

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta**

**Studium exprese cílových mRNA při pospiviroidní  
patogenezi v systému „leaf factory“**

Diplomová práce

Bc. Martin Selinger

Vedoucí práce: RNDr. Jaroslav Matoušek, CSc.

ÚMBR BC AVČR, v.v.i.

České Budějovice 2013

**Selinger M.**, 2013: Studium exprese cílových mRNA při pospiviroidní patogenezi v systému „leaf factory“ [Expression of target mRNAs during Pospiviroid pathogenesis in the „leaf factory“ system]. - Master Thesis (in Czech), 59 p., Faculty of Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:** The aim of this work was to identify potential mRNA targets of PTGS triggered by viroid-derived small RNAs (vsRNAs) in PSTVd-infected tomato plants (*S. lycopersicum* L.). We selected 47 possible gene targets using data provided by Prof. Dr. Steger (Heinrich Heine Universität, Düsseldorf, Germany) - the list of 1633 possible target mRNAs from tomato based on vsRNA:mRNA duplex prediction. The vsRNA sequences were obtained by Illumina sequencing of small RNA libraries from healthy and PSTVd-infected tomato plants. By qRT-PCR analysis we identified 6 genes with significantly altered levels of mRNA in PSTVd-infected tomato plants: *CUL1* (protein ubiquitination), *ERF4* (transcription factor of abiotic stress signalling pathway), *H/ACAI* (rRNA pseudouridylation), *NPH3* (transcription factor of phototropic signalling pathway), *Sl-MYB* (transcription factor regulating leaf development) and *TCP3* (transcription factor regulating leaf development). The binary vector pLV07 with inserted expression cassette containing coding sequence of *Sl-MYB* was prepared for experiments in “leaf factory” system in *N. benthamiana* plants. Expression analyses in “leaf factory” system after 1,5 DPI using qRT-PCR and RNA blots revealed strong inhibition of expression of *Sl-MYB* in leaf sectors infiltrated with severe PSTVd AS1 strain, while mild PSTVd QFA strain showed minimal change in expression comparing to control sectors. Moreover, the overexpression of *Sl-MYB* in leaf sectors resulted in development of necroses after 2,5-3 DPI, in presence of silencing suppressor p19 after 2 DPI. The development of necroses was largely inhibited in PSTVd AS1-infiltrated leaf sectors in comparison with PSTVd QFA- and control-infiltrated sectors.

**Key words:** Potato spindle tuber viroid (PSTVd), PTGS, vsRNA, leaf factory, *Sl-MYB*

**This Master Thesis work contributed to the following publications:**

**Selinger, M.**, Duraisamy, G.S., Füßy, Z., Steger, G. and Matoušek, J. (2012) Screening of expression levels of host mRNAs in PSTVd-infected tomato plants revealed misregulation of genes involved in plant development. The 10th International PhD Conference on Experimental Plant Biology. Brno, Czech Republic, September 3-5.

Matoušek, J., **Selinger, M.**, Füßy, Z., Duraisamy, G.S., Uhlířová, K., Piernikarczyk, R. and Steger, G. (2012) Pathogenic pospiviroid RNA causes gene dysregulation in plants as detected by quantification of potential mRNA targets of vsRNA-mediated gene silencing. The EMBO Meeting 2012, Nice, France, September 22-25.

Tato práce byla financována z projektů GCP501/10/J018 a GAJU 134/2010/P.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v

souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích 22. 4. 2013

Bc. Martin Selinger

**Poděkování:**

Rád bych poděkoval svému školiteli RNDr. Jaroslavu Matouškovi, CSc. za odborné vedení mé práce a za cenné rady a připomínky. Dále bych rád poděkoval kolektivu Laboratoře molekulární genetiky, zejména pak Mgr. Zoltánu Füßsymu, PhD., za pomoc a rady při řešení laboratorních úkolů a za ochotné zodpovídání mých dotazů.

# Obsah:

<b>1. Úvod</b> .....	<b>1</b>
1.1. Viroidy.....	1
1.2. Mechanismy viroidní patogeneze.....	6
1.3. Systém „leaf factory“ a agro-infiltrace.....	13
<b>2. Cíle práce</b> .....	<b>15</b>
<b>3. Materiál a metody</b> .....	<b>16</b>
3.1. Materiál .....	16
3.1.1. Rostlinný materiál .....	16
3.1.2. Biochemický materiál .....	16
3.1.3. Roztoky a živná média .....	16
3.2. Metodické postupy .....	20
3.2.1. Metody inokulace PSTVd .....	20
3.2.2. Metody izolace a purifikace RNA.....	21
3.2.3. Kvantitativní real-time RT-PCR (qRT-PCR).....	22
3.2.4. Metody použité při klonování .....	24
3.2.5. Metody molekulární hybridizace .....	27
<b>4. Výsledky</b> .....	<b>30</b>
4.1. Bioinformatická predikce a selekce potenciálních targetů (P)TGS .....	30
4.2. Kvantifikace hladin mRNA selektovaných potenciálních targetů (P)TGS.....	32
4.3. Klonování genu SI-MYB do expresního vektoru pLV07 .....	36
4.4. Kvantifikace hladin mRNA genu SI-MYB v systému „leaf factory“ .....	38
<b>5. Diskuze</b> .....	<b>40</b>
5.1. Selekcce potenciálních targetů (P)TGS .....	40
5.2. SI-MYB jako kandidátní cíl PTGS vyvolaného vsRNA .....	41
5.3. Dysregulace SI-MYB jako možný důsledek viroidem-indukované změny hladin hostitelských miRNA .....	43
<b>6. Závěr</b> .....	<b>45</b>
<b>7. Použité zkratky</b> .....	<b>46</b>
<b>8. Citovaná literatura</b> .....	<b>47</b>
<b>9. Přílohy</b> .....	<b>60</b>

# 1. Úvod

## 1.1. Viroidy

Viroidy představují nejmenší známé infekční agens vyšších rostlin, jejichž objev je přisuzován Theodoru O. Dienerovi (Diener *et al.*, 1971). Jsou charakterizovány jako cirkulární jednořetězcové molekuly RNA o velikosti v rozmezí 246-401 nukleotidů. Sekvence viroidů je vysoce komplementární, tvořící termodynamicky velmi stabilní a specifickou sekundární strukturu, ve které se střídají kovalentně uzavřené dvouřetězcové úseky s jednořetězcovými smyčkami (Obr. 1-A). Viroidní genom postrádá obalový prvek v podobě proteinové kapsidy či lipidové dvojvrstvy a dále nekóduje žádné proteiny; infekční cyklus viroidů je tedy závislý na proteinovém aparátu svého hostitele. Jinak však viroidy disponují schopností autonomní replikace a pohybu infikovanou rostlinou, zatímco replikace a pohyb satelitních RNA (skupina nekódujících RNA vykazujících určité strukturní podobnosti s viroidní RNA) vyžadují přítomnost pomocného viru a jeho proteinového aparátu. I přes svou značnou jednoduchost jsou viroidy schopny u řady hostitelských rostlin vyvolat symptomy podobné těm, které způsobují rostlinné RNA a DNA viry, ačkoliv je jejich genom 20-krát menší (přehledné práce viz Flores *et al.*, 2005; Owens *et al.*, 2009; Matoušek *et al.*, 2012a; Navarro *et al.*, 2012a).

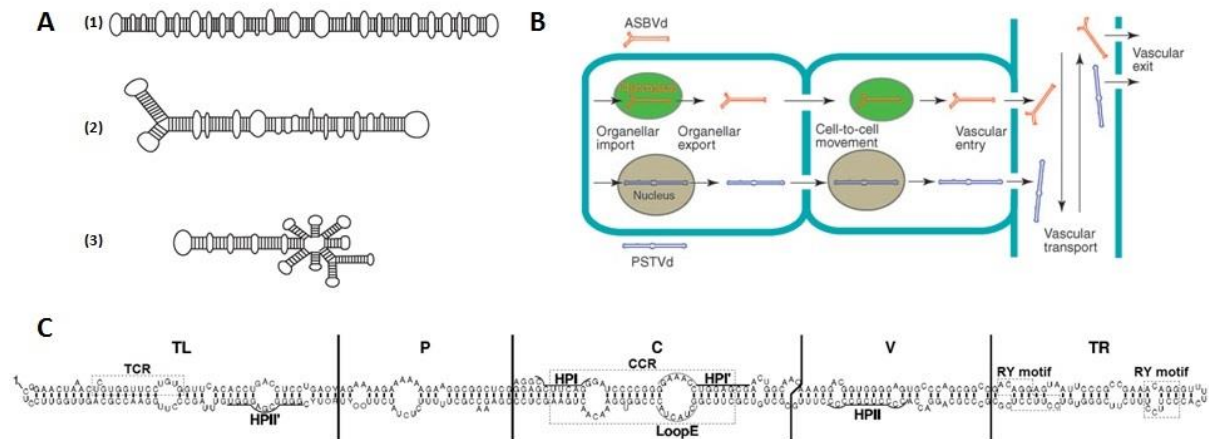
Na základě strukturních a funkčních vlastností je v současnosti více jak 30 známých viroidů rozděleno do dvou skupin (Tab. I). Pro skupinu *Pospiviroidae*, v níž je zařazena většina druhů, je charakteristická tyčkovitá sekundární struktura rozdělená do 5 strukturních a funkčních domén (Obr. 1-C): C (centrální) doména obsahující vysoce konzervovanou sekvenci CCR („central conserved region“), P (patogenní) doména spojovaná s patogenicitou, V (variabilní) doména s vysokou sekvenční variabilitou, levá ( $T_L$ ) a pravá ( $T_R$ ) terminální doména (Keese *et al.*, 1985). V závislosti na charakteru CCR a přítomnosti či nepřítomnosti TCR („terminal conserved region“) a TCH („terminal conserved hairpin“) se skupina *Pospiviroidae* dělí do 5 podskupin (Flores *et al.*, 2005). Viroidy patřící do skupiny *Pospiviroidae* se replikují v jádře rostlinných buněk, kde také dochází k jejich akumulaci (Qi *et al.*, 2003a). Charakteristickým zástupcem této skupiny je viroid vřetenovitosti brambor (PSTVd - Potato Spindle Tuber Viroid), který je hlavním předmětem výzkumu v této práci.

Skupina *Avsunviroidae* zahrnuje 4 druhy (Tab. I). Zástupci této skupiny postrádají CCR a replikují se v chloroplastech. Jejich sekundární struktura je více větvená než u skupiny *Pospiviroidae* (Obr. 1-A) a velice zajímavou charakteristikou této skupiny je přítomnost

## Bc. Martin Selinger

### Studium exprese cílových mRNA při pospiviroidní patogenezí v systému „leaf factory“

„hammerhead“ ribozymů (Hutchins *et al.*, 1986; Daròs *et al.*, 1994). Jedná se o malé RNA motivy, které se při pokojové teplotě, neutrálním pH a v přítomnosti dvojmocného kovu (nejčastěji  $Mg^{2+}$ ) samy štěpí a vytváří 2', 3'-cyklický fosfodiesterový a 5'-OH konec (Flores *et al.*, 2004).



**Obr. 1:** (A) Schématické znázornění sekundárních struktur viroidů. 1-PSTVd, 2-ASBVd a 3-PLMVd (převzato z Góra-Sochacka, 2004). (B) Schéma transportu viroidních RNA v rámci systémové infekce (převzato z Ding *et al.*, 2005). (C) Sekundární struktura viroidu PSTVd-AS1. Znázornění strukturálních domén: T<sub>L</sub> doména (zahrnující TCR), P doména, C doména (zahrnující CCR), V doména a T<sub>R</sub> doména (zahrnující oba RY motivy interagující s Virp1). Smyčka E, lokalizovaná v CCR, je funkční doména nacházející se v mnoha RNA, u viroidů se podílí na procesu štěpení a ligace monomerních PSTVd (+) RNA transkriptů; HPI a HPII jsou termostabilní vlásenky vyskytující se v intermediátech během replikace (převzato z Matoušek *et al.*, 2012a).

Pohyb viroidních částic v rámci hostitelské rostliny můžeme rozdělit do několika fází: (1) import do jádra (*Pospiviroidae*) či chloroplastu (*Avsunviroidae*) a následnou replikaci, (2) export z těchto organel, (3) transport mezi buňkami a (4) transport do vzdálených pletiv (Obr. 1-B; přehledná práce viz Ding *et al.*, 2005). Klíčovým pro import viroidu PSTVd do jádra se ukázala být přítomnost sekvence a/nebo strukturálního motivu. Tento transport je nezávislý na cytoskeletu a je zajišťován specifickým receptorem, který není dosud znám (Woo *et al.*, 1999). Velice slibným kandidátem se ukazuje být protein Virp1 (Viroid-binding protein 1) s bromodoménou, který specificky interaguje s (+) molekulami PSTVd *in vitro* i *in vivo* a obsahuje jaderný lokalizační signál (Martinez de Alba *et al.*, 2003). V práci Gozmanové *et al.* (2003) byly pak identifikovány dva tzv. RY motivy v T<sub>R</sub> doméně PSTVd odpovědné za specifickou vazbu Virp1. Jedná se o asymetrické vnitřní smyčky se sekvencí 5'-ACAGG a CUCUCC-5'. Transport viroidů na mezibuněčné úrovni je uskutečňován přes plazmodezmata a je opět pravděpodobně zajišťován na základě specifické sekvence či strukturálního motivu interagujících s určitým hostitelským faktorem (Ding *et al.*, 1997). K systemickému rozšíření viroidů z primárního místa infekce slouží cévní systém, jmenovitě

floém, kdy viroidy následují tok fotoasimilátů (Zhu *et al.*, 2001). Transport viroidních molekul v rámci floému je ovšem regulován a viroidní částice jsou selektivně propouštěny pouze do určitých pletiv a orgánů, přičemž stejně jako u endogenních RNA je tato regulace (1) ovlivněna vývojovými a buněčnými faktory rostliny a (2) podmiňována přítomností specifických strukturních motivů interagujících s proteiny hostitele (Zhu *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2002).

Jedním z takovýchto proteinů je floémový lektin PP2 z okurky (CsPP2), který váže HSVd (Hop Stunt Viroid) *in vitro* (Gómez *et al.*, 2001; Owens *et al.*, 2001) i *in vivo* (Gómez *et al.*, 2004). Jedná se o jeden z nejčtenějších proteinů floému, schopný pohybu z průvodních buněk do sítkovic skrze plazmodezmata (Golecki *et al.*, 1999). CsPP2 obsahuje RNA-vazebný motiv odpovědný za vazbu HSVd, kdy tento ribonukleoproteinový komplex je schopný transportu ve floému i v rámci mezidruhových roubů (Gómez *et al.*, 2004). Dalším možným kandidátem podílejícím se na systemickém transportu viroidů je již zmiňovaný Virp1, neboť PSTVd s mutovaným RY motivem nebyl schopný systémové infekce v rostlinách rajčete (Maniataki *et al.*, 2003). Kalantidis *et al.* (2007) tuto hypotézu podpořili, když ve své práci potvrdili neschopnost systémové infekce viroidů PSTVd a CEVd (Citrus exocortis viroid) v transgenních rostlinách *N. benthamiana* a *N. tabacum* s potlačenou expresí Virp1. Pro účast v rámci systemického transportu zástupců skupiny *Avsunviroidae* jsou diskutovány dva floémové proteiny identifikované v rostlinách melounu schopné vázat ABSVd - CmmLec17 a neznámý protein o velikosti 14 kDa (Gómez *et al.*, 2005).

Proces viroidní replikace je u obou skupin realizován mechanismem valivé kružnice ve třech krocích, které kromě několika variací, jsou shodné pro (+) i (-) řetězce<sup>1</sup>, přičemž jsou přítomny pouze RNA intermediáty: (1) syntéza konkatemerů, (2) štěpení na monomerní viroidní jednotky a (3) cirkularizace. Rozdílné je však řazení těchto kroků a způsob jejich realizace. U skupiny *Pospiviroidae* probíhá replikace tzv. asymetrickým cyklem, kdy transkribované (-) konkatemery, jsou přepsány na (+) konkatemery, které jsou poté štěpeny na monomery a cirkularizovány. Pro skupinu *Avsunviroidae* je typický tzv. symetrický replikační cyklus, ve kterém jsou (-) konkatemery štěpeny a cirkularizovány, načež (-) monomery pak slouží jako templát pro získání (+) konkatemerů, jež jsou následně opět štěpeny a cirkularizovány (Obr. 2-A; přehledná práce viz Flores *et al.*, 2009).

---

<sup>1</sup> Označení orientace viroidních RNA řetězců je založeno na dohodě, kdy více abundantní řetězec *in vivo* byl označen jako (+).



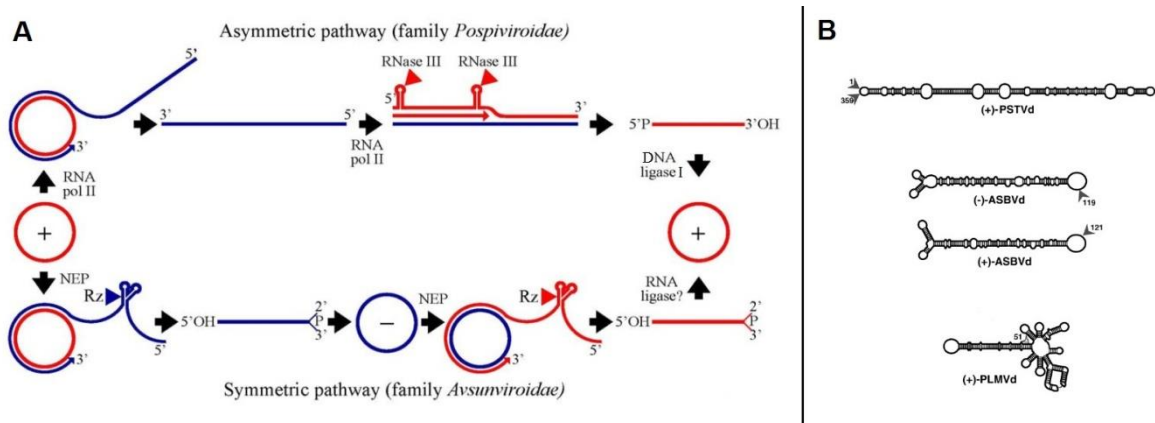
**Bc. Martin Selinger**

Studium exprese cílových mRNA při pospiviroidní patogenезi v systému „leaf factory“

**Tab. I:** Taxonomické rozdělení viroidů dle ICTV; převzato ze Subviral RNA database (<http://subviral.med.uottawa.ca>).

<i>Pospiviroidae</i>			<i>Avsunviroidae</i>		
název druhu	zkratka	velikost [nukleotidy]	název druhu	zkratka	velikost [nukleotidy]
<i>Apscaviroid</i>			<i>Pelamoviroid</i>		
Pear blister canker viroid	PBCVd	296 - 374	Chrysanthemum chlorotic mottle viroid	CChMVd	397 - 401
Grapevine yellow speckle viroid-2	GYSVd-2	361 - 363	Peach latent mosaic viroid	PLMVd	335 - 351
Grapevine yellow speckle viroid-1	GYSVd-1	187 - 368	<i>Avsunviroid</i>		
Citrus viroid-III	CVd-III	291 - 297	Avocado sunblotch viroid	ASBVd	120 - 255
Citrus bent leaf viroid	CBLVd	315 - 334	<b>nezařazeno</b>		
Australian grapevine viroid	AGVd	369	Eggplant latent viroid	ELVd	332 - 335
Apple dimple fruit viroid	ADFVd				
Apple scar skin viroid	ASSVd				
Apple fruit crinkle viroid	AFCVd	368 - 375			
Citrus viroid-I-LSS	CVd-LSS	325 - 330			
Citrus viroid-OS	CVd-OS	326 - 331			
Japanese citrus viroid 1	JCVd	331			
<i>Pospiviroid</i>					
Tomato planta macho viroid	TPMVd	360			
Tomato apical stunt viroid	TASVd	360 - 364			
Potato spindle tuber viroid	PSTVd	341 - 364			
Mexican papita viroid	MPVd	359 - 360			
Iresine viroid 1	IrVd	370			
Columnea latent viroid	CLVd	350 - 456			
Citrus exocortis viroid	CEVd	197 - 475			
Chrysanthemum stunt viroid	CSVd	348 - 356			
Tomato chlorotic dwarf viroid	TCDVd	356 - 360			
<i>Cocadviroid</i>					
Hop latent viroid	HLVd	255 - 256			
Coconut tinangaja viroid	CTiVd	254			
Coconut cadang-cadang viroid	CCCvD	246 - 301			
Citrus viroid IV	CVd-IV	284 - 286			
<i>Hostuviroid</i>					
Hop stunt viroid	HSVd	267 - 368			
<i>Coleviroid</i>					
Coleus blumei viroid 3	CbVd-3	361 - 364			
Coleus blumei viroid 2	CbVd-2	295 - 301			
Coleus blumei viroid 1	CbVd-1	248 - 251			
Coleus blumei viroid	CbVd	295			

*Pospiviroidae* k replikaci (+) i (-) řetězců využívají DNA-dependentní RNA polymerázu II (Schindler *et al.*, 1992), přičemž počátek replikace (-) řetězce u PSTVd byl lokalizován v koncové vlásence T<sub>L</sub> domény, konkrétně v místě U359 či C1 (Obr. 2-B; Kolonko *et al.*, 2006). Jako promotor při syntéze (+) řetězce slouží termostabilní vláseková struktura HPII (Qu *et al.*, 1993). K následnému štěpení je pak pravděpodobně využívána RNáza typu III (Gas *et al.*, 2008), přičemž štěpicí a ligační místo bylo identifikováno mezi G95 a G96. Tyto nukleotidy jsou lokalizované ve smyčce E (viz Obr. 1-C), jejíž sekvence společně se strukturou termostabilní vlásenky HPI, utvořené v průběhu replikace, napomáhá v procesu štěpení i následné ligace (Baumstark *et al.*, 1997; Qu *et al.*, 1993). Slibným kandidátním enzymem zajišťujícím ligaci u PSTVd je DNA ligáza I, u které byla potvrzena schopnost cirkularizace viroidních (+) monomerů štěpených v pozici G95-G96 (Nohales *et al.*, 2012). Zajímavým jevem je rozdílná distribuce jednotlivých řetězců, kdy (-) řetězce byly lokalizovány pouze v jádře, zatímco (+) řetězce byly detekovány jak v jádře, tak zejména v jadérku (Qi *et al.*, 2003a). Takovéto rozlišení opačných řetězců RNA poukazuje na přítomnost vysoce specifické buněčné mašinérie s potenciálním významem pro genovou regulaci (Flores *et al.*, 2005).



**Obr. 2:** (A) Schéma replikace obou čeledí: *Pospiviroidae*: infekční monomerní (+) cirkulární RNA → replikace (RNA polymeráza II) na (-) multimery, které slouží jako templáty pro druhou RNA-RNA replikaci → výsledné (+) multimery jsou štěpeny na jednotlivé monomery (RNáza III) → ligace (RNA ligáza) na konečné cirkulární (+) RNA; *Avsunviroidae*: infekční monomerní (+) cirkulární RNA → replikace (NEP) na (-) multimery → štěpení pomocí ribozymů na jednotlivé (-) monomery → replikace na (+) multimery → štěpení pomocí ribozymů na jednotlivé (+) monomery → ligace na konečné (+) cirkulární RNA (převzato z Flores *et al.*, 2009). (B) Schématicky znázorněné počátky replikace u jednotlivých viroidů (převzato z Kolonko *et al.*, 2006).

Zástupci skupiny *Avsunviroidae* k replikaci (+) i (-) řetězců využívají chloroplastovou RNA polymerázu kódovanou jaderným genomem - NEP (Nuclear-Encoded Polymerase). Jedná se o jednoduchou polymerázu o jedné podjednotce podobající se fágovým RNA polymerázám (Navarro *et al.*, 2000a). Iniclace replikace viroidu ASBVd probíhá u (+) i (-) řetězců v (A+U)-bohaté oblasti terminální vlásenky, konkrétně U121 pro (+) řetězce a U119

## **Bc. Martin Selinger**

### Studium exprese cílových mRNA při pospiviroidní patogenezi v systému „leaf factory“

pro (–) řetězce (Obr. 2-B; Navarro *et al.*, 2000b). Pro viroid PLMVd bylo identifikováno iniciační replikační místo C51 (Delgado *et al.*, 2005; Motard *et al.*, 2008). Na rozdíl od skupiny *Pospiviroidae*, *Avsunviroidae* své (+) i (–) konkatemery štěpí autokatalyticky pomocí strukturních RNA motivů, ribozymů (Hutchins *et al.*, 1986; Daròs *et al.*, 1994). Ribozymy jsou přítomné i u satelitních RNA, které jsou strukturně viroidům nejvíce příbuzné (Forster *et al.*, 1987). Otázka procesu ligace u skupiny *Avsunviroidae* zůstává nevyřešena. Možným kandidátem by mohla být tRNA ligáza, která specificky vyžaduje 2', 3'-cyklický fosfodiesterový a 5'-OH konec, typický pro produkty autokatalytického štěpení pomocí ribozomů. Dále se také diskutuje možnost autokatalytické ligace (Flores *et al.*, 2009).

