

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2012

Bc. Pavel Brázda

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Interakce PSbMV
se specifickými dsRNA molekulami**

Diplomová práce

Bc. Pavel Brázda

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2012

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Milan Navrátil, CSc.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením Prof. RNDr. Milana Navrátila, CSc. s použitím uvedených zdrojů.

V Olomouci

Podpis:

Poděkování:

Chtěl bych poděkovat svému školiteli Prof. RNDr. Milanu Navrátilovi, CSc. za pomoc a rady při tvorbě práce, dále bych rád ocenil pomoc Mgr. Dany Šafářové, Ph.D. a dalších pracovníků Katedry buněčné biologie a genetiky UP Olomouc.

Experimentální práce byly financovány z projektů MSM6198959215 „Variabilita složek a interakcí v rostlinném patosystému a vliv faktorů prostředí na jejich projev“ a LD12071 „Kontrola rostlinných virů pomocí RNA-vakcín“.

SOUHRN

Viry a jejich hostitelé se střetávají ve věčném boji o získání životních výhod, tj. hostitelské resistence a virulence patogena. Mechanismus RNA interference umožňuje rostlinám bránit se vůči virovým infekcím. V současné době je tento mechanismus využíván k navození resistence rostlin vůči danému viru pomocí tzv. RNA-vakcín bez nutnosti jakékoliv manipulace s genetickým materiálem rostliny.

V této práci je testována schopnost dvouvláknových molekul RNA, odvozených od viru mozaiky hrachu přenosné semenem (PSbMV), navodit resistenci vůči danému viru. Z konzervativních oblastí obou kandidátních genů PSbMV, genu pro obalový protein (CP) a genu pro HC proteasu, se podařilo nasyntetizovat dvouvláknové RNA.

Aplikací CP dsRNA na chronicky infikované rostliny hrachu PSbMV došlo k aktivaci umlčujícího signálu jak v dsRNA ošetřeném listu, tak listu neošetřeném. Výsledky ukazují, že relativní koncentrace viru v obou listech se snížila až k 50 % sedmý den po aplikaci dsRNA.

Přídavek dsRNA do inokula mechanickou inokulací neovlivnil. Infiltrací se nepodařilo inokulovat rostliny inokulem, ani inokulem s CP dsRNA.

SUMMARY

Viruses and its hosts engage in the eternal battle to gain reproductive advantage, that is host resistance and virulence of pathogen. Mechanism of RNA interference allows plants to counter-attack viral infections. Nowadays, this mechanism has been utilized to induce resistance in plants against given virus by RNA-based vaccines without a need of any manipulation with plant genetic material.

In this work the ability of double-stranded RNA molecules derived from *Pea seed-borne mosaic virus* is tested to induce resistance against given virus. It was accomplished to produce double-stranded RNAs from conserved regions of two candidate genes, the coat protein gene (CP) and the gene for helper-component protease.

Application of dsRNA into chronically infected pea plants by *Pea seed-borne mosaic virus* caused activation of an silencing signal in either dsRNA-treated, or non-treated leaf. Results show that relative concentration of virus in both leaves was falling to the level of 50% at the seventh day after application.

Addition of dsRNA to inoculum did not affect mechanical inoculation. Inoculum with/without dsRNA applied by infiltration was not able to inoculate plants.

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	CÍLE PRÁCE	10
3	ÚLOHA ARTIFICIÁLNÍCH RNA V INTERAKCI VIRUS – HOSTITEL	11
3.1	Objev RNA interference (RNAi)	11
3.2	Funkce a význam RNA interference	11
3.3	Mechanismus posttranskripčního umlčování	12
3.4	Viry a RNA umlčování genů	18
4	MATERIÁL A METODY	21
4.1	Použité přístroje	21
4.2	Použité chemikálie	21
4.3	Bioinformatická analýza sekvencí	22
4.4	Návrh a hodnocení primerů	23
4.5	Klonování sekvence genu pro obalový protein	23
4.6	Optimalizace „annealing“ teploty a množství templátu PCR reakce	25
4.7	Syntéza dvouvláknové RNA	26
4.8	Stanovení vlivu dsRNA na inokulaci a koncentraci viru	27
4.8.1	Hodnocení vlivu dsRNA na infekci při paralelní aplikaci inokula a dsRNA	28
4.8.2	Hodnocení vlivu dsDNA na chronicky infikované rostliny	28
5	VÝSLEDKY	30
5.1	Bioinformatická analýza sekvencí, návrh a hodnocení primerů	30
5.2	Klonování a optimalizace PCR	36
5.3	Syntéza dvouvláknové RNA	38
5.4	Hodnocení interakce viru a specifických dsRNA molekul	39
5.4.1	Paralelní aplikace inokula a dsRNA	39

5.4.2	Aplikace CP dsRNA po inokulaci rostlin	40
6	DISKUZE	42
7	ZÁVĚR	45
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	46
9	LITERATURA	48
10	PŘÍLOHY	60

1 ÚVOD

Kulturní rostlina je neustále vystavována virovým infekcím. Po napadení rostliny virem dojde často ke dramatickému snížení výnosu, který následně způsobuje nemalé finanční ztráty. V současné době existuje jen málo možností, jak ochránit rostlinu před virem nebo jak ozdravit již napadenou rostlinu.

Ochrana rostliny před virovým patogenem může být docílena klasickým šlechtěním resistantních odrůd, křížovou ochranou, nebo vnesením virového transgenu do genomu rostliny. Při křížové ochraně se plodiny úmyslně inokulují mírným izolátem viru s lehčím průběhem patogeneze, který zatíží rostlinu jen minimálně a poskytuje jí ochranu vůči mnohem agresivnějšímu virovému izolátu. Například u rajčete (*Solanum lycopersicum*) byla takto úspěšně snížena jak koncentrace agresivního izolátu *Pepino mosaic virus*, tak symptomy choroby (Hanssen a kol. 2010).

Rostlina může získat resistenci vůči viru, pokud je transformována sekvencí odvozenou z daného viru. RNA transkript transgenu bývá navržen tak, aby tvořil vlásenku z „sense“ a „antisense“ části sekvence pocházející z virového genomu. Vznik dvouvláknové struktury aktivuje posttranskripční umlčování, které způsobí nárůst resistance vůči danému viru. Jako příklad lze uvést resistenci sóji (*Glycine max*) vůči viru zakrslosti sóji (*Soybean dwarf virus*), kdy tři ze sedmi transformovaných rostlin v T2 generaci nevykazovaly žádné symptomy infekce i po dvou měsících od inokulace (Tougou a kol. 2006).

Novým směrem pro ochranu i pro ozdravování rostlin by mohlo být využití RNA interference – použití syntetických dsRNA jako RNA-vakcín (Valkonen 2009). Aplikací dvouvláknové RNA, připravené proti specifickému virovému patogenu, do hostitele je možné spustit posttranskripční umlčování genů v rostlině. Po jeho aktivaci dojde k blokování replikace viru. Výsledkem je pak zvýšení odolnosti a snížení ztrát rostlin.

2 CÍLE PRÁCE

- Shromáždění literatury a vypracování literární rešerše na téma úloha artifiálních RNA v interakci virus – hostitel.
- Bioinformatická analýza dostupných genomických sekvencí PSbMV. Výběr vhodných genomických segmentů pro syntézu dsRNA, návrh primerů a syntéza dsRNA interferující s PSbMV.
- Studium vlivu syntetických dsRNA na průběh virové infekce.

3 ÚLOHA ARTIFICIÁLNÍCH RNA V INTERAKCI VIRUS – HOSTITEL

3.1 Objev RNA interference (RNAi)

Na počátku minulého století Napoli a kol. (1990) usilovali o zvýšení exprese chalcon syntasy, důležitého enzymu v biosyntetické dráze tvorby antokyanů, s cílem dosáhnout ještě sytější barvy květů u petúnie (*Petunia hybrida*). Oproti očekávání transformované rostliny vykazovaly na květech fenotyp, který se lišil i mezi transformovanými rostlinami. Květy původně tmavé byly s různým rozsahem vyběleny, některé byly dokonce celé bílé. Nečekaný fenomén byl nazván kosupresí. Za objevitele RNA interference se však považují Fire a Mello (1998), kteří při pokusech s *Caenorhabditis elegans* zjistili, že exprese vybraných genů kódujících myofilamentární proteiny se nejvíce sníží při aplikaci dvouvláknové RNA ve srovnání s aplikací jednovláknové RNA „sense“, nebo „antisense“.

3.2 Funkce a význam RNA interference

Později po objevení RNA interference bylo zjištěno, že fenomén RNA interference je poměrně evolučně starý. Podle fylogenetických analýz by mohl být přítomen už u společného předka eukaryot, protože se objevuje u všech eukaryot (Cerutti a Casas-Mollano 2006). Možným důvodem pro tak velké evoluční stáří je využití RNA interference pro kontrolu integrity genomu a regulace aktivity transpozónů. RNA interference také umožňuje buňce kontrolovat genovou expresi (Czech a kol. 2008). Příkladem může být regulace při reakci neuronů sítnice na změnu světla na tmu (Krol a kol. 2010). Hodně studovanou funkcí RNA umlčování genů je obrana rostlin vůči virům. Ratcliff a kol. (1999) prokázali, že RNA umlčování je přirozená odpověď rostlin na infekci virem. Autoři testovali, zda se u rostlin tabáku (*Nicotiana benthamiana*) po inokulaci pseudorekombinovaným virem se sekvencí pro GFP protein aktivuje RNA interference. Skutečně po 8 dnech od inokulace došlo k výraznému snížení fluorescence zprostředkované GFP ve srovnání s výraznou fluorescencí čtvrtý den po inokulaci. Tyto výsledky byly potvrzeny i třicetinásobným poklesem koncentrace virové nukleové kyseliny osmý den po inokulaci v porovnání se

čtvrtým dnem. *Cymbidium ringspot tobusvirus* také nebyl schopen efektivní replikace v mladých listech rostlin po aktivaci protivirové obrany. Pro experiment nebyl použit „wild-type“ virus, ale byl upraven. Do virového genu pro protein potlačující RNA interferenci byly vloženy dva stop kodony, které zamezují expresi genu (Szitty a kol. 2002).

RNA interference popisovaná Ratcliffem a Szittyem se týkala posttranskripčního umlčování genů (PTGS), kdy jsou umlčeny homologní transkripty (Montgomery a kol. 1998). Druhá z drah RNA interference je transkripční umlčování genů (TGS). Transkripční umlčování popisuje situaci, kdy pomocí metylace DNA nastává blokáce transkripce (Susuki a kol. 2005). Stejně tak Sijen a kol. (2000) při studiu dsRNA zprostředkovaném umlčení genů pro pigmentaci květu petúnie (*Petunia hybrida*) potvrzují, že PTGS může být indukováno kódujícími sekvencemi genů, zatímco TGS je vyvoláno homologními sekvencemi promotoru. Transkripční umlčování zprostředkovává RNA-řízená DNA metylace (RdDM). Původní funkce RdDM je obrana proti transpozonomům metylací DNA, kdy se využívá malých RNA transportovaných do jádra, kde spustí DNA metylaci homologní sekvence (Mette a kol. 2000). Posttranskripční ani transkripční umlčování nejsou od sebe striktně oddělené, ale mohou kontrolovat expresi genu zároveň – TGS v jádře a PTGS v cytoplazmě (Alló a kol. 2009). O propojení transkripčního a postranskripčního umlčování se již dříve zmiňují Zilberman a kol. (2004).

Problematická je skutečnost, že termínu RNA interference dávají různí autoři rozdílný obsah. Například Jung a kol. (2011) ji nazývají stejně u rostlin i u živočichů. Hoffer a kol. (2011) ji dělí na transkripční a posttranskripční. Voinnet (2005) používá termín RNA interference jen pro živočichy a PTGS pro rostliny. Mette a kol. (2000) naopak považují RNA interferenci a PTGS za synonyma. Baulcombe (2004) užívá dělení jevu na cytoplazmatické, epigenetické umlčování a umlčování endogenních genů. Někteří autoři rozdělují RNA interferenci i na Dicer-závislou a Dicer-nezávislou (Ketting 2011).

3.3 Mechanismus posttranskripčního umlčování

Posttranskripční umlčování je indukováno dvouvláknovou RNA. Zdroje, ze kterých je dvouvláknová RNA získána, jsou různé. Smith a kol. (2000) publikovali,

že se jim podařilo aktivovat PTGS pomocí exprese transkriptu tvořícího vlásenku. Transformací rostlin konstruktem, nesoucím sekvenci genu NIa proteasy Y viru bramboru v „sense“ a „antisense“ orientaci s vloženým intronem, bylo dosaženo vyšší účinnosti PTGS v umlčení cílového genu v porovnání s konstrukty nesoucími gen pro NIa proteasu pouze „sense“, nebo „antisense“ orientaci. Vysoká účinnost PTGS vyvolaného transformací konstruktem tvořícím vlásenku s intronem byla potvrzena i dalšími autory např. Wesley a kol. (2001). Hu a kol. (2011) transformovali rostliny tabáku (*Nicotiana tabacum*) konstruktem nesoucím sekvence genu pro „movement“ protein viru mozaiky tabáku (TMV) a genu pro replikační protein viru mozaiky okurky (CMV) s vloženým intronem s cílem zvýšit resistenci vůči TMV a CMV. Ve T4 generaci transformovaných rostlin dosáhli kompletní resistance vůči oběma virům.

K aktivaci posttranskripčního umlčování genů rostlin nemusí být transformace nutná. K zastavení či jen snížení exprese genu, tj. jeho knockoutování, stačí aplikovat přímo molekuly dsRNA pomocí mikroinjekce. Liu a kol. (2010) dosáhli čtvrtý den po mikroinjekci dsRNA do hnědého lučního koníka (*Nilaparvata lugens*) redukce exprese genu pro kalretikulin až o 40 %. Zha a kol. (2011) se podařilo snížit expresi genu *Nltry* až o 61 % krměním jeho larev transgenní rýží, exprimující dvouvláknovou RNA vlásenku vůči cílovému genu. Tato aplikace naznačuje nové možnosti pro biotechnologické aplikace dsRNA v krmivu.

Knockoutovat gen lze i za pomoci malých dvouvláknových RNA. Silva a kol. (2010) dokázali potlačit expresi genu *NtCesA-1* v biosyntetické dráze buněčné stěny u rostlinných protoplastů pomocí 22 nukleotidů dlouhé dsRNA.

Jiným způsobem, jak aktivovat PTGS, je použít virem indukované umlčování genu (VIGS). Například Liu a kol. (2002) použili *Tobacco rattle virus* jako vektor, který „dopravil“ kódující sekvenci genu pro fytoen desaturasu do rajčete (*Solanum lycopersicum*). Rostliny od desátého dne měly jasně rozpoznatelný vybělený fenotyp jako důsledek umlčení cílového genu. Podobně byl pro VIGS použit upravený *Turnip crinkle virus* ke snížení exprese genu pro Dicer DCL1 (Dicer-like1) v rostlině *Arabidopsis thaliana*, protože absolutní ztráta genu v embryu může být letální (Qu a kol. 2008).

Zdrojem dvouvláknové RNA pro indukci PTGS může být i virová nukleová kyselina. Podle Haasnoot (2003) nezáleží, jaký typ genomu virus má – RNA interference může působit proti všem typům virového genomu. Tuto skutečnost dokládá řada prací,

kde posttranskripční umlčování viru bylo vyvoláno po infekci hostitele jak viry s genomem ss/dsRNA (Kubota a kol. 2003, Su a kol. 2009), tak viry s genomem ss/dsDNA (Chellapan a kol. 2004, Haas a kol. 2008).

Dvouvláknová RNA může být syntetizována i z tzv. aberantních, tedy nesprávně editovaných jednovláknových RNA transkriptů. Po vytvoření dvouvláknové formy těchto transkriptů je zahájeno RNA umlčování (Wu-Scharf a kol. 2000, Luo a Chen 2007). Příkladem nesprávné editace mRNA je nepřítomnost čepičky. Gazzani a kol. (2004) navrhli, že tato struktura může rozhodovat o tom, zda bude mRNA označena jako aberantní. Jejich tvrzení podpořili výsledky Klahre a kol. (2002), kteří úspěšně aktivovali PTGS v rostlině po biolistickém vnesení jednovláknové RNA. Použité transformované rostliny obsahovaly gen pro tetracyklinový represor a gen pro β -glukoronidasu pod promotorem pro tetracyklin. Biolistickou aplikací jednovláknové RNA došlo k interferenci této RNA a transkriptu tetracyklinového represoru, která umožnila tetracyklinovému promotoru být aktivní a exprimovat β -glukoronidasu.

Přítomnost dvouvláknové RNA bez ohledu na zdroj jejího vzniku je signálem pro aktivaci enzymu Dicer, který je prvním článkem ve sledu reakcí vedoucích k posttranskripčnímu umlčení genu. Bernstein a kol. (2001) jako první identifikovali enzym zodpovědný za katalýzu stříhání dlouhé dsRNA na menší úseky – malé RNA. Enzym degradoval pouze dvouvláknové, nikoliv jednovláknové RNA za spotřeby ATP. Tento enzym, nazývaný Dicer, byl zařazen do RNAase III rodiny, která specificky váže dsRNA, protože obsahuje dsRNA vázající doménu. (St Johnston a kol. 1992, Lamontagne a kol. 2001).

Počet genů kódující Dicer je u živočichů i rostlin různý. Například *Ceanorhabditis elegans* má pouze jeden (Ketting a kol. 2001), *Drosophila melanogaster* kóduje dva geny (Lee a kol. 2004) a u *Arabidopsis thaliana* byly identifikovány čtyři geny kódující Dicer a pojmenovány DCL1 (Dicer-like1) až DCL4 (Schauer a kol. 2002). Každý z nich je více nebo méně specializovaný při výběru templátu pro katalýzu. DCL1 se soustředí na generování miRNA, kdy ztrátou funkce genu (*dcl1*) je ovlivněna akumulace miRNA. Při ztrátě funkce jak DCL2, tak DCL3 genu, tj. u mutantů *dcl2* a *dcl3*, není akumulace miRNA ovlivněna. Produkt DCL3 genu se specializuje na produkci endogenních siRNA transkribovaných v genomu, protože ztráta funkce genu na rozdíl od *dcl1* a *dcl2* vykazuje snížené množství endogenních siRNA pocházejících z 5S rRNA a retroelementu SINE. DCL2 se naproti tomu účastní obrany

při napadení hostitele virem produkcí siRNA. Ztráta jeho funkce vyústí ve zvýšenou citlivost a vnímavost vůči infekci virovým patogenem a zároveň dochází ke zpomalení tvorby „obránných“ siRNA (Xie a kol. 2004). Jiná studie ukazuje, že nejen DCL2 se účastní protivirové obrany, ale že se do obranných reakcí proti viru zapojují i ostatní Dicer; produkty DCL2, 3 a 4 pozitivně přispívají k aktivaci PTGS, naproti tomu DCL1 snižuje expresi DCL3 a působí v antivirové obraně negativně (Qu a kol. 2008).

Maniataki a Mourelatos (2005) objevili u člověka, že Dicer kromě katalytické aktivity funguje jako „podavač“ malých RNA pro další komplex RISC (RNA-induced silencing complex). K vykonávání této funkce interaguje spolu s dalšími proteiny za sestavení RLC komplexu (RISC Loading Complex). Autoři navrhli, že RLC může být sestaven za pomoci „heat-shock“ proteinů. MacRae a kol. (2008) tuto hypotézu vyvrátili, protože se jim podařilo sestavit RLC spontánně *in vitro*. RLC komplex odpovídá za utvoření RISC, který byl poprvé popsán v roce 2000 (Hammond a kol. 2000) u *Drosophila melanogaster*. Změnu RLC na aktivní RISC provází destabilizace duplexu malé RNA a interakce jednoho řetězce malé RNA s AGO (Argonaute) proteinem. Protein s řetězcem se oddělí od zbytku RLC komplexu za aktivace RISC (Maniataki a Mourelatos 2005, MacRae a kol. 2008).

Součástí RISC komplexu nemusí být pouze jeden AGO protein, ale v komplexu může být více typů AGO proteinů (Martinez a kol. 2002). AGO protein může k indukci PTGS použít jak „sense, tak „antisense“ vlákno malé RNA (Elbashir a kol. 2001a), které s ním bude asociovat (Meister a kol. 2004). Výběr řetězce, který bude inkorporován, stejně jako destabilizace duplexu je podmíněna termodynamickými vlastnostmi malých RNA (Khorová a kol. 2003). Schwarz a kol. (2003) zjistili, že nenavázaný řetězec je degradován. Hutvager a Zamore (2002) publikovali výsledky, kde AGO s inkorporovaným řetězcem může buď specificky štípat komplementární sekvenci, nebo „jen“ zastavit translaci na základě komplementarity k cílové sekvenci.

Model pro místně specifické štípání templátu byl navržen Zamore a kol. (2000), kteří zjistili, že fragmenty pocházející z dsRNA, tj. malé RNA, jsou cíleně naváděny na templát a že místa na dsRNA a na cílové molekule si odpovídají. Specifické štípání je upřednostněno za předpokladu vysoké komplementarity inkorporovaného oligonukleotidu, zejména jeho centrální části, a templátu (Elbashir a kol. 2001b).

K represí translace postačuje, když prvních 8 nukleotidů na pátém konci bude interagovat s templátem (Doench a Scharp 2004). Zastavení translace je u mRNA regulováno na třetím nepřekládaném konci. Hybridizací neúplně komplementárních

malých RNA s AGO proteiny dojde k přenosu signálu na polyribosomy, které se oddělí od mRNA. Signál represe translace proběhne v době mezi iniciací a před terminací syntézy polypeptidu. Signifikantně se tedy sníží úroveň proteinu konkrétně luciferasy, ale bez výrazného poklesu hladiny transkripce mRNA pro luciferasu (Petersen a kol. 2006). Wang a kol. (2006) potvrzují tyto výsledky, ale navíc objevili, že pro úspěšnou represi musí být na mRNA přítomna čepička a polyA konec. Umlčování cílové RNA může být zvýšeno samotným prodloužením polyA konce. Wu a kol. (2006) zjistili, že miRNA urychlují odbourávání polyA konce komplementárních mRNA, a tím také jejich degradaci. Nejen ztráta polyA sekvence, ale i nepřítomnost čepičky pozitivně ovlivňuje degradaci mRNA (Behm-Ansmant a kol. 2006).

Komplementarita sekvencí mezi inkorporovaným oligonukleotidem a cílovou sekvencí není to jediné, co rozhoduje, zda nastane specifické štípání, nebo represe translace. Důležitý je právě i průvodce, AGO protein, který bude interagovat s malou RNA. AGO proteiny se totiž od sebe liší biologicky i biochemicky. Při studiu tří savčích AGO proteinů zjistili Liu a kol (2004), že pouze jediný má katalytickou aktivitu specificky štípat templát po inkorporaci malé RNA. Ze čtyř AGO proteinů u savců (Carmell a kol. 2002) je schopen této aktivity pouze AGO2. U octomilky (*Drosophila melanogaster*) mají „slicer“ aktivitu oba AGO1 i AGO2 (Miyoshi a kol. 2005). Z deseti AGO proteinů u *Arabidopsis thaliana* (Carmell a kol. 2002) specificky štípe cílovou RNA jen AGO1 (Baumberger a Baulcombe 2005).

AGO proteiny mají i jiné funkce, než je specifické štípání. Například AGO4 se účastní RNA-řízené DNA metylace a za jeho pomoci jsou umlčovány repetitivní sekvence v genomu *Arabidopsis* (Zilberman a kol. 2003, Qi a kol. 2006). AGO6, AGO9 a AGO4 představují blízce příbuznou skupinu AGO proteinů a všechny zodpovídají za transkripční umlčování. Nicméně, jak ukázali Havecker a kol. (2010), mezi AGO6, AGO9 a AGO4 jsou rozdíly v tkáňové specifitě.

Prozatím byla popisována tvorba primárních malých RNA při RNA umlčování. Signál k umlčení může být amplifikován produkcí sekundárních malých RNA pomocí RNA-dependentní RNA polymerasy (RdRp). RNA-dependentní RNA polymerasa byla identifikována u rostlin (Dalmay a kol. 2000), hub (Cogoni a Macino 1999), hlístic (Smardon a kol. 2000) a hmyzu (Liopardi a Paterson 2009). Enzym je důležitý pro rostlinu v protivirové obraně (Yu a kol. 2003). RdRp syntetizuje z jednovláknové RNA dvouvláknovou za použití primerů, ale může amplifikovat dsRNA i bez primeru (Schiebel a kol. 1993). Funkci RdRp v RNA interferenci (RNAi) pro syntézu duplexu

z templátu potvrzují Sijen a kol. (2001). Autoři zjistili, že sekvence jedné skupiny malých primárních RNA byla odvozená z vnesené dsRNA, zatímco druhá skupina nemůže být přímo odvozena z vloženého templátu. Indukce RNAi je u sekundárního typu silnější a, jak bylo zjištěno Aoki a kol. (2007), druhotné malé RNA se liší od primárních trifosforylací na 5' koncích.

Snad nejznámější dva typy malých RNA jsou siRNA a miRNA. Chemická struktura obou typů malých RNA je stejná (Llave a kol. 2002, Tang a kol. 2003), ale tradičně jsou rozlišovány vzhledem ke svému původu. Malé RNA odvozené z vnějšího zdroje dsRNA nebo z virové nukleové kyseliny se nazývají siRNA (Marques a kol. 2010). Poprvé byly siRNA popsány v roce 1999 (Hamilton a Baulcombe 1999) u rostlin. Termín siRNA byl použit spolu s objasněním struktury až v roce 2001 (Elbashir a kol. 2001a). Strukturou siRNA molekuly je dvouvláknová oligonukleotidová sekvence o délce cca 22 nukleotidů s přesahy 2 nukleotidů u obou řetězců, kde 5' konec řetězce je zakončený fosfátovou skupinou a 3' konec hydroxylovou. Li a kol. (2005) popsali, že duplexy jak u siRNA, tak u miRNA jsou na koncích metylovány metyltransferasou HEN1. Přidáním metylové skupiny se zabrání uridinaci, která může být také značkou pro aktivaci exonukleasové aktivity nutné k degradaci samotných malých RNA, jako je tomu u produktů specifického štípání dlouhé templátové RNA (Shen a Goodman 2004). V kontrastu se vžitým pojmenováním pro siRNA pro jejich mimobuněčný původ, byly popsány i endo-siRNA, které jsou naproti tomu produkovány jako ochrana genomu proti retroelementům a transpozonům (Xie a kol. 2004).

Druhým typem malých RNA jsou miRNA. První popsanou miRNA byla lin-4 regulující vývoj u *Caenorhabditis elegans* (Lee a kol. 1993). Tyto malé RNA narozdíl od siRNA (s výjimkou endogenních siRNA) mají endogenní původ a byly nalezeny v intragenových a intergenových oblastech (Lagos-Quintana a kol. 2001, Rodriguez a kol. 2004, Gu a kol. 2006, Corcoran a kol. 2009). Transkripce miRNA genů je uskutečněna pouze polymerasou II ve formě pri-miRNA s čepičkou a polyA koncem (Cai a kol. 2004, Lee a kol. 2004). Pri-miRNA je v jádře sestříhána RNAasou III nazývanou Drosha do cca 70 nukleotidů dlouhé vlásenkové pre-miRNA (Basyuk a kol. 2003, Lee a kol. 2003). Knockoutováním enzymu Drosha došlo k nárůstu pri-miRNA a poklesu pre-miRNA. Denli a kol. (2004) ukázali, že Drosha vykonává svou funkci v komplexu spolu s proteinem Pasha schopným vázat dvouvláknovou RNA. U *Drosophila melanogaster* Drosha interaguje s proteinem Pasha, zatímco u člověka funkci proteinu Pasha vykonává DGCR8 (Han a kol. 2004, Landtaler a kol. 2004).

U rostlin nebyl protein Drosha identifikován (Lee a kol. 2003, Kurihara a Watanabe 2004). Jeho funkci při tvorbě pre-miRNA z pri-miRNA plní Dicer DCL1 (Kurihara a Watanabe 2004). Po první editaci je pre-miRNA transportována z jádra do cytoplazmy pomocí jaderného exportního proteinu, exportinu-5, za účasti Ran-GTP kofaktoru (Yi a kol. 2003). V cytoplazmě jsou tyto prekurzory dále sestříhány do zralých miRNA Dicerem (Grishok a kol. 2001). Saito a kol. (2005) ukázali, že u *Drosophila melanogaster* má ztráta Diceru (Dicer-1) stejné výsledky na biogenezi miRNA, a tím i na regulaci exprese u genů, jako ztráta proteinu Logs, který s ním asociuje v komplexu. Navázáním jednovlákn z zralé miRNA do RISC a vyhledáním cílového templátu jsou kontrolovány hlavně endogenní geny. Například miR-1 a miR-133 řídí proliferaci a diferenciaci kosterních svalů (Chen a kol. 2006). U *Arabidopsis thaliana* je důležitá miR160, která kontroluje vývoj embrya, kořene, květu a vegetativní části (Mallory a kol. 2005).

3.4 Viry a RNA umlčování genů

Malé RNA slouží jako mechanismus, který umožňuje rostlinám i živočichům bránit se napadení virem. Viry se naopak snaží RNA interferenci inaktivovat. Jednou možností je interakce virových proteinů s proteiny podílejícími se na mechanismu RNAi. Například *Flock house virus* indukuje silný signál k aktivaci RNA umlčování, ale antivirová obrana je záhy efektivně potlačena supresorem RNAi kódovaným virem (Li a kol. 2002). Virovými supresory mohou být virové strukturální (Qu a kol. 2003) i nestrukturální proteiny (Fenner a kol. 2006). Supresory mohou interagovat s RNAi na úrovni protein-protein nebo protein-nukleová kyselina. Supresory cílí nejen nukleové kyseliny v RNAi, ale i proteiny AGO a Dicer.

Prvním identifikovaným supresorem byla HC proteasa (Anandalakshmi a kol. 1998) u potyvírů. HC proteasa (HC-pro) se účastní mnoha funkcí zpracování polyproteinu, amplifikace genomu, přenosu viru na dlouhé vzdálenosti po rostlině a přenosu viru mšicemi (Kaschau a kol. 1997). HC-pro spolu s P1 proteasou ovlivňuje metabolismus malých RNA (Kaschau a kol. 2003). Chapman a kol. (2004) upřesnili působení obou virových proteinů. Podle nich P1 proteasa/HC-pro inhibuje rozvinutí duplexu malých RNA a sestavení komplexu RISC. Z testovaných supresorů v této práci byl HC-pro jeden z nejsilnějších v porovnání s p21 a p19. Problematika

s HC-pro jako supresoru je mnohem složitější, protože některé potyviry jako například *Cucumber vein yellowing virus*, který postrádá celou sekvenci pro HC-pro. Namísto toho obsahuje duplikovaný gen pro P1 proteasu (Valli a kol. 2006), která zastupuje funkci HC-pro jako supresoru (Valli a kol. 2008).

Kanazawa a kol. (2011) zjistili, že 2b protein *Cucumber mosaic virus* (CMV) ovlivňuje lokalizaci malých RNA a podporuje epigenetické změny v genomu hostitele. Virus tak nejenom potlačil obranu hostitele, ale navíc začal kontrolovat a měnit expresi hostitelských genů.

V2 supresor *Tomato yellow leaf curl virus* soutěží s SGS3 o vazbu na dsRNA. Interakce SGS3 a RNA-dependentní RNA polymerasy je důležitá pro antivirovou obranu u rostlin, proto supresor V2 rychlejší asociací s dsRNA zbavuje SGS3 substrátu (Fukunaga a Douts 2008).

Supresor P0 *Beet western yellows polerovirus* působí v potlačování RNAi jinak než např. p19 u tombusvirů. Přestože nebrání komplexu RISC ve specifickém degradování templátu, zabraňuje nové asociaci mi/siRNA a AGO1. Navíc supresor P0 posílá AGO1 polyubiquitinací k degradaci do proteosomu (Csorba a kol. 2010).

Dalším příkladem supresoru je p19 protein tombusvirů. Tento protein sice není důležitý pro replikaci a transkripci virové nukleové kyseliny, ale patrně se uplatňuje při šíření viru a rozvinutí symptomů (Scholthof a kol. 1995). Nedávno bylo za použití modelu objasněno, jak p19 interferuje s RNAi (Rawlings a kol. 2011). Celý model je popisován enzymovou kinetikou. Supresor p19 zároveň interaguje s RISC komplexem, který postupně destabilizuje, tak i s Dicerem, se kterým soutěží o siRNA. Po interakci supresoru s Dicerem s navázanou siRNA komplex disociuje s reversibilně navázanou siRNA na supresor. Následně se supresor odpoutá od siRNA za vzniku její volné varianty, která může soutěžit s p19, Dicerem a RISC. Model proto dostal název „chytň a pusť“ (catch and release). Neustálý rychlý obrat v asociaci a disociaci těchto proteinů způsobí, že virus drží krok s obranou hostitele (Rawlings a kol. 2011).

Virus nemusí útočit jen na RISC, ale cílem může být i Dicer. Dicer DCL4 u *Arabidopsis thaliana* je zodpovědný za antivirovou obranu a tvorbu siRNA, supresor P38 z *Tobacco crinkle virus* interferuje primárně právě s tímto proteinem a vyřazuje jej z funkce (Deleris a kol. 2006).

Nedávné výzkumy vrhají jiné světlo na interakci mezi hostitelem a virem, viry nepotlačují obranu hostitele nejen supresory RNAi, ale i malými virovými RNA. Epstein-Barrové virus (EBV), herpesviry a pravděpodobně i jiné DNA viry kódují

ve svém genomu virové miRNA, které regulují expresi jak hostitelských, tak virových genů (Pfeffer a kol. 2004). Nedávno byly odhaleny další virové miRNA u EBV, které umožňují viru ovlivnit expresi genů u hostitele. Exprese proteinů je hlavně zasažena v drahách buněčného cyklu, apoptosy a vrozené imunity a naproti tomu interakce virové miRNA s mRNA zvýhodní virovou patogenezí a lymfogenezi, virovou latenci nebo přežití buněk (Skalsky a kol. 2012).

Lidský cytomegalovirus (HCMV), patřící mezi herpesviry, také působí na hostitele pomocí miRNA a obdobně jako EBV vyřazuje vrozenou imunitu. Malá RNA HCMV pod označením hcmv-miR-UL112 je schopna potlačit expresi jednoho proteinu (řetězec B) z histokompatibilního komplexu I. Jinými slovy, virová miRNA zamezí předání signálu o napadení hostitele k „Natural Killer Cells“, členům imunitního systému, kteří by za normálního stavu buňku „usmrtili“ (Stern-Ginissar a kol. 2007).

Malé virové RNA mohou být homologní k hostitelské mRNA, a tak umlčovat expresi stejných transkriptů. Patrně je pak pro virus jednodušší jen využít již existující dráhu regulace genů. Například virová miR-K12-11 (z viru Kaposiho sarkomu) a buněčná miR-155 jsou prokazatelně homologní a mohou ovlivňovat stejné geny (Skalsky a kol. 2007).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Použité přístroje

Spektrofotometr	Nanodrop 1000, Thermo Scientific, Biotech
Laminární box	PV-100, Telstar, Life Sciences
Termostat	TH-30 Edmund Bühler GmbH, Trigon Plus
Termoblok	dri-block DB-2D, Techne
Minitřepačka	MS231, IKA Works, Inc.
Centrifugy	C1301 B-230 V EU Spectrafuge mini 24D, Labnet International, Inc. Universal 32, Hettich
Vortex	MS1 Minishaker, IKA®
Termocykler	Rotor Gene RG-3000A, Corbet research TGradient, Biometra
Horizontální elektroforéza	Fisherbrand
Zdroj stejnosměrného napětí	Power Pack P 25, Biometra
UV transluminátor	G:BOX, Syngene
Mikrovlnná trouba	

4.2 Použité chemikálie

5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galaktopyranosid, B9146 (Sigma-Aldrich)
Agarosa 1, Biotechnology Grade, cat. no. 0710-500G (Amresco)
Ampicilin, 96%, cat. no. A9393 (Sigma-Aldrich)
AMV reverzní transkriptasa, cat. no. M510A (Promega)
Etanol, p.a. (Lachema)
Ethidium Bromid, cat. no. R034 (G Biosciences), pracovní koncentrace 2,5 mg/ml
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, cat. no. SM0241 (Thermo Scientific, Fermentas)
GeneRuler™ 100 bp plus DNA Ladder, cat. no. SM0321 (Thermo Scientific, Fermentas)
GelRed™, cat. no. 41003 (Biotium)

Glycerol, p.a. (Lachema)
 GoTaq™ DNA Polymerase, cat. no. M3001 (Promega)
 Isopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosid, I5502 (Sigma-Aldrich)
 Izopropanol, p.a. (Lachema)
 NucleoSpin® RNA Plant, cat. no. 740949.10 (Macherey-Nagel)
 pGEM®-T Vector System, cat. no. A3600 (Promega)
 PSbMV ELISA kit, cat. no. 07030 (Loewe Biochemica)
 QIAprep® Spin Miniprep kit, cat. no. 207106 (QIAGEN)
 QIAquick® Qiagen gel extraction kit, cat. no. 28704 (QIAGEN)
 Recombinant RNasin®, cat. no. N2511 (Promega)
 Replicator™ RNAi, cat. no. F-610 (Finnzymes)
 Luria-Bertani médium (1 l) 10 g Kasein hydrolyzát
 5 g Kvasničný autolyzát
 10 g NaCl
 16-18 g Agar (tuhé LB)
 pH 7,2-7,4, uchovávat při 4 °C
 TAE pufr (1 l): 40 mmol/l Tris-báze, pH 7,8
 10 mmol/l octan sodný
 1 mmol/l EDTA
 28 mmol/l kyselina octová

4.3 Bioinformatická analýza sekvencí

Z genomu viru mozaiky hrachu přenosné semenem byly pro syntézu dvouvláknové RNA vybrány dva kandidátní geny, gen pro obalový protein (CP) a gen pro HC proteasu (HC-pro). Pro oba geny byly shromážděny dostupné sekvence z databáze GenBank, které byly doplněny sekvencemi dodanými pracovníky Laboratoře molekulární biologie mikroorganismů. „Alignment“ sekvencí byl sestaven v programu MEGA 4.0 (Tamura a kol. 2007). „Neighbour-Joining“ analýza všech sekvencí obou analyzovaných genů byla provedena za standardního nastavení programu MEGA 4.0. U obou kandidátních genů byl stanoven DNA polymorfismus sekvencí pomocí programu DnaSP 4.10.3 (Rozas a kol. 2003), a to u sekvencí všech patotypů

a u sekvencí patotypu P1. Na základě analýzy polymorfismu obou genů byly vybrány konzervativní oblasti pro návrh primerů.

4.4 Návrh a hodnocení primerů

Primery pro CP i HC-pro byly navrhovány v programu Primer-BLAST (Rozen a kol. 2000) na sekvenci genu pro obalový protein a HC proteasu izolátu PSB117 řazenému k patotypu P1. U obou genů bylo vynecháno prvních 150 bazí, kde sekvence analyzovaných izolátů vykazovaly nejvyšší polymorfismus DNA. Velikost PCR produktu byla nastavena na 500 nt, optimální velikost primeru na 20 nt, optimální „melting“ teplota (T_M) primeru na 58 °C a minimální obsah GC párů bazí na 60 %. Jeden pár primerů amplifikující gen pro HC-pro byl navíc poskytnut MSc. Andreou Tripepim.

Specifita „forward“ a „reverse“ primeru pro CP a HC-pro byla porovnáována se všemi sekvencemi izolátů patotypů P1 až P4.

Z deseti navržených primerů pro CP i pro HC-pro byly vybrány čtyři páry primerů nejlépe splňující zadané parametry. K jejich 5' koncům byly přidány promotorové sekvence pro T7 polymerasu a phi6 RNA replikasu, které jsou potřebné k syntéze dsRNA pomocí kitu ReplicatorTM RNAi (Finnzymes) a potom byla provedena jejich detailní analýza. Analýza dimerů, vlásenek a „melting“ teploty (T_M) byla provedena v programu Oligoanalyzer 3.1 (IDT Sci tools, <http://eu.idtdna.com>). V případě HC-pro byl navíc analyzován po přidání promotorových sekvencí pár primerů dodaný MSc. Andreou Tripepim. Parametry pro finální výběr primerů byly nastaveny podle manuálu pro návrh primerů (www.premierbiosoft.com). Byly tolerovány hodnoty ΔG homo/heterodimerů do -6 kcal/mol a vlásenek do -3 kcal/mol. Primery, které nejvíce odpovídaly těmto parametrům, byly vybrány pro syntézu dsRNA.

4.5 Klonování sekvence genu pro obalový protein

Plazmid s inzertem CP musel být teprve připraven, zatímco plazmid obsahující HC-pro sekvenci byl dodán pracovníky laboratoře. Pro získání CP inzertu byla pomocí kitu NucleoSpin[®] RNA Plant (Macherey-Nagel) izolována celková RNA ze 70mg listu hrachu (*Pisum sativum*) infikovaného izolátem viru PSB117 (potvrzeno DAS-ELISA

testem). Koncentrace a kvalita celkové RNA byla změřena spektrofotometricky na Nanodropu.

RT-PCR reakce byla provedena v objemu 40 μ l. Reakce obsahovala 195 ng celkové RNA, 0,5 μ M T18 primer (5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'), 1x pufr pro RT, 10 U AMV reverzní transkriptasy, 40 U RNasin, 0,625 mM dNTP a variabilní množství DEPC vody. Primer, templát a DEPC voda byly smíchány v objemu 15 μ l, ke směsi byl přidán minerální olej a roztok byl inkubován při teplotě 70 °C po dobu 5 min. Po inkubaci byl roztok chlazen na ledu po dobu 5 min a doplněn do celkového objemu 40 μ l směsí AMV RT pufru, dNTP, inhibitoru RNasin, reverzní transkriptasou a DEPC vodou. Reakce byla inkubována při 42 °C 1 hod.

Amplifikace cDNA byla provedena v reakčním objemu 20 μ l s primery p9502 (5'-GCGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3', van der Vlugt a kol. 1999) a PSbMV8812Up (5'-TTGAGAAATACACGGAAGC-3', Šafářová a kol. 2008). Reakční směs obsahovala destilovanou vodu, 1x Go Taq pufr, 1,5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTP, 0,5 μ M primery, 1 U Go Taq polymerasy a 2 μ l jednovláknové cDNA. Program PCR amplifikace byl 2 min při 94 °C, 31x: 1 min při 94 °C, 1 min při 47 °C, 2 min při 72 °C se závěrečnou elongací 10 min při 72 °C. Amplifikovaný úsek měl velikost 1136 nt, který zahrnuje na 5' konci část sekvence *Nib* genu, celý CP a 3' UTR. Přítomnost pozitivního produktu byla ověřena elektroforetickou separací na 1% agarovém gelu v 1x TAE pufru s fluorochromem GelRedTM (2 μ l fluorochromu do 50 ml gelu) při napětí 90 V po dobu 30-40 min.

Zbytek PCR produktu byl elektroforeticky separován na 1% agarosovém gelu v 1x TAE pufru s ethidium bromidem (4 μ l pracovního roztoku fluorochromu na 50 ml gelu) při 90 V. Po separaci byl PCR produkt přečištěn pomocí QIAquick[®] Qiagen gel extraction kitu (QIAGEN).

Purifikovaný produkt byl zaligován do vektoru pGEM-T při 4 °C/noc podle návodu výrobce (pGEM[®]-T Vector System, Promega). Změněn byl pouze objem přidaného vektoru pGEM-T, který byl snížen o polovinu.

Transformace kompetentních buněk *E. coli* kmene JM109 a DH5 α plazmidem se zaligovaným inzertem PSB117 CP byla provedena tepelným šokem dle návodu výrobce.

Bílé kolonie JM109 a DH5 α kultivované přes noc při 37 °C byly otestovány pomocí colony PCR se standardními primery M13 (Promega) („forward“: 5'-GTAAAACGACGGCCA-3', „reverse“: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). Objem

reakční směsi byl 20 µl. Reakční směs obsahovala sterilní PCR vodu, 1x Go Taq pufr, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 0,2 µM primer F/R, 1 U Go Taq polymerasy. Templátem pro reakci byl vzorek odebrané kolonie. Podmínky PCR byly 5 min 94 °C, 31x: 1 min 94 °C, 1 min 55 °C, 1,5 min 72 °C se závěrečnou elongací 7 min při 72 °C. Výsledek amplifikace byl vyhodnocen po elektroforetické separaci produktů na 1% agarosovém gelu v 1x TAE pufru s flurochromem GelRedTM. Positivní kolonie byly inkubovány přes noc při 37 °C na plotně s LB médiem a ampicilinem (konečná koncentrace 100 µg/ml) v aseptických podmínkách.

Pro zamražení bakterií nebo izolaci plazmidu byly kolonie po kultivaci přeneseny párátkem do 10 ml tekutého LB média s ampicilinem v Erlenmayerově baňce a dále inkubovány při 37 °C přes noc. V případě volby zamražení bylo 0,85 ml bakteriální suspenze smícháno s 0,15 ml 100% glycerolu a roztok byl uložen do -80 °C. V případě izolace plazmidu byly použity 2 ml bakteriální suspenze 5 JM109 na izolaci pomocí QIAprep[®] Spin Miniprep kitu (QIAGEN). Postup byl proveden podle návodu výrobce. Změna protokolu byla pouze u vymývání nukleové kyseliny z frity, kdy namísto dodávaného pufru byla použita sterilní PCR voda. Koncentrace a čistota plazmidové DNA byla změřena spektrofotometricky na Nanodropu.

Kultivace bakteriálních kolonií obsahující plazmid s HC-pro se na rozdíl od plazmidu s CP lišila. Kultivace probíhala v 2ml mikrozkuvkách typu Eppendorf. Izolace plazmidu byla provedena ze 4 ml bakteriální suspenze v 2ml mikrozkuvkách typu Eppendorf pomocí kitu QIAprep[®] Spin Miniprep kitu (QIAGEN).

4.6 Optimalizace „annealing“ teploty a množství templátu PCR reakce

U vybraných kombinací primerů byla pomocí gradientové PCR optimalizována „annealing“ teplota pro syntézu templátu nezbytného pro přípravu dsRNA. Reakce byla provedena v objemu 20 µl. Složení reakční směsi bylo 1x Go Taq pufr, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 0,5 µM primery pro amplifikaci CP segmentu PSB117cp0_F/R a pro amplifikaci HC-pro segmentu PSB117HCPro0_F/R, 1 U Go Taq polymerasy a 46 ng plazmidu se segmentem CP genu, respektive 62 ng plazmidu se segmentem HC-pro genu. Program gradientové PCR byl 30 s při 98 °C, 35x: 20 s při 98 °C, 20 s při 55 °C (gradient 20 °C), 45 s při 72 °C se závěrečnou elongací 5 min při 72 °C. Gradient „annealing“ teploty byl: 45,5 °C; 49,0 °C; 53,8 °C; 58,6 °C; 63,1 °C a 65,0 °C.

PCR produkty byly separovány v 1% agarosovém gelu v 1x TAE pufru s fluorochromem GelRed™ při napětí 80 V.

Optimální množství plazmidového templátu do reakce bylo analyzováno dekadickým naředěním obou plazmidů. Reakční směs o objemu 20 µl byla složena z 1x Go Taq pufru, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 0,5 µM primeru F/R (PSB117PSBcp0_F/R, respektive PSB117HCPro0_F/R), 1 U Go Taq polymerasy. Koncentrace templátu v reakci byla od 10 ng do 0,0001 pg. Podmínky PCR amplifikace byly 30 s při 98 °C, 35x: 20 s při 98 °C, 20 s při 58 °C, 45 s při 72 °C se závěrečnou elongací 5 min při 72 °C. PCR produkty byly separovány v 1% agarosovém gelu v 1x TAE pufru s fluorochromem GelRed™ při napětí 80 V.

4.7 Syntéza dvouvláknové RNA

Syntéza dvouvláknové RNA (dsRNA) byla provedena podle návodu výrobce kitu Replicator™ RNAi (Finnzymes) a „Training School“ manuálu „Double-stranded RNA production for plant biotechnology“ (Bamford 2009). Dvouvláknová DNA byla získána PCR amplifikací 1 ng plazmidového templátu CP, nebo HC-pro. Reakční směs o objemu 50 µl obsahovala DEPC vodu, 1x Phusion HF pufr, 200 µM dNTP, 0,5 µM primeru F/R (PSB117cp0_F/R, respektive PSB117HCPro0_F/R), 1 U Phusion HF polymerasy. Program PCR amplifikace byl 30 s při 98 °C, 35x: 20 s při 98 °C, 20 s při 58 °C, 45 s při 72 °C se závěrečnou elongací 5 min při 72 °C.

PCR produkty byly separovány na 1% agarosovém gelu v 1x TAE pufru s ethidium bromidem (na 70 ml gelu 6 µl pracovního roztoku ethidium bromidu) při napětí 80 V cca 40 min. Přečištění produktů bylo provedeno pomocí QIAquick® Qiagen gel extraction (QIAGEN). DNA byla rozpuštěna ve 30 µl DEPC sterilní vody. Koncentrace DNA byla změřena na spektrofotometru Nanodrop 1000.

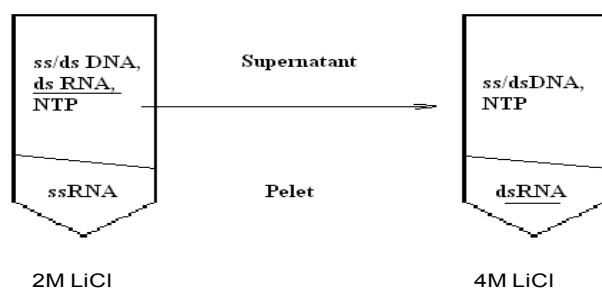
Reakční směs pro syntézu dsRNA byla připravena (Tab. 1) při laboratorní teplotě ve flowboxu. Do reakce o objemu 50 µl bylo použito 1 µg purifikovaného dsDNA PCR produktu CP, nebo HC-pro. Reakce probíhala v parafilmu utěsněné 0,6ml mikrozkušavce typu Eppendorf v termobloku při 35 °C/noc (tj. 18 hod).

Tab. 1: Složení reakční směsi pro dsRNA syntézu CP a HC-pro segmentu

Složka	μl /test
Sterilní destilovaná DEPC voda	x
10x dsRNA synthesis pufr	5
5x ribonukleotidy (NTP) - mix	10
dsDNA PCR produkt (1 μg)	y
50 mM chlorid manganatý	1,5
Pyrofosfatasa	1
T7 RNA polymerasa	1,5
phi6 RNA polymerasa	1,5
Celkový objem	50 μl

Purifikace dsRNA produktu byla provedena precipitací s chloridem litným podle přiloženého návodu u kitu s výjimkou promývání dsRNA peletu, kde doba centrifugace byla prodloužena na 10 min. Precipitace je založena na rozdílné precipitaci nukleových kyselin na základě různé koncentrace chloridu litného (Schéma 1). Všechny reakce jsou prováděny (s výjimkou vysušení peletu) na ledu a ve flowboxu. Zachycené frakce, tj. nepurifikovaná dsRNA reakce, ssRNA a purifikovaná dsRNA, byly pro ověření výsledku reakce a purifikace elektroforeticky separovány na 1% agarosovém gelu v 1x TAE pufru s fluorochromem GelRedTM při napětí 80 V cca 40 min.

Schéma 1: Precipitace nukleových kyselin pomocí LiCl



Jednovláknová RNA precipituje při 2 molární koncentraci LiCl, zatímco dsRNA se sráží při 4 molární koncentraci. Nukleotidy a DNA nejsou LiCl precipitovány vůbec.

4.8 Stanovení vlivu dsRNA na inokulaci a koncentraci viru

Rostliny hrachu (*Pisum sativum* L.) odrůdy Bohatýr byly kultivovány ve fytokomoře v podmínkách uvedených v článku Smýkal a kol. (2010). Po dvou týdnech růstu v komoře byly provedeny dva různé experimenty s použitím CP dsRNA.

4.8.1 Hodnocení vlivu dsRNA na infekci při paralelní aplikaci inokula a dsRNA

Inokulum pro mechanický i infiltrační způsob aplikace bylo připraveno homogenizací rostlinného materiálu s fosfátovým pufrům o pH 8 (0,01 M) v poměru 1:1 (tj. 440 mg : 440 µl) na ledu. Homogenát byl centrifugován 5 min při 8060 rpm a 4 °C. Pro inokulaci byl použit supernatant. Připravené inokulum bylo chlazeno na ledu a muselo být spotřebováno do 15 min.

Prvním způsob aplikace inokula s/bez CP dsRNA byl mechanický. Všechny čtyři listy prvního a druhého patra u 10 kontrolních i u 10 testovaných rostlin byly poprášeny karborundem. Na karborundem ošetřený list bylo napipetováno 10 µl inokula u kontrolních rostlin a v případě testovaných 10 µl inokula s 4 µl CP dsRNA. Roztok byl posléze rozetřen prstem a po 3 min byl list opláchnut vodou. Na jednu testovanou rostlinu bylo použito celkem 60 ng CP dsRNA.

Druhý způsob aplikace inokula a CP dsRNA je infiltračně pomocí injekční stříkačky. Mezi žilky jednoho listu ve 2. patře bylo vtlačeno 10 µl inokula u kontrolních rostlin, nebo 10 µl inokula s 4 µl CP dsRNA u testovaných. Na 1 rostlinu bylo použito 60 ng CP dsRNA.

Rostliny po inokulaci byly umístěny do fytokomory s fotoperiodou 16/8 den/noc při teplotě 22/18 °C. Po třech týdnech byly všechny rostliny otestovány DAS-ELISA testem (Loewe Biochemica). DAS-ELISA byla provedena při těchto ředěních: ředění potahovacích protilátek 200x, homogenizace vzorku 1:10 (list : pufr), ředění značených protilátek 200x, barvení – 1 mg pNPP v 1 ml substrátového pufru. Vyhodnocení reakce bylo provedeno po 1, 2 a 24 hod.

4.8.2 Hodnocení vlivu dsDNA na chronicky infikované rostliny

U 30 testovaných rostlin byla provedena standardní mechanická inokulace (Šafářová a kol. 2008) izolátem PSB117 viru mozaiky hrachu přenosné semenem. Po 3 týdnech byly rostliny otestovány na přítomnost PSbMV DAS-ELISA testem (Loewe Biochemica), všechny rostliny byly pozitivní na infekci. Po čtyřech týdnech bylo do 25 rostlin vtlačeno infiltrační pomocí injekce po 60 ng CP dsRNA mezi žilky třetího a čtvrtého listu shora. Rostliny byly rozděleny do skupin po pěti pro každý den odběru. Odebírán byl druhý list a čtvrtý list shora po prvním, druhém,

třetím, sedmém a desátém dni od aplikace. Spolu s testovanými rostlinami byly stejným způsobem odebírány listy infikovaných a zdravých rostlin. Získané listy byly uschovány při -80 °C. Izolace celkové RNA ze vzorků listů byla provedena pomocí kitu NucleoSpin[®] RNA Plant (Macherey-Nagel). Pro kvantitativní analýzu byly všechny vzorky izolované RNA naředěny 10x. Kvantitativní RT-PCR reakce o objemu 20 µl byla připravena podle Tab. 2. Pro kvantifikaci PSbMV byly použity primery navržené Mgr. Danou Šafařovou (PSBcpF: 5'-CAAAGGCGGAATGGCTATCA-3'; PSBcpR: 5'-ACCCCGTACTCTTGCGACACT-3'), které amplifikují úsek CP genu o velikosti 132 nt. Amplikace kontrolního genu pro β-tubulin byla provedena pomocí primerů navržených Die a kol. (2010) (bTubF: 5'-GCTCCCAGCAGTACAGGACTCT-3', bTubR: 5'-TGGCATCCCACATTTGTTGA-3). Profil Q-RT-PCR pro obě kombinace primerů je uveden v Tab. 3.

Tab. 2: Složení mixu u Q-RT-PCR

Složky	Zásobní konc.	Konečná konc.	µl/test
QRT SybrMix	2x	1x	10
DEPC voda			6,5
F primer	20 pmol/µl	0,1 µM	0,1
R primer	20 pmol/µl	0,2 µM	0,2
Enhancer	1,25/25 µl		1
Enzyme mix	0,25/25 µl		0,2
Vzorek			2 µl
Celkový objem			20 µl

Tab. 3: Profil Q-RT-PCR pro obě kombinace primerů

PSBcpF/R			bTubF/R		
Teplota	Doba	Počet cyklů	Teplota	Doba	Počet cyklů
42 °C	25 min		45 °C	30 min	
95 °C	15 min		95 °C	15 min	
95 °C	30 s	40x	95 °C	20 s	45x
55 °C	30 s		55 °C	20 s	
72 °C	30 s		72 °C	20 s	
72-95 °C	45 s (1. cyklus), další 5 s		72-95 °C	45 s (1. cyklus), další 5 s	

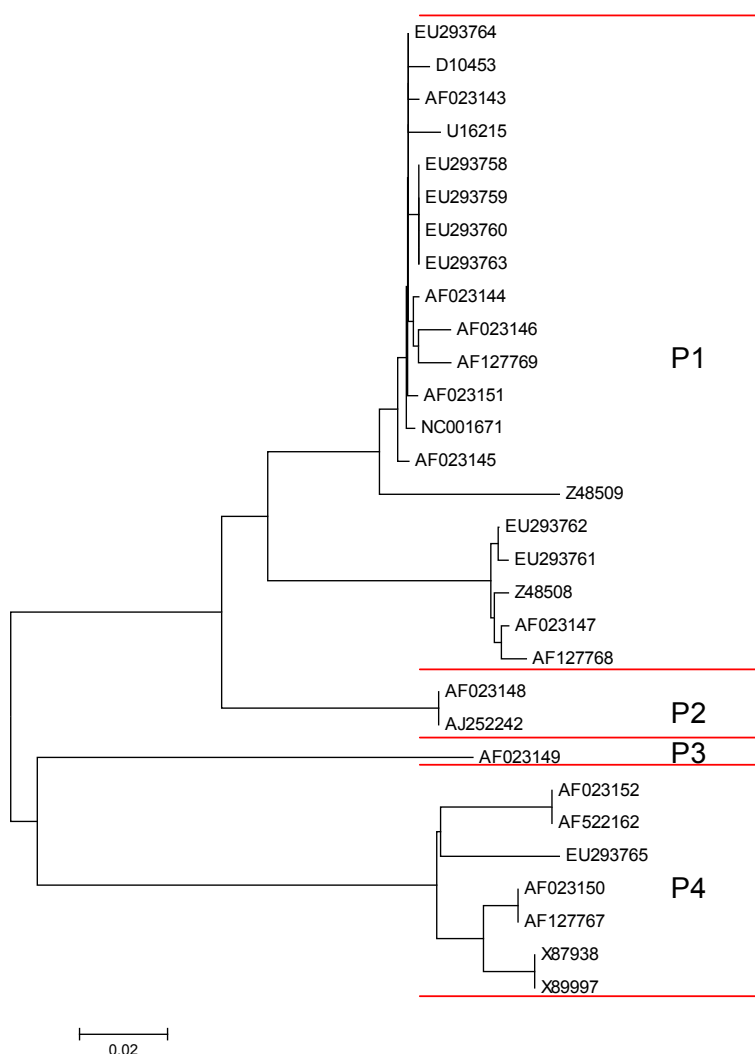
Relativní koncentrace viru, v ošetřených/neošetřených listech odebraných ve stejný den v daném místě, byla stanovena pomocí metody $2^{-\Delta\Delta Ct}$ podle Livaka (Livak a kol. 2001). Ke stanovení relativní koncentrace byl použit referenční gen β-tubulin. Statistická analýza dat byla provedena ve statistickém programu multifaktoriální analýzy ANOVA 5.0.

5 VÝSLEDKY

5.1 Bioinformatická analýza sekvencí, návrh a hodnocení primerů

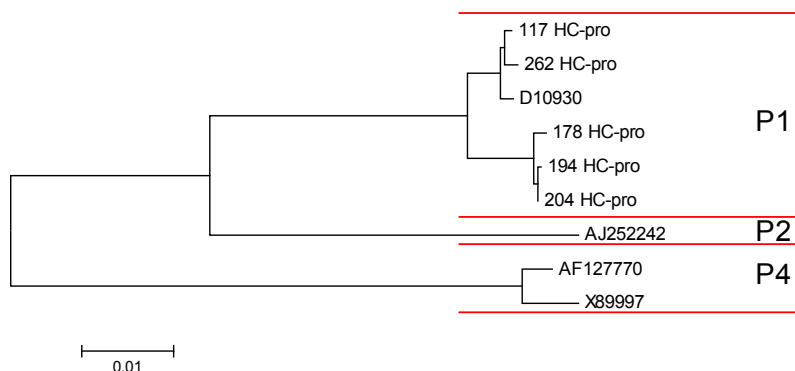
Pro experimenty byly vybrány dva kandidátní geny – gen pro obalový protein (CP) a pro HC proteasu (HC-pro). Sekvence pro oba geny viru mozaiky hrachu přenosné semenem (PSbMV) byly seřazeny v programu MEGA 4.0. Po sestavení „alignmentu“ byly sekvence izolátů PSbMV rozděleny na základě fylogenetické příbuznosti pomocí „Neighbour-Joining“ analýzy. Vytvořené skupiny izolátů odpovídaly patotypům P1 až P4 (Obr. 1 a 2).

Obr. 1: Fylogenetická analýza CP pomocí „Neighbour-Joining“ metody



Vysvětlivky: P1 až P4 – patotyp P1 až P4, úsečka znázorňuje počet substitucí nukleotidů na pozici

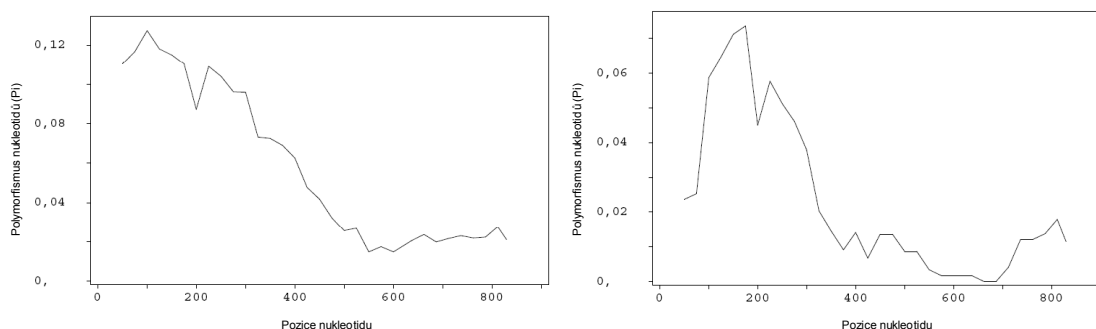
Obr. 2: Fylogenetická analýza HC-pro pomocí „Neighbour-Joining“ metody



Vysvětlivky: P1 až P4 – patotyp P1 až P4, úsečka znázorňuje počet substitucí nukleotidů na pozici

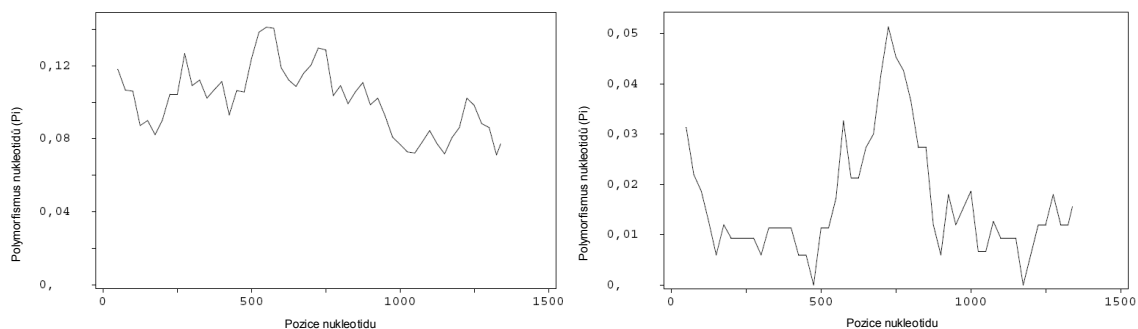
DNA polymorfismus CP a HC-pro genů byl vyhodnocen v programu DnaSP 4.10.3. U genu pro obalový protein je největší DNA polymorfismus s P_i indexem cca 0,13 na 5' konci jeho sekvence a naopak nejmenší na 3' konci sekvence s P_i indexem 0,02 (Obr. 3 vlevo). Polymorfismus byl vyhodnocen samostatně u izolátů patotypu P1, protože do této skupiny patří izolát PSB117, na který budou navrhovány primery (Obr. 3 vpravo). U izolátů patotypu P1 je opět na 5' konci sekvence CP P_i index vysoký (až cca 0,08) a na 3' konci nízký cca 0,005. Variabilita nukleotidů u sekvence genu pro HC-pro je po celé délce sekvence vysoká s P_i indexem 0,08 až 0,14 (Obr. 4 vlevo). Polymorfismus HC-pro sekvence izolátů patotypu P1 (Obr. 4 vpravo) je očekávaně nižší s maximální hodnotou P_i indexu 0,05 s určitým platem (P_i index = 0,01) v úseku od 150 do 500 nt.

Obr. 3: DNA polymorfismus CP patotypů P1-P4 (nalevo) a patotypu P1 (napravo)



Vysvětlivky: P_i – P_i index

Obr. 4: DNA polymorfismus HC-pro patotypů P1, P2 a P4 (nalevo) a patotypu P1 (napravo)



Vysvětlivky: Pi – Pi index

Na základě stanovení DNA polymorfismu byly primery pro amplifikaci CP segmentu navrženy na 3' konci sekvence v oblasti od 400 nt do 873 nt. V případě HC-pro byl z důvodu vysokého polymorfismu sekvence (Pi index = 0,08-0,14) zvolen pro návrh primerů úsek plata s nižším polymorfismem, a to od 125 nt do 500 nt.

Z deseti navržených párů primerů v programu Primer-BLAST byly u obou kandidátních genů vybrány čtyři páry, které po přidání promotorových sekvencí pro phi6 replikasu a T7 polymerázu byly hodnoceny v programu OligoAnalyzer 3.1. V případě primerů amplifikujících CP segment nastaveným parametrům nejvíce odpovídal pár PSB117cp0_F/R (Tab. 4, 5a, b), který byl použit pro následnou syntézu dsRNA. Primery PSB117cp0_F/R se liší v T_M jen o 3,3 °C. Tato hodnota je podle manuálu tolerována. Velikost jejich amplikonu je 502 bp (promotory nejsou započítány).

V případě primerů amplifikujících segment HC-pro nebyly parametry splněny u žádného ze čtyř párů, proto byl otestován pár navržených primerů od MSc. Andrey Tripepiho. Tento pár primerů PSB117HCPro0_F/R (Tab. 4, 5a,b) se nejvíce blížil požadovaným parametrům, proto byly použity k syntéze HC-pro dsRNA. Primery PSB117HCPro0_F/R se na rozdíl od páru primerů PSB117cp0_F/R liší v T_M o 8,6 °C a amplifikují úsek o velikosti 357 bp (promotory nejsou započítány).

Tab. 4: Sekvence použitých primerů pro syntézu dsRNA

Název primeru	Sekvence 5' - 3'	Velikost (nt)
PSB117cp0_F	TAATACGACTCACTATAGGGAGCAACGCAGAGCCAGTTCG	40
PSB117cp0_R	GGAAAAAATGCTGTGTGCCTCTCCGTGT	29
PSB117HCPro0_F	TAATACGACTCACTATAGGGACTATGTTGGAGGAATCAC	39
PSB117HCPro0_R	GGAAAAAATTGCCGCTAAAATACTA	26

Vysvětlivky: Sekvence promotorů pro T7 polymerasu a phi6 replikasu jsou vyznačeny žlutě

Tab. 5a: Vlastnosti navržených primerů

Název primeru	Melting teplota T_M (°C)	Obsah GC párů bází (%)	Start*	Amplikon (bez promotorů)
PSB117cp0_F	66,3	50,0	324	502
PSB117cp0_R	63,0	48,3	825	
PSB117HCPro0_F	61,5	41,0	80	357
PSB117HCPro0_R	52,9	30,8	436	

Vysvětlivky: * nasedání primeru na příslušné sekvenci genu z dat referenční sekvence DPD1

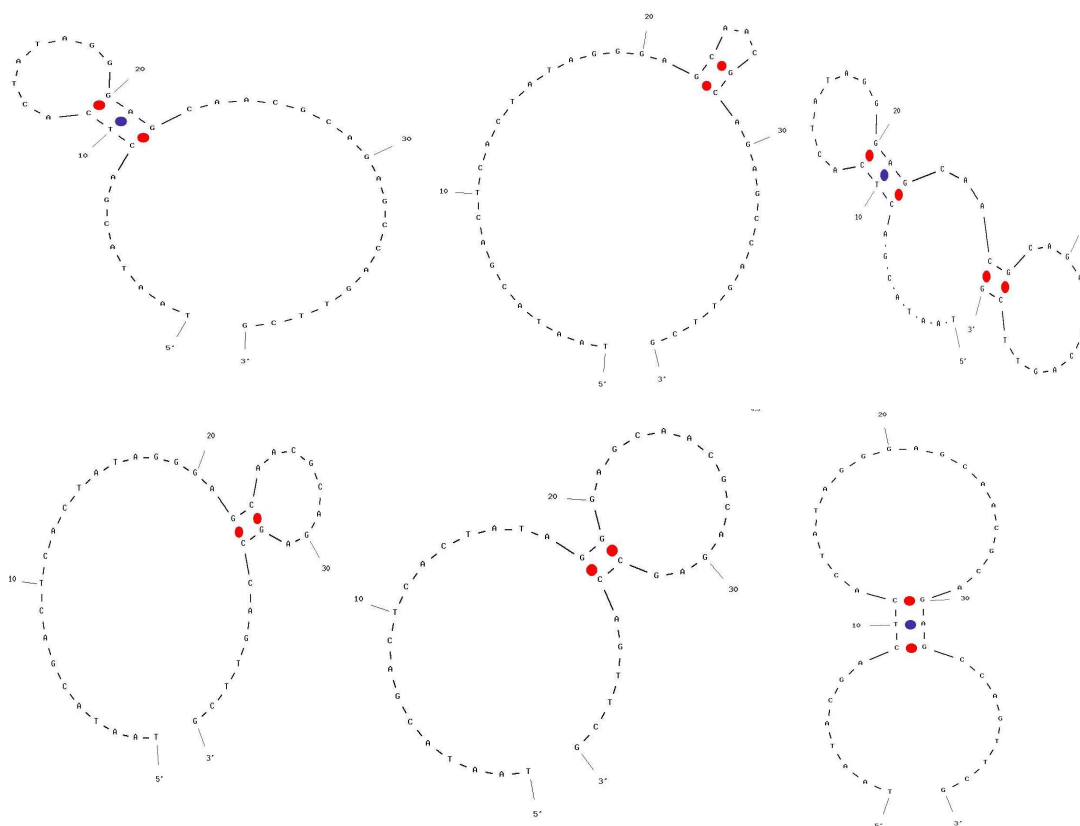
Tab. 5b: Vlastnosti navržených primerů – pokračování

Název primeru	ΔG Homodimer (kcal/mol)		ΔG Heterodimer (kcal/mol)		Vlášenska	
	od	do	od	do	ΔG (kcal/mol)	Struktury
PSB117cp0_F	-6,59	-0,96	-6,69	-1,34	-0,36 až 0,44	Obr.5, 6
PSB117cp0_R	-4,64	-1,47			-0,95	
PSB117HCPro0_F	-6,59	-1,6	-3,61	-0,96	-3,21	Obr.7
PSB117HCPro0_R	-5,36	-0,96			0,72 až 1,55	Obr.8

Vysvětlivky: ΔG – Změna Gibbsovy energie

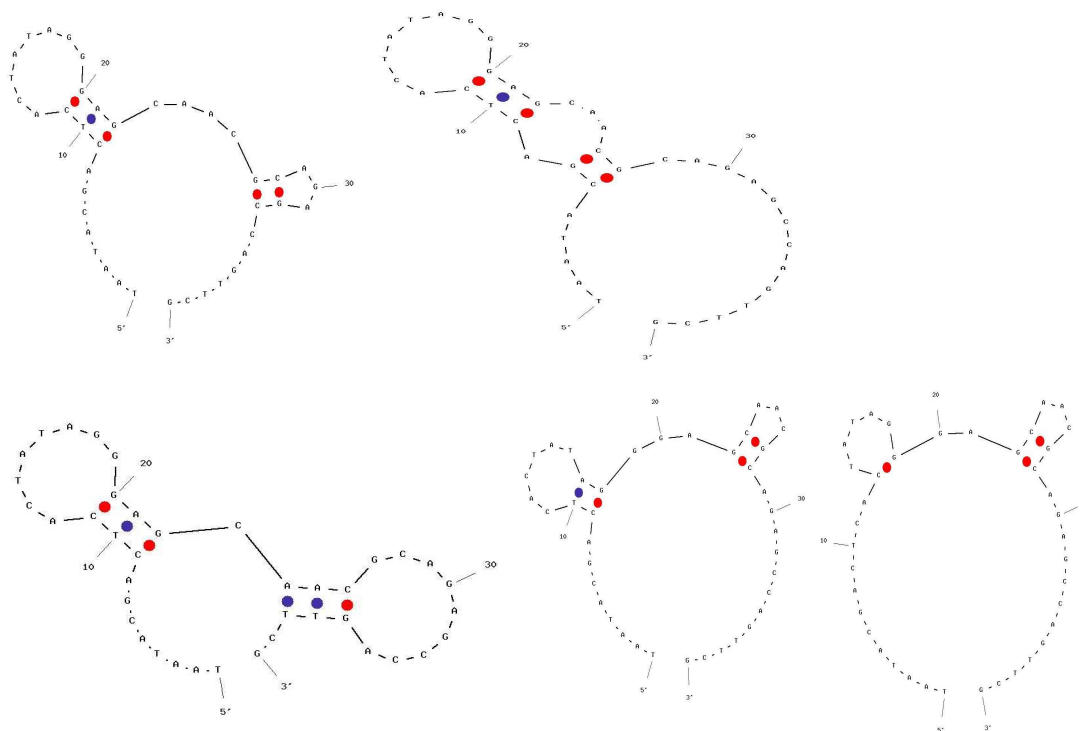
Vlásenky, které jsou tvořeny oběma páry primerů, jsou uvedeny v Tab. 4b. Jejich struktury jsou znázorněny na Obr. 5, 6, 7, 8. Primer PSB117cp0_F tvoří 11 vlásenek, PSB117HCPro0_R čtyři, PSB117cp0_R a PSB117HCPro0_F jednu.

Obr. 5: Struktury vlásenek u primeru PSB117cp0_F



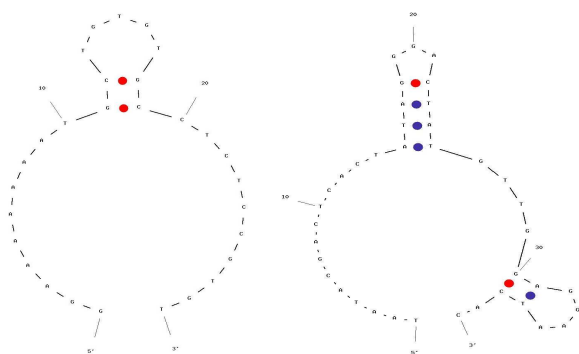
Vysvětlivky: Změna Gibbsovy energie ΔG (kcal/mol) zleva doprava: -0,36, -0,23, -0,1, 0,09, 0,12, 0,23

Obr. 6: Struktury vlásenek u primeru PSB117cp0_F



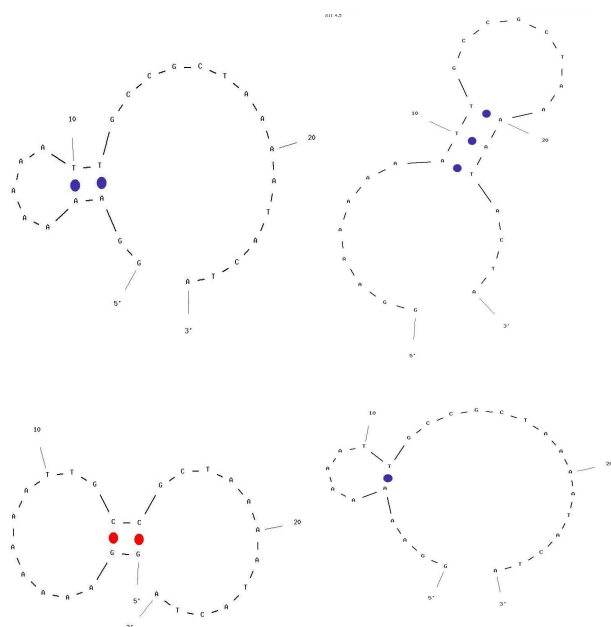
Vysvětlivky: Změna Gibbsovy energie ΔG (kcal/mol) zleva doprava: 0,25, 0,26, 0,28, 0,42, 0,44

Obr. 7: Struktury vlásenek u primerů PSB117cp0_R a PSB117HCPro0_F



Vysvětlivky: Změna Gibbsovy energie ΔG (kcal/mol) zleva doprava: -0,95 PSB117cp0_R,
-3,21 PSB117HCPro0_F

Obr. 8: Struktury vlásenek PSB117HCPro0_R



Vysvětlivky: Změna Gibbsovy energie ΔG (kcal/mol) zleva doprava: 0,72, 1,24, 1,48, 1,55

Vybrané primery obou kandidátních genů byly hodnoceny z hlediska komplementarity k různým patotypům v programu MEGA 4.0 (Tab. 6). Úspěšná amplifikace sekvencí u CP i HC-pro patotypu P1 je vysoce pravděpodobná. Naopak málo pravděpodobná je amplifikace u ostatních patotypů. Důvodem jsou substituce na 3' konci v místě nasedání „forward“ primeru u CP a v místě nasedání „reverse“ primeru u HC-pro.

Tab. 6: Nekomplementární místa v cílové cDNA u různých patotypů

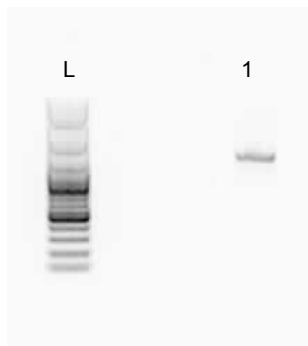
Název primeru	Patotyp	Nekomplementární místa v cílové cDNA (5'-3')
PSB117cp0_F	P1	AGCAACGCAGAGCCAGTTCG
	P1 – Z48509	AGCAACGCAAAGCCAGTTCG
	P2	AGCAACACAAAGCCAGTTTG
	P3	TGCAACA CAGAGTCAA TTTG
	P4	CGCAACA CAGAGCCAA TTTG
	P4 – EU293765	CGCAACA CAGAA CCAA TTTG
PSB117cp0_R	P1	TGCTGTGTGCCCTCTCCGTGT
	P1 – EU293762	TGCTGTGTGCCACTCCGTGT
	P2	TGCTGTGTGCCCTCTCCGTGT
	P4	TGCTGTGTGCCCTCTCCGTGT
PSB117HCPro0_F	P1	ACTGTGTTGGAGGAATCAC
	P1 – PSB117	ACTATGTTGGAGGAATCAC
	P2	AATGTGTGGAGGAATCAC
	P4 – AF127770	AGTGTGTGGGGATCAC
	P4 – X89997	AGTGTGTGGAGGAATCAC
PSB117HCPro0_R	P1	TTGCCGCTAAAAATACTA
	P2	TTGCCGCTAAAAATGCAA
	P4	GC GCCGC AAAA C G C A A

Vysvětlivky: Substituce v cílové cDNA jsou vyznačena žlutě

5.2 Klonování a optimalizace PCR

HC-pro plazmid byl dodán pracovníky laboratoře. Plazmid s CP inzertem musel být připraven. Inzert CP byl amplifikován pomocí RT-PCR. Přítomnost produktu o velikosti 1136 bp byla následně ověřena separací na 1% agarosovém gelu (Obr. 9). Amplikon byl na kolonce přečištěn pomocí QIAquick® Qiagen gel extraction kitu (QIAGEN).

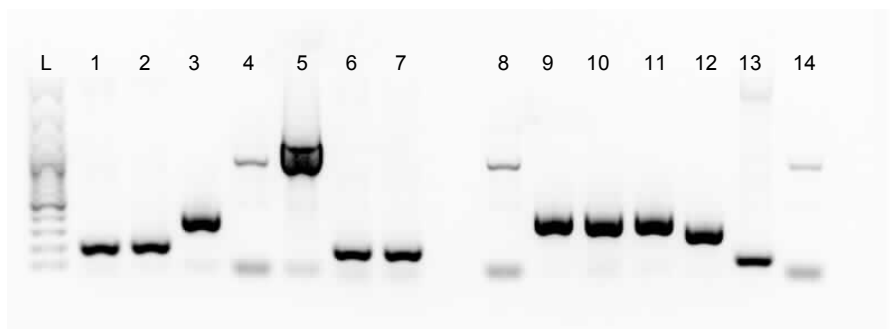
Obr. 9: Elektroforetická separace RT-PCR produktu CP



Vysvětlivky: L – GeneRuler™ 100 bp plus DNA Ladder, 1 – RT-PCR produkt

Purifikovaný PCR produkt CP byl zaligován do vektoru pGEM-T a použit k transformaci kompetentních bakterií *E. coli* kmene JM109 a DH5 α . Úspěšnost ligace a transformace u bakteriálních kolonií byla ověřena pomocí colony PCR s primery M13. Očekávaný pozitivní produkt reakce měl cca 1300 bp (Obr. 10). Z 14 testovaných kolonií na byly pozitivní kolonie č. 4 a 5 u kmene JM109 a č. 8 a 14 u kmene DH5 α . Purifikací 2 ml bakteriální suspenze namnožené v Erlenmayrově baňce (kolonie 5JM109) byla získána vyšší koncentrace plazmidu (50 μ l, 231 ng/ μ l, 260/280 = 1,92) než u purifikace plazmidu HC-pro (50 μ l, 31 ng/ μ l, 260/280 = 1,7). Purifikace plazmidu s HC-pro však byla provedena ze 4 ml bakteriální suspenze připravené ve 2ml mikrozkuvkách typu Eppendorf.

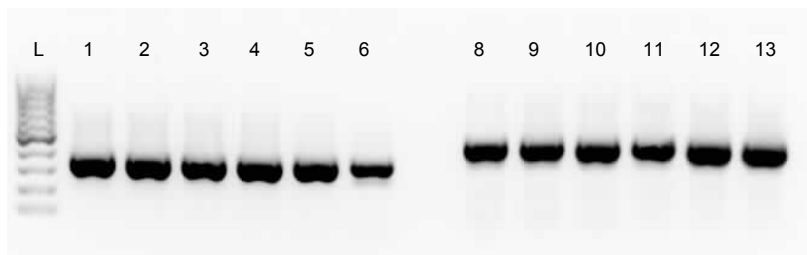
Obr. 10: Elektroforetická separace produktů colony PCR



Vysvětlivky: L – GeneRuler™ 100 bp plus DNA Ladder, 1-7 kolonie JM109, 8-14 kolonie DH5 α

Pomocí gradientové PCR byla určena „annealing“ teplota PCR amplifikace templátu u obou kombinací primerů. Nejvyšší výtěžnosti a čistoty produktu u obou kandidátních genů bylo dosaženo při „annealing“ teplotě 58,6 °C (Obr. 11), a proto hybridizační teplota všech následujících reakcí byla nastavena na 58 °C.

Obr. 11: Optimalizace „annealing“ teploty stanovené pomocí gradientové PCR

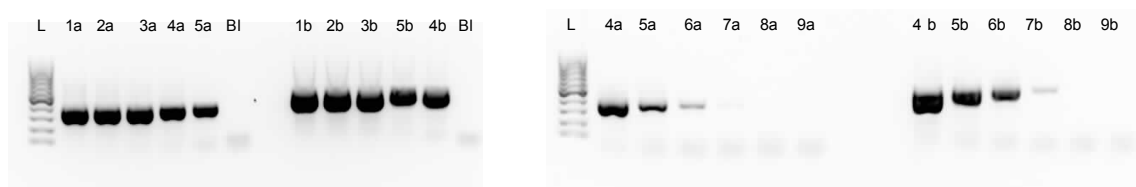


Vzorek	1, 8	2, 9	3, 10	4, 11	5, 12	6, 13
Hybridizační teplota (°C)	45,5	49	53,8	58,6	63,1	65

Vysvětlivky: L – GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, PCR produkt HC-pro (1-6) a CP (8-13)

Maximální množství templátu do reakce doporučeného manuálem COST FA806 (Bamford 2009) bylo 50 ng. Jinou maximální hodnotu, tj. 10 ng, uváděl návod výrobce kitu Relicator RNAi kitem (Finnzymes, Finnland). Nadbytkem templátu v reakci může dojít k inhibici reakce. K určení optimálního množství DNA do reakce byly plazmidy CP a HC-pro dekadicky naředěny. Templát v reakci se pohyboval od 10 ng do 0,0001 pg (Obr. 12). Minimálně 0,01 pg bylo potřeba k úspěšné amplifikaci produktu u CP i u HC-pro, i když amplikon HC-pro byl velice slabý. Na základě výsledků bylo rozhodnuto použít 1 ng templátu do reakce pro syntézu dsRNA, který je spodní hranicí u obou materiálů.

Obr. 12: Optimalizace templátu v reakci



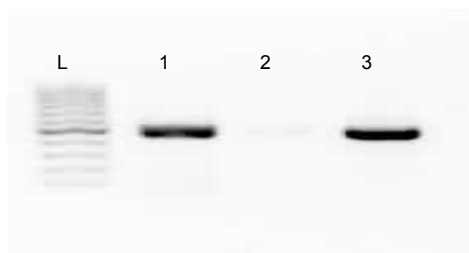
Vzorek	1 a,b	2a, b	3a, b	4a, b	5a, b	6a, b	7a, b	8a, b	9a, b
Templátu v reakci	10 ng	1 ng	100 pg	10 pg	1 pg	0,1 pg	0,01 pg	0,001 pg	0,0001 pg
CP produkt	+	+	+	+	+	+	+	-	-
HC-pro produkt	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Vysvětlivky: L – GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, a – HC-pro PCR produkt, b – CP PCR produkt, Bl – blank

5.3 Syntéza dvouvláknové RNA

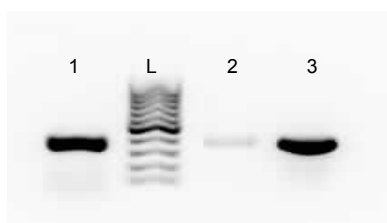
Syntéza dsRNA u CP i u HC-pro byla provedena podle návodu výrobce. Nejdříve byl amplifikován DNA produkt s příslušnými primery z plazmidového templátu, který byl přečištěn pomocí QIAquick® Qiagen gel extraction kitu (QIAGEN). Po extrakci byla dsDNA přepsána do dsRNA vlastní dsRNA syntetickou reakcí a výsledná dsRNA byla oddělena od dalších složek reakce purifikací LiCl. V průběhu postupu pro srážení nukleových kyselin s chloridem lithným byly oddělovány jednotlivé frakce – nepurifikovaná dsRNA syntetická reakce, jednovláknová ssRNA a dsRNA. Frakce byly podrobeny elektroforetické separaci (Obr. 13, 14) a poté byly změřeny koncentrace dsRNA na nanodropu. Nejvyšší výtěžek dsRNA komplementární k CP byl 58 ng/μl z 1 μg dsDNA a komplementární k HC-pro 30 ng/μl z 1 μg dsDNA.

Obr. 13: Elektroforetická separace frakcí CP dsRNA syntézy po purifikaci LiCl



Vysvětlivky: L – GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, 1 - nepurifikovaná dsRNA syntetická reakce, 2 – ssRNA, 3 – dsRNA

Obr. 14: Elektroforetická separace frakcí HC-pro dsRNA syntézy po purifikaci LiCl



Vysvětlivky: L – GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, 1 – nepurifikovaná dsRNA syntetická reakce, 2 – ssRNA, 3 – dsRNA

5.4 Hodnocení interakce viru a specifických dsRNA molekul

5.4.1 Paralelní aplikace inokula a dsRNA

Cílem prvního experimentu bylo zjistit, co se stane v případě současné aplikace inokula viru a syntetizované CP dsRNA. Mechanická aplikace celkem 60 ng CP dsRNA neměla na úspěšnost inokulace žádný účinek, protože po třech týdnech od inokulace nebyl naměřen výrazný pokles absorbance v DAS-ELISA testu u testovaných rostlin ve srovnání s kontrolními rostlinami. Absorbance testovaných a kontrolních rostlin byly vyšší než zdravé a negativní kontroly a zároveň nižší než pozitivní kontroly (Tab. 7). Všechny rostliny projevovaly standardní příznaky napadení virem mozaiky hrachu přenosné semenem – zakrslost, mozaiku, prosvětlení žilek a svinutku listů. Obě skupiny byly tedy pozitivní na infekci PSbMV.

Aplikací inokula infiltrací v kontrolní i pokusné variantě nedošlo k infekci rostlin, tedy vliv přídatku dsRNA do inokula na infekci nebyl hodnotitelný.

Tab. 7: Výsledek DAS-ELISA testu

	Způsob aplikace inokula				Zdravé rostliny	Positivní kontrola	Negativní kontrola
	Mechanicky		Infiltrací				
	Inokulum	Inokulum + CP dsRNA	Inokulum	Inokulum + CP dsRNA			
Absorbance	0,278	0,346	-0,001	-0,007	-0,004		
	0,222	0,309	-0,001	-0,005	-0,004		
	0,336	0,330	-0,006	-0,009	-0,002		
	0,326	0,390	-0,004	0,008	0,014		
	0,375	0,362	-0,002	0,006	0,147	0,719	-0,005
	0,289	0,410	-0,008	0,037	-	0,681	-0,002
	0,348	0,421	-0,006	-0,005	-		
	0,220	0,261	0,258	-0,002	-		
	0,323	0,620	0,005	-0,007	-		
	0,384	-	0,001	-0,009	-		

Vysvětlivky: Positivní kontroly (infikované rostliny), negativní kontroly (zdravé rostliny)

5.4.2 Aplikace CP dsRNA po inokulaci rostlin

Cílem druhého pokusu bylo ozdravení infikované rostliny pomocí CP dsRNA. Hodnocení průběhu RNA umlčování bylo sledováno u druhého listu shora a u čtvrtého dsRNA aplikovaném listu shora v průběhu prvního, druhého, třetího, sedmého a desátého dne od vnesení celkem 120 ng CP dsRNA do infikovaných rostlin.

Na 10x naředěné celkové RNA byla provedena Q-RT-PCR viru mozaiky hrachu přenosného semenem s primery PSBcpF/R, které neamplifikovaly vnesenou CP dsRNA, protože primer PSB117cp0_F má cílové místo mimo amplicon použitý k syntéze dsRNA (Obr. 15). Stanovení relativní koncentrace viru bylo provedeno komparativní analýzou Ct mezi genem pro obalový protein a β -tubulinem pomocí $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metody. Po aplikaci dsRNA došlo k nárůstu koncentrace viru u druhého i čtvrtého listu shora a poté k poklesu jeho koncentrace, a to až na 50 % v sedmý den po aplikaci (Obr. 16). Tento trend však nebyl prokázán na úrovni průkaznosti 95 %.

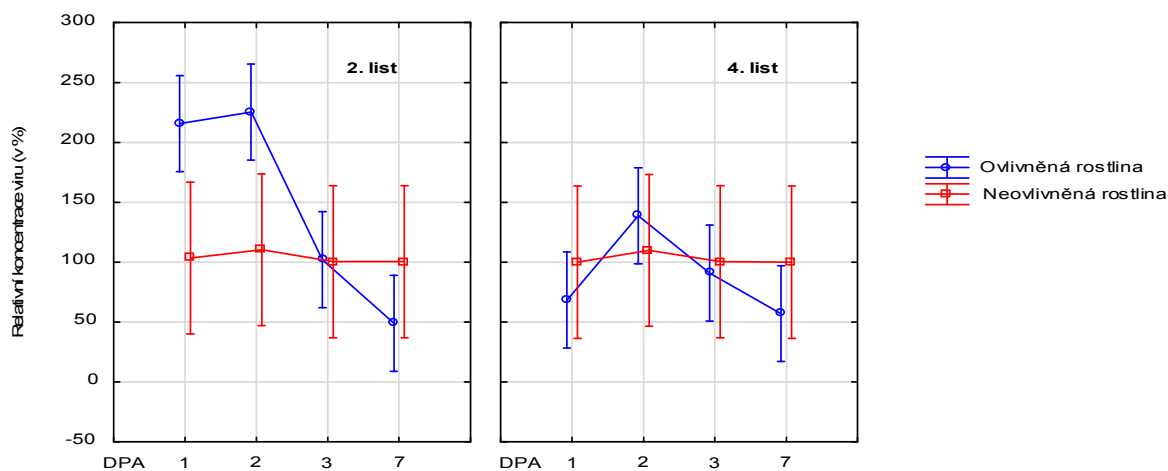
Obr. 15: Analýza specifických míst primerů PSBcpF/R a PSB117cp0_F/R na části genu pro CP izolátu PSB117

```

CAAAGGCGGAATGGCTATCA GCTTGCAACATTTAGTTGATTACAATCCAGCACAAGTTGACATTTCAAACA
CTCG AGCAACGCAGAGCCAGTTCG ATA AACTGGTGGAGGGC AGTGTGCGCAAGAGTACGGGGT TGGAGACAAT
GAAATGCAAGTTTTGGCAAGTGGTTTTGATGATATGGTGCAATGAAAAATGGAACATCGCCTAACATAAATGG
GATGTGGACAATGATGGACGGGGAAGAGCAGGTTGAGTACCCCCATAAGCCAGTGATGGATAAYGCGCGTC
CAACTTTCAGACAGATAATGGCGCATTT CAGTGACGTAGCGGAGGCGTACATTGAAAAGAGAACTCAACA
GAGGTGTACATACCCAGGTACGCTCTACAACGCAATTTAAGGGACCCGAGTCTTGCAAGATATGGTTTTCGA
CTTCTACGAAATCACAGCAAAGACACCTGTGAGGGCAAGAGAGGCACACTTTCAGATGAAAGCAGCAGCAA
TCAGAGGAAAATCCAATAGCCTATTTGGCTTGGATGGGAACGTTGGGACACAGGAGGAGA ACACGGAGAGG
CACACAGCA
    
```

Vysvětlivky: Zeleně jsou vyznačeny primery PSBcpF/R a žlutě primery PSB117cp0_F/R

Obr. 16: Hodnocení změny koncentrace viru po aplikaci dsRNA



Vysvětlivky: DPA – den po aplikaci, vertikální sloupce znázorňují interval spolehlivosti ($p = 0,95$)

6 DISKUZE

Aktivace mechanismu RNA interference umožňuje objasnit funkci genu při jeho knockoutování, nebo interakci umělé dsRNA s virem. Pro studium interakce je potřeba připravit dsRNA. Dvouvláknová RNA byla syntetizována ReplikatorTM RNAi kitem se specifickými primery na sekvenci PSB117. Tyto primery byly navrženy v oblastech s nejnižším polymorfismem sekvencí pro CP a HC-pro, aby se dosáhlo co největší homologie napříč všemi patotypy, zejména však patotypu P1.

PCR amplifikace probíhala na purifikovaném plazmidovém templátu. Purifikaci plazmidu CP bylo dosaženo vyšší výtěžnosti DNA v porovnání s plazmidem HC-pro, protože transformované bakterie *E. coli* kmene JM109 plazmidem CP byly kultivovány v Erlenmayerově baňce a ne v 2ml mikrozkuvkách typu Eppendorf jako u transformovaných bakterií *E. coli* kmene JM109 s plazmidem HC-pro. Možným vysvětlením je, že v baňce dochází k lepšímu provzdušnění bakteriální suspenze, a tedy vyšší proliferaci bakteriální kultury.

Výrobce ReplikatorTM RNAi kitu uváděl, že je možné připravit 20 až 60 µg v jedné dsRNA-syntetizující reakci v závislosti na cílové sekvenci a délce cílové sekvence. Na rozdíl od rozsahu uváděného výrobcem se podařilo nasyntetizovat maximálně 3 µg dsRNA u genu pro obalový protein a 1,5 µg u genu pro HC proteasu. Nízká koncentrace může být podle návodu výrobce způsobena výběrem templátu, který je obtížný pro syntézu dvouvláknové RNA enzymy T7 polymerasou a phi6 replikasou. Oba enzymy mohou mít i krátkou dobu expirace (maximálně půl roku), přestože výrobce uvádí jeden rok. Půl roku otevřený kit a skladovaný dle pokynů výrobce neprodukoval ani dsDNA, ani dsRNA. Do současné doby byly nalezeny pouze dvě práce, které použily ReplikatorTM RNAi kit. Jedna z nich je od autorů Gouveia a kol. (2011), kteří neuvádějí výtěžnost reakce. Pro další syntézy dsRNA mohou doporučit optimalizovat postup, nebo použít jiný postup syntézy. Campbell a kol. (2010) pro získání dsRNA provedli PCR s „normálními“ primery, přidali linkery v podobě T7 promotoru, odděleně přepsali dsDNA do ssRNA „sense“ a „antisense“ a následně ponechali transkripty hybridizovat za získání duplexu RNA. Yang a kol (2002) a Myers a kol. (2003) připravili dsRNA hybridizací „sense“ a „antisense“ transkriptů z T7 promotoru přítomného na 5' konci prodloužených primerů. Myers ani Campbell neuvádí výtěžnost produkce dsRNA, ale jejich pracovní koncentrace dsRNA

pro experimenty u Myerse byla 1 µg/µl u Campbella 2,5 µg/µl. Z toho lze usoudit, že výtěžnost reakce musela být značná, zatímco pracovní koncentrace dsRNA produkované ReplikatorTM RNAi kitem u CP byla maximálně 60 ng/µl.

Při paralelní aplikaci inokula a CP dsRNA infiltrací pomocí injekce, nebo mikromechanicky bylo použito 60 ng/µl na cca 14 dní starou rostlinu hrachu, zatímco při „léčbě“ již PSbMV-infikovaných rostlin bylo aplikováno infiltrací 120 ng/µl dsRNA na 4 týdny starou rostlinu hrachu. Aplikovaná množství CP dsRNA jsou srovnatelná s experimentálním dsRNA knockoutováním genů u jiných autorů. Například u roztoče *Varroa destructor* bylo dosaženo třicetinásobné redukce transkriptu Mu-třídy glutation S-transferasy po aplikaci 50 ng dsRNA (Campbell a kol. 2010), u hnědého lučního koníka (*Nilaparvata lugens*) byl gen pro kalretikulin knockoutován po aplikaci 125 ng/µl dsRNA (Liu a kol. 2010). Na druhou stranu je potřeba si uvědomit, jaká je velikost pokusných objektů těchto autorů v porovnání se čtyřtýdenní rostlinou hrachu. Poměr množství aplikované dsRNA a velikosti hrachu tedy neodpovídá. Nicméně bylo rozhodnuto začít experimenty i s těmito nízkými koncentracemi.

Infiltrací inokula nebo inokula s přídavkem dsRNA nebyly rostliny hrachu úspěšně infikovány, tedy vliv dsRNA na inokulaci nebyl hodnotitelný. Při mechanické inokulaci CP dsRNA současně s inokulem nebyl pozorován vliv CP dsRNA na infekci. Je možné, že efekt RNA umlčování záleží na dávce dsRNA (Li a kol. 2011).

Po ošetření chronicky infikovaných rostlin CP dsRNA se relativní koncentrace PSbMV měnila v čase po aplikaci. Relativní koncentrace viru u čtvrtého ošetřeného listu shora je první den po aplikaci CP dsRNA nízká, poté se koncentrace viru zvedá a od třetího dne zase klesá. Vzestup koncentrace viru může být způsobena amplifikací templátů rostlinnou RNA-dependentní polymerasou. Od třetího dne koncentrace viru postupně klesá až na cca 50 %. RNA interference je indukována silněji z důvodu tvorby sekundárních siRNA, které vznikají po štěpení duplexů tvořených RNA-dependentní polymerasou (RdRp). Jediné logické řešení je, že primární siRNA z umělé CP dsRNA byla vybrána a že byla použita jako primer RdRp. RNA polymerasa nasynthetizovala detekovanou sekvenci „upstream“ k umělé vnesené CP dsRNA, a tak falešně zvedla relativní koncentraci viru. Druhý neošetřený list shora vykazoval podobnou, ne však stejnou změnu relativní koncentrace viru v čase. Nárůst relativní koncentrace viru je patrný v prvních dvou dnech po aplikaci CPdsRNA a poté opět dochází k poklesu koncentrace viru. Snížení koncentrace bylo jediné možné za předpokladu šíření umlčovacího signálu napříč rostlinou, který mohl být posílen

tvorbou sekundárních siRNA jako u čtvrtého ošetřeného listu shora. Data z křivek změny koncentrace viru v čase vykazovala určitý trend, ale na úrovni prokazatelnosti 95 % nebyly rozdíly mezi pozitivními kontrolami a testovanými rostlinami průkazné.

Snížení relativní koncentrace viru od třetího dne po aplikaci je ve shodě s literaturou o dsRNA-knockoutování genů, kdy RNA umlčování začíná být aktivní už od druhého dne po aplikaci dsRNA (Campbell a kol. 2010) a mechanismus zůstává aktivní až do desátého dne po vnesení dsRNA (Li a kol. 2011).

Výsledky léčení virového onemocnění u krevet pomocí dsRNA se naproti tomu lišily. Krevety (*Litopenaeus. vannamei*) o hmotnosti 2-5 g infikované patogenem *Penaeus stylirostris densovirus* byly léčeny dsRNA připravené vůči viru, která byla aplikována každé 3 dny o dávce 2,5 µg/g živé váhy krevet. Krevety byly navíc po 12 hod od první aplikace dsRNA inokulovány podruhé. Virus byl silně inhibován prvních 5 dní po první aplikaci dsRNA, ale poté až do desátého dne byla inhibice replikace viru nižší (Ho a kol. 2011).

7 ZÁVĚR

Pro syntézu dvouvláknových RNA molekul byly vybrány konzervativní oblasti genů pro obalový protein a HC proteasu viru mozaiky hrachu přenosné semenem. Vůči oběma genům se podařilo nasyntetizovat specifickou dsRNA.

Po infiltraci CP dsRNA do již chronicky infikovaných rostlin došlo ke snížení relativní koncentrace viru mozaiky hrachu přenosné semenem sedmý den po aplikaci o cca 50 % ve srovnání s kontrolními infikovanými rostlinami.

Další práce by se měly zabývat aplikací dsRNA odvozené od genu pro HC proteasu, který je mimo jiné supresorem RNA interference.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ΔG	změna Gibbsovy energie
AMV	<i>Avian myeloblastosis virus</i>
AGO	Argonaute
cDNA	Complementary DNA, komplementární DNA
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i> , virus mozaiky okurky
CP	Coat protein, obalový protein
Ct	Threshold cycle
DAS-ELISA	Double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay,
DCL	Dicer-like
DEPC voda	voda ošetřená diethyl pyrokarbonátem
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region gene 8
dNTP	deoxynukleotid trifosfát
ds/ss	dvouvláknová/jednovláknová forma
EBV	<i>Ebstein-Barr virus</i> , virus Epstein-Barrové
GFP	Green fluorescent protein, zelený fluorescenční protein
HCMC	<i>Human Cytomegalovirus</i> , lidský cytomegalovirus
HC-pro	Helper-Component protease, HC proteasa
LiCl	chlorid lithný
MgCl ₂	chlorid hořečnatý
miRNA	micro RNA
mRNA	mediátorová RNA
PCR	Polymerase chain reaction, polymerasová řetězová reakce
pNPP	p-nitrofenylfosfát.Na ₂
PSbMV	<i>Pea seed-borne mosaic virus</i> , virus mozaiky hrachu přenosné semenem
PTGS	Posttranscriptional silencing, posttranskripční umlčování
Q-RT-PCR	Quantitative Reverse-Transcription PCR, kvantitativní PCR spojená s reverzní transkripcí
Ran-GTP	Ras-related nuclear protein - guanosine triphosphate

RdDM	RNA-directed DNA methylation, RNA-řízená DNA metylace
RdRP	RNA-dependent RNA polymerase, RNA-dependentní RNA polymerasa
RISC	RNA-induced silencing complex, RNA-indukovaný umlčující komplex
RLC	RISC loading complex
RNAi	RNA interference, RNA interference
RT-PCR	PCR spojená s reverzní transkripcí
SGS3	Supressor of gene silencing 3
siRNA	Small interfering RNA, malá interferující RNA
TGS	Transcriptional silencing, Transkripční umlčování
T _M	„melting“ teplota
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i> , virus mozaiky tabáku
VIGS	Virus induced gene silencing, virem indukované umlčování genu

9 LITERATURA

- Alló M, Buggiano V, Fededa JP, Petrillo E, Schor I, de la Mata M, Agirre E, Plass M, Eyra E, Elela SA, Klinck R, Chabot B, Kornblihtt AR (2009): Control of alternative splicing through siRNA-mediated transcriptional gene silencing. *Nat Struct Mol Biol* 16 (7): 717-724.
- Anandalakshmi R, Pruss GJ, Ge X, Marathe R, Mallory AC, Smith TH, Vance VB. (1998): A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (22): 13079-13084.
- Aoki K, Moriguchi H, Yoshioka T, Okawa K, Tabara H (2007): *In vitro* analyses of the production and activity of secondary small interfering RNAs in *C. elegans*. *EMBO J* 26 (24): 5007-5019.
- Bamford, D (2009): Double-stranded RNA production for plant biotechnology. COST FA0806 Training School. Sep 7-10, 2009. Helsinki, Finland.
- Basyuk E, Suavet F, Doglio A, Bordonné R, Bertrand E (2003) Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products. *Nucleic Acids Res* 31 (22): 6593-6597.
- Baulcombe D (2004): RNA silencing in plants. *Nature* 431 (7006): 356-363.
- Baumberger N, Baulcombe DC (2005): *Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (33): 11928-11933.
- Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, Stark A, Bork P, Izaurralde E (2006): mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev* 20 (14): 1885-1898.
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001): Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409 (6818): 363-366.
- Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR (2004): Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10 (12): 1957-1966.
- Campbell EM, Budge GE, Bowman AS (2010). Gene-knockdown in the honey bee mite *Varroa destructor* by a non-invasive approach: studies on a glutathione S-transferase. *Parasit Vectors* 3:73.

- Carmell MA, Xuan Z, Zhang MQ, Hannon GJ (2002): The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev* 16 (21): 2733-2742.
- Cerutti H, Casas-Mollano JA (2006): On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Curr Genet* 50 (2): 81-99.
- Cogoni C, Macino G (1999): Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature* 399 (6732): 166-169.
- Corcoran DL, Pandit KV, Gordon B, Bhattacharjee A, Kaminski N, Benos PV (2009): Features of mammalian microRNA promoters emerge from polymerase II chromatin immunoprecipitation data. *PLoS One* 4 (4): e5279.
- Csorba T, Lózsa R, Hutvágner G, Burgyán J (2010): Poliovirus protein P0 prevents the assembly of small RNA-containing RISC complexes and leads to degradation of ARGONAUTE1. *Plant J* 62 (3): 463-472.
- Czech B, Malone CD, Zhou R, Stark A, Schlingeheyde C, Dus M, Perrimon N, Kellis M, Wohlschlegel JA, Sachidanandam R, Hannon GJ, Brennecke J (2008): An endogenous small interfering RNA pathway in *Drosophila*. *Nature* 453 (7196): 798-802.
- Dalmay T, Hamilton A, Rudd S, Angell S, Baulcombe DC (2000): An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 101 (5): 543-553.
- Deleris A, Gallego-Bartolome J, Bao J, Kasschau KD, Carrington JC, Voinnet O. (2006): Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 313 (5783): 68-71.
- Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ (2004): Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432 (7014): 231-235.
- Die VJ, Román B, Nadal S, González-Verdejo (2010): Evaluation of candidate reference genes for expression studies in *Pisum sativum* under different experimental conditions. *Planta* 232 (1): 145-153.
- Doench JG, Sharp PA (2004) Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* 18 (5): 504-511.
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T (2001a): RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15 (2): 188-200.

- Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T (2001b): Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J* 20 (23): 6877-6888.
- Fenner BJ, Thiagarajan R, Chua HK, Kwang J (2006): Betanodavirus B2 is an RNA interference antagonist that facilitates intracellular viral RNA accumulation. *J Virol* 80 (1): 85-94.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391 (6669): 806-811.
- Fukunaga R, Doudna JA (2009): dsRNA with 5' overhangs contributes to endogenous and antiviral RNA silencing pathways in plants. *EMBO J*. 28 (5): 545-555.
- Gazzani S, Lawrenson T, Woodward C, Headon D, Sablowski R (2004): A link between mRNA turnover and RNA interference in Arabidopsis. *Science* 306 (5698): 1046-1048.
- Gouveia P, Dