the C-terminal KH domains of KSRP reveals a noncanonical motif important for mRNA degradation. *Structure*, 15, 4: 485-498
- Hammond, S. M. 2005. Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS letters*, 579, 26: 5822-5829
- Han, M.-H., Goud, S., Song, L., Fedoroff, N. 2004. The *Arabidopsis* double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation.



Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101, 4: 1093-1098

Harvey, J. J. W., Lewsey, M. G., Patel, K., Westwood, J., Heimstädt, S., Carr, J. P., Baulcombe, D. C. 2011. An antiviral defense role of AGO2 in plants. *PLoS one*, 6, 1: e14639

Havecker, E. R., Wallbridge, L. M., Hardcastle, T. J., Bush, M. S., Kelly, K. a, Dunn, R. M., Schwach, F. 2010. The Arabidopsis RNA-directed DNA methylation argonautes functionally diverge based on their expression and interaction with target loci. *The Plant cell*, 22, 2: 321-334

Hohn, T., Vazquez, F. 2011. RNA silencing pathways of plants: silencing and its suppression by plant DNA viruses. *Biochimica et biophysica acta*, 1809, 11-12: 588-600

Huang, X., Madan, A. 1999. CAP3 : a DNA Sequence Assembly Program. *Genome research*, 9: 868-877

Hutvagner, G., Simard, M. J. 2008. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9, 1: 22-32

Jaubert, M., Bhattacharjee, S., Mello, A. F. S., Perry, K. L., Moffett, P. 2011. ARGONAUTE2 Mediates RNA-Silencing Antiviral Defenses against Potato virus X in Arabidopsis. *Plant physiology*, 156, 3: 1556-1564

Jordan, I. K., Natale, D. A., Galperin, M. Y., Rna, R.-dependent, Schpo, Y. A. H., Argonaute, A., Pinhead, Z. 2000. Domains in gene silencing and cell differentiation proteins : the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain molecular mechanisms involved in. *Genome*, 4: 481-482

Kapoor, M., Arora, R., Lama, T., Nijhawan, A., Khurana, J. P., Tyagi, A. K., Kapoor, S. 2008. Genome-wide identification, organization and phylogenetic analysis of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA Polymerase gene families and their expression analysis during reproductive development and stress in rice. *BMC genomics*, 9: 451

Kim, K. W., Eamens, A. L., Waterhouse, P. M. 2006. RNA Processing Activities of the Arabidopsis Argonaute Protein Family, V: RNA processing. Grabowski P. (ur.). Rijeka, InTech: 137-156  
<http://www.intechopen.com/books/rna-processing/rna-processing-activities-of-the-arabidopsis-argonaute-protein-family>

Kloosterman, B., De Koeyer, D., Griffiths, R., Flinn, B., Steuernagel, B., Scholz, U., Sonnewald, S. 2008. Genes driving potato tuber initiation and growth: identification based on transcriptional changes using the POCI array. *Functional & integrative genomics*, 8, 4: 329-340

- Lewsey, M., Palukaitis, P., Carr, J. P. 2009. Plant–Virus Interactions: Defence and Counter-Defence. V: Annual Plant Reviews Volume 34: Molecular Aspects of Plant Disease Resistance. Parker J. (ur.) Wiley online library: 134–176
- Machida, S., Chen, H.-Y., Adam Yuan, Y. 2011. Molecular insights into miRNA processing by *Arabidopsis thaliana* SERRATE. *Nucleic acids research*, 39, 17: 7828-7836
- Mallory, A., Vaucheret, H. 2010. Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins. *The Plant cell*, 22, 12: 3879-3889
- Mourrain, P., Béclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J. B., Jouette, D. 2000. *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for post-transcriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell*, 101, 5: 533-542  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10850495>
- Mérai, Z., Kerényi, Z., Kertész, S., Magna, M., Lakatos, L., Silhavy, D. 2006. Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *Journal of virology*, 80, 12: 5747-5756
- Pantaleo, V. 2011. Plant RNA silencing in viral defence. *Advances in experimental medicine and biology*, 722: 39-58
- R Development Core Team. 2012. R: A Language and Environment for Statistical Computing  
<http://www.r-project.org> (23. 11. 2011)
- Rodríguez-Negrete, E. A, Carrillo-Tripp, J., Rivera-Bustamante, R. F. 2009. RNA silencing against geminivirus: complementary action of post-transcriptional gene silencing and transcriptional gene silencing in host recovery. *Journal of virology*, 83, 3: 1332-1340
- Rotter, A., Usadel, B., Baebler, S., Stitt, M., Gruden, K. 2007. Adaptation of the MapMan ontology to biotic stress responses: application in solanaceous species. *Plant methods*, 3: 10
- Scholthof, K. B. G., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B. 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 12: 938-954
- Scholthof, H. B., Alvarado, V. Y., Vega-Arreguin, J. C., Ciomperlik, J., Odokonyero, D., Brosseau, C., Jaubert, M. 2011. Identification of an ARGONAUTE for Antiviral RNA Silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Plant physiology*, 156, 3: 1548-1555
- Schwab, R., Voinnet, O. 2010. RNA silencing amplification in plants: size matters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 34: 14945-14946

- Song, J.-J., Smith, S. K., Hannon, G. J., Joshua-Tor, L. 2004. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* (New York, N.Y.), 305, 5689: 1434-1437
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., Leunissen, J. a M. 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic acids research*, 35: 71-74
- Vaucheret, H. 2006. Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes & development*, 20, 7: 759-771
- Xie, Z., Qi, X. 2008. Diverse small RNA-directed silencing pathways in plants. *Biochimica et biophysica acta*, 1779, 11: 720-724
- Xu, X., Pan, S., Cheng, S., Zhang, B., Mu, D., Ni, P., Zhang, G. 2011. Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature*, 475, 7355: 189-195
- Zhang, X., Zhao, H., Gao, S., Wang, W.-C., Katiyar-Agarwal, S., Huang, H.-D., Raikhel, N. 2011. Arabidopsis Argonaute 2 regulates innate immunity via miRNA393(\*)-mediated silencing of a Golgi-localized SNARE gene, MEMB12. *Molecular cell*, 42, 3: 356-366
- Zong, J., Yao, X., Yin, J., Zhang, D., Ma, H. 2009. Evolution of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) genes: duplications and possible losses before and after the divergence of major eukaryotic groups. *Gene*, 447, 1: 29-39

## **ZAHVALA**

Do tega poglavja me je pripeljala dolga pot. Rad bi se zahvalil vsem, ki so mi na tej poti pomagali, da sem na koncu lahko zagledal cilj. Rad bi se zahvalil sodelavcem v laboratoriju, za čas, ki so mi ga ob delu posvetili ter delovni mentorici, za potrpljenje in pomoč v odkrivanju veščin laboratorijskega dela. Profesorju dr. Andreju Blejecu bi se rad zahvalil za izdelavo R-ih skript in seznanitev s programom Pajek.

Iskrena zahvala gre tudi mentorici prof. dr. Kristini Gruden, za neprecenljive nasvete in pomoč, tako na področju molekularne biologije kot vsakdanjega življenja.

Na koncu, bi se rad še zahvalil puncici Deborah, ki me je strpno prenašala, mi skrbno pomagala ter mi vedno stala ob strani.

## **PRILOGE**

Zgoščenska z dodatnimi podatki: Priloge/swissprot\_annotacije.xls

Zgoraj navedeni Excelov delovni zvezek vsebuje preglednico s podatki o pregledovanju anotacij unigenov iz podatkovne baze POCI, na podlagi rezultatov algoritma BLAST.

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Marko CHERSICOLA

**ANOTACIJA IN SEKVENČNA ANALIZA GENOV,  
UDELEŽENIH V POST-TRANSKRIPCISKEM  
UTIŠANJU PRI KROMPIRJU (*Solanum tuberosum* L.)**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