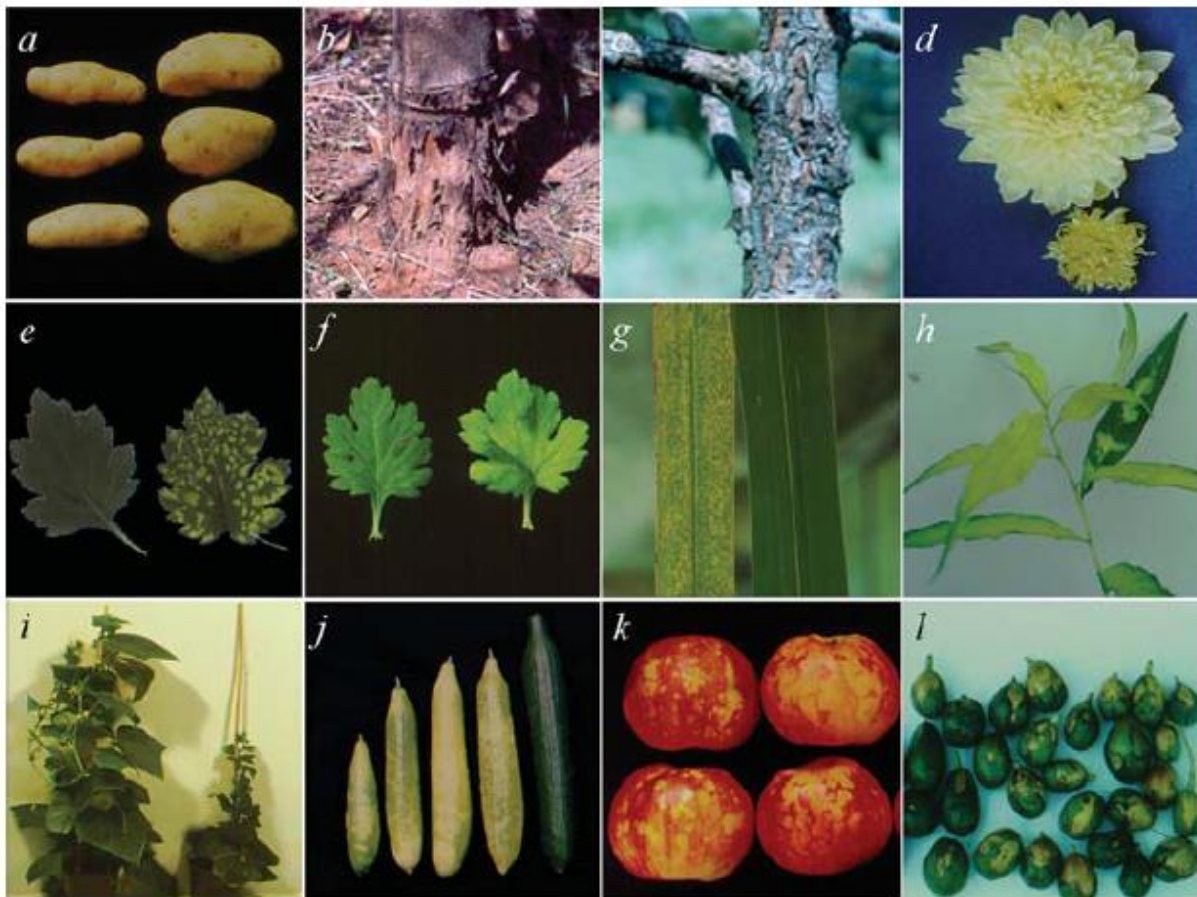
Na základě výše uvedených informací můžeme tedy konstatovat, že viroidy se maximálně adaptovaly evolucí svých strukturních a sekvenčních motivů, které mimikují motivy hostitelských RNA, díky čemuž jsou rozpoznávány buněčnými faktory zajišťujícími zdárný průběh jejich infekčního cyklu v rostlině. Studium viroidů tak může poskytnout i praktický význam při studiu rostlinných signálních, regulačních a metabolických drah využívajících molekuly RNA.

## **1.2. Mechanismy viroidní patogeneze**

Viroidy jsou schopné infikovat široké spektrum rostlin, přičemž mnoho z nich patří mezi významné potravinářské, průmyslové a okrasné druhy. Symptomy typické pro viroidní infekci jsou zakrslost, epinastie, chlorotické a nekrotické léze, poruchy vývoje určitých orgánů a vzácně i smrt rostliny (Obr. 3). Je ovšem nutné podotknout, že některé viroidy jsou schopné infikovat rostliny a dosahovat vysokých titerů i bez jakýchkoliv projevů patogeneze. Absence symptomů je častá zejména v případě planě rostoucích rostlin, které tak fungují jako rezervoár viroidních populací. (přehledné práce viz Flores *et al.*, 2005; Owens *et al.*, 2009; Matoušek *et al.*, 2012a; Navarro *et al.*, 2012a). Viroidy, podobně jako další RNA replikony, se ve svém hostiteli množí jako komplexní populace blízké příbuzných ale ne naprosto identických sekvenčních variant („quasi-species“), přičemž jedna či několik variant dominují (Eigen *et al.*, 1988). Tepelný stres pak může vyvolat změny v distribuci populací sekvenčních variant a výrazně zvýšit jejich variabilitu (Matoušek *et al.*, 2001; Matoušek *et al.*, 2004).

Viroidní genom je jedním z klíčových faktorů ovlivňujících stupeň patogenního projevu - i minimální sekvenční odlišnosti mohou významně ovlivnit patogenicitu daného viroidu a jeho schopnost infikovat určitý rostlinný druh. Jediná substituce v C-doméně (tranzice C → U) u kmene PSTVd KF440-2 například zapříčinila získání schopnosti infikovat rostliny *N. tabacum* (Wassenegger *et al.*, 1996). Značný podíl mutací vedoucích k odlišným

projevům patogenезe je u kmenů PSTVd lokalizován zejména v P-doméně. Pouhé 2-3 substituce v rámci této domény jsou schopny modulovat patogenicitu u kmenů QFA, QFB a RG1 u kultivaru rajčete (*S. lycopersicum*) Rutgers (Gruner *et al.*, 1995). Kmen PSTVd AS1 vyvolává silnou zakrslost a nekrózy u kultivaru Rutgers, zatímco kmen QFA je téměř asymptomatický, přičemž AS1 se od QFA liší 4 substitucemi a 2 inzercemi v P-doméně (Matoušek *et al.*, 2007).



**Obr. 3: Symptomy typické pro určité zástupce viroidů.** (a) hlízy bramboru napadené PSTVd (nalevo) a zdravé (napravo), (b) kořen pomerančovníku napadený CEVd, (c) hrušeň napadená PBCVd, (d) symptomy infekce CSVd u květu chryzantémy (dole) a zdravé (nahore), (e) listy chryzantémy napadené CSVd (vpravo) a zdravé (nalevo), (f) listy chryzantémy napadené CChMVd (vpravo) a zdravé (vlevo), (g) listy kokosové palmy napadené CCCVd (vlevo) a zdravé (vpravo), (h) chloróza (peach calico) způsobená PLMVd, (i) zkracování internodií u okurky způsobené HSVd (vpravo) a zdravé (vlevo), (j) plody rostlin okurky napadených HSVd (4 zleva) a zdravá (vpravo), (k) skvrnitost jablek způsobená ASSVd, (l) ASBVd symptomy na plodech avokáda. Převzato z Flores *et al.* (2005).

Míra vyvolaných symptomů je však závislá nejen na genomu viroidu, ale i na genomu hostitelské rostliny. Například Matoušek *et al.* (2007) prokázali, že silně patogenní kmen PSTVd KF440 je schopen vyvolat silně patogenní symptomy u kultivarů rajčete Rutgers a Linia, zatímco kultivary Moneymaker a Harzfeuer se ukázaly být tolerantními a prakticky asymptomatickými hostiteli. Projev symptomů je závislý i na fyzikálních podmínkách -

exprese symptomů je obecně podporována větší intenzitou světla a vyšší teplotou (Gruner *et al.*, 1995; Matoušek *et al.*, 2001).

Vzhledem k absenci kódování jakýchkoliv proteinů však musí být indukce symptomů typických pro viroidní infekci výsledkem interakcí viroidní RNA s hostitelskými faktory (proteiny a nukleové kyseliny), kdy tyto interakce spouští kaskádu komplexních procesů, které vedou ke změnám ve vývoji, metabolismu a fyziologii hostitelských rostlin (Matoušek *et al.*, 2012a; Navarro *et al.*, 2012a). V průběhu let bylo představeno mnoho hypotéz snažících se dát do spojitosti expresi symptomů s viroidní infekcí, avšak doposud nebyla otázka principu viroidní patogeneze zodpovězena.

Byla například identifikována celá řada hostitelských proteinů, které jsou schopny přímé interakce s nativní viroidní (+) cirkulární formou: Virp1 (Martinez de Alba *et al.*, 2003), floemový lektin PP2 (Goméz *et al.*, 2001; Owens *et al.*, 2001), ribozomální protein L5, transkripční faktor IIIA (Eiras *et al.*, 2010) či histony (Wolff *et al.*, 1985). Role těchto proteinů v procesu patogeneze není většinou známa, Navarro *et al.* (2012a) diskutuje možnost, že interakcí viroidních molekul s těmito proteiny by mohla být snižována jejich přirozená aktivita, což ve výsledku může vést k projevu symptomů (Obr. 6).

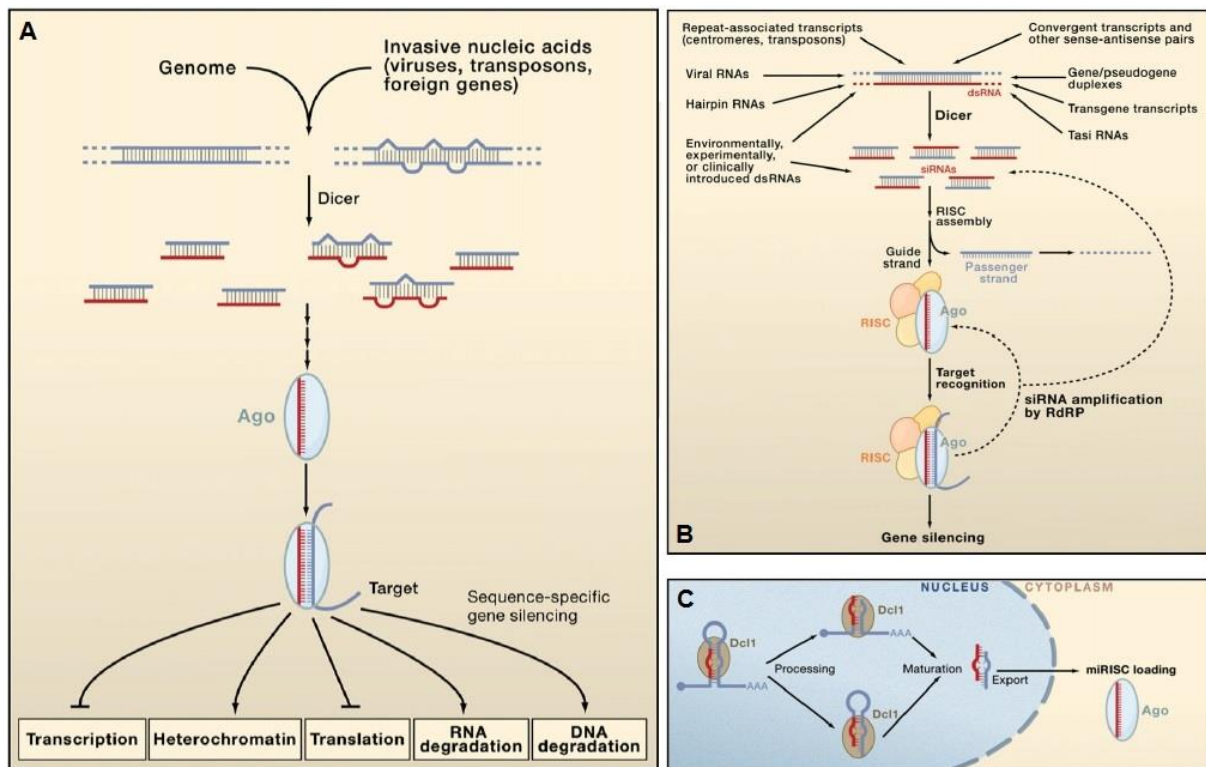
Mnoho studií popisuje efekt viroidní infekce na transkripční aktivitu individuálních genů. U rostlin rajčete infikovaných PSTVd byla pozorována silná redukce mRNA transkripčního faktoru TCP3, kinázy CIPK a expansinu LeExp2 (Matoušek *et al.*, 2012b; Qi *et al.*, 2003b), naopak Hammond *et al.* detekovali zvýšenou transkripční aktivitu genu *pkv* kódujícího kinázu pravděpodobně zapojenou v signálních drahách giberelinů (Hammond *et al.*, 2000 a 2009). Snížená hladina transkriptů giberelin 20-oxidázy, a tedy narušení syntézy giberelinů, byla pozorována u rostlin cedrátu (*Citrus medica*) infikovaných CEVd (Vidal *et al.*, 2003). Viroidy také aktivují obecný rostlinný obranný systém založený na „pathogenesis-related“ (PR) proteinech, jejichž exprese je indukována také ostatními rostlinnými patogeny zahrnujícími viry, bakterie a houby (Gadea *et al.*, 1996). Analýzy pomocí mikročipů však poukazují na to, že situace bude mnohem komplexnější – nejenže viroidní infekce indukuje změnu exprese stovek až tisíců hostitelských genů, ale dokonce je vzor této změny exprese závislý na genomu viroidu a hostitelské rostliny (Itaya *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2011; Owens *et al.*, 2012 a Rizza *et al.*, 2012).

Po zjištění, že replikace PSTVd vede k *de novo* metylaci PSTVd cDNA integrované do genomu hostitelské rostliny (Wassenegger *et al.*, 1994) a detekci malých RNA s viroidní sekvencí v rostlinách infikovaných viroidy skupiny *Pospiviroidae* (Papaefthimiou *et al.*, 2001; Itaya *et al.*, 2001; Matoušek *et al.*, 2007; Machida *et al.*, 2007) i *Avsunviroidae*

(Martínez de Alba *et al.*, 2002), se současný výzkum soustředí zejména na možné spojení mezi viroid-specifickými malými RNA a deregulací exprese hostitelských genů skrze transkripční (TGS) či post-transkripční genový silencing (PTGS).

(P)TGS, neboli RNA silencing, je regulační mechanismus přítomný u většiny eukaryot, který modifikuje expresi řady genů a zároveň brání organismus proti „škodlivým“ nukleovým kyselinám exogenního či endogenního původu jejich degradací (Obr. 4-A). Jedná se o sekvenčně-specifický proces, který je iniciován přítomností dsRNA či vysoce strukturované ssRNA, jež jsou štěpeny specifickými isozymy RNázy typu III (DCL; Dicer-like) na 21-26 nukleotidů dlouhé dsRNA s převisem na 3' konci. Tyto malé RNA jsou rozděleny do několika tříd na základě jejich biogeneze a mechanismu působení, například tzv. „micro RNA“ (miRNA; Obr. 4-C) a „short-interfering RNA“ (siRNA; Obr. 4-B). Generované malé dsRNA jsou následně inkorporovány do proteinového komplexu RISC (RNA-induced silencing complex), kde jsou pomocí helikázové aktivity rozpleteny, přičemž jedno vlákno je degradováno („passenger strand“) a druhé vlákno („guide strand“) následně slouží k vyhledávání cílových RNA/DNA v buňce na základě komplementarity - přehledné práce viz Brodersen *et al.*, 2006 a Carthew *et al.*, 2009.

Důkazem o probíhající PTGS v rostlině je přítomnost sekvenčně specifických siRNA molekul a, jak již bylo uvedeno výše, v rostlinách infikovaných viroidy různých druhů byly prokazatelně identifikovány malé RNA dlouhé 21-24 nukleotidů se sekvencí odvozenou z viroidních intermediátů obou polarit. Tyto RNA jsou nazývány „viroid-specific RNAs“ (vsRNA) nebo „viroid-derived RNAs“ (vdRNA). Itaya *et al.* (2007) prokázali, že nativní cirkulární (+) forma PSTVd je substrátem pro DCL v protoplastech *Arabidopsis thaliana* a vzhledem k faktu, že viroidy se akumulují v jádře (*Pospiviroidae*) či chloroplastech (*Avsunviroidae*), by vsRNA mohly být generovány v cytoplazmě v rámci pohybu mezi buňkami. U členů skupiny *Pospiviroidae* by navíc mohly být generovány i v jádře, neboť v *A. thaliana* byly identifikovány 4 proteiny rodiny DCL (DCL1-4), přičemž DCL1 společně s DCL4 mají jadernou lokalizaci (Schauer *et al.*, 2002). Denti *et al.* ovšem detekovali PSTVd-vsRNA pouze v cytoplazmě, je tedy možné, že vsRNA jsou produkovány i v jádře, ale jsou ihned transportovány do cytoplazmy. Kromě nativních cirkulárních (+) forem by spouštěči PTGS mohly být i oligomerní replikační intermediáty, jejichž struktura může mimikovat prekurzor miRNA pro DCL či ta-siRNA pro RdRP (RNA-dependentní RNA polymeráza).

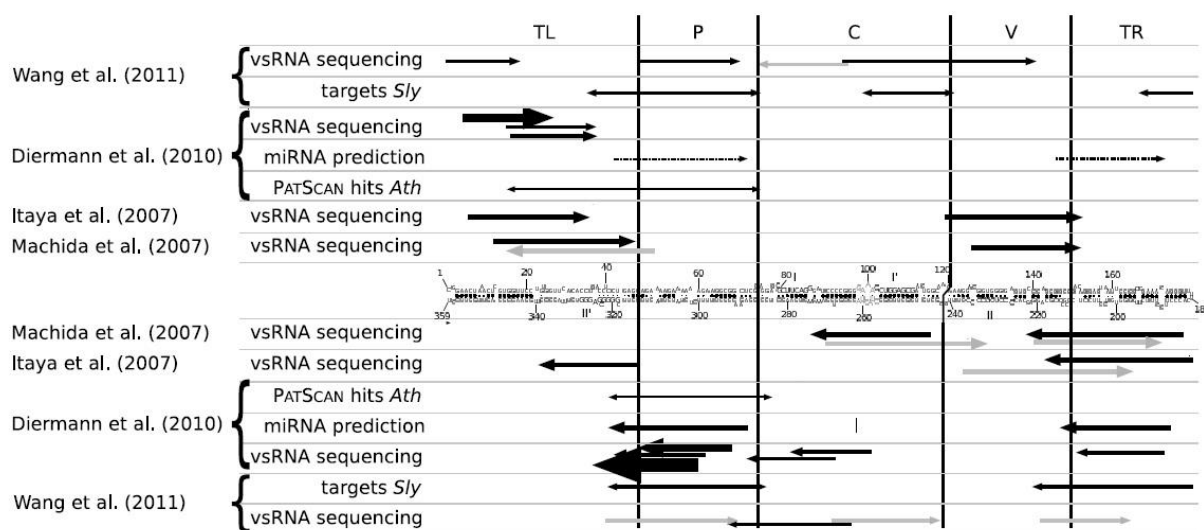


**Obr. 4: (A) Obecné schéma zachycující mechanismus RNA silencingu:** malé RNA odvozené z endogenních či exogenních zdrojů pomocí DCL (Dicer-like) jsou inkorporovány do RISCu, konkrétně interagují s proteinem AGO (Argonaute) umožňujícím rozpoznání cílové RNA/DNA na základě komplementárního párování bází. Jakmile je cíl rozpoznán, jeho exprese je regulována různými mechanismy v závislosti na biologickém kontextu (inhibice translace či transkripce, degradace cílové RNA/DNA, tvorba heterochromatinu). **(B) Možné zdroje siRNA a mechanismus působení siRISC:** mnoho kategorií transkriptů se v buňce vyskytuje ve formě dsRNA, která může být rozpoznána a štěpena DCL (viry a satelitní RNA; transkripty transgenů, centromer a transpozony; ta-siRNA, atd.). Pomocí RNA-dependenčních RNA polymeráz (RdRP) jsou syntetizovány sekundární siRNA komplementární k jiným regionům stejné tapetované RNA, které udržují proces RNA silencingu aktivní a systémově ho rozšiřují po celé rostlině. **(C) Biogeneze rostlinných miRNA:** transkript miRNA genu vytváří specifickou vlásečkovou sekundární strukturu (pri-miRNA), která je štěpena DCL1 ve dvou krocích (není známo jejich přesné řazení) ve výsledný duplex miRNA/miRNA\*, který je následně transportován z jádra, přičemž pouze „guide strand“ je inkorporován do RISC (miRISC). Převzato z Carthew *et al.*, 2009.

Mechanismus biogeneze vsRNA je stále zatím předmětem debat, je ale pravděpodobné, že bude realizován cestou podobnou biogenezi siRNA, miRNA nebo ta-siRNA („trans-acting siRNA“; jedná se o další druh regulačních endogenních malých RNA, k jejichž maturaci je zapotřebí miRNA; Allen *et al.*, 2005). Tvorba vsRNA skrze dráhu ta-siRNA je podporována studiemi Gómeze *et al.*, kdy indukce symptomů u HSVd-infikovaných rostlin *N. benthamiana* je závislá na aktivitě RNA-dependenční RNA polymerázy 6 (RDR6; Gómez *et al.*, 2008 a 2009). Na druhou stranu Di Serio *et al.* prokázali, že exprese symptomů u PSTVd-infikovaných *N. benthamiana* je nezávislá na RDR6 a naopak její aktivita zabraňuje infekci dalších pletiv (Di Serio *et al.*, 2009). Možnou alternativou je produkce vsRNA dráhou podobnou biogenezi miRNA, neboť nativní cirkulární (+) forma PSTVd se ukázala být substrátem pro DCL v protoplastech *A. thaliana*. (Itaya *et al.*, 2007).

Pokud je hostitelská mašinerie RNA silencingu schopna generovat malé RNA s viroidní sekvencí, vyvstává otázka, zda mohou být viroidy degradovány skrze aktivovaný RISC komplex s integrovanými vsRNA. Několik studií prokázalo odolnost nativní cirkulární (+) formy PSTVd (Wang *et al.*, 2004; Itaya *et al.*, 2007) a HSVd (Gómez *et al.*, 2007) vůči RISC komplexu, pravděpodobně díky vysoce specifické sekundární struktuře. Na druhou stranu Schwind *et al.* (2009) ve své práci dokazuje přesný opak - transgenní rostliny rajčete (*S. lycopersicum*, cv. MoneyMaker) exprimující vlásenkový RNA konstrukt odvozený ze sekvence PSTVd byly imunní vůči infekci PSTVd, což naznačuje specifickou degradaci PSTVd skrze PTGS vyvolaný vlásenkovým RNA konstruktem.

Pomocí sekvenování v malém i velkém rozsahu byly získány sekvence vsRNA odvozených z PSTVd, jež byly izolovány z rostlin rajčete (*S. lycopersicum*, cv. Rutgers a MoneyMaker; Itaya *et al.*, 2007; Machida *et al.*, 2007; Diermann *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011a) a *N. benthamiana* (DiSerio *et al.*, 2009). Shrnutím výsledků uvedených prací můžeme říci, že vsRNA sekvence nejsou rovnoměrně distribuovány v rámci genomu PSTVd, ale



**Obr. 5: Mapování vsRNA u PSTVd.** V centrální části je zobrazen konsensus sekundární struktury (+) cirkulární formy PSTVd. V boxech nad a pod schématem PSTVd jsou sumarizovány výsledky mapování (+) forem (černé šipky) a (-) forem (šedé šipky) vsRNA. Šipky v boxech „miRNA prediction“ označují miRNA/miRNA\* duplexy predikované pomocí NOVOMIRu (Teune and Steger, 2010). Data v boxu „PatScan“ odkazují na lokalizaci vsRNA mapovaných ke genomu *A. thaliana*. Převzato z Matoušek *et al.*, 2012a.

existují tzv. „hotspots“. Jedná se zejména o horní i dolní část P-domény (Diermann *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011a). Dále horní část T<sub>L</sub>-domény (Itaya *et al.*, 2007; Diermann *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011a) a dolní část T<sub>R</sub>-domény (Machida *et al.*, 2007; Itaya *et al.*, 2007).

Navíc distribuce vsRNA je odlišná mezi řápkem a listem a také mezi kultivary rajčete MoneyMaker a Rutgers (Wang *et al.*, 2011a), což zdůrazňuje orgánovou a genetickou



## **Bc. Martin Selinger**

### Studium exprese cílových mRNA při pospiviroidní patogenезi v systému „leaf factory“

specifitu interakce viroid-hostitel. Podíl (+) a (-) vsRNA je rovněž nerovnoměrný, s převahou (+) vsRNA (Obr. 5).

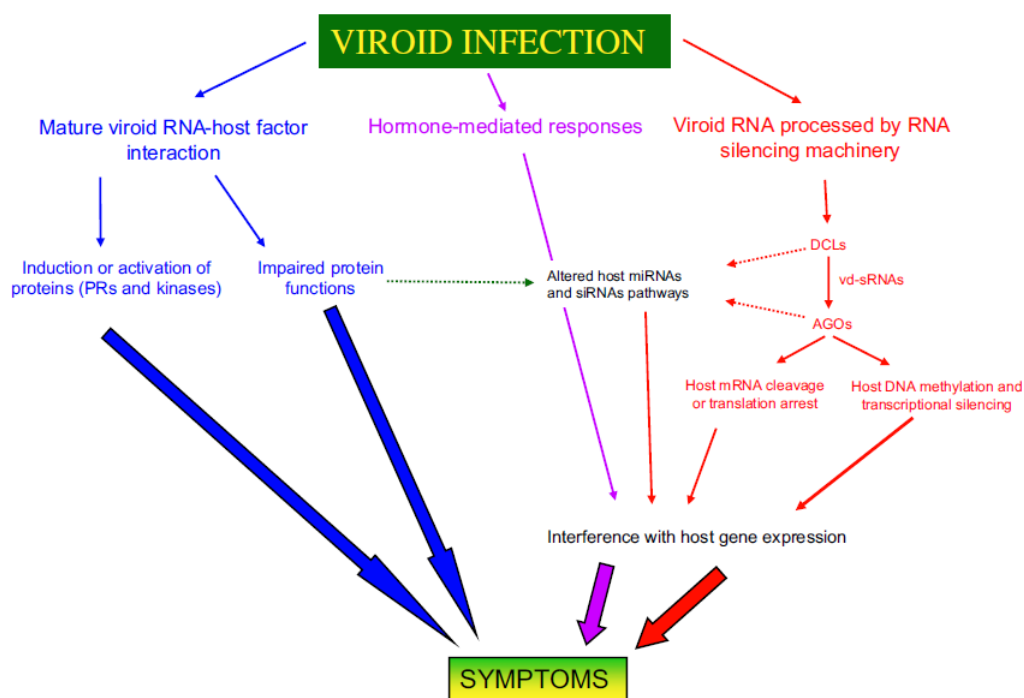
Vztah mezi akumulací vsRNA a titrem viroidů v infikovaných rostlinách je doposud nejasný. Výsledky popsané v literatuře se značně rozcházejí: příkladem budiž PSTVd, kdy rozdíl v hladinách vsRNA pro různě virulentní kmeny buďto nebyl pozorován (Papeřthimiou *et al.*, 2001; Martínez de Alba *et al.*, 2002) anebo naopak pozorován byl (Itaya *et al.*, 2001; Matoušek *et al.*, 2007).

Spojitosť mezi PTGS a viroidní patogenезí prokázali Wang *et al.* (2004). U transgenních rajčat (*S. lycopersicum*, cv. Moneymaker) exprimujících neinfekční vlásenkový RNA konstrukt odvozený z PSTVd (IR-14) pozorovali symptomy typické pro viroidní infekci. Pokud jsou vsRNA zodpovědné za projev symptomů skrze (m)RNA silencing, lze jejich cíle v hostitelském genomu identifikovat pomocí bioinformatické predikce a experimentálního ověření exprese, přičemž míra deregulace daného cíle (genu) by měla korelovat s mírou projevených symptomů. Wangovi *et al.* se podařilo pomocí bioinformatické predikce identifikovat 470 potenciálních cílů v genomu rajčete, z nichž 42 mělo signifikantně změněnou hladinu v reakci na infekci PSTVd. Zajímavé je, že 2/3 potenciálních cílových míst bylo komplementárních k vsRNA odvozeným z P-domény. Ovšem pouze 3 geny měly signifikantně sníženou hladinu u kultivarů Rutgers, Moneymaker a také u linie IR-14, přičemž dva z nich, giberelin beta-hydroxyláza a omega-3-desaturáza, hrají klíčovou úlohu v biosyntéze giberelinů a jasmonové kyseliny (Wang *et al.*, 2011a), důležitých rostlinných hormonálních drah (přehledná práce Wang *et al.*, 2011b). V genomu *A. thaliana* bylo v závislosti na kmeni PSTVd nalezeno průměrně 100-200 možných cílových míst, přičemž 40% z nich bylo lokalizováno v regionech kódujících proteiny. Až 90% z těchto míst bylo komplementárních k vsRNA odvozených z P-domény a horní T<sub>L</sub>-domény (Diermann *et al.*, 2010; Obr. 5). Pomocí screeningu databáze EST rajčete byly predikovány 2 potenciální cíle na základě částečné komplementarity s vsRNA třídy IV (region 293-312 PSTVd lokalizovaný v P-doméně; Matoušek *et al.*, 2012b). Jedná se o transkripční faktor TCP3 odpovědný za morfogenezi listů (Ori *et al.*, 2007) a kináza CIPK podílející se na fyziologických funkcích spojených s vápníkem a draselnými kanály (Kim *et al.*, 2000). U obou těchto genů byla prokázána signifikantně snížená hladina u rajčat infikovaných silně patogenními kmeny PSTVd AS1 a C3, zatímco slabý kmen QFA nevykazoval téměř žádnou změnu oproti zdravým rostlinám (Matoušek *et al.*, 2012b).

vsRNA-indukovaný RNA silencing však nemusí být cílen pouze proti hostitelským mRNA. Existuje zde možnost přímé interakce vsRNA s pri-miRNA, neboť u rajčat

infikovaných PSTVd byla detekována snížená hladina několika miRNA (miR156, miR159, miR396, miR319 a miR403; Diermann *et al.*, 2010; Owens *et al.*, 2012).

Závěrem lze konstatovat, že princip mechanismu viroidní patogeneze je velice komplexní proces, ve kterém vystupuje řada faktorů, jejichž součinností jsou proječovány symptomy (Obr. 6). Celkový obraz této rozsáhlé sítě zůstává stále neobjasněn, velice slibnou hypotézou je v současnosti úloha vsRNA v indukci RNA silencingu vyúsťující v deregulaci hostitelských genů a narušení funkce hostitelských malých RNA. Tuto hypotézu potvrdili Navarro *et al.* (2012), kteří identifikovali dvě vsRNA (*PC-sRNA8a* a *PC-sRNA8b*) tvořící duplex s mRNA chloroplastového heat-shock proteinu 90 (cHSP90), u kterého byla prokázána snížená hladina v PLMVd-infikovaných rostlinách broskve (*Prunus persica*). Pomocí metody RLM-RACE pak potvrdili cílenou degradaci transkriptu cHSP90 skrze komplex RISC-vsRNA.



**Obr. 6:** Potenciální cesty spojující primární interakce viroid-hostitel, které skrze jednu či více signálních kaskád vedou k makroskopickému projevu symptomů. Převzato z Navarro *et al.*, 2012a.

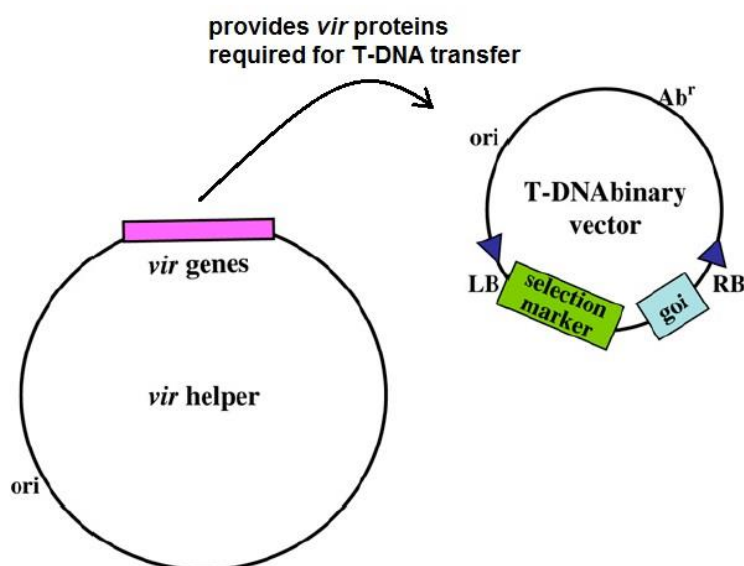
### 1.3. Systém „leaf factory“ a agro-infiltrace

*Agrobacterium tumefaciens* je gram-negativní proteobakterie napadající dvouděložné rostliny, u kterých vyvolává charakteristické nádorové bujení na kořenech. Vznik nádorů je zapříčiněn transformací genomu rostliny pomocí speciálních bakteriálních Ti plasmidů („tumor-inducing“). Ti plasmidy obsahují T-DNA region (transfer DNA), který se začlení do

jaderné DNA rostliny. T-DNA region obsahuje geny, které ovlivňují tvorbu auxinu a cytokininů, kdy nadprodukce a změněný poměr těchto fytohormonů způsobuje množení nediferenciovaných nádorových buněk (Nečásek, 1993).

Umělou úpravou Ti plasmidů, kdy v T-DNA regionu zaměníme geny pro nadprodukcii fytohormonů zkoumaným genem, byl získán efektivní systém pro genetickou transformaci rostlin (viz např. Gelvin *et al.*, 2003). Rekombinantní *A. tumefaciens* lze použít i pro systém transientní exprese v diferenciovaných pletivech (tzv. agro-infiltrace). Většina buněk v infiltrované oblasti je pak transformována a exprimuje transgen. Tento systém je výhodný zejména pro svoji rychlost, flexibilitu a možnost kombinace několika transgenů najednou (např. Matoušek *et al.*, 2012c). Zvýšení efektivity systému transientní exprese může být dosaženo koinfiltrací transgenů pro virové supresory silencingu, které potlačují PTGS vyvolané přítomností cizorodé DNA (Voinnet *et al.*, 2003).

Biotechnologický systém „leaf factory“ využívá procesu transientní exprese po infiltraci rekombinantních *A. tumefaciens* (nesoucích binární vektor) do listů *Nicotiana benthamiana* (*Solanaceae*). Systém binárních vektorů využívá skutečnosti, že separace *vir*-regionu (oblast Ti plasmidu obsahující geny potřebné k přenosu T-DNA do rostlinných buněk a její integraci do genomu) a T-regionu do dvou plasmidů v rámci bakteriální buňky nemá vliv na indukci nádoru (Hoekema *et al.*, 1983). Využívá tedy dvou plasmidů, kdy jeden obsahuje pouze *vir*-region (tzv. pomocný plasmid) a druhý obsahuje T-region a selekční marker (Obr. 7). V laboratoři OMG pro systém „leaf factory“ používáme kmen LBA4404 (pomocný plasmid pAL4404) nesoucí binární vektor pLV07 (Vrba *et al.*, 2005) odvozený z vektoru pBINPLUS (van Engelen *et al.*, 1995), v jehož T-DNA je vložený zájmový gen.



**Obr. 7: Schéma systému binárních vektorů:** Zájmové geny (goi) jsou vloženy do T-DNA regionu binárního vektoru. Vir proteiny jsou kódovány geny na separátním replikonu (*vir* helper). Selekční marker v T-DNA regionu se využívá pro indikaci úspěšné transformace. Gen pro rezistenci k určitému antibiotiku ( $Ab^r$ ) je používán pro selekci úspěšně transformovaných *E. coli* (v počátečních fázích konstrukce genové kazety) nebo *A. tumefaciens*. Převzato z Lee *et al.* (2008).

## 2. Cíle práce

1) Selektce potenciálních targetů RNA silencingu vyvolaného viroid-specifickými malými RNA za použití získaných bioinformatických dat.

2) Analýza hladin mRNA vybraných genů v PSTVd-infikovaných rostlinách rajčete (*S. lycopersicum*) pomocí kvantitativní real-time RT-PCR a následná selektce genů, u nichž byla detekována aberantní hladina mRNA.

3) Klonování selektovaných/kandidátních genů do expresního rostlinného vektoru pLV07.

4) Analýza exprese vybraných kandidátních genů v systému „leaf factory“ v přítomnosti supresoru silencingu p19 pomocí kvantitativní real-time RT-PCR a RNA blotu v rostlinách *N. benthamiana*, kde společně se studovanými geny a supresorem silencingu budou koinfiltrovány kmeny PSTVd s kontrastními symptomy (tzv. koinfiltrace).

## **3. Materiál a metody**

Při své práci jsem dodržoval zásady bezpečnosti práce, organizační řád ÚMBR BC AV ČR, v.v.i. a interní směrnice oddělení molekulární genetiky BC AV ČR ÚMBR pro práci s karanténními viroidními patogeny a geneticky modifikovanými organismy a pro práci v izotopové laboratoři.

### **3.1. Materiál**

#### **3.1.1. Rostlinný materiál**

V této práci byly použity rostliny *Solanum lycopersicum*, cv. Rutgers a Heinz, a rostliny *Nicotiana benthamiana*. Oba druhy byly pěstovány ve skleníku při teplotě 25°C ± 3°C za přirozeného denního světla a dodatečného přisvětlování (170 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> PAR) pro udržení 16-ti hodinového denního režimu, pokud není uvedeno jinak.

#### **3.1.2. Biochemický materiál**

Byly použity restriční endonukleázy *AscI*, *PacI*, *XbaI* a *XhoI* s příslušnými pufrů (NEB, Takara). T4 DNA ligáza (Takara) a PCR master-mixy s *Taq* polymerázou (Qiagen) a s *Pwo* polymerázou (Roche). Pro určení velikosti fragmentů při elektroforéze byl použit DNA marker (1kbp DNA ladder GibcoBRL). Při molekulární hybridizaci byl použit radioaktivní izotop α-[<sup>32</sup>P]dCTP (3000 Ci/mmol; MP Biomedicals); dále pak nylonová membrána typu N0144 s upraveným nábojem a průměrem pórů 0,45 μm (Sigma-Aldrich) pro koloniovou hybridizaci a RNA membrána (Biodyne A Membrane 0,2 μm, PALL) pro RNA blot. Názvy použitých komerčních kitů použitých v této práci jsou uvedeny v níže uvedených metodických postupech (kap. 3.2.).

#### **3.1.3. Rostky a živná média**

##### **5× koncentrovaný nanášecí pufr:**

0,01% xylycyanolová modř, 0,01% bromfenolová modř, 30% glycerín, 100 μg/ml EtBr, 5×TBE

##### **1 Kb Plus DNA Ladder:**

10 μl 10×DNA Ladder (GibcoBRL), 20 μl nanášecí pufr, 70 μl H<sub>2</sub>O.

**Bc. Martin Selinger**Studium exprese cílových mRNA při pospiviroidní patogenезi v systému „leaf factory“

---

**10×TBE pufr (1000 ml):**

1M Tris-borát pH 8,3	108 g Tris
0,88M kyselina boritá	55g kyselina boritá
20mM EDTA	7,44 g EDTANa <sub>2</sub>

**Fenol:chloroform (25 : 24 : 1) (100 ml):**

25 fenol	50 ml fenol (v pufovaném TE pH 8.0)
24 chloroform	48 ml chloroform
1 <i>iso</i> -amylalkohol	2 ml <i>iso</i> -amylalkohol

Výsledný roztok dobře promíchat a převrstvit cca 1/3 objemu 10× TE pufru; skladovat ve tmě při 4°C.

**Roztoky pro přípravu membrán na koloniovou hybridizaci (200 ml):**

(1) 0,5M NaOH	4 g NaOH
(2) 1M Tris-HCl pH 7.4	24,2 g Tris
(3) 3M NaCl	35 g NaCl
(4) 1,5M NaCl, 0,5M Tris	100 ml (2) + 100 ml (3)
(5) 0,15M NaCl	10 ml (3) do 200 ml roztoku
(6) 1×SSC	10 ml 20×SSC do 200 ml roztoku

roztoky 1-3 sterilizovat

**5×FGB (500 ml) :**

40mM octan sodný	2,72 g Na <sub>2</sub> COOH·3H <sub>2</sub> O
rozpustit v H <sub>2</sub> O	350 ml DEPC H <sub>2</sub> O
90mM MOPS-NaOH pH 7.0	10,3 g MOPS (C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub> S)
20mM EDTA pH 7.0	100 ml 0,1M EDTA

Sterilizovat, CHRÁNIT PŘED SVĚTLEM (v lahvi obalené hliníkovou fólií), skladovat při 4 °C nebo při -20 °C.

**FGL (10 ml):**

50% glycerol	5 ml glycerol
1mM EDTA pH 8.0	20 µl 0,5M EDTA pH 8.0
0,25% bromfenolová modř	
0,25% xylencyanolová modř	

**Bc. Martin Selinger**Studium exprese cílových mRNA při pospiviroidní patogenезi v systému „leaf factory“

---

**20×SSPE (1000 ml):**

3M NaCl	175,3 g NaCl
0,2M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	71,6 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O
0,02M EDTA	7,4 g EDTANa <sub>2</sub>

Upravit pH NaOH na 7,4, filtrovat, sterilizovat.

**20×SSC (1000 ml):**

3M NaCl	175,3g NaCl
0,3M citrát sodný pH 7.0	88,2g citrát sodný

Sterilizovat.

**DEPC H<sub>2</sub>O (RNase-free):**

1000 ml H <sub>2</sub> O	
0,02% DEPC	0,2 ml diethylpyrokarbonát

Roztok připravovat v digestoři, potom nechat inkubovat přes noc při 37 °C a sterilizovat.

**100×Denhardtovo činidlo (100 ml):**

2% Ficoll 400 (w/v)	2 g Ficoll 400
2% BSA fraction V (w/v)	2 g BSA
2% PVP (w/v)	2 g polyvinylpyrrolidon Mw 40 000

**Příprava tRNA**

1 g kvasniční RNA se rozpustí v 10 ml TE pufru. Je třeba zahřát RNA na 50-60 °C a často promíchávat. Roztok se odstředí a supernatant se fenolizuje 1:1 (v/v) směsí fenol:chloroform (25:24:1). K odebrané horní fázi se přidá 4M LiCl (1:1 v/v), RNA se umístí na 1 hodinu do ledu. Po odstředění se měří koncentrace supernatantu, sediment se vyhazuje.

**Pre-prehybridizační pufr (1000 ml):**

50mM Tris-HCl pH 8.0	6,05 g Tris
1mM EDTA	0,372 g EDTANa <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O
1M NaCl	58,44 g NaCl
0,1% SDS (w/v)	1 g SDS nebo 5 ml 20% SDS (w/v)

**Bc. Martin Selinger**Studium exprese cílových mRNA při pospiviroidní patogenезi v systému „leaf factory“

---

**Prehybridizační pufr (100 ml):**

50% formamid (v/v)	50 ml deionizovaný formamid
1,5×Denhardtovo činidlo	1,5 ml 100×Denhardtovo činidlo
0,1% SDS (w/v)	500 µl 20% SDS (w/v)
5×SSPE	25 ml 20×SSPE
20 mg/100 ml tRNA	

skladovat při -20 °C, popř. pro použití při RNA blotu při 4 °C.

**Promývací roztoky pro hybridizaci**

2×SSC, 0,1% SDS  
1×SSC, 0,1% SDS  
0,5×SSC, 0,1% SDS  
0,1×SSC, 0,1% SDS

**10×MES (100ml):**

0,1M MgCl <sub>2</sub>	2,03g MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O
0,1M MES	2,15g MES·H <sub>2</sub> O 2-morfolino-ethansírová kyselina

upravit pH na 5,6 pomocí NaOH; sterilizovat a skladovat při 4°C

**Aktivační směs (100 ml):**

1×MES	10 ml 10×MES
200µM acetosyringon	1 ml 20 µM acetosyringon (rozpuštěný v DMSO)

**LB médium (100 ml):**

1 g kazein – Tryptone  
0,5 g kvasničný extrakt  
1 g NaCl

Upravit na pH 7,0, sterilizovat.

**LK médium (100 ml):**

1 g sacharóza  
0,8 g kazein – Tryptone  
0,4 g kvasničný extrakt  
0,2 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
30 mg MgSO<sub>4</sub>

Upravit na pH 6,8, sterilizovat.



**YEP médium (100 ml):**

1 g kazein - Tryptone

0,5 g kvasničný extrakt

0,8 g NaCl

Sterilizovat.

## **3.2. Metodické postupy**

### **3.2.1. Metody inokulace PSTVd**

#### **3.2.1.1. Biolistická inokulace**

Byl použit systém Helios Gene Gun System (BioRad), přičemž metoda byla provedena dle postupu uvedeného v práci Matouška *et al.* (2004b): 25 mg zlatých mikroprojektilů o průměru 1.0  $\mu\text{m}$  (váha zlatých mikroprojektilů byla 0,5 mg/náboj) bylo re-suspendováno ve 100  $\mu\text{l}$  0,025 M spermidinu a krátce sonikováno. K suspenzi bylo následně aplikováno 50  $\mu\text{l}$  DNA (koncentrace 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), vortexováno a sonikováno. Za stálého třepání bylo postupně přidáno 100  $\mu\text{l}$  1,0 M  $\text{CaCl}_2$  pro precipitaci DNA. Suspenze byla poté inkubována 5 minut při pokojové teplotě a 5 minut v ledě. Následně byly mikroprojektily s navázanou DNA krátce centrifugovány a třikrát promyty 1 ml 99,8% ethanolu. Následovala re-suspenze ve směsi PVP/ethanolu (0,05 mg PVP/1 ml 99,8% ethanolu). Tato suspenze byla okamžitě použita na nanesení do trubice dle návodu výrobce.

Tlak hélia při vlastní inokulaci byl nastaven na 150 PSI. Inokulovány byly vždy oba děložní lístky rostlin rajčete (*S. lycopersicum*) ze vzdálenosti cca 2 cm. Lístky byly během inokulace podepřeny tvrdou kartonovou podložkou. Po inokulaci byly rostliny ihned přikryty polyethylenovými sáčky (minimalizace vysušení porušené listové části) a ponechány 24 h ve stínu. První den po inokulaci byly sáčky proděravěny a třetí den sundány.

#### **3.2.1.2. Mechanická inokulace**

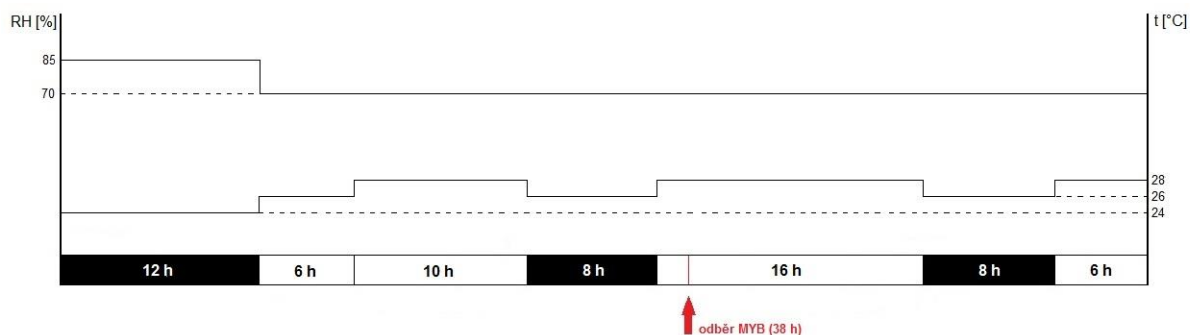
Pro mechanickou inokulaci rostlin rajčete (*S. lycopersicum*) bylo na jeden list použito 20  $\mu\text{l}$  inokula (0,04 M fosfátový pufr, pH 7.6) obsahujícího 2 ng nativní viroidní RNA. Pro mechanické poškození listů bylo použito Carborundum (500 mesh; Carborundum Electrite, a.s., Benátky nad Jizerou).

#### **3.2.1.3. Aktivace bakterií *A. tumefaciens* a listová infiltrace**

Bakterie *A. tumefaciens* s požadovaným konstruktem byly kultivovány v selektivním LK médiu (kanamycin 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) při 28°C a 120 ot.min<sup>-1</sup> do dosažení OD<sub>595</sub>=1,0. Narostlou kulturu jsme centrifugovali (10 min; 5 000 ot.min<sup>-1</sup>) a sediment jsme poté resuspendovali v aktivační směsi, přičemž množství přidané aktivační směsi bylo totožné s objemem

kultivačního média. Bakteriální suspenzi jsme poté nechali inkubovat 24 h ve stínu při pokojové teplotě.

Bakteriální suspenze aktivovaných *A. tumefaciens* byla následně infiltrována do spodní strany listů *N. benthamiana* pomocí injekčních stříkaček bez jehel. Infiltrované rostliny byly buďto ihned přeneseny do fytotronu SANYO MLR 351H (SANYO Electric Co., Ltd., Moriguchi, Japonsko; kultivační program uveden na Obr. 8) či byly ponechány 12 hodin ve stínu a poté přeneseny do skleníku (podmínky kultivace uvedeny v kapitole 3.1.1.).



**Obr. 8:** Kultivační program používaný ve fytotronu SANYO MLR 351H. Intenzita světla v průběhu světelných period činila 80% maximálního nastavitelného osvětlení (cca  $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PAR).

## 3.2.2. Metody izolace a purifikace RNA

### 3.2.2.1. Izolace rostlinné RNA

Rostlinná RNA byla izolována pomocí Plant RNA Purification Reagent (Invitrogen). Postupovali jsme podle návodu výrobce: 200 mg rostlinného pletiva bylo zhomogenizováno ve třecích miskách pomocí tekutého dusíku a přemístěno do mikrozkušavky se sterilně napipetovaným 1 ml RNA purifikačního reagens. Mikrozkušavku jsme krátce vortexovali a nechali inkubovat 5 minut při pokojové teplotě v poloze naležato. Poté následovala centrifugace (3 min;  $14\,000 \text{ ot}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $4^{\circ}\text{C}$ ), po které jsme následně odebrali veškerý supernatant do mikrozkušavky s 200  $\mu\text{l}$  5M NaCl. Přidali jsme 400  $\mu\text{l}$  chloroformu, zvortexovali a pomocí centrifugace (10 min;  $14\,000 \text{ ot}\cdot\text{min}^{-1}$ ) jsme oddělili jednotlivé fáze směsi. K odebranému maximálnímu objemu vodné fáze (cca 1 ml) jsme přidali totožný objem izopropanolu a inkubovali 10 minut při pokojové teplotě. Pomocí centrifugace (30 min;  $14\,000 \text{ ot}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $4^{\circ}\text{C}$ ) jsme sedimentovali vysráženou RNA. Získaný vzorek byl pročištěn 75% ethanolem, vysušen a eventuelně rozpuštěn v 15  $\mu\text{l}$  nahřáté RNase-free vody ( $54^{\circ}\text{C}$ ). Koncentrace vzorku byla stanovena pomocí spektrofotometru při 260 nm (WPA UV 1101, Biotech Photometer, Cambridge, Velká Británie). Suchý sediment či rozpuštěná RNA byly uchovávány při  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**3.2.2.2. Purifikace RNA pomocí kolonek Qiagen („RNA cleanup“)**

Pro purifikaci izolované RNA od kontaminujících metabolitů a DNA byl použit RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Postupovali jsme podle návodu výrobce: Suchý sediment či odebranou alikvotu izolované RNA jsme rozpustili ve 100  $\mu\text{l}$  DEPC  $\text{H}_2\text{O}$  a následně přidali 350  $\mu\text{l}$  pufru RLT a promíchali vortexováním. Po přidání 250  $\mu\text{l}$  96% ethanolu jsme vzorek lehce promíchali a aplikovali na kolonku. Pomocí stolní centrifugy (15 s; 8 000 ot.min<sup>-1</sup>) jsme nechali vzorek 2 $\times$  protéct kolonkou pro zachycení RNA. Na fritu s navázanou RNA jsme posléze aplikovali DNázu (10  $\mu\text{l}$  DNázy + 70  $\mu\text{l}$  pufru RDD) a 30 minut inkubovali při 37°C (štěpení genomové DNA). Pro očištění navázané RNA jsme fritou nechali pomocí centrifugace (15 s; 8 000 ot.min<sup>-1</sup>) protéct 350  $\mu\text{l}$  promývacího pufru RW1 a 2 $\times$  500  $\mu\text{l}$  promývacího pufru RPE. Pro odstranění zbytků pufrů a ethanolu jsme vzorky krátce centrifugovali při vysokých otáčkách (3 min; 14 000 ot.min<sup>-1</sup>). RNA z kolony jsme eluovali 50  $\mu\text{l}$  přehřáté (56°C) DEPC vody, kdy po 3 minutách inkubace při RT jsme kolonku centrifugovali (1 min; 14 000 ot.min<sup>-1</sup>). Přečištěná RNA byla skladována při -80°C.

**3.2.2.3. DNázování pomocí DNázy AMBION**

Pro úplné odstranění kontaminujících zbytků DNA byl použit kit Ambion DNA-free<sup>TM</sup>. Složení reakce pro každý vzorek bylo následující:

vzorek RNA	x $\mu\text{l}$ (5 $\mu\text{g}$ )
DNase I	1 $\mu\text{l}$ (2U)
DNase Buffer (10 $\times$ )	2 $\mu\text{l}$
DEPC $\text{H}_2\text{O}$	x $\mu\text{l}$ (doplnit do celkového objemu 20 $\mu\text{l}$ )
	20 $\mu\text{l}$

Reakce probíhala 45 minut při 37°C. Následně jsme k reakci přidali 3  $\mu\text{l}$  DNase Inactivation Reagent, důkladně promíchali vortexem a nechali inkubovat 3 minuty při pokojové teplotě pro inaktivaci DNázy I, přičemž jsme po 60 sekundách reakci promíchávali. DNase Inactivation Reagent jsme odstranili centrifugací (2 min; 9 000 ot.min<sup>-1</sup>), kdy jsme odebrali 16  $\mu\text{l}$  supernatantu čisté RNA. Přečištěná RNA byla skladována při -80°C. Přečištěná RNA byla podrobena kontrolní PCR (složení reakce viz kap. 3.2.5.2.) pro vyloučení kontaminace genomovou či vektorovou DNA.

**3.2.3. Kvantitativní real-time RT-PCR (qRT-PCR)****3.2.3.1. Reverzní transkripce**

Pro syntézu cDNA na kvantitativní PCR analýzu byl použit kit RT SuperScript<sup>TM</sup> III (Invitrogen), přičemž v reakcích byly používány následující primery: oligo dT<sub>18</sub>, 7SL specific primer HL-anti  $\beta$ , U5\_06-rt a U5\_11-rt (viz Příloha 1, kap. 9). Po namíchání níže popsané

## Bc. Martin Selinger

### Studium exprese cílových mRNA při pospiviroidní patogenezí v systému „leaf factory“

---

směsi byla RNA denaturována 5 minut při 65°C a následným prudkým ochlazením 5 minut na ledu.

RNase-free H <sub>2</sub> O	3 µl
dNTP mix (2,5 mM každý dNTP)	4 µl
primer (100 µM)	1 µl
přečištěná RNA	5 µl (1,1 µg)
	<hr/>
	13 µl

Poté jsme reakci zkompletovali přidáním 2 µl 0,1 M DTT, 4 µl 5× First Strand Buffer a 1 µl reverzní transkriptázy (200 U). Reakci jsme inkubovali po dobu 50-60 minut při 50°C. Enzym byl inaktivován 15 minut při 70°C. Získaná cDNA byla naředěna<sup>2</sup> a uskladněna při -20°C.

#### 3.2.3.2. Vlastní real-time amplifikace

Veškeré amplifikační reakce byly provedeny na přístroji IQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (BioRad) za použití iQ<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Supermixu (BioRad). Reakce pro kvantifikaci mRNA vybraných genů byly provedeny v duplikátech a měly následující složení:

milliQ H <sub>2</sub> O	2,1 µl
2× iQ SG Master Mix	6 µl
forward primer (10 µM)	0,45 µl
reverse primer (10 µM)	0,45 µl
templátová cDNA	3 µl
	<hr/>
	12 µl

Teplotní a časový profil reakce byl následující: po počáteční denaturaci [3 min/95°C] následovalo 50 amplifikačních cyklů [20s/94°C → 30s/ 56-59°C v závislosti na primerech → 30s/72°C]; v programu byla zahrnuta i analýza křivky tání pro rozlišení specifických a nespecifických produktů [zvyšování teploty o 1°C/min; 50-96°C]. Průběh reakce a výsledné hodnoty C<sub>t</sub> byly získány pomocí programu IQ5<sup>TM</sup> Optical System Software v. 2.0. (Bio-Rad). Pro vyhodnocení výsledků byla použita  $\Delta\Delta$ -c<sub>t</sub> metoda s modifikací dle Pfaffla (Pfaffl *et al.*, 2001). Relativní hladiny zájmových genů byly normalizovány za použití relativních hladin genů referenčních (tzv. housekeeping genů). Vhodné referenční geny byly vybrány pomocí programů geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002) a NormFinder (Andersen *et al.*, 2004). Pro kvantifikaci v rostlinách rajčete (*S. lycopersicum*) byly použity geny CAC (Expósito *et al.*, 2008) a UBI3 (Rotenberg *et al.*, 2006) z pěti analyzovaných (dále 7SL RNA, aktin a TIP41) a pro kvantifikaci v rostlinách *N. benthamiana* byl použit gen pro aktin.

---

<sup>2</sup> cDNA byla naředěna 50× (s výjimkou pro kvantifikaci mRNA genů REFL, PDI, Midasin, TRANS a MYB, kde byla použita 5× ředěná cDNA).

### **3.2.4. Metody použité při klonování**

#### **3.2.4.1. Transformace bakterií *Escherichia coli***

Práce probíhala ve sterilních podmínkách. Ihned po rozmrznutí kompetentních bakterií (kmen DH5 $\alpha$ ; alikvoty po 200  $\mu$ l) na ledu jsme aplikovali 1  $\mu$ l purifikovaného plazmidu či 5  $\mu$ l ligační směsi a nechali jsme 30 minut inkubovat v ledu. Následoval tepelný šok trvající 90 s při 42°C ve vodní lázni a poté rychlé ochlazení v ledu po dobu 2 minut. K bakteriím jsme přidali 800  $\mu$ l přehřátého (37°C) LB média a kultivovali při 37°C po dobu 1,5 h při 170 ot.min<sup>-1</sup>. Narostlou kulturu jsme vyseli na selektivní agarovou půdu (1,5% agar; kanamycin 50 mg/l nebo ampicilin 100 mg/l) a inkubovali přes noc při 37°C.

#### **3.2.4.2. Transformace bakterií *Agrobacterium tumefaciens***

Práce probíhala ve sterilních podmínkách. Bakterie (kmen LBA4404) jsme inokulovali do 10 ml tekutého LK média a nechali jsme přes noc kultivovat (28°C; 100 ot.min<sup>-1</sup>). Narostlou kulturu jsme upravili na OD<sub>660</sub> = 0,02 přidáním čerstvého LK média (na 200  $\mu$ l bakteriální suspenze 20 ml LK média). Bakterie jsme nechali růst po dobu 4 h při 28°C a 100 ot.min<sup>-1</sup> a následně jsme bakteriální suspenzi sedimentovali centrifugací (5 min; 5000 ot.min<sup>-1</sup>). Pelet jsme promyli resuspendací ve 20 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,4-7,6 a následným sedimentováním (5 min; 5000 ot.min<sup>-1</sup>). Získané buňky jsme zahustili resuspendováním ve 100  $\mu$ l YEP média, přemístili do čisté mikroskopické pipety a přidali 5  $\mu$ l plazmidové DNA (tj. 1-5  $\mu$ g). Směs jsme 5 minut inkubovali v tekutém dusíku a poté 25 minut ve vodní lázni při 37°C. Suspenzi jsme poté zředili přidáním 0,5 ml čerstvého LK média a inkubovali 2 h při 28°C a 100 ot.min<sup>-1</sup>. Následně byla suspenze nanášena na selektivní agarovou půdu LK (1,5% agar; kanamycin 50 mg/l). Bakterie jsme nechali růst přes noc při 28°C.

#### **3.2.4.3. Izolace DNA fragmentu z agarózového gelu**

Pro izolaci fragmentů DNA z gelu byl použit kit QIAEX<sup>®</sup> II Gel Extraction Kit (Qiagen), který je vhodný pro extrakci DNA fragmentů o velikosti nad 1 kbp (dle výrobce lze izolovat fragmenty o velikosti 40 bp – 50 kbp).

Postupovali podle návodu výrobce: Z agarózového gelu jsme vyřízli požadovaný fragment pod UV lampou a zvážili jsme jej. Ke gelu jsme přidali 3 $\times$  v/w pufru QX<sub>1</sub> a 30  $\mu$ l nosiče, promíchali a umístili do termobloku (50°C). Gel jsme nechali za občasného promíchání rozpustit a poté jsme vzorek centrifugovali 30 s při 10 000 ot.min<sup>-1</sup>. Po odebrání supernatantu jsme sediment (nosič s navázanou DNA) promyli 500  $\mu$ l pufru QX<sub>1</sub>, resuspendovali a opět sedimentovali centrifugací (30 s; 10 000 ot.min<sup>-1</sup>). Po odebrání supernatantu jsme sediment 2 $\times$  obdobně promyli vymraženým pufrem PE a poté jsme jej

## **Bc. Martin Selinger**

### Studium exprese cílových mRNA při pospiviroidní patogenезi v systému „leaf factory“

nechali 20-30 minut vyschnout v digestoři při pokojové teplotě. Následně jsme k vyschlému sedimentu přidali 30  $\mu$ l pufru EB, resuspendovali a inkubovali 5 minut v termobloku při 50°C. Vzorek jsme poté centrifugovali 2 minuty při 10 000 ot.min<sup>-1</sup> a supernatant, obsahující izolovanou DNA, jsme přepipetovali do nové zkumavky.

#### **3.2.4.4. Izolace plasmidu**

Pro izolaci plasmidů byl použit kit QIAGEN Plasmid Purification Kit (Qiagen). Přes noc narostlou bakteriální kulturu transformovaných *E. coli* v 60 ml selektivního LB média (kanamycin - 50 mg/l či ampicilin - 100 mg/l; inkubace při 37°C, 120 ot.min<sup>-1</sup>) jsme sedimentovali centrifugací (10 min; 4000 ot.min<sup>-1</sup>). Sediment byl resuspendován 1 ml P1 pufru (resuspendační pufr, obsahuje RNázu A). K resuspendovaným bakteriím jsme přidali 1,1 ml pufru P2 (lyzační pufr s NaOH a SDS) a několikrát pomalu promíchali převrácením. Lyzát jsme nechali inkubovat 5 min při pokojové teplotě a poté 5 minut v ledu. Následně jsme přidali 1,2 ml P3 pufru (neutralizační pufr), několikrát jsme květy promíchali převrácením a inkubovali 20 minut v ledu. Vysrážené proteiny a další nečistoty jsme sedimentovali centrifugací (30 min; 16 000 ot.min<sup>-1</sup>; 4°C). Pro přečištění jsme získaný supernatant aplikovali na kolonku (Qiagen Tip-20), která byla předtím aktivována 1 ml QBT pufru. Kolonka s navázanou plasmidovou DNA byla promyta 4 ml pufru QC a eluce vzorku proběhla přidáním 800  $\mu$ l pufru QF. Eluát byl zachytáván do mikrozkušavky s 500  $\mu$ l izopropanolu. DNA jsme nechali precipitovat po dobu nejméně 1 h při pokojové teplotě a její sedimentaci jsme provedli centrifugací (30 minut; 15 000 ot.min<sup>-1</sup>; 4°C). Následovala druhá precipitace DNA pomocí ethanolu a acetátu sodného, kdy jsme získaný sediment rozpustili ve 100  $\mu$ l 0,3M octanu sodném, přidali 300  $\mu$ l vymraženého 96% ethanolu a nechali inkubovat nejméně 30 minut při - 80°C. DNA byla posléze sedimentována centrifugací (30 min; 15 000 ot.min<sup>-1</sup>; 4°C). Vzniklý sediment jsme vysušili (centrifugací ve vakuu) a rozpustili ve 20-50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O dle velikosti sedimentu. Poté jsme stanovili koncentraci izolovaného plasmidu pomocí spektrofotometru (WPA UV 1101, Biotech Photometer, Cambridge, Velká Británie).

#### **3.2.4.5. Přečištění DNA fenol-chloroformem**

Přečištění DNA pomocí směsi fenol-chloroform bylo použito pro inaktivaci a odstranění proteinů po restrikčních reakcích. Ke vzorku jsme přidali stejný objem (1:1, v/v) směsi fenol-chloroform (25:24:1). Vzorek jsme poté vortexovali a nechali stát 5 minut při RT. Následně jsme vzorek centrifugovali 10 minut při 13 500 ot.min<sup>-1</sup> a odebrali vodní fázi.

Vzorek jsme dále precipitovali pomocí ethanolu, pokud jsme jej dále enzymaticky zpracovávali (např. restrikční reakce či ligace): ke vzorku jsme přidali 1/10 objemu (v/v) 3M

## Bc. Martin Selinger

### Studium exprese cílových mRNA při pospiviroidní patogenезi v systému „leaf factory“

octanu sodného (pH 5,2) a vymražený 96% ethanol v poměru 3:1 - ethanol/vzorek, v/v. Vzorek jsme inkubovali při -80°C nejméně 1 hodinu a precipitovanou DNA jsme sedimentovali centrifugací (30 min; 15 000 ot.min<sup>-1</sup>; 4°C). Získaný sediment jsme vysušili a rozpustili v ddH<sub>2</sub>O.

#### 3.2.4.6. Ligační reakce

Ligační reakce probíhala vždy při 16 °C přes noc ve vodní lázni (HAAKE K20-DC1, Thermo Haake GmbH).

recipient (pLV68, pLV07)	1 µl
10× ligační pufr (Takara)	1 µl
fragment	6 µl
T4 DNA ligáza (Takara)	1 µl (350 U)
	10 µl

#### 3.2.4.7. Restrikční reakce

Restrikční endonukleázy byly použity při manipulaci s fragmentem SI-MYB při vyštěpení z plasmidu či pro získání kohezivních konců pro snadnější ligaci. Reakce probíhaly při 37 °C přes noc.

##### Restrikční opracování fragmentu po přidání *Xba*I a *Xho*I míst pomocí PCR:

fragment (SI-MYB)	50 µl
10× pufr NEB2	7 µl
100× BSA (NEB)	0,7 µl
<i>Xba</i> I (Takara)	2 µl (30 U)
<i>Xho</i> I (Takara)	2 µl (20 U)
ddH <sub>2</sub> O	8,3 µl
	70 µl

##### Restrikční vyštěpení fragmentu:

po štěpení *Pac*I (NEB1) sraženo EtOH, posléze přes noc štěpeno *Asc*I (NEB4).

10× pufr	5 µl
plasmid (pLV68)	5 µl (7,5-10 µg)
enzym	3,5 µl (35 U)
100× BSA	0,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	36 µl
	50 µl

#### 3.2.4.8. PCR

High-fidelity *Pwo* polymerázu jsme použili v reakci pro získání genu SI-MYB z rajčatové cDNA knihovny, pro následnou reamplifikaci izolovaného DNA fragmentu a pro přidání nových restrikčních míst *Xba*I a *Xho*I na 5' a 3' konce fragmentu pomocí vhodně navržených primerů (viz Příloha 1, kap. 9). Pomocí PCR s využitím *Taq* polymerázy jsme ověřovali klony selektované molekulární hybridizací transformovaných bakterií. Teplotní a časový profil reakce: 2 minuty 94°C (úplná denaturace templátové DNA) → 35× [30s při 94°C → 30s při 52°C → 120s při 72°C]. Reakce probíhala na přístroji T3 Thermocycler, Biometra.

#### 3.2.4.9. Elektroforéza DNA na agarózovém gelu

Odvážené množství agarózy jsme přidali do odměřeného objemu pufru 1×TBE tak, abychom získali roztok agarózy o dané koncentraci. Agarózu jsme rozpustili přivedením roztoku k varu. Do roztoku ochlazeného na cca 50°C jsme přidali ethidium bromid (na 100 ml

gelu 1,7  $\mu$ l zásobního roztoku EtBr – konečná koncentrace 250 ng/ml). Gel byl nalit do elektroforetické vany s upevněným hřebenem. Po ztuhnutí byl gel vložen do elektroforetického tanku a zalit pufrem 1 $\times$ TBE tak, aby hladina byla zhruba 5 mm nad gelem. Po vyndání hřebene jsme do jamek aplikovali vzorky smíchané s nanášecím pufrem v poměru 1:4, v/v. Tank s gelem a nanesenými vzorky byl připojen ke zdroji stejnosměrného napětí, přičemž vhodné napětí bylo nastaveno v závislosti na délce sledovaných fragmentů. Elektroforézu jsme nechali probíhat až do oddělení sledovaných fragmentů. Gel byl analyzován na UV transiluminátoru (Chromato-Vue TM-36, UVP) při vlnové délce 312 nm.

### **3.2.5. Metody molekulární hybridizace**

#### **3.2.6.1. Příprava membrán pro hybridizaci bakteriálních kolonií**

Vybrané bakteriální klony byly aplikovány na membránu a kultivovány na Petriho misce se selektivní bakteriální půdou přes noc - *A. tumefaciens* při 28°C, LK médium, 1,5% agar, kanamycin 50 mg/l; *E. coli* při 37°C, LB médium, 1,5% agar, ampicilin 100 mg/l či kanamycin 50 mg/l. Druhý den jsme membránu postupně inkubovali (koloniemi nahoru) na filtračních papírech nasáknutých roztoky (1) - 10 minut, (2) - 5 minut a (4) - 10 minut; při snímání membrány z nasáklých filtračních papírů se tato lehce vysušila dotykem (spodní strany) na suchý filtrační papír a posléze se přemístila do následujícího roztoku. Po inkubaci ve třetím roztoku jsme membránu umístili mezi 2 suché filtrační papíry a mírným tlakem jsme odstranili buněčný materiál. Poté jsme membránu pinzetou sejmuli a nechali zcela vyschnout při pokojové teplotě. Vysušenou membránu jsme dále inkubovali 15 minut v roztoku 1 $\times$ SSC (koloniemi dolů) a následně zbavili nečistot inkubací ve třech Petriho miskách s chloroformem, v každé po dobu 1-2 minut při pomalém kroužení. Membránu jsme opláchli v dH<sub>2</sub>O a posléze inkubovali 20-30 minut v roztoku 0,15M NaCl (koloniemi dolů).

Membránu jsme vysušili mezi dvěma suchými filtračními papíry a poté provedli cross-linking UV zářením (120 mJ/cm<sup>2</sup>; fixace DNA) a zapečením při 80°C po dobu 20 minut. Pro uskladnění byla membrána zatavena do mikrotenového sáčku uchovávána při 4°C až do použití.

#### **3.2.6.2. Příprava membrán pro hybridizaci - RNA blot**

Pro přípravu denaturačního gelu pro RNA blot jsme navázili 2,16 g agarózy a rozpustili v 84 ml ddH<sub>2</sub>O zahřátím na bod varu. Po ochlazení roztoku na cca 40-60°C jsme přidali 24 ml 5 $\times$ FGB, promíchali a pak přidali 24 ml 37% formaldehydu. Směs jsme promíchali kroužením a ihned nalili do připravené elektroforetické vany s hřebenem. Gel jsme nechali tuhnout cca 1 hodinu při pokojové teplotě a poté uskladnili při 4°C do druhého dne.



Ztuhlý gel byl vložen do elektroforetického tanku a zalit pufrům 1×FGB tak, aby byl zcela ponořen. Před aplikací vzorků se provádí „předelektroforéza“ po dobu cca 5 minut a napětí >80V.

Ze vzorků s izolovanou RNA (viz kap. 2.2.3.) jsme si připravili alikvoty obsahující 30 µg RNA ve 4,5 µl. K připraveným alikvotám vzorků jsme přidali 2 µl 5×FGB, 3,5 µl 37% formaldehydu a 10 µl deionizovaného formamidu. Vzorky jsme po přidání každé složky promíchali pipetou a finálně lehce vortexovali. Následně jsme vzorky denaturovali 15 minut při 65°C a prudce zchladili na ledu. Ke vzorkům jsme před nanesením na gel přidali 2 µl nanášecího pufru FGL. Elektroforéza se prováděla za pokojové teploty po dobu cca 4 hodin, při napětí 80 V.

Po elektroforéze jsme gel 3× po dobu 10 minut propláchli v DEPC H<sub>2</sub>O z důvodu odstranění zbytků formaldehydu. Gel jsme uložili na můstek z papíru 3MM Whatman smočeného v roztoku 20×SSPE, jenž má kontakt s rezervoárem stejného pufru. Na gel jsme přiložili membránu a 3 ks 3MM Whatman papíru smočeného ve 20×SSPE. Vše jsme převrstvili suchým filtračním papírem, buničitou vatou a zatížili. Blotovali jsme přes noc, nejméně však 16 h. Membránu s navázanou RNA jsme cross-linkovali UV zářením (120 mJ/cm<sup>2</sup>; fixace RNA) a zapekli po dobu 20 minut při 80°C. Pro uskladnění byla membrána zatavena do mikrotenového sáčku uchovávána při 4°C až do použití.

### **3.2.6.3. Příprava radioaktivně značených sond**

Při přípravě radioaktivně značených sond jsme používali kitu Amersham Rediprime II Random Prime Labelling System (GE Healthcare). DNA templát byl rozpuštěn v 1×TE pufru (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM EDTA) do výsledné koncentrace 2,5-25 ng na objem 45 µl reakční směsi a následně denaturován při 95-100°C po 2 minuty. Reakční směs se prudce ochladila přenesením do ledu nejméně po dobu 5 minut. Templát byl následně aplikován do alikvoty Amersham Rediprime II Random Prime Labelling System, inkubován několik minut v ledu pro hydrataci reakční směsi a promíchán. Poté jsme do reakční směsi přidali 1,5-5 µl dCTP (s izotopem α-[<sup>32</sup>P]dCTP), promíchali a inkubovali 1 h při 37°C. Po ukončení značící reakce byly změřeny charakteristiky sondy, CPM (counts per minute) a procento inkorporace, na scintilačním počítači LS7000 Beckman. Na čtvereček DEAE celulózy jsme aplikovali 1 µl připravené sondy a nechali ve scintilační skleničce oschnout. Po přidání 2-3 ml 0,5M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> jsme na scintilačním počítači odečetli aktivitu sondy pomocí změřeného Čerenkovova záření (CPM). Pro celkovou hodnotu byly získané hodnoty vynásobeny 50 (celkový objem sondy). Pro výpočet procenta inkorporace se vyměnil roztok 0,5M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

## **Bc. Martin Selinger**

### Studium exprese cílových mRNA při pospiviroidní patogenезi v systému „leaf factory“

a opět se změřila aktivita, přičemž toto bylo provedeno 2×. Procento inkorporace jsme pak vypočetli z poměru prvního a třetího měření. Aktivita sond se pohybovala v rozmezí  $1,1-8 \cdot 10^7$  CPM, procento inkorporace bylo větší než 79%.

Před použitím při molekulární hybridizaci byla sonda denaturována při 95-100°C po dobu 2 minut a poté prudce ochlazena přendáním do ledu.

#### **3.2.6.4. Molekulární hybridizace**

Teploty pro hybridizaci byly následující: 42°C pro hybridizaci bakteriálních kolonií a 47-55°C pro RNA blot. Připravené membrány jsme promývali cca 2 hodiny ve 20-35 ml prehybridizačního pufru. Poté následovala inkubace opět cca 2 hodiny ve 25 ml prehybridizačního pufru. Pro následnou hybridizaci byly membrány přendány do nového válce, bylo přidáno 25 ml prehybridizačního pufru a denaturovaná sonda. Vlastní hybridizace probíhala v izotopové laboratoři po nejméně 8 hodin, nejčastěji však přes noc.

Membránu jsme pak promývali v promývacích roztocích s rostoucí vymývací schopností:

2×SSC, 0,1% SDS  
1×SSC, 0,1% SDS  
0,5×SSC, 0,1% SDS  
0,1×SSC, 0,1% SDS

T=teplota hybridizace; t= 10 minut; roztok nepředehřátý  
druh vymývacího roztoku a jeho teplotu, teplotu a čas  
vymývání určujeme podle intenzity záření na membráně

Veškeré promývání a hybridizace byly uskutečněny v hybridizérech Techne hybridiser HB-1D (Techne Corp., Minneapolis, MN, USA).

#### **3.2.6.5. Získání obrazu a jeho zpracování**

Membrány byly exponovány v kazetě pro detekci radioaktivního signálu (Storage Phosphor Screen, Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA). Výsledek byl vyhodnocen pomocí skenovacího přístroje Typhoon Scanner 9410 (Amersham Biosciences). Získaná data byla zpracována pomocí programu ImageJ 1.46r (US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

## 4. Výsledky

### 4.1. Bioinformatická predikce a selekce potenciálních targetů (P)TGS

Pro selekci potenciálních targetů (P)TGS vyvolaného vsRNA byla použita data získaná od prof. Dr. G. Stegera (Heinrich Heine Universität, Düsseldorf, Německo). Pomocí Illumina HiSeq 2000 systému byly osekvenovány 4 knihovny malých RNA získané ze zdravé a tří PSTVd-infikovaných variant rajčete (*Solanum lycopersicum*, náchylný cv. Heinz), za použití 3 kmenů PSTVd s odlišným patogenním efektem (2 vysoce patogenní kmeny AS1 a C3 a slabý kmen QFA; viz Obr. 9). Pomocí programu RNAhybrid (Rehmsmeier *et al.*, 2004), který posuzoval možnost hybridizace vsRNA k hostitelským mRNA za určitých podmínek, byl získán seznam 1633 lokusů/potenciálních mRNA targetů, které mají fragmenty alespoň v 1 ze 4 knihoven. Podmínky použité při identifikaci potenciálních cílových mRNA byly následující: energie hybridu vsRNA:mRNA musela být vyšší jak 75% dokonalého duplexu nebo vsRNA po hybridizaci na cílovou mRNA musela mít méně než dva volné nukleotidy a vnitřní smyčky o max. velikosti 1 nukleotidu; prahová frekvence vsRNA v knihovnách byla nastavena na 0,01.

V rámci seznamu jsme pak předpovězené targety rozdělili do několika pracovních skupin: (1) kinázy a fosfatázy, (2) transkripční faktory, (3) proteiny zapojené v hormonální a vývojové regulaci, (4) proteiny podílející se na metabolismu RNA, (5) regulace buněčného cyklu a (6) ostatní - např. molekulární přenašeče, obecné metabolické proteiny a enzymy atd. Výběr targetů pro skrínig exprese byl proveden na základě několika parametrů; kromě možného propojení funkce targetovaného proteinu se symptomy jsme za použití BLASTu vybírali lokusy kódující úplné proteiny, vysoce sekvenčně podobné k dříve popsaným proteinům. Dále jsme prioritně vybírali lokusy targetované vsRNA s vyšší frekvencí u patogenních kmenů PSTVd AS1 a C3 než u kmene QFA. Geny *TCP3* a *CIPK* byly přidány k ověřovaným potenciálním targetům na základě jejich snížené exprese v rostlinách rajčete infikovaných kmeny PSTVd AS1 a C3 (Matoušek *et al.*, 2012b).

Vybrali jsme 47 potenciálních primárních targetů (P)TGS indukovaného vsRNA, jejichž seznam a popis je uveden v Tabulce I., většina (59,6 %) kandidátních targetů byla komplementárních k vsRNA odvozených z regionu P-domény.

## Bc. Martin Selinger

### Studium exprese cílových mRNA při pospiviroidní patogenezi v systému „leaf factory“

**Tab. II:** Seznam a popis 47 selektovaných potenciálních primárních targetů (P)TGS:

zkratka	SOL genomics název	SOL genomics kód	charakteristika vsRNA odvození vsRNA sekvence vsRNA vazebné místo na cílové mRNA	BLAST	
				(A) maximálně sekvenčně podobný gen nalezený v databázi	(B) nejvíce sekvenčně podobný anotovaný gen v případě absence anotace u (A)
AGO4	Argonaute 4-like protein	Solyc01g096750	PSTVd ASI: 304-326 5'-aucuacuagucucggcgca-3' mRNA: 307-327 (ORF)	AGO4D [ <i>S. lycopersicum</i> ] n/a	AGO4-2 [ <i>N. benthamiana</i> ] Jones <i>et al.</i> , 2006
AP2	AP2-like ethylene-responsive transcription factor	Solyc02g093150	PSTVd QFA: 295-317 5'-cuuuuuuucuaucuaucug-3' mRNA: 270-291 (ORF)	AP2 transcription factor SlAP2c [ <i>S. lycopersicum</i> ] Karlova <i>et al.</i> , 2011	-
API5	Apoptosis inhibitor 5	Solyc10g008800	PSTVd QFA: 282-304 5'-gcucccgagaccgcuuuuu-3' mRNA: 1685-1709 (ORF)	apoptosis inhibitor 5-like [ <i>V. vinifera</i> ] n/a	apoptosis inhibitory protein 5 [ <i>A. thaliana</i> ] Lin <i>et al.</i> , 1999
ARF10	Auxin response factor 10	Solyc11g069500	PSTVd QFA: 175-197 5'-gguuuuuacccuucuuuu-3' mRNA: 779-803 (ORF)	auxin response factor 10 (ARF10) [ <i>S. lycopersicum</i> ] Hendelman <i>et al.</i> , 2012	-
bZIP	Homeobox-leucine zipper-like protein	Solyc02g086930	PSTVd ASI: 301-323 5'-cucuauuacucagucggcg-3' mRNA: 66-89 (5'UTR)	homeodomain leucine zipper protein (hb-1) [ <i>S. lycopersicum</i> ] n/a	homeodomain-leucine zipper protein HD3 [ <i>G. hirsutum</i> ] Qin <i>et al.</i> , 2010
CAK1	Cell division protein kinase 20	Solyc12g007200	PSTVd QFA: 8-30 5'-aaucucgugucucguguc-3' mRNA: 749-770 (ORF)	CDK-activating kinase (CAK) [ <i>E. esula</i> ] n/a	cyclin-dependent kinase F-1 [ <i>A. thaliana</i> ] Mayer <i>et al.</i> , 1999
CatB	Cathepsin B-like cysteine proteinase	Solyc03g006210	PSTVd QFA: 290-312 5'-gaaccgcuuuuuucuaucuc-3' mRNA: 410-430 (ORF)	phytophthora-inhibited protease 1 (pip1) [ <i>S. lycopersicum</i> ] Tian <i>et al.</i> , 2007	-
CDC20	WD repeat-containing protein 5 homolog	Solyc06g072830	PSTVd QFA: 244-266 5'-gcugcgcucggcuacuacc-3' mRNA: 1222-1242 (ORF)	cell division control 20 (cdc20-1) [ <i>S. lycopersicum</i> ] Mathieu-Rivet <i>et al.</i> , 2010	-
CIPK	CBL-interacting protein kinase	-	PSTVd ASI class IV: 293-312 5'-cgcuuuuuucuaucuauc-3' mRNA: 229-247 (ORF)	Kim <i>et al.</i> , 2000 (vybráno dle Matoušek <i>et al.</i> , 2012b)	-
CKI1	Two-component response regulator ARR3	Solyc03g113720	PSTVd QFA: 295-317 5'-gcuuuuuucuaucuaucug-3' mRNA: 356-378 (ORF)	two-component sensor protein histidine protein kinase [ <i>R. communis</i> ] n/a	<i>Catharanthus roseus</i> type-A response regulator (RR1) Papon <i>et al.</i> , 2003
CLV1	Receptor kinase	Solyc11g020280	PSTVd QFA: 294-316 5'-cgcuuuuuucuaucuaucuc-3' mRNA: 1721-1740 (ORF)	receptor protein kinase CLAVATA1 precursor [R. communis] n/a	leucine-rich receptor-like protein kinase [ <i>A. thaliana</i> ] Theologis <i>et al.</i> , 2000
CUL1	Cullin-1-like protein C	Solyc01g067270	PSTVd QFA: 233-255 5'-gccccuuuugcgcugcucuc-3' mRNA: 41-65 (5'UTR)	cullin 1-like protein C (CUL1-C) [ <i>P. integrifolia</i> ] Hua <i>et al.</i> , 2006	-
DREB3	Ethylene responsive transcription factor 2b	Solyc04g072900	PSTVd C3: 197-219 5'-gguguccuuccgcgcgcga-3' mRNA: 571-594 (ORF)	dehydration-responsive element binding protein 3 (DREB3) [L. esculentum] Islam <i>et al.</i> , 2009	-
eIF3s6	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 6	Solyc10g079880	PSTVd ASI: 309-331 5'-uacuagucggcgagggug-3' mRNA: 337-363 (ORF)	translation initiation factor eIF-3 subunit 6 (EIF3E) [A. thaliana] Salanoubat <i>et al.</i> , 2000	-
ELAV	RNA binding protein	Solyc09g074360	PSTVd QFA: 27-49 5'-uuacacaccgaccucgagca-3' mRNA: 1200-1221 (ORF)	CUGBP Elav-like family member 5 [ <i>V. vinifera</i> ] n/a	RNA-binding protein-defense related 1 [ <i>A. thaliana</i> ] Mayer <i>et al.</i> , 1999
ELO4	Elongator complex protein 4	Solyc11g010950	PSTVd QFA: 54-76 5'-gaaaaaaagaagcgucgca-3' mRNA: 15-36 (ORF)	elongator complex protein 4-like [ <i>G. Max</i> ] n/a	elongator complex protein 4 (ELO1) [ <i>A. thaliana</i> ] Nelissen <i>et al.</i> , 2010
ERF4	Ethylene-responsive transcription factor 4	Solyc12g008350	PSTVd ASI: 311-333 5'-cuagcuccggcgagggugu-3' mRNA: 641-664 (ORF)	dehydration responsive element binding protein (DREB2) [ <i>S. lycopersicum</i> ] Guo <i>et al.</i> , 2011	-
ETR5	Ethylene receptor	Solyc11g006180	PSTVd ASI: 300-322 5'-ucucuauuacucgucggg-3' mRNA: 937-962 (ORF)	ethylene receptor homolog (ETR5) [ <i>S. lycopersicum</i> ] Tiemann <i>et al.</i> , 1999	-
FB-ANK	F-box/ankyrin repeat protein SKIP35	Solyc12g017540	-	F-box/ankyrin repeat protein SKIP35-like [ <i>V. vinifera</i> ] n/a	ankyrin repeat-containing protein [ <i>A. thaliana</i> ] Lin <i>et al.</i> , 1999
GID1L2	Gibberellin receptor GID1L2	Solyc09g075670	PSTVd ASI: 316-338 5'-uccggcgaggguguuagcc-3' mRNA: 324-348 (ORF)	gibberellin-insensitive dwarf protein 1 (GID1) [S. nigrum] n/a	HIDM mRNA for 2-Hydroxyisoflavanone dehydratase [G. Echinata] Akashi <i>et al.</i> , 2005
GRAS	GRAS family transcription factor	Solyc03g123400	-	GRAS16 [ <i>L. esculentum</i> ] Mayrose <i>et al.</i> , 2006	-
GTP	GTP-binding family protein	Solyc11g071910	PSTVd QFA: 39-61 5'-cuccgagcagaaaaaagaaa-3' mRNA: 682-701 (ORF)	large subunit GTPase 1 homolog [ <i>V. vinifera</i> ] n/a	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase-like protein [A. thaliana] Lin <i>et al.</i> , 1999
H/ACA	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 1-like protein 1	Solyc10g078540	PSTVd QFA: 291-313 5'-aacgcuuuuuucuaucua-3' mRNA: 439-460 (ORF)	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit [ <i>R. communis</i> ] n/a	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 1 – GAR1 [A. thaliana] Pendle <i>et al.</i> , 2004
CHAPER	Chaperonin	Solyc09g091180	PSTVd C3: 297-319 5'-uuucuaucuaucugucg-3' mRNA: 667-687 (ORF)	chaperonin-60kD (ch60) [ <i>R. communis</i> ] n/a	chaperonin CPN60 (HSP60) [ <i>A. thaliana</i> ] Rikhvanov <i>et al.</i> , 2007
KHD	KH domain containing RNA binding signal transduction associated 1	Solyc10g074870	PSTVd QFA: 46-68 5'-gcagaaaagaaaaagagcc-3' mRNA: 748-768 (ORF)	KH domain-containing protein At2g38610-like [G. Max] n/a	RNA-binding KH domain-containing protein [A. thaliana] Lin <i>et al.</i> , 1999
KIP1	Kinase interacting family protein - KIP1-like	Solyc09g082510	PSTVd QFA: 283-305 5'-cuccgagaccgcuuuuu-3' mRNA: 2283-2306 (ORF)	kinase interacting KIP1-like protein [ <i>A. thaliana</i> ] Salanoubat <i>et al.</i> , 2000	-
LEO1	RNA polymerase-associated protein LEO1	Solyc03g115240	PSTVd ASI: 284-306 5'-cccagaccgcuuuucua-3' mRNA: 1067-1088 (ORF)	PAF1 complex component [ <i>P. trichocarpa</i> ] Tuskan <i>et al.</i> , 2006	-
Midasin	Midasin	Solyc04g072260	PSTVd QFA: 289-311 5'-agaaccgcuuuucuaucua-3' mRNA: 5406-5427 (ORF)	midasin-like [ <i>V. vinifera</i> ] n/a	AAA ATPase containing von Willebrand factor type A domain-containing protein [ <i>A. thaliana</i> ] Theologis <i>et al.</i> , 2000

## Bc. Martin Selinger

### Studium exprese cílových mRNA při pospiviroidní patogenезi v systému „leaf factory“

zkratka	SOL genomics název	SOL genomics kód	charakteristika vsRNA odvození vsRNA sekvence vsRNA vazebné místo na cílové mRNA	BLAST	
				(A) maximálně sekvenčně podobný gen nalezený v databázi	(B) nejvíce sekvenčně podobný anotovaný gen v případě absence anotace u (A)
MYB	MYB transcription factor	Solyc05g007870	PSTVd QFA: 283-305 5'-cuccgagaaccgcuuuuuuu-3' mRNA: 116-138 (ORF)	Trifoliolate - R2R3 MYB transcription factor [ <i>S. lycopersicum</i> ] Naz <i>et al.</i> , 2012	-
NPH3	Phototropic-responsive NPH3 family protein	Solyc07g052970	PSTVd AS1: 306-328 5'-uccuacugcucggggcgagg-3' mRNA: 834-855 (ORF)	BTB/POZ domain-containing protein At3g22104-like [ <i>V. vinifera</i> ] n/a	phototropic-responsive NPH3 family protein [ <i>A. thaliana</i> ] Salanoubat <i>et al.</i> , 2000
PDI	Protein disulfide isomerase L-2	Solyc06g075210	PSTVd QFA: 47-69 5'-cagaaaagaaaaaaggcg-3' mRNA: 532-553 (ORF)	protein disulfide isomerase [ <i>R. communis</i> ] n/a	protein disulfide isomerase-like protein [ <i>G. Max</i> ] Kamauchi <i>et al.</i> , 2009
PP2A	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit delta isoform	Solyc05g055530	-	serine/threonine protein phosphatase 2A 57 kDa regulatory subunit B' alpha isoform-like [ <i>V. vinifera</i> ] n/a	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B' [ <i>A. thaliana</i> ] Haynes <i>et al.</i> , 1999
PPAL	Expansin protein	Solyc10g018500	PSTVd QFA: 236-258 5'-ccuuugcgcucgcuucg-3' mRNA: 138-159 (ORF)	beta-expansin-like protein (PPAL) [ <i>N. tabacum</i> ] Pezzotti <i>et al.</i> , 2002	-
RabA2	Ras-related protein Rab-25	Solyc06g005810	-	SRI Nt-rab11a [ <i>N. tabacum</i> ] Haizel <i>et al.</i> , 1995	-
RBP1	Nuclear RNA binding protein	Solyc08g007220	PSTVd QFA: 55-77 5'-aaaaaagaaggcgucgag-3' mRNA: 983-1005 (3'UTR)	nuclear RNA binding protein (RggA) [ <i>N. tabacum</i> ] Landsberger <i>et al.</i> , 2002	-
REFL	REF-like stress related protein 1	Solyc05g015390	PSTVd C3: 297-319 5'-uuucuaucuaacuuugcg-3' mRNA: 9-31 (ORF)	REF/SRPP-like protein At1g67360-like [ <i>V. vinifera</i> ] n/a	rubber elongation factor protein [ <i>A. thaliana</i> ] Theologis <i>et al.</i> , 2000
SAC1	Phosphatidylinositol phosphate (PtdInsP) phosphatase involved in hydrolysis of PtdIns	Solyc02g082750	PSTVd QFA: 348-14 5'-cgaguuugcuucggaacua-3' mRNA: 1166-1188 (ORF)	phosphatidylinositol phosphate SAC1-like [ <i>V. vinifera</i> ] n/a	phosphatidylinositol-4-phosphate phosphatase RHD4 [ <i>A. thaliana</i> ] Thole <i>et al.</i> , 2008
SERK1	Receptor like kinase, RLK	Solyc04g072570	PSTVd AS1: 315-337 5'-cuccggcgaggguuuagc-3' mRNA: 919-941 (ORF)	somatic embryogenesis receptor kinase 1 (SERK1) [ <i>S. lycopersicum</i> ] Mantelin <i>et al.</i> , 2011	-
TCP3	TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA, and PCF (TCP) family transcription factor 3	-	PSTVd AS1 class IV: 293-312 5'-cgcuuuucuaucuuac-3' mRNA: 1381-1400 (ORF)	Ori <i>et al.</i> , 2007 (vybráno dle Matoušek <i>et al.</i> , 2012b)	-
TEJ	Poly(ADP-ribose) glycohydrolase	Solyc12g017920	PSTVd QFA: 106-128 5'-ggagcgaacggcaaaaagga-3' mRNA: 146-168 (ORF)	poly(ADP-ribose) glycohydrolase 1-like [ <i>V. vinifera</i> ] n/a	poly(ADP-ribose) glycohydrolase 1 [ <i>A. thaliana</i> ] Adams-Phillips <i>et al.</i> , 2010
THO1	THO1 complex subunit 1	-	PSTVd AS1: 287-309 5'-gagaaccgcuuuucuauc-3' mRNA: 1127-1149 (ORF)	THO complex subunit 1-like [ <i>V. vinifera</i> ] n/a	THO complex subunit 1 [ <i>A. thaliana</i> ] Furumizu <i>et al.</i> , 2010
TRANS	Translocase of chloroplast 90, chloroplastic	Solyc01g111240	PSTVd QFA: 294-316 5'-cgcuuuucuaucuaucua-3' mRNA: 1234-1256 (ORF)	translocase of chloroplast 120, chloroplastic-like [ <i>V. vinifera</i> ] n/a	translocase of chloroplast 120 [ <i>A. thaliana</i> ] Bauer <i>et al.</i> , 2000
TTK	Serine/threonine-protein kinase 36	Solyc11g013240	PSTVd AS1: 313-335 5'-agcuccggcgaggguuuua-3' mRNA: 192-214 (ORF)	dual specificity protein kinase-ttk (TTK) [ <i>R. communis</i> ] n/a	serine/threonine-protein kinase TTK/MPS1 [ <i>A. thaliana</i> ] Theologis <i>et al.</i> , 2000
U5_06	U5 snRNA	-	U5 SL 06: 35-59 5'-uuagagaagaacgagugucga-3'	-	-
U5_11	U5 snRNA	-	U5 SL 11: 35-59 5'-uuagagaagaacgagugucga-3'	-	-
ULP1	Ulp1 protease family C-terminal catalytic domain containing protein	-	PSTVd AS1: 287-309 5'-gagaaccgcuuuucuaucua-3' mRNA: 639-661 (ORF)	sentrin/sumo-specific protease [ <i>R. communis</i> ]	cysteine-type peptidase [ <i>A. thaliana</i> ] Novatschkova <i>et al.</i> , 2012
VAMP	Vesicle-associated membrane protein-associated protein	Solyc10g018350	PSTVd QFA: 291-313 5'-aacgcuuuucuaucua-3' mRNA: 404-426 (ORF)	vesicle-associated protein 27 (VAP27) [ <i>N. plumbaginifolia</i> ] Laurent <i>et al.</i> , 2000	-

## 4.2. Kvantifikace hladin mRNA selektovaných potenciálních targetů

### (P)TGS

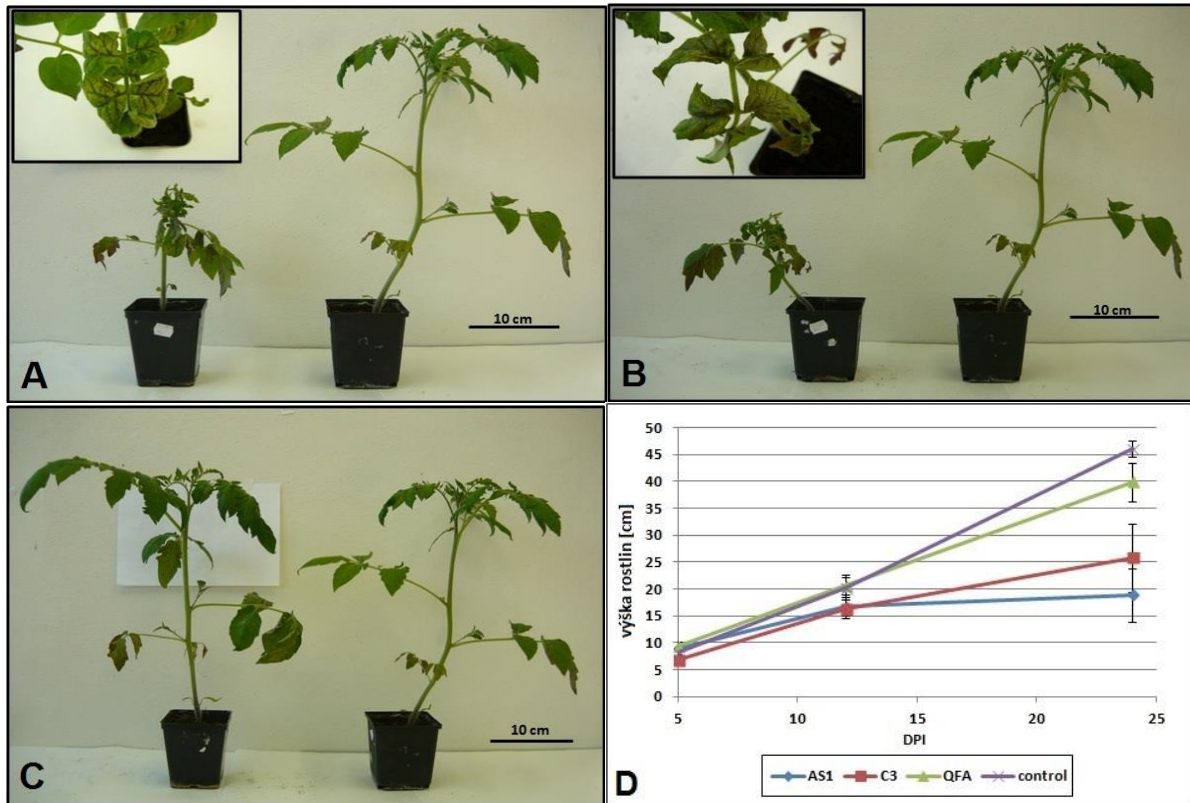
Byly provedeny dva nezávislé pokusy pro porovnání hladin mRNA jednotlivých potenciálních targetů ve zdravých a PSTVd-infikovaných rostlinách rajčete (*S. lycopersicum*, cv. Rutgers). Rajčata byla mechanicky (experiment I) či biolisticky (experiment II) inokulována<sup>3</sup> silně patogenním kmenem PSTVd AS1. Po projevení symptomů (Obr. 9-A; 19

<sup>3</sup> Mechanická a biolistická inokulace rostlin *S. lycopersicum* byla provedena RNDr. Jaroslavem Matouškem, CSc.

## Bc. Martin Selinger

### Studium exprese cílových mRNA při pospiviroidní patogenezí v systému „leaf factory“

DPI a 17-20 DPI, experiment I a II) byly odebrány symptomatické listy a listy ze zdravých rostlin, z nichž byla posléze vyizolována celková RNA. Vzorky, zbavené kontaminace DNA pomocí dvoustupňové purifikace, byly následně přepsány do cDNA pomocí reverzní transkripce (kap. 3.2.5.1.)



**Obr. 9:** Projevy patologie typické pro infekci PSTVd kmeny AS1 (A), C3 (B) a QFA (C) u rostlin rajčete (*S. lycopersicum*, cv. Rutgers, 25 DPI). Rostliny infikované kmeny PSTVd vždy vlevo. Tzv. „stop efekt“, projevující se u kmene PSTVd AS1 a popisovaný v práci Matouška *et al.* (2007), je jasně pozorovatelný i na zaznamenané výšce pokusných rostlin (D).

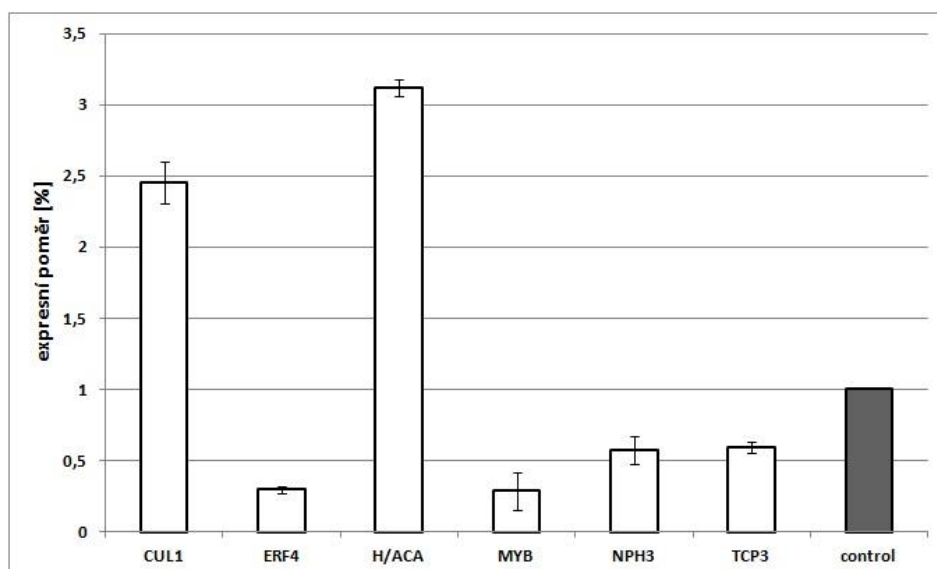
Pro kvantifikaci exprese 47 vybraných potenciálních targetů (P)TGS pomocí qRT-PCR byly navrženy primery (viz Příloha 1, kap. 9) pomocí programu LaserGene v7.1.0. (DNASar), přičemž délka amplifikovaných fragmentů se pohybovala v rozmezí 150-250 bp. Pro geny *TCP3* a *CIPK* byly použity primery dle Matouška *et al.* (2012b). Relativní hladiny potenciálních targetů byly normalizovány za použití housekeepingových genů pro ubiquitin (*UBI3*; Rotenberg *et al.*, 2006) a podjednotku clathrinového adaptorového komplexu (*CAC*; Expósito *et al.*, 2008), které byly vybrány z celkových 5 kvantifikovaných kandidátů pomocí programů geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002) a NormFinder (Andersen *et al.*, 2004). Analýza prokázala signifikantně změněnou hladinu u 6 ze 47 kvantifikovaných genů v PSTVd AS1-infikovaných rostlinách v porovnání se zdravými (Obr. 10). Signifikantně zvýšená hladina mRNA v PSTVd AS1-infikovaných rostlinách byla pozorována u následujících dvou genů:

- 1) **CUL1 (Cullin-1-like protein C)** - hladina mRNA pro tento gen byla zvýšena 2,45× u AS1-infikovaných rostlin. CUL1 je součástí SCF E3 ligázového komplexu, který společně s komplexy E1 a E2 zprostředkovává ubiquitinaci proteinů buněčného cyklu, signálních drah a transkripce. V našem případě CUL1 vykazuje 87% sekvenční podobnost s genem *CUL1-C* a 73,15% podobnost s proteinem CUL1-C (Tab. I) z *Petunia integrifolia*, kde pravděpodobně hraje roli v determinaci inkompatibility pylu (Hua *et al.*, 2006).
- 2) **H/ACA1 (H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 1-like protein 1)** - v porovnání se zdravými byla v AS1-infikovaných rostlinách hladina mRNA 3,12× vyšší, přičemž gen vykazoval 72% sekvenční podobnost s genem *H/ACA ribonucleoprotein complex subunit* z *Ricinus communis* a 53% homologii k podjednotce Gar1 z *A. thaliana* (Tab. I), která společně s proteiny Cbf5, Nop10, Nhp2 a snoRNA tvoří H/ACA komplex podílející se na katalyzaci pseudouridylace rRNA v rámci biogeneze ribosomů (přehledná práce viz Kiss *et al.*, 2010).

Signifikantně snížená hladina mRNA v PSTVd AS1-infikovaných rostlinách byla pozorována u následujících čtyř genů:

- 1) **ERF4 (Ethylene-responsive transcription factor 4)** - hladina mRNA tohoto transkripčního faktoru byla 3,4× nižší u AS1-infikovaných rostlin. ERF4 vykazuje 100% sekvenční podobnost s DREB2 z rajčete (Tab. I). DREB2 je transkripční faktor signální kaskády abiotického stresu, jehož exprese je indukována dehydratací rostliny a oxidativním stresem (Guo *et al.*, 2011). DREB proteiny patří do rodiny ERF proteinů, jež obsahují konservovanou ERF doménu (58-59 aa), pomocí které se vážou na tzv. DRE a GCC boxy. GCC motiv se nachází v promotorech genů pro PR proteiny a genů indukovaných ethylenem, zatímco DRE element je odpovědný za expresi stresem-indukovaných proteinů (přehledná práce viz Agarwal *et al.*, 2006).
- 2) **MYB (MYB transcription factor)** - hladina mRNA tohoto transkripčního faktoru byla 3,5× nižší u AS1-infikovaných rostlin. MYB je v práci Naze *et al.* (2013) nazván *Tf (Trifoliolate)*. *Tf* kóduje R2R3 MYB transkripční faktor (Tab. I). Tento transkripční faktor reguluje vývoj listů u rostlin rajčete (*S. lycopersicum*), konkrétně formaci a tvar jednotlivých lístků při vývoji složeného listu a zakládání úžlabních meristémů. Aktivita *Tf* je vyžadována KNOTTED1-LIKE proteiny (rovněž regulace vývoje listů) a je nezbytná i pro zakládání postranních listů stimulovaného auxinem (Naz *et al.*, 2012). Protein obsahuje SANT/Myb homeodoménu typickou pro jaderné receptory a chromatin-remodelující komplexy.

- 3) **NPH3 (Phototropic-responsive NPH3 family protein)** - hladina mRNA tohoto transkripčního faktoru byla 1,74× nižší u AS1-infikovaných rostlin. NPH3 vykazuje 69% sekvenční podobnost k predikovanému genu kódujícímu BTB/POZ domain-containing protein At3g22104-like (*Vitis vinifera*) a 51,8% sekvenční podobnost s genem *NPH3* identifikovaného v *A. thaliana* (At3g22104; Salanoubat *et al.*, 2000; viz Tab. I). NPH3 se v *A. thaliana* váže na světlem aktivovanou serin-threoninovou kinázu NPH1, čímž pravděpodobně umožňuje spuštění fototropické signální kaskády indukované modrým světlem (Motchoulski *et al.*, 1999). Rodina NPH3 proteinů v *A. thaliana* je velice široká. Byly například identifikovány paralogy genů *NPH1* a *NPH3* - *PID (PINOID)* a *NPY1 (Naked pins in yuc mutants 1)*, které hrají kritickou roli v organogenezi regulované auxinem (Cheng *et al.*, 2007).
- 4) **TCP3 (TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA, and PCF (TCP) family transcription factor 3)** - hladina mRNA tohoto transkripčního faktoru byla 1,69× nižší u AS1-infikovaných rostlin. TCP3 patří do rozsáhlé rodiny TCP transkripčních faktorů obsahujících bHLH doménu, které jsou odpovědné za morfogenezi listů skrze kontrolu buněčného dělení, expanzi a diferenciaci buněk (přehledná práce viz Martín-Trillo *et al.*, 2009). TCP3 v rajčeti je kódovaný genem *La (Lanceolate)*, přičemž transkript tohoto genu obsahuje vazbené místo pro miR319 regulující tak jeho hladinu (Ori *et al.*, 2007).



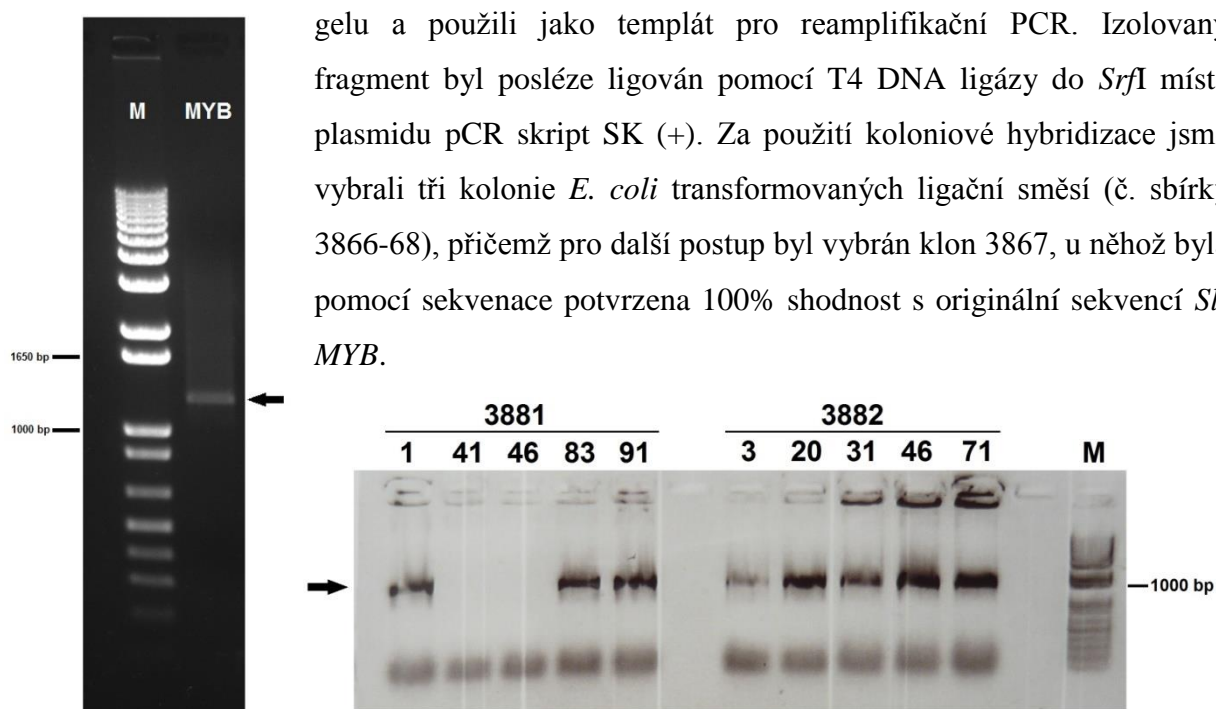
**Obr. 10:** Změny hladin kandidátních targetů při infekci silně patogenním kmenem PSTVd AS1 v symptomatických listech rajčete (zobrazeno pouze 6 genů se signifikantně změněnou hladinou; T - test,  $\alpha=0,05$ ). Hodnoty představují průměr ze dvou nezávislých experimentů, přičemž chybové úsečky představují směrodatnou odchylku.



**4.3. Klonování genu *Sl-MYB* do expresního vektoru pLV07<sup>4</sup>**

Pro analýzu exprese v systému „leaf factory“ byl vybrán gen *MYB* (nazvaný *Sl-MYB*; GenBank: JX522478.1) z důvodu největšího rozdílu hladin mRNA tohoto genu mezi zdravými a PSTVd-infikovanými rostlinami rajčete (Obr. 10). Naším dalším cílem tedy bylo získání *A. tumefaciens* nesoucích expresní rostlinný vektor pLV07 s integrovaným genem *Sl-MYB*.

Za použití primerů S1Myb-start a S1Myb-stop jsme pomocí PCR získali kódující sekvenci *Sl-MYB* o délce 1254 bp z cDNA knihovny<sup>5</sup> rajčete (*S. lycopersicum*, cv. Rutgers; Obr. 11). Po ověření délky amplifikovaného fragmentu jsme tento vyizolovali z agarózového



**Obr. 11:** Gen *Sl-MYB* o délce 1254 bp (šipka vpravo) získaný pomocí PCR za použití cDNA knihovny rajčete.

**Obr. 12:** Kontrolní PCR s primery S1MybXho a S1MybXba pro ověření transformovaných *E. coli* konstruktem pLV07 s vloženou expresní kazetou obsahující *Sl-MYB*. Amplifikovaný fragment je dlouhý 1272 bp, přičemž pro další práci byl vybrán klon č. 20.

Dalším krokem byla inserce *Sl-MYB* do expresní kazety plasmidu pLV68 (odvozeného od vektoru pRT100, Töpfer *et al.*, 1987) za účelem připojení silného promotoru 35S a terminátoru viru mozaiky kvěťáku (CaMV). Izolovaný plasmid pCR skript SK (+) se sekvencí *Sl-MYB* byl použit jako templát pro PCR, pomocí které jsme za použití primerů S1MybXho a

<sup>4</sup> Klonování úplné cDNA sekvence genu *Sl-MYB*, její modifikace a konstrukce rostlinného expresního vektoru na bázi vektoru pLV07, jakož i příprava kmenu *A. tumefaciens* nesoucího *Sl-MYB*, bylo provedeno týmem Laboratoře molekulární genetiky, ve své práci jsem se podílel na teoretické přípravě cDNA a na screeningu bakterií.

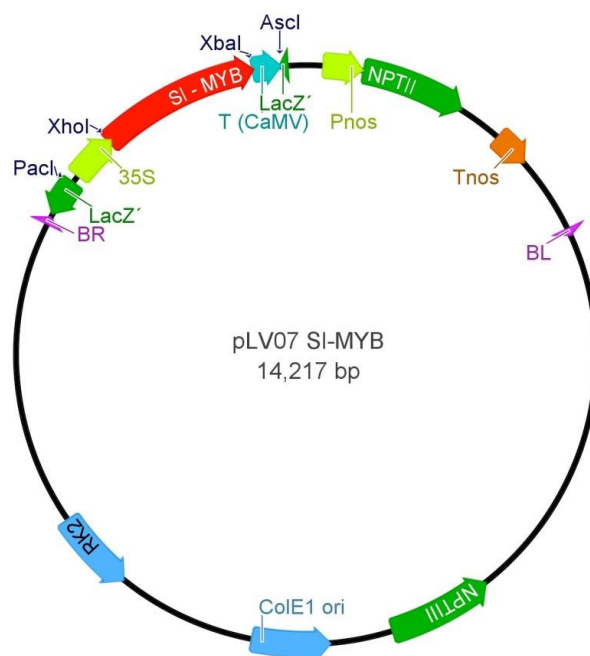
<sup>5</sup> cDNA knihovna byla připravena v laboratoři OMG (Mgr. Zoltán Füßy, PhD.).

## Bc. Martin Selinger

### Studium exprese cílových mRNA při pospiviroidní patogenezí v systému „leaf factory“

SLMybXba získali *Sl-MYB* fragment o délce 1272 bp s novými *XbaI* a *XhoI* restrikčními místy. Izolovaný DNA fragment byl opracován endonukleázami *XbaI* a *XhoI* pro vytvoření kohezivních konců. Pro inaktivaci restrikčních endonukleáz byly vzorky po reakci fenolovány a fragment následně extrahován z agarózového gelu. Získaný DNA fragment byl poté pomocí T4 DNA ligázy integrován do *XbaI* a *XhoI* míst linearizovaného vektoru pLV68. Pomocí koloniové hybridizace jsme seletovali kolonie *E. coli*, úspěšně transformované získanými plasmidy pLV68 s inzertem *Sl-MYB*. Byly vybrány dva klony s nejsilnějším signálem (č.s. 3881 a 3882). Po izolaci plasmidů z klonů 3181 a 3882 jsme endonukleázami *AscI* a *PacI* vyštěpili expresní kazetu z pLV68 (1943 bp). Po fenolizaci jsme fragment expresní kazety separovali pomocí elektroforézy z gelu.

Za použití T4 DNA ligázy jsme fragment expresní kazety ligovali do *AscI* a *PacI* míst linearizovaného vektoru pLV07 (Vrba *et al.*, 2005). Transformované *E. coli* byly podrobeny koloniové hybridizaci, 10 pozitivních klonů bylo ověřeno pomocí PCR za použití primerů SLMybXho a SLMybXba (Obr. 12). Plasmid vybraného klonu (č. sb. 3886) byl použit pro transformaci *A. tumefaciens*. Pomocí screeningu transformovaných kolonií za použití PCR s primery SLMybXho a SLMybXba jsme vybrali 3 klony (č. sb. 3907-09), přičemž pronásledné infiltrační pokusy byl použit klon 3907. Příprava binárního vektoru pLV07 s integrovanou expresní kazetou obsahující *Sl-MYB* a jeho přenos do *A. tumefaciens* byla tedy úspěšná.

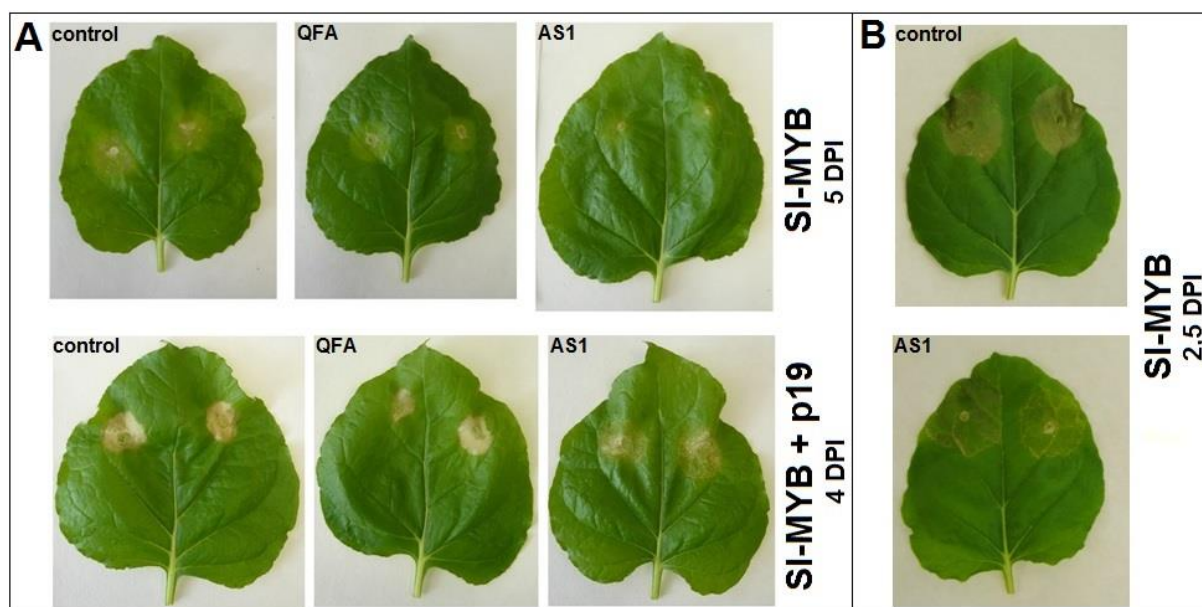


**Obr. 13:** Schéma binárního vektoru pLV07 s integrovanou expresní kazetou obsahující *Sl-MYB*: Region T-DNA, ohraničený BR (border right) a BL (border left), obsahuje expresní kazetu (promotor 35S, *Sl-MYB* a poly(A) signál) společně se selekčním genem pro neomycin fosfotransferázu (NPTII) pod regulačními elementy nopalín syntázy (Pnos a Tnos). Plasmid obsahuje replikační počátek pro *E. coli* (ColE1 ori) a *A. tumefaciens* (RK2) společně se selekčním genem NPTIII pro kanamycinovou rezistenci. Schéma bylo vytvořeno v programu Geneious v5.6. (Drummond *et al.*, 2012).

#### 4.4. Kvantifikace hladin mRNA genu *Sl-MYB* v systému „leaf factory“

Pro expresní analýzy v rámci systému „leaf factory“ byl získán expresní vektor pLV07 s integrovaným *Sl-MYB* použit společně s dalšími konstrukty kódujícími dimerní genom silně patogenního kmene PSTVd AS1 (Selinger, 2008) a slabého kmene PSTVd QFA (Selinger, 2011); a dále supresor silencingu p19 pro potlačení PTGS vyvolaného infiltrací experimentálních rostlin (Voinnet *et al.*, 2003).

Do zdravých rostlin *N. benthamiana* byly koinfiltrovány bakterie exprimující kmene PSTVd AS1 a QFA společně s *Sl-MYB* a supresorem silencingu *p19*. Overexprese *Sl-MYB* v infiltrovaných listových sektorech zapříčinila vznik nekrotizace (3 DPI), přičemž u AS1-infiltrovaných sektorů byl vývoj nekrotizace značně potlačen (Obr 14). Přítomnost supresoru silencingu p19 značně urychlila vývoj a míru projevu nekrotizace v infiltrovaných sektorech (již 2 DPI; Obr. 14-A). Dalším faktorem ovlivňujícím rychlost vývoje nekrotizace bylo stáří experimentálních rostlin, kdy u mladších rostlin byly nekrotické léze pozorovány dříve (Obr. 14-B).



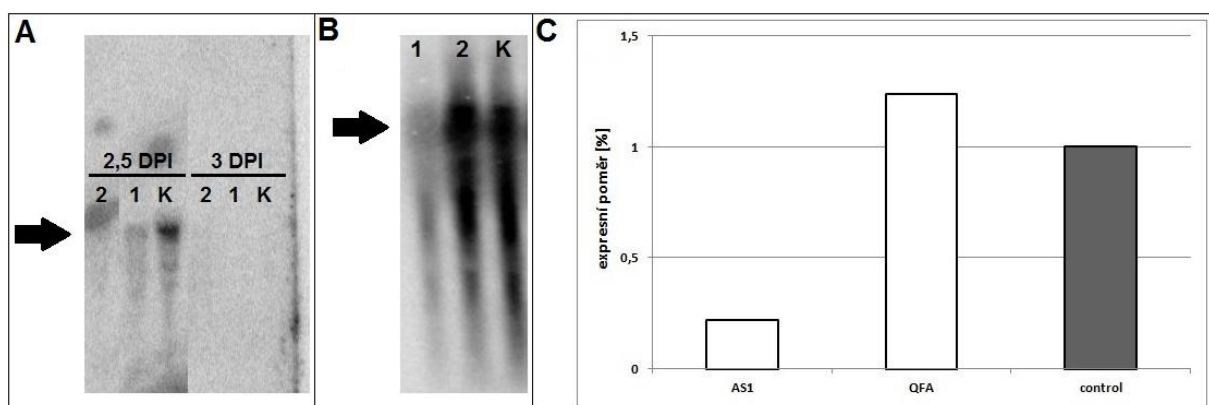
**Obr. 14: Nekrózy listových sektorů koinfiltrovaných *Sl-MYB*, PSTVd AS1 či QFA a p19:** (A) Rostliny *N. benthamiana* (cca 1,5 měsíce po vysetí) - plně vyvinuté nekrózy u sektorů v přítomnosti p19 (4 DPI; inkubace ve fytotronu) a bez p19 (5 DPI; inkubace ve fytotronu). (B) Rostliny *N. benthamiana* (cca 1 měsíc po vysetí), u nichž se nekrózy plně projeví již 2,5 DPI. Přítomnost PSTVd AS1 v infiltrovaných sektorech snížila projev nekrotizace v obou experimentech.

Abychom stanovili vhodnou dobu odběru sektorů k dalším analýzám, provedli jsme koinfiltraci kmenů PSTVd AS1 a QFA společně s *Sl-MYB*, přičemž odběry byly provedeny 2,5 a 3 DPI. Zároveň jsme z dalších experimentů vyloučili supresor silencingu p19, vzhledem k pozitivnímu efektu na vývoj nekrotizace u infiltrovaných sektorů. Pomocí RNA blotu jsme analyzovali hladiny mRNA *Sl-MYB* v infiltrovaných sektorech - 2,5 DPI byla určena jako

hraniční doba odběru, neboť po 3 DPI nebyla mRNA *Sl-MYB* již detekována. Na RNA blotu je také patrné snížení hladiny mRNA *Sl-MYB* u PSTVd-infiltrovaných sektorů (47,36% pro PSTVD QFA a 46,92% pro PSTVd AS1, Obr. 15-A).

Kvůli krátkému intervalu, kdy bylo možné hodnotit vliv PSTVd na hladinu mRNA bez postranního degradačního procesu, který je indukován samotným faktorem *Sl-MYB*, byly v některých experimentech výsledky značně variabilní. Vzhledem k tomuto a dále faktu, že exprese *Sl-MYB* ve starých a plně vyvinutých listech rajčete je minimální (Naz *et al.*, 2013), jsme přistoupili k hodnocení experimentu provedeného pouze s mladými rostlinami (Obr. 15-B, C).

Po provedení experimentu s kratší dobou inkubace ve fytotronu (odběr 1,5 DPI) jsme získali data, která naznačují možný vztah mezi projevem symptomů a vsRNA řízenou degradací *Sl-MYB* - RNA blot i data získaná pomocí qRT-PCR odhalily, že míra snížení hladiny mRNA *Sl-MYB* v tomto experimentu koreluje s mírou patogenicity viroidního kmene. V porovnání s kontrolními sektory přítomnost silně patogenního kmene PSTVd AS1 snížila hladinu mRNA *Sl-MYB* na 22% (qRT-PCR, Obr. 15-C) a 11,29 % (RNA blot, Obr. 15-B), zatímco slabý kmen QFA hladinu *Sl-MYB* mírně zvýšil na 124% (qRT-PCR, Obr. 15-C) a 233% (RNA blot, Obr. 15-B). Relativní hladiny mRNA pro *Sl-MYB* byly normalizovány za použití housekeepingových genů pro 7SL RNA (Matoušek *et al.*, 1999) a aktin (NB-actin), které byly vybrány pomocí programů geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002) a NormFinder (Andersen *et al.*, 2004).



**Obr. 15: Kvantifikace hladin mRNA *Sl-MYB* v sektorech koinfiltrovaných PSTVd AS1 a QFA pomocí RNA blotu a qRT-PCR: (A) RNA blot se specifickou sondou pro *Sl-MYB*, 2,5 DPI a 3 DPI, kde K - kontrolní sektor infiltrovaný *Sl-MYB*, 1- sektor koinfiltrovaný PSTVd AS1 a *Sl-MYB*, 2 - sektor koinfiltrovaný PSTVd QFA a *Sl-MYB*. (B) RNA blot se specifickou sondou pro *Sl-MYB*, 1,5 DPI, kde K - kontrolní sektor infiltrovaný *Sl-MYB*, 1- sektor koinfiltrovaný PSTVd AS1 a *Sl-MYB*, 2 - sektor koinfiltrovaný PSTVd QFA a *Sl-MYB*. (C) Změny hladin *Sl-MYB* v sektorech koinfiltrovaných kmeny PSTVd AS1 a QFA v porovnání s kontrolními sektory.**

## 5. Diskuze

### 5.1. Selektce potenciálních targetů (P)TGS

Přes množství akumulovaných informací je mechanismus viroidní patogenезe stále předmětem debat. V současnosti nejvíce diskutovanou hypotézou je úloha vsRNA, generovaných v hostitelské rostlině v průběhu infekce, jako spouštěčů RNA silencingu cíleného na hostitelské mRNA. vsRNA byly detekovány v rostlinách infikovaných řadou viroidních druhů - PSTVd (Itaya *et al.*, 2001 a 2007; Papaefthimiou *et al.*, 2001; Machida *et al.*, 2007; Matoušek *et al.*, 2007; Diermann *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011a), PLMVd (Martínez *et al.*, 2002; Navarro *et al.*, 2012b), HSVd (St-Pierre *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2010), CChMVd (Martínez *et al.*, 2002), CEVd (Martín *et al.*, 2007) a další. Pro účast vsRNA v biogenезi symptomů svědčí i kmenová specifická, kdy kmeny, lišící se pouze několika bázemi, jsou schopné vyvolávat odlišné patogenní efekty u hostitelských rostlin (Gruner *et al.*, 1995; Matoušek *et al.*, 2007).

S cílem identifikovat možné cíle vsRNA indukovaného PTGS jsme přistoupili k analýze sekvencí vsRNA, získaných pomocí sekvenování ve velkém rozsahu, u PSTVd-infikovaných rostlin rajčete (*S. lycopersicum*, cv. Heinz; data poskytnuta prof. Dr. G. Stegerem; Heinrich Heine Universität, Düsseldorf, Německo) pomocí sekvenování ve velkém rozsahu. Stejný postup zvolili i Navarro *et al.* (2012b), díky kterému tak identifikovali dvě vsRNA (*PC-sRNA8a* a *PC-sRNA8b*) tvořící duplex s mRNA chloroplastového heat-shock proteinu 90 (cHSP90), u kterého byla prokázána snížená hladina v PLMVd-infikovaných rostlinách broskve (*Prunus persica*). Pomocí metody RLM-RACE pak potvrdili cílenou degradaci transkriptu cHSP90 skrze komplex RISC-vsRNA (*PC-sRNA8a* a *PC-sRNA8b*). Wang *et al.* (2011a) nevycházeli z konkrétních sekvencí vsRNA získaných z experimentálních dat, namísto toho získali teoretické vsRNA rozdělením genomové a anti-genomové RNA PSTVd do sérií 359 překrývajících se a 21 nukleotidů dlouhých RNA fragmentů, přičemž identifikoval tři potenciální cíle PTGS, u kterých byla následně potvrzena signifikantně snížená hladina (giberelin beta-hydroxyláza; metal ion-binding protein a omega-3-desaturáza) u rostlin rajčete (*S. lycopersicum*).

Owens *et al.* (2012) a Wang *et al.* (2011a) provedli screening hladin mRNA několika stovek až tisíců vybraných genů v PSTVd infikovaných rostlinách rajčete pomocí arrayů, v našem případě jsme u 47 potenciálních targetů, vybraných pomocí specifických kritérií (funkce genu, rozdíl frekvencí vsRNA mezi různě patogenními kmeny PSTVd), provedli primární screening za použití qRT-PCR. Tato analýza ve zdravých a PSTVd AS1

infikovaných rostlinách rajčete (*S. lycopersicum*, cv. Rutgers) odhalila 6 kandidátních genů se signifikantně změněnou hladinou mRNA, z čehož u dvou byla detekována zvýšená hladina (*CUL1* a *H/ACAI1*) a u čtyř snižena (*ERF4*, *Sl-MYB*, *NPH3* a *TCP3*). Pozoruhodné je, že 4 z 6 kandidátních targetů tvoří duplexy s vsRNA odvozených z regionu dolní P-domény (*H/ACAI1*, *Sl-MYB*, *NPH3* a *TCP3*). V této doméně jsou lokalizovány veškeré sekvenční rozdíly kmenů PSTVd AS1, QFA a C3 (Matoušek *et al.*, 2007 a 2012b) a zároveň je z této domény derivována značná část rezervoáru vsRNA identifikovaných v rajčatech (cv. Rutgers a MoneyMaker; Obr. 5; Diermann *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011a). Dále až 90% predikovaných cílů vsRNA odvozených z PSTVd nalezených v genomu *A. thaliana* bylo rovněž komplementárních k P-doméně (Diermann *et al.*, 2010). Tyto výsledky naznačují možný vztah mezi strukturou či sekvencí P-domény a biogenezí symptomů.

## 5.2. Sl-MYB jako kandidátní cíl PTGS vyvolaného vsRNA

Z 6 kandidátních genů se signifikantně změněnou hladinou byl pro analýzu exprese v systému „leaf factory“ vybrán gen *Sl-MYB* (Tf dle Naz *et al.*, 2013), jehož hladina mRNA byla u PSTVd AS1 infikovaných rostlin rajčete nejmarkantněji snížena (na  $28,6 \pm 13,3\%$  v porovnání s kontrolními rostlinami;  $p=0,033$ ). Jedná se o R2R3 MYB transkripční faktor podílející se na formování tvaru jednotlivých lístků při vývoji složeného listu rajčete a zakládání meristémů v jejich úžlabích, a to konkrétně inhibicí předčasné diferenciace pluripotentních buněk v pupenech. Aktivita Tf je dále vyžadována KNOTTED1-LIKE proteiny (rovněž funkce v regulaci vývoje listů) a je nezbytná i pro zakládání postranních listů indukované auxinem. *Sl-MYB* je exprimován ve vzrostném vrcholu (v pupenech na okraji zakládajících se listů a později v úžlabích listů), stonku a v květech. Hladina transkriptu *Sl-MYB* je však výrazně snížena v mladých a plně vyvinutých listech, v kořenech pak nebyl detekován vůbec (Naz *et al.*, 2013).

V této práci byl pro komplexnější expresní analýzy použit systém „leaf factory“, který je výhodný zejména pro svoji rychlost a možnost kombinace několika transgenů najednou (např. Matoušek *et al.*, 2012c). Experimenty odhalily snížení hladiny mRNA pro *Sl-MYB* v listových sektorech koinfiltrovaných PSTVd AS1, zatímco u sektorů koinfiltrovaných PSTVd QFA byla hladina transkriptu téměř shodná s kontrolními sektory (Obr. 15). Overexprese *Sl-MYB* v infiltrovaných listových sektorech navíc vedla ke vzniku nekrot, jejichž vývoj byl značně inhibován v přítomnosti silně patogenního kmene PSTVd AS1. Naproti tomu koinfiltrace téměř asymptomatického kmene PSTVd QFA vedla ke shodnému vývoji nekrot jako u kontrolních rostlin (Obr. 14). Tato pozorování implikují vliv kmene

PSTVd AS1 na inhibici exprese *Sl-MYB* a také podporují možný vztah projevu symptomů v závislosti na vsRNA-řízené degradaci transkriptů *Sl-MYB*.

Variabilita výsledků v koinfiltračních pokusech v této práci mohla být způsobena několika faktory. *Sl-MYB* je transkripční faktor, jehož exprese je tkáňově a vývojově specifická (Naz *et al.*, 2013), záleží tedy na stáří experimentální rostliny a na ontologickém stáří jednotlivých listů použitých pro infiltraci. Toto podporuje i model vývoje nekrotů u infiltrovaných sektorů, kdy byl u mladších listů výraznější (nepublikované výsledky) a obecně rychlejší u ontologicky mladších rostlin (Obr. 14). Dalším faktorem je pak krátký časový interval, ve kterém je možné analyzovat vliv PSTVd AS1 a QFA na hladinu transkriptů *Sl-MYB*. Ten je ohraničen degradačním procesem indukovaným samotným *Sl-MYB* na jedné straně a dostatečnou inkubační dobou pro proces transienční exprese na straně druhé. Nebylo tedy jednoduché určit vhodnou inkubační dobu pro přesný popis tohoto děje. Podařilo se nám však dosáhnout konzistentních výsledků použitím infiltrace mladých listů, kdy ke sklizení vzorků došlo 1,5 DPI (Obr. 15-B, C).

Vznik nekrotů v listových sektorech je pravděpodobně zapříčiněn nspecifickou interakcí *Sl-MYB* s určitým faktorem či faktory specifickými pro *N. benthamiana*. Overexprese u rajčete vedla pouze k narušení vývoje listů, kdy složené listy obsahovaly více lístků s výraznějším dělením laloků (Naz *et al.*, 2013). Proteinové extrakty z listových sektorů *N. benthamiana* infiltrovaných *Sl-MYB* navíc vykazovaly vyšší nukleázovou aktivitu (Mgr. Anna Týcová, nepublikované výsledky). Vliv supresoru silencingu p19 na výrazné urychlení vývoje nekrotů nejspíše spočívá v potlačení PTGS vyvolaného v infiltrovaných sektorech (Voinnet *et al.*, 2003), čímž umožňuje zvýšenou expresi *Sl-MYB*. Supresor p19 inhibuje PTGS skrze navázání 21-25 nukleotidů dlouhých siRNA duplexů s převisem na 3' konci (Silhavy *et al.*, 2002). Je ovšem otázkou, proč je v sektorech koinfiltrovaných *Sl-MYB* a PSTVd AS1 i přes přítomnost p19 vývoj nekrotů inhibován. Pokud je *Sl-MYB* mRNA degradována komplexem vsRNA-RISC, možným vysvětlením neúčinnosti p19 by mohla být jeho nízká molarita, neschopna inaktivovat dostatečné množství vsRNA, aby potlačila spuštění PTGS. Supresor p19 je také funkční pouze jako dimer (Park *et al.*, 2004) a interaguje pouze s siRNA, tj. naprosto komplementární dsRNA (Vargason *et al.*, 2003). Nespárované nukleotidy v rámci duplexu RNA či jednořetězcové smyčky mohou inhibovat interakci - doposud není známo, zda vsRNA vznikají z dospělé viroidní molekuly nebo činností RdRP, která vytváří plně komplementární vlákno a tudíž dsRNA podobnou siRNA.

Souhrnem, výsledky z expresní analýzy v systému „leaf factory“ společně s modelem vývoje nekrotů podporují možnou roli *Sl-MYB* jako primárního cíle vsRNA indukovaného

PTGS v rostlinách rajčete. Míra degradace mRNA pro *Sl-MYB* koreluje s mírou projevu symptomů u rajčete (Obr. 9) i *N. benthamiana* (Selinger, 2011), kdy silně patogenní kmen PSTVd AS1 vykazuje nejvyšší inhibiční efekt (Obr. 15). Podobná závislost mezi projevem symptomů a degradací specifické mRNA, predikované na základě vsRNA sekvencí, byla popsána u broskvoně infikované PLMVd (Navarro *et al.*, 2012b). Narušení exprese *Sl-MYB*, jakožto transkripčního faktoru zodpovědného za vývoj listů, by se tedy mohlo ve výsledku podílet na biogenezi symptomů. Zásadní role *Sl-MYB* ve vývoji symptomů je podporována experimenty VIGS, kdy snížení exprese orthologu *Sl-MYB* z *N. benthamiana* vedlo k inhibici vývoje květů a růstu rostliny (Matoušek *et al.*, 2012d), fenotypu podobnému symptomům infekce PSTVd AS1 (Selinger, 2011).

### **5.3. Dysregulace *Sl-MYB* jako možný důsledek viroidem-indukované změny hladin hostitelských miRNA**

Degradace mRNA genu *Sl-MYB* ovšem nemusí probíhat pouze přímou interakcí s vsRNA. Pokud by byla exprese *Sl-MYB* regulována specifickou miRNA/ta-siRNA, nabízí se zde možnost deregulace *Sl-MYB* skrze interakci s miRNA, jejíž hladina byla změněna v důsledku viroidní infekce. Změna hladin hostitelských miRNA indukovaná viroidní infekcí byla skutečně popsána u PSTVd (Diermann *et al.*, 2010; Owens *et al.*, 2012) a HSVd (Alabi *et al.*, 2012). PSTVd neznámým mechanismem zvýšil hladinu tří hostitelských miRNA u kultivaru rajčete Rutgers (*osa-miR398b*, *ath-miR167a* a *ath-miR162a*; Diermann *et al.*, 2010), z nichž však ani jedna nebyla dle programu RNAhybrid (Rehmsmeier *et al.*, 2004) schopna vazby na mRNA genu *Sl-MYB*. Ani pomocí programu psRNATarget (Dai and Zhao, 2011) jsme nebyli schopni identifikovat miRNA potenciálně schopné vazby na *Sl-MYB* mRNA. Existuje však možnost, že miRNA potenciálně regulující expresi *Sl-MYB* nebyla doposud identifikována.

Je nepravděpodobné, že se v případě *Sl-MYB* bude jednat o jediný cíl PTGS zodpovědný za projev symptomů. Důležitou roli zde totiž hraje také tkáňová specifita, kdy vsRNA mohou způsobit degradaci mRNA odlišných genů či změnu hladin určitých miRNA v závislosti na typu pletiva. Například Matoušek *et al.* (2007) detekovali zvýšenou hladinu apoptotické nukleázy TBN1 v cévních svazcích u PSTVd AS1 infikovaných rajčat, zatímco v čepelích listů byla změna její hladiny minimální. Biogeneze symptomů viroidní infekce bude tedy pravděpodobně probíhat skrze vsRNA-cílenou degradaci více specifických hostitelských mRNA, jejichž misregulace povede k systémovému projevu patogenezí přes narušení určitých kaskád. Skupina určitých genů cíleně degradovaných skrze interakci



**Bc. Martin Selinger**Studium exprese cílových mRNA při pospiviroidní patogenezí v systému „leaf factory“

---

s vsRNA by mohla zahrnovat zejména další transkripční faktory. Tato hypotéza je podporována následujícími pozorováními: 1) exprese symptomů je závislá na ontologickém stupni vývoje rostliny, 2) viroidní patogenezí je značně komplexním a tkáňově specifickým dějem na úrovni hostitelského transkriptomu, 3) proces viroidní patogenezí ovlivňuje signální dráhy fytohormonů (Matoušek *et al.*, 2012a). Hypotézu biogeneze symptomů skrze narušení exprese široké palety hostitelských transkripčních faktorů dále podporuje fakt, že většina dosud identifikovaných rostlinných miRNA hraje důležitou roli v regulaci exprese transkripčních faktorů (Zhang *et al.*, 2006) a v neposlední řadě také to, že čtyři ze šesti průkazně ovlivněných kandidátních genů identifikovaných v této práci jsou transkripční faktory (*ERF4*, *Sl-MYB*, *NPH3* a *TCP3*).

## 6. Závěr

1) Na základě bioinformatických dat získaných od prof. Dr. G. Stegera (Heinrich Heine Universität, Düsseldorf, Německo) jsme vybrali 47 genů, které mohou být potenciálními cíli PTGS vyvolaného vsRNA produkovanými v průběhu infekce PSTVd. Většina z vybraných genů (59,6 %) byla komplementární k vsRNA odvozených z regionu P-domény genomu PSTVd.

2) Analýza hladin mRNA 47 vybraných genů v PSTVd-infikovaných rostlinách rajčete (*S. lycopersicum*, cv. Rutgers) pomocí qRT-PCR odhalila signifikantně změněné hladiny u 6 genů. Zvýšená hladina v porovnání s kontrolami byla detekována u *CUL1* (ubiquitinace proteinů) a *H/ACA* (pseudouridylace rRNA), zatímco snížená hladina byla detekována u *ERF4* (TF signální kaskády abiotického stresu), *NPH3* (TF fototropické signální kaskády), *Sl-MYB* (TF regulace vývoje listů) a *TCP3* (TF regulace vývoje listů).

3) Analýza exprese klonovaného genu *Sl-MYB* v systému „leaf factory“ pomocí qRT-PCR a RNA blotů odhalila zřejmou korelaci, kdy míra inhibice exprese/degradace mRNA genu *Sl-MYB* korelovala s dříve pozorovanou mírou projevu symptomů u PSTVd infikovaných rostlin *N. benthamiana*. Tato korelace byla potvrzena i charakteristickým vývojem nekrotizace, k jejíž tvorbě docházelo při overexpresi *Sl-MYB* v infiltrovaných listových sektorech. Vliv supresoru silencingu p19 na urychlení vývoje nekrotizace se dá přisuzovat potlačení PTGS v infiltrovaných sektorech.

## 7. Použité zkratky

aa	„amino acids“ - aminokyseliny
bp	„base pairs“ - páry bazí
BSA	„bovine serum albumine“ - hovězí sérový albumin
cDNA	„complementary“ DNA
cv.	kultivar
dH <sub>2</sub> O	destilovaná voda
ddH <sub>2</sub> O	deionizovaná voda
DMSO	dimethylsulfoxid
DPI	„days post infection“ - dny po infekci
dsDNA/RNA	„double-stranded“ DNA/RNA - dvouřetězcová DNA/RNA
EtBr	ethidium bromid
OMG	laboratoř Oddělení molekulární genetiky, ÚMBR BC AV ČR, v. v. i.
PCR	„polymerase chain reaction“ - polymerázová řetězová reakce
RLM-RACE	„RNA ligase-mediated rapid amplification of cDNA ends“
ssDNA/RNA	„single-stranded“ DNA/RNA - jednořetězcová DNA/RNA
TF	„transcription factor“ - transkripční faktor
v/w	„volume/weight“ ratio - poměr objem/váha

## 8. Citovaná literatura

- Adams-Phillips, L., Briggs, A.G. and Bent, A.F. (2010) Disruption of Poly(ADP-ribosylation) Mechanisms Alters Responses of Arabidopsis to Biotic Stress. *Plant Physiol.* 152 (1): 267-280.
- Agarwal, P.K., Agarwal, P., Reddy, M.K. and Sopory, S.K. (2006) Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Rep.* 25: 1263-1274.
- Akashi, T., Aoki, T. and Ayabe, S. (2005) Molecular and biochemical characterization of 2-hydroxyisoflavanone dehydratase. Involvement of carboxylesterase-like proteins in leguminous isoflavone biosynthesis. *Plant Physiol.* 137 (3): 882-891.
- Alabi, O.J., Zheng, Y., Jagadeeswaran, G., Sunkar, R. and Naidu, R.A. (2012) High-throughput semence analysis of small RNAs in grapevine (*Vitis vinifera* L.) affected by grapevine leafroll disease. *Mol. Plant Pathol.* 13 (9): 1060-1076.
- Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A.M. and Carrington, J.C. (2005) microRNA-Directed Phasing during *Trans*-Acting siRNA Biogenesis in Plants. *Cell* 121 (2): 207-221.
- Andersen, C.L., Jensen, J.L. and Ørntoft, T.F. (2004) Normalization of Real-Time Quantitative Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Res.* 64 (15): 5245-5250.
- Bauer, J., Chen, K., Hiltbunner, A., Wehrli, E., Eugster, M., Schnell, D. and Kessler, F. (2000) The major protein import receptor of plastid is essential for chloroplast biogenesis. *Nature* 403: 203-207.
- Baumstark, T., Schröder, A., Riesner, D. (1997) Viroid processing: switch from cleavage to ligation is driven by a change from a tetraloop to a loop E conformation. *EMBO J.* 16:599–610.
- Brodersen, P. and Voinnet, O. (2006) The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet.* 22 (5): 268-280.
- Carthew, R.W. and Sontheimer, E.J. (2009) Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136 (4): 642-655.
- Dai, X. and Zhao, P.X. (2011) psRNATarget: A Plant Small RNA Target Analysis Server. *Nucleic Acids Research*, doi: 10.1093/nar/GKR319.

## **Bc. Martin Selinger**

Studium exprese cílových mRNA při pospiviroidní patogenезi v systému „leaf factory“

---

- Daròs, J.A., Marcos, J.F., Hernández, C. and Flores, R. (1994) Replication of avocado sunblotch viroid: Evidence for a symmetric pathway with two rolling circles and hammerhead ribozyme processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12813-12817.
- Delgado, S., Martínez de Alba, A.E., Hernández, C. and Flores, R. (2005): A Short Double-Stranded RNA Motif of *Peach Latent Mosaic Viroid* Contains the Initiation and the Self-Cleavage Sites of Both Polarity Strands. *J. Virol.* 79 (20): 12934-12943.
- Denti, M.A., Boutla, A., Tsagris, M. and Tabler, M. (2004) Short interfering RNAs specific for potato spindle tuber viroid are found in the cytoplasm but not in the nucleus. *Plant J.* 37 (5): 762-769.
- Di Serio, F., Martínez de Alba, A., Navarro, B., Gisel, A. and Flores, R. (2009) RNA-dependent RNA polymerase 6 delays accumulation and precludes meristem invasion of a viroid that replicates in the nucleus. *J. Virol.* 84 (5): 2477–2489.
- Diener, T.O. (1971) Potato spindle tuber “virus” : IV. A replicating, low molecular weight RNA. *Virology* 45: 411-428
- Diermann, N., Matoušek, J., Junge, M., Riesner, D., Steger, G. (2010) Characterization of plant-miRNAs and small RNAs from potato spindle tuber viroid (PSTVd) in infected tomato. *Biol. Chem.* 391:1379–1390
- Ding, B., Kwon, M-O., Hammond, R., Owens, R.A. (1997) Cell-to-cell movement of potato spindle tuber viroid. *Plant Journal* 12: 931–36
- Ding, B., Itaya, A. and Zhong, X. (2005) Viroid trafficking: a small RNA makes a big move. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8 (6): 606-612
- Drummond, A.J., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Cooper, A., Duran, C., Field, M., Heled, J., Kearse, M., Markowitz, S., Moir, R., Stones-Havas, S., Sturrock, S., Thierer, T. and Wilson, A. (2012) Geneious v5.6
- Eigen, M., McCaskill, J. and Schuster, P. (1988) Molecular Quasi-Species. *J. Phys. Chem.* 92: 6881-6891.
- Eiras, M., Nohales, M.A., Kitajima, E.W., Flores, R. and Daròs, J.A. (2010) Ribosomal protein L5 and transcription factor IIIA from *Arabidopsis thaliana* bind *in vitro* specifically *Potato spindle tuber viroid* RNA. *Arch. Virol.* 156: 529-533.
- Expósito-Rodríguez, M., Borges, A.A., Borges-Pérez, A., Pérez, J.A. (2008) Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biol.* 8:131.

**Bc. Martín Selinger**Studium exprese cílových mRNA při pospiviroidní patogenезi v systému „leaf factory“

---

- Flores, R., Delgado, S., Gas, M.E., Carbonell, A., Molina, D., Gago, S., Pena, M. (2004) Viroids: the minimal non-coding RNAs with autonomous replication. *FEBS Letters* 567: 42-48
- Flores, R., Hernández, C., Martínez de Alba, A.E., Daròs, J.-A., Di Serio, F. (2005) Viroids and viroid-host interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 117-139
- Flores, R., Gas, M.E., Molina-Serrano, D., Nohales, M.A., Carbonell, A., Gago, S., De la Peña, M. and Daròs, J.A. (2009) Viroid Replication: Rolling-Circles, Enzymes and Ribozymes. *Viruses* 1: 317-334.
- Fortser, A.C. and Symons, R.H. (1987) Self-cleavage of plus and minus RNAs of a virusoid and structural model for the active sites. *Cell* 49 (2): 211-220.
- Furumizu, Ch., Hirokazu, T. and Komeda, Y. (2010) Characterization of *EMU*, the *Arabidopsis* homolog of the yeast THO komplex member *HPRI*. *RNA* 16 (9): 1809-1817.
- Gadea, J., Mayda, M., Conejero, V. and Vera, P. (1996) Characterization of defense-related genes ectopically expressed in viroid-infected tomato plants. *Mol. Plant Microbe Interact.* 9:409–415
- Gas, M.E., Molina-Serrano, D., Hernández, C., Flores, R. and Daròs, J.A. (2008) Monomeric Linear RNA of *Citrus Exocortis Viroid* from Processing In Vivo Has 5'-Phosphomonoester and 3'-Hydroxyl Termini: Implications for the RNase and RNA Ligase Involved in Replication. *J. Virol.* 82 (20): 10321-10325.
- Gelvin, B.G. (2003) *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67 (1): 16–37
- Gómez, G. and Pallás, V. (2001) Identification of an in vitro ribonucleoprotein complex between a viroid RNA and a phloem protein from cucumber plants. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14 (7): 910–913.
- Gómez, G., Torres, H. and Pallás, V. (2005) Identification of translocatable RNA-binding phloem proteins from melon, potential components of the long-distance RNA transport system. *Plant J.* 41 (1): 107-116.
- Gómez, G. and Pallás, V. (2005) A long-distance translocatable phloem protein from cucumber forms a ribonucleoprotein complex in vivo with Hop stunt viroid RNA. *J. Virol.* 78 (18): 10104–10110.
- Gómez, G., and Pallás, V. (2007) Mature monomeric forms of Hop stunt viroid reset RNA silencing in transgenic plants. *Plant J.* 51 (6): 1041-1049.

- Gómez, G., Martínez, G., Pallás, V. (2008) Viroid-induced symptoms in *Nicotiana benthamiana* plants are dependent of RDR6 activity. *Plant Physiol.* 148: 414–423
- Gómez, G., Martínez, G. and Pallás, V. (2009) Interplay between viroid-induced pathogenesis and RNA silencing pathways. *Trends Plant Sci.* 14 (5): 264-269.
- Góra-Sochacka, A. (2004) Viroids: unusual small pathogenic RNAs. *Acta Biochimica Polonica* 51 (3): 587-607.
- Gozmanova, M., Denti, M.A., Minkov, I.N., Tsagris, M. and Tabler, M. (2003) Characterization of the RNA motif responsible for the specific interaction of potato spindle tuber viroid RNA (PSTVd) and the tomato protein Virp1. *Nucleic Acid Res.* 31 (19): 5534-5543.
- Gruner, R., Fels, A., Qu, F., Zimmat, R., Steger, G. And Riesner, D. (1995) Interdependence of Pathogenicity and Replicability with Potato Spindle Tuber Viroid. *Virology* 209: 60-69.
- Guo, J. and Wang, M.H. (2011) Expression Profiling of the DREB2 Type Gene from Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) under Various Abiotic Stresses. *Hort. Environ. Biotechnol.* 52 (1): 105-111.
- Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W., Semancik, J.S. (2003) Viroids, CSIRO publishing, ISBN 0643067892, p.126-127.
- Haizel, T., Merkle, T., Turck, F. and Nagy, F. (1995) Characterization of membrane-bound small GTP-binding proteins from *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiol.* 108 (1): 59-67.
- Hammond, R.W., Zhao, Y. (2000) Characterization of a tomato protein kinase gene induced by infection by *Potato spindle tuber viroid*. *Mol Plant-Microbe Interact* 13: 903-910.
- Hammond, R.W., Zhao, Y. (2009) Modification of tobacco plant development by sense and antisense expression of the tomato viroid-induced AGC VIIIa protein kinase PKV suggests involvement in gibberellin signaling. *BMC Plant Biology* 9: 108.
- Haynes, J.G., Hartung, A.J., Hendershot, J.D., Passingham, R.S. and Rundle, S.J. (1999) Molecular characterization of the B' regulatory subunit gene family of Arabidopsis protein phosphatase 2A. *Eur. J. Biochem.* 260: 127-136.
- Hendelman, A., Buxdorf, K., Stav, R., Kravchik, M. and Arazi, T. (2012) Inhibition of lamina outgrowth following *Solanum lycopersicum* AUXIN RESPONSE FACTOR 10 (SIARF10) derepression. *Plant Mol. Biol.* 78 (6): 561-576.
- Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J. and Schilperoort, R.A. (1983) A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303: 179-180.

**Bc. Martin Selinger**Studium exprese cílových mRNA při pospiviroidní patogenезi v systému „leaf factory“

---

- Hua, Z. and Kao, T.H. (2006) Identification and characterization of components of a putative petunia S-locus F-box-containing E3 ligase complex involved in S-RNase-based self-incompatibility. *Plant Cell* 18 (10): 2531-53.
- Hutchins, Ch.J., Rathjen, P.D., Forster, A.C. and Symons R.H. (1986) Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sunblotch viroid. *Nucleic Acids Res.* 14 (9): 3627-3640.
- Cheng, Y., Qin, G., Dai, X. and Zhao, Y. (2007) NPY1, a BTB-NPH3-like protein, plays a critical role in auxin-regulated organogenesis in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (47): 18825-18829.
- Islam, M.S. and Wang, M.H. (2009) Expression of dehydration responsive element-binding protein 3 (DREB3) under different abiotic stress in tomato. *BMB Rep.* 42 (9): 611-616.
- Itaya, A., Folimonov, A., Matsuda, Y., Nelson, R.S., Ding, B. (2001) Potato spindle tuber viroid as inducer of RNA silencing in infected tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14: 1332-1334.
- Itaya, A., Matsuda, Y., Gonzales, R.A., Nelson, R.S., Ding, B. (2002) *Potato spindle tuber viroid* strains of different pathogenicity induces and suppresses expression of common and unique genes in infected tomato. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10: 990-999.
- Itaya, A., Zhong, X., Bundschuh, R., Qi, Y., Wang, Y., Takeda, R., Harris, A.R., Molina, C., Nelson, R.S., Ding, B. (2007) A Structured Viroid RNA Serves as a Substrate for Dicer-Like Cleavage To Produce Biologically Active Small RNAs but Is Resistant to RNA-induced Silencing complex-Mediated Degradation. *J. Virol.* 81 (6): 2980-2994.
- Jones, L., Keining, T., Eamens, A. and Vaistij, F.E. (2006) Virus-induced gene silencing of argonaute genes in *Nicotiana benthamiana* demonstrates that extensive systemic silencing requires Argonaute1-like and Argonaute4-like genes. *Plant Physiol.* 141 (2): 598-606.
- Kamauchi, S., Wadahama, H., Iwasaki, K., Nakamoto, Y., Nishizawa, K., Ishimoto, M., Kawada, T. and Urade, R. (2008) Molecular cloning and characterization of two soybean protein disulfide isomerases as molecular chaperones for seed storage proteins. *FEBS J.* 275 (10): 2644-2658.
- Kalantidis, K., Denti, M.A., Tzortzakaki, S., Marinou, E., Tabler, M., Tsagris, M. (2007) Virp1 is a host protein with a major role in *Potato Spindle Tuber Viroid* infection in *Nicotiana* plants. *J Virol.* 81 (23): 12872–12880.
- Karlova, R., Rosin, F.M., Busscher-Lange, J., Parapunova, V., Do, P.T., Fernie, A.R., Fraser, P.D., Baxter, C., Angenent, G.C. and de Maagd, R.A. (2011) Transcriptome and



**Bc. Martin Selinger****Studium exprese cílových mRNA při pospiviroidní patogenězi v systému „leaf factory“**

---

- metabolite profiling show that APETALA2a is a major regulator of tomato fruit ripening. *Plant Cell* 23:923–941.
- Keese, P. and Symons, R.H. (1985) Domains in viroids: Evidence of intramolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 4582-4586.
- Kim, K.N., Cheong, Y.H., Gupta, R. and Luan, S. (2000) Interaction specificity of *Arabidopsis* calcineurin B-like calcium sensors and their target kinases. *Plant Physiol.* 124 (4): 1844-1853.
- Kiss, T., Fayet-Lebaron, E. and Jády, B.E. (2010) Box H/ACA Small Ribonucleoproteins. *Mol. Cell* 37 (5): 597-606.
- Kolonko, N., Bannach, O., Aschermann, K., Hu, K.H., Moors, M., Schmitz, M., Steger, G. and Riesner, D. (2006) Transcription of potato spindle tuber viroid by RNA polymerase II starts in the left terminal loop. *Virology* 347: 392–404.
- Landsberger, M., Lorković, Z.J. and Oelmüller, R. (2002) Molecular characterization of nucleus-localized RNA-binding proteins from higher plants. *Plant Mol. Biol.* 48 (4): 413-421.
- Laurent, F., Labesse, G. and de Wit, P. (2000) Molecular cloning and partial characterization of a plant VAP33 homologue with a major sperm protein domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270 (1): 286-292.
- Lee, L.Y. and Gelvin, S.B. (2008) T-DNA Binary Vectors and Systems. *Plant Physiol.* 146: 325-332.
- Lin, X., Kaul, S., Rounsley, S., Shea, T.P., Benito, M.I. *et al.* (1999) Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 402: 761–768.
- Machida, S., Yamahata, N., Watanuki, H., Owens, R.A. and Sano, T. (2007) Successive accumulation of two size classes of viroid-specific small RNA in potato spindle tuber viroid-infected tomato plants. *J. Gen. Virol.* 88: 3452–3457.
- Maniataki, E., Tabler, M., Tsagris, M. (2003) Viroid RNA systemic spread may depend on the interaction of a 71-nucleotide bulged hairpin with the host protein VirP1. *RNA* 9: 346-354.
- Mantelin, S., Peng, H.C., Li, B., Atamian, H.S., Takken, F.L. and Kaloshian, I. (2011) The receptor-like kinase SISERK1 is required for Mi-1-mediated resistance to potato aphids in tomato. *Plant J.* 67: 459-471.

## **Bc. Martin Selinger**

### Studium exprese cílových mRNA při pospiviroidní patogenězi v systému „leaf factory“

- Martín, R., Arenas, C., Daròs, J.A., Covarrubias, A., Reyes, J.L. and Chua, N.H. (2007) Characterization of small RNAs derived from *Citrus exocortis viroid* (CEVd) in infected tomato plants. *Virology* 367: 135-146.
- Martín-Trillo, M. and Cubas, P. (2010) TCP genes: a family snapshot ten years later. *Trends Plant Sci.* 15 (1): 31-39.
- Martínez de Alba, A.E., Flores, R., Hernández, C. (2002) Two chloroplastic viroids induce the accumulation of small RNAs associated with posttranscriptional gene silencing. *J. Virol.* 76: 13094-13096.
- Martínez de Alba, A.E., Sagesser, R., Tabler, M., Tsagris, M. (2003) A bromodomain containing protein from tomato specifically binds potato spindle tuber viroid RNA *in vitro* and *in vivo*. *J. Virol.* 77 (17): 9685-9694.
- Mathieu-Rivet, E., Gévaudant, F., Sicard, A., Salar, S., Do, P.T., Mouras, A., Fernie, A.R., Gibon, Y., Rothan, C., Chevalier, C., Hernould, M. (2010) Functional analysis of the anaphase promoting complex activator CCS52A highlights the crucial role of endoreduplication for fruit growth in tomato. *Plant J.* 62 (5): 727-741.
- Matoušek, J., Junker, V., Vrba, L., Schubert, J., Patzak, J., and Steger, G. (1999). Molecular characterization and genome organization of 7SL RNA genes from hop (*Humulus lupulus* L.). *Gene* 239: 173 – 183.
- Matoušek, J., Patzak, J., Orctová, L., Schubert, J., Vrba, L., Steger, G. And Riesner, D. (2001) The variability of hop latent viroid as induced upon heat treatment. *Virology* 287: 349-358.
- Matoušek, J., Orctová, L., Steger, G., Škopek, J., Moors, M., Dědič, P., Riesner, D. (2004a) Analysis of thermal stress-mediated PSTVd variation and biolistic inoculation of progeny of viroid „thermomutants“ to tomato and *Brassica* species. *Virology* 323: 9-23.
- Matoušek, J., Orctová, L., Steger, G., Riesner, D. (2004b) Biolistic inoculation of plants with viroid nucleic acids. *J. Virol.* 122: 153-164.
- Matoušek, J., Kozlová, P., Orctová, L., Schmitz, A., Pešina, K., Bannach, O., Diermann, N., Steger, G., Riesner, D. (2007) Accumulation of viroid-specific small RNAs and increase in nucleolytic activities linked to viroid-caused pathogenesis. *Biol. Chem.* 388: 1-13.
- Matoušek, J., Riesner, D., Steger, G. (2012a) Viroids: the smallest known infectious agents cause accumulation of viroid-specific small RNAs. From Nucleic Acids Sequences to Molecular Medicine. *RNA technologies*: 629-644.

- Matoušek, J., Stehlík, J., Procházková J., Orctová, L., Wullenweber, J., Füßy, Z., Kováčik, J., Duraisamy, G. S., Ziegler, A., Schubert, J. and Steger, G. (2012b) Biological and molecular analysis of the pathogenic variant C3 of Potato spindle tuber viroid (PSTVd) evolved during adaptation to chamomile (*Matricaria chamomilla*). *Biol. Chem.* 393 (7): 605-615.
- Matoušek, J., Kocábek, T., Patzak, J., Füßy, Z., Procházková, J. and Heyerick, A. (2012c) Combinatorial analysis of lupulin gland transcription factors from R2R3Myb, bHLH and WDR families indicates a complex regulativ of *chs\_H1* genes Essentials for prenylflavonoid biosynthesis in hop (*Humulus lupulus* L.).
- Matoušek, J., Selinger, M., Füßy, Z., Duraisamy, G.S., Uhlířová, K., Piernikarczyk, R. and Steger, G. (2012d) Pathogenic pospiviroid RNA causes gene dysregulation in plants as detected by quantification of potential mRNA targets of vsRNA-mediated gene silencing. The EMBO Meeting 2012, Nice, France, September 22-25.
- Mayer, K., Schüller, C., Wambutt, R., Murphy, G., Volckaert, G. *et al.* (1999) Sequence and analysis of chromosome 4 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 402: 769–777.
- Mayrose, M., Ekengren, S.K., Melech-Bonfil, S., Martin, G.B. and Sessa, G. (2006) A novel link between tomato GRAS genes, plant disease resistance and mechanical stress response. *Mol. Plant Pathol.* 7 (6): 593-604.
- Motard, J., Bolduc, F., Thompson, D. and Perreault, J.P. (2008) The peach latent mosaic viroid replication initiation site is located at a universal position that appear to be defined by a conserved semence. *Virology* 373: 362-375.
- Motchoulski, A. and Liscum, E. (1999) *Arabidopsis* NPH3: Photoreceptor-Interacting Protein Essential for Phototropism. *Science* 286 (5441): 961-964.
- Navarro, B., Gisel, A., Rodio, M.E., Delgado, S., Flores, R. and Di Serio, F. (2012a) Viroids: How to infect a host and cause disease without encoding proteins. *Biochimie* 94: 1474-1480.
- Navarro, B., Gisel, A., Rodio, M.E., Delgado, S., Flores, R. and Di Serio, F. (2012b) Small RNAs containing the pathogenic determinant of a chloroplast-replicating viroid guide the degradation of a host mRNA as predicted by RNA silencing. *Plant J.* 70: 991-1003
- Navarro, J.A., Vera, A. and Flores, R. (2000a) A Chloroplastic RNA Polymerase Resistant to Targetotoxin Is Involved in Replication of *Avocado Sunblotch Viroid*. *Virology* 268: 218-225.

- Navarro, J.A. and Flores, R. (2000b) Characterization of the initiation sites of both polarity strands of a viroid RNA reveals a motif conserved in sequence and structure. *EMBO J.* 19 (11): 2662-2670.
- Naz, A.A., Raman, S., Martinez, C.C., Sinha, N.R., Schmitz, G. and Theres, K. (2013) *Trifoliolate* encodes an MYB transcription factor that modulates leaf and shoot architecture in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110 (6): 2401-2406.
- Nečásek, J. (1993) Genetika. *Scientia*, 1. vydání, ISBN 80-85827-04-2, 76-77.
- Nelissen, H., De Groeve, S., Fleury, D., Neyt, P., Bruno, L., Bitonti, M.B., Vandenbussche, F., van der Straeten, Yamaguchi, T., Tsukaya, H., Witters, E., De Jaeger, G., Houben, A. and van Lijsebettens, M. (2010) Plant Elongator regulates auxen-related genes during RNA polymerase II transcription elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107 (4): 1678-1683.
- Nohales, M.A., Flores, R. and Daròs, J.A. (2012) Viroid RNA redirects host DNA ligase 1 to act as an RNA ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109 (34): 13805-13810.
- Novatchkova, M., Tomanov, K., Hofmann, K., Stuible, H.P. and Bachmair, A. (2012) Update on sumoylation: defining core components of the plant SUMO conjugation system by phylogenetic comparison. *New Phytol.* 195 (1): 23-31.
- Ori, N., Cohen, A.R., Etzioni, A., Brand, A., Yanai, O., Shleizer, S., Menda, N., Amsellem, Z., Efroni, I., Pekker, I. *et al.* (2007) Regulation of *LANCEOLATE* by *miR319* is required for compound-leaf development in tomato. *Nat. Genet.* 39: 787-791.
- Owens, R.A., Blackburn, M. and Ding, B. (2001) Possible involvement of the phloem lectin in long-distance viroid movement. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14 (7): 905–909.
- Owens, R.A., Hammond, R.W. (2009) Viroid Pathogenicity: One Process, Many Faces. *Viruses* 1: 298-316.
- Owens, R.A., Tech, K.B., Shao, J.Y., Sano, T. and Baker C.J. (2012) Global Analysis of Tomato Gene Expression During *Potato spindle tuber viroid* Infection Reveals a Complex Array of Changes Affecting Hormone Signaling. *Mol. Plant Microbe Interact.* 25 (4): 582-598.
- Papaefthimiou, I., Hamilton, J.H., Denti, M.A., Baulcombe, D.C., Tsagris, M., Tabler, M. (2001) Replicating potato spindle tuber viroid RNA is accompanied by short RNA fragments that are characteristic of post-transcriptional gene silencing. *Nucleic Acids Res.* 29: 2395-2400.

**Bc. Martin Selinger**Studium exprese cílových mRNA při pospiviroidní patogenězi v systému „leaf factory“

---

- Papon, N., Clastre, M., Gantet, P., Rideau, M., Chénieux, J.C. and Crèche, J. (2003) Inhibition of the plant cytokinin transduction pathway by bacterial histidine kinase inhibitors in *Catharanthus roseus* cell cultures. *FEBS Lett.* 537 (1-3): 101-105.
- Park, J.W., Faure-Rabasse, S., Robinson, M.A., Desvoyes, B. and Scholthof, H.B. (2004) The multifunctional plant viral suppressor of gene silencing P19 interacts with itself and an RNA binding host protein. *Virology* 323 (1): 49-58.
- Pendle, A.F., Clark, G.P., Boon, R., Lewandowska, D., Lam, Y.W., Andersen, J., Mann, M., Lamond, A.I., Brown, J.W.S. and Shaw, P.J. (2005) Proteomic Analysis of the *Arabidopsis* Nucleolus Suggests Novel Nucleolar Functions. *Mol. Biol. Cell* 16: 260-269.
- Pezzotti, M., Feron, R., and Mariani, C. (2002) Pollination modulates expression of the PPAL gene, a pistil-specific beta-expansin. *Plant Mol. Biol.* 49: 187–197.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29: 2002-2007.
- Qi, Y. and Ding, B. (2003a) Differential subnuclear localization of RNA strands of opposite polarity derived from an autonomously replicating viroid. *Plant Cell* 15:2566–2577.
- Qi, Y. and Ding, B. (2003b) Inhibition of Cell Growth and Shoot Development by a Specific Nucleotide Sequence in a Noncoding Viroid RNA. *Plant Cell* 15: 1360-1374.
- Qin, Y.F., Li, D.D., Wu, Y.J., Liu, Z.H., Zhang, J., Zheng, Y. and Li, X.B. (2010) Three cotton homeobox genes are preferentially expressed during early seedling development and in response to phytohormone signalling. *Plant Cell Rep.* 29 (10): 1147-1156.
- Qu, F., Heinrich, C., Loss, P., Steger, G., Tien, P. and Riesner, D. (1993) Multiple pathways of reversion in viroids for conservation of structural elements. *EMBO J.* 12 (5): 2129-2139.
- Rehmsmeier, M., Steffen, P., Höchsmann, M. and Giegerich, R. (2004) Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA* 10: 1507-1517.
- Rikhvanov, E.G., Gamburg, K.Z., Varakina, N.N., Rusaleva, T.M., Fedoseeva, I.V., Tauson, E.L., Stupnikova, I.V., Stepanov, A.V., Borovskij, G.B. and Voinikov, V.K. (2007) Nuclear-mitochondrial cross-talk during heat shock in *Arabidopsis* cell culture. *Plant J.* 52: 763-778.
- Rizza, S., Conesa, A., Juarez, J., Catara, A., Navarro, L., Duran-Vila, N. and Ancillo, G. (2012) Microarray analysis of Etrog citron (*Citrus medica* L.) reveals changes in

## **Bc. Martin Selinger**

### Studium exprese cílových mRNA při pospiviroidní patogenězi v systému „leaf factory“

- chloroplast, cell wall, peroxidase and symporter activities in response to viroid infection. *Mol. Plant Pathol.* 13 (8) 852-864.
- Rotenberg, D., Thompson, T.S., German, T.L. and Willis, D.K. (2006) Methods for effective real-time RT-PCR analysis of virus-induced gene silencing. *J. Virol. Methods* 138: 49-59.
- Salanoubat, M., Lemcke, K., Rieger, M., Ansorge, W., Unseld, M. *et al.* (2000) Sequence and analysis of chromosome 3 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 820-822.
- Selinger, M. (2008) Infekční systém pro studium mechanismů viroidní patogeněze. Středoškolská odborná činnost 2007/2008, Obor – biologie.
- Selinger, M. (2011) Aktivace vybraných rostlinných promotorů v systému leaf factory v závislosti na přítomnosti supresorů silencingu a viroidní infekce [Activation of selected plant promoters in leaf factory system dependent on the presence of silencing suppressors and viroid infection, Bc. Thesis, in Czech] – 45 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.
- Schauer, S.E., Jacobsen, S.E., Meinke, D.W., Ray, A. (2002) DICER-LIKE1: blind men and elephants in *Arabidopsis* development. *Trends Plant Sci.* 7: 487-491
- Schindler, I.M. and Mühlbach, H.P. (1992) Involvement of nuclear DNA-dependent RNA polymerases in potato spindle tuber viroid replication: a reevaluation. *Plant Sci.* 84: 221–229.
- Schwind, N., Zwiebel, M., Itaya, A., Ding, B., Wang, M.B., Krczal, G. and Wassenegger, M. (2009) RNAi-mediated resistance to *Potato spindle tuber viroid* in transgenic tomato expressing a viroid hairpin RNA construct. *Mol. Plant Pathol.* 10 (4): 459-469.
- Silhavy, D., Molnar, A., Lucioli, A., Szittya, G., Hornyik, C., Tavazza, M., Burgyan, J. (2002) A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J.* 21: 3070–3080.
- Tabler, M., Tsagris, M. (2004) Viroids: petite RNA pathogens with distinguished talents. *Trends Plant Sci.* 9: 339-348.
- Teune, J. and Steger, G. (2010) NOVOMIR: de novo prediction of microRNA-coding regions in a single plant genome. *J. Nucleic Acids:* 495904.
- Theologis, A., Ecker, J. R., Palm, C. J., Federspiel, N. A., Kaul, S. *et al.* (2000). Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 816-820.
- Thole, J.M., Vermeer, J.E.M., Zhang, Y., Gadella, T.W.J. and Nielsen, E. (2008) *ROOT HAIR DEFECTIVE4* Encodes a Phosphatidylinositol-4-Phosphate Phosphatase Required for proper Root Hair Development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 20: 381-395.

- Tian, M., Win, J., Song, J., van der Hoorn, R., van der Knaap, E. and Kamoun, S. (2007) A *Phytophthora infestans* cystatin-like protein targets a novel tomato papain-like apoplastic protease. *Plant Physiol.* 143 (1): 364-377.
- Tieman, D.M. and Klee, H.J. (1999) Differential expression of two novel members of the tomato ethylene-receptor family. *Plant Physiol.* 120 (1): 165-172.
- Töpfer, R., Matzeit, V., Gronenborn, B., Schell, J., Steinbiss, H.H. (1987) A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucleic Acids Res.* 15: 5890.
- Tuskan, G.A., Difazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I. *et al.* (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313: 1596–1604.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. and Speleman, F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3 (7): research0034.1–0034.11
- Van Engelen, F., Molthoff, J.W., Conner, A.J., Nap, J.P., Pereira, A. and Stiekema, W.J. (1995) pBINPLUS: an improved plant transformation vector based on pBIN19. *Transgenic Res.* 4 (4): 288-290.
- Vargason, J.M., Szittyá, G., Burgyán, J. and Hall, T.M.T. (2003) Size Recognition of siRNA by an RNA Silencing Suppressor. *Cell* 115: 799-811.
- Vidal, A.M., Ben-Cheikh, W., Talón, M., García-Martínez, J.L. (2003) Regulation of gibberellin 20-oxidase gene expression and gibberellin content in citrus by temperature and citrus exocortis viroid. *Planta* 216: 442-448.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., Baulcombe, D. (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* 33: 949-956
- Vrba, L., Matoušek, J. (2005) Expression of modified 7SL RNA gene in transgenic *Solanum tuberosum* plants. *Biologia Plantarum* 49 (3): 371-380
- Wang, M.B., Bian, X.Y., Wu, L.M., Liu, L.X., Smith, N.A., *et al.* (2004) On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 3275–3280.
- Wang, Y., Shibuya, M., Taneda, A., Kurauchi, T., Senda, M., Owens, R.A. and Sano, T. (2011a) Accumulation of Potato spindle tuber viroid-specific small RNAs is accompanied by specific changes in gene expression in two tomato cultivars. *Virology* 413: 72-83.

**Bc. Martin Selinger**

Studium exprese cílových mRNA při pospiviroidní patogenězi v systému „leaf factory“

---

- Wang, Y.H. and Irving, H.R. (2011b) Developing a model of plant hormone interactions. *Plant Signalling and Behavior* 6 (4): 494-500.
- Wassenegger, M., Heimes, S., Riedel, L. and Sänger, H. (1994) RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 76: 567–576
- Wassenegger, M., Spieker, R.L., Thalmeir, S., Gast, F.U., Riedel, L., Sänger, H.L. (1996) A single nucleotide substitution converts potato spindle tuber viroid (PSTVd) from a noninfectious to an infectious RNA for *Nicotiana tabacum*. *Virology* 226: 191–197.
- Wolff, P., Gilz, R., Schumacher, J., Riesner, D. (1985) Complexes of viroids with histones and other proteins. *Nucleic Acids Res.* 13: 355–367.
- Woo, Y.M., Itaya, A., Owens, R.A., Tang, L., Hammond, R.W., Chou, H.C., Lai, M.M.C., Ding, B. (1999) Characterization of nuclear import of potato spindle tuber viroid RNA in permeabilized protoplasts. *Plant J.* 17 (6): 627-635.
- Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. and Anderson, T.A. (2006) Plant microRNA: A small regulatory molecule with big impact. *Dev. Biol.* 289 (1): 3-16.
- Zhong, X., Archual, A.J., Amin, A.A., Ding, B. (2008) A Genomic Map of Viroid RNA Motifs Critical for Replication and Systemic Trafficking. *The Plant Cell* 20: 35-47
- Zhu, Y.L., Green, L., Woo, Y.M., Owens, R., Ding, B. (2001) Cellular basis of potato spindle tuber viroid systemic movement. *Virology* 279 (1): 69-77.
- Zhu, Y.L., Qi, Y.J., Xun, Y., Owens, R., Ding, B. (2002) Movement of potato spindle tuber viroid reveals regulatory points of phloem-mediated RNA traffic. *Plant Physiol.* 130 (1): 138-146.



## 9. Přílohy

### Příloha 1 - seznam použitých primerů

#### a) primery použité při klonování

M13f	5'- GTTGTAACGACGGCCAGT -3'
M13r	5'- CACAGGAAACAGCTATGACC -3'
SMyb-start	5'- ATGTCATCAACATCATCATCTTG -3'
SMyb-stop	5'- TCAAGTGGCTCCTACTCCAAG -3'
SLMybXho	5'- AAACCTCGAGATGTCATCAACATCATCATCTTG -3'
SLMybXba	5'- AAATCTAGATCAAGTGGCTCCTACTCCAAG -3'

#### b) primery pro qRT-PCR analýzu

AGO4-pcr	5'- GCCCGTTGTGATGTTTCGTAAG -3'	
AGO4-rt	5'- AGGGGCCATAGAGGTCAGAGTT -3'	
AP2L-pcr	5'- GTCGGAAATGGGTGGTGTG -3'	
AP2L-rt	5'- GGCTCTTCTTAATAGGCTGCTGTT -3'	
API5-pcr	5'- CACACCCGAGCATCTTTCAA -3'	
API5-rt	5'- CATCCGACAGTCTGCTCATCAA -3'	
ARF10-pcr	5'- ATATGCTGACCCGTGTGCTCTA -3'	
ARF10-rt	5'- GTCCTGCCTGGTTTGATGAAT -3'	
bZIP/HAT5-pcr	5'- AGCAGCTCGAGAGGGATTATG -3'	
bZIP/HAT5-rt	5'- CCTCAGCCTTCACCTTCACTT -3'	
CAK1At-pcr	5'- GATTCTGTCACCGTCGCTCTG -3'	
CAK1At	5'- TTCCCATTTCTTCGCTTCCTTA -3'	
CatB-pcr	5'- GATTCATGCAAGATTCAAGACTCA -3'	
CatB-rt	5'- TTCATCACCACAATTTCCATCATA -3'	
CDC20-pcr	5'- TACAAGTGTTAAATGGGCTCCTG -3'	
CDC20-rt	5'- ATTGGCGATCTCACTCTCACAT -3'	
LE-CIPK-F1	5'- ATGTGGGAGACGAAGATTGTGT -3'	Matoušek <i>et al.</i> , 2012b
LE-CIPK-R1	5'- CTA TAGCTGGCTTTGTTGTTGC -3'	Matoušek <i>et al.</i> , 2012b
CKI1-pcr	5'- TTCTATGCCTGGGATGACTGG -3'	
CKI1-rt	5'- TCGATATTCTTCTCCGTTTCTTTG -3'	
CLV1-pcr	5'- GGAAGTCAAGGATGGGAAGA -3'	
CLV1-rt	5'- TTGCAACACCGAAATCAGAAAC -3'	
CUL1-pcr	5'- GCTGCAATGCTCAAGGACAC -3'	
CUL1-rt	5'- TGGCATAACAGACAACAACACTCAT -3'	
DREB3-pcr	5'- CCTCAACTCCGCCACAAC -3'	
DREB3-rt	5'- TTTCGGATCCAACCTTCTGCT -3'	
eIF3s6-pcr	5'- TTGCTGCGGTACTTGGCTATT -3'	
eIF3s6-rt	5'- TCTTCGCACTCCTTCATCTTCTC -3'	
ELAV-pcr	5'- AAAACTACGCGTGCTTCTCG -3'	
ELAV-rt	5'- TCTTTCCAACCTCGCCATCAG -3'	
ELO1-pcr	5'- TGCCTCTACTTGAACGATGCT -3'	
ELO1-rt	5'- TTTAAAAGGCTGGCGAGAC-3'	

ERF4-pcr 5'- GTATCCGAAATCCGTGAACCTAA -3'  
 ERF4-rt 5'- GTCGGGGCAGTAAATGTGAAA -3'  
 ETR5-pcr 5'- CAGGGAGGCTTCTTGTCTTGTTA -3'  
 ETR5-rt 5'- CCCAGTCTCAGCTCCAGTCTCTA -3'  
 FBA-pcr 5'- ACGGTGAATCTCCTATCTGTTTGA -3'  
 FBA-rt 5'- TCTTTTCCTTGGTTTGCCTCTT -3'  
 GID1L2-pcr 5'- CGGCGATAACGAGGTGGTAG -3'  
 GID1L2-rt 5'- ATGCTCCGCCGTGATAGTAGAC -3'  
 GRAS-pcr 5'- AGCCGGTGGATCTGTCTAAG -3'  
 GRAS-rt 5'- AGGGGTTGAGCAAATGTTCT -3'  
 GTP-pcr 5'- GATTGCCCGGGTTTAGTGTT -3'  
 GTP-rt 5'- GTGGCTCATATGGCTTTGGTT -3'  
 H/ACA1-pcr 5'- ACACAGATTGGGAAAGTTGATGA -3'  
 H/ACA1-rt 5'- CTCCACGTCCACCTCTACCAC -3'  
 CHAPER-pcr 5'- GCTGCCAGTGTCTCGTCTCT -3'  
 CHAPER-rt 5'- AGGCGCGTTTTCTATCGTA -3'  
 KHD-pcr 5'- AGGACTGGGTGGCTGGAG -3'  
 KHD-rt 5'- ATTACCCCTAGGACCGAGAAGT -3'  
 KIP1-pcr 5'- CGTGGTGGTGGGATAGTCAT -3'  
 KIP1-rt 5'- TAGCTCAGGCCTTTTCTTGTAG -3'  
 LEO1-pcr 5'- ACTCGCACCGTTTATTGACTG -3'  
 LEO1-rt 5'- ATGTATTTTCGGCTGACCTTCT -3'  
 MIDAS-pcr 5'- CAGGTATGGGTGAGGGTAGC -3'  
 MIDAS-rt 5'- GAAGACGGCAATGAAGAAAAT -3'  
 MYB-pcr 5'- TTGCTATTTATGGCCCTCAGAA -3'  
 MYB-rt 5'- CTATCATTGCCCATTTGTTACCA -3'  
 NPH3-pcr 5'- ATTTTCAGTGGCGGACGAGA -3'  
 NPH3-rt 5'- GTGACGGGAGCAGGAGGTTA -3'  
 PDI-pcr 5'- CGCGAAGTCCAATTAAGAAACATA -3'  
 PDI-rt 5'- CTCCAGTGACCCCAAATAATC -3'  
 PP2A-pcr 5'- CGGAGACGGTTAAGTGTGCT -3'  
 PP2A-rt 5'- TTCCGACCCAGTGTTCAT -3'  
 PPAL-pcr 5'- GATATGGAAACGACGTAAAGAACC -3'  
 PPAL-rt 5'- CACAAGACCCTGGACACTCATC -3'  
 RabA2-pcr 5'- GTTGGTGCACCTCCTTGTTTATG -3'  
 RabA2-rt 5'- CCTTATCTACGTTGACTGCTTCC -3'  
 RBP1-pcr 5'- TCGTCGTGGTGGTTCAATA -3'  
 RBP1-rt 5'- TTCTCAGCCTCGACAATCTTC -3'  
 REFL-pcr 5'- TTTGGGTTGGATTAGGAAGTG -3'  
 REFL-rt 5'- TAAGTAAAGTGAATGCCCAAACA -3'  
 SAC1-pcr 5'- AGCTGCAATTGGGAAAGACA -3'  
 SAC1-rt 5'- ATTGACCCCTGACCTGAAC -3'  
 SERK1-pcr 5'- GCCTTCTGAACCACCACTTGAT -3'  
 SERK1-rt 5'- CTGGAGCTATATGCCCGATTGT -3'  
 LE-TCP3-F1 5'- TGTATGAAGATTTAGATACCATCA -3'  
 LE-TCP3-R1 5'- ACCAAATTTTGACGATGTTAC -3'

Matoušek *et al.*, 2012b

Matoušek *et al.*, 2012b

TEJ-pcr	5'- TAATCGCTGGCATCCTTTTCTT -3'
TEJ-rt	5'- TTTCCCTGGGCTGCTTAGTG -3'
THO1-pcr	5'- TCCGCAGTATTGAGCACATT -3'
THO1-rt	5'- CACCCGTTTCAGCATCAGTTA -3'
TRANS-pcr	5'- GCGCCTTATGAATCCTGTTT -3'
TRANS-rt	5'- AAGATAGTAGCTCAAGGCCACAG -3'
TTK-pcr	5'- GTCAGCCGTTCCCTTACACTCTC -3'
TTK-rt	5'- GGGGAATTTTCATCTTGGGTCTT-3'
U5_06-pcr	5'- ACGCAGCCACGCAATAAGC -3'
U5_06-rt	5'- TTGTTGGGATTTCTCCCGC -3'
U5_11-pcr	5'- ACGCAGCCACGCAATGAG -3'
U5_11-rt	5'- TTGTTGGGATTTCTCCCTCTAAAA -3'
ULP1-pcr	5'- GGAGGAAACTACCAGAGGATAAG -3'
ULP1-rt	5'- TTCACCGAGATGGCAAAG -3'
VAMP-pcr	5'- TAACGGAGGAGAGCTACTTCAA -3'
VAMP-rt	5'- TGGGCCTTACACAATACTTCTT -3'

c) primery pro housekeeping geny

LE-CAC-F1	5'- CCTCCGTTGTGATGTAAGTGG -3'	Expósito <i>et al.</i> , 2008
LE-CAC-R1	5'- ATTGGTGGAAAGTAACATCATCG -3'	Expósito <i>et al.</i> , 2008
LE-actin-F1	5'- TTCCCTCTATGCCAGTGGAC -3'	
LE-actin-R1	5'- GGCTGTGGTGGTGAAAGAGT -3'	
LE-TIP41-F1	5'- GCTGCGTTTCTGGCTTAGG -3'	Expósito <i>et al.</i> , 2008
LE-TIP41-R1	5'- ATGGAGTTTTTGAGTCTTCTGC -3'	Expósito <i>et al.</i> , 2008
LE-UBI3-F1	5'- ACTCTTGCCGACTACAACATCC -3'	Rotenberg <i>et al.</i> , 2006
LE-UBI3-R1	5'- CTCCTTACGAAGCCTCTGAACC -3'	Rotenberg <i>et al.</i> , 2006
NB-actin-F1	5'- TTCTGTTCCAACCATCAATGA -3'	
NB-actin-R1	5'- GTACCACCCTGAGGACAATGT -3'	
7SL-primer $\alpha$	5'- TGTAACCCAAGTGGGGG -3'	Matoušek <i>et al.</i> , 1999
7SL-primer anti $\beta$	5'- GCACCGGCCCGTTATCC -3'	Matoušek <i>et al.</i> , 1999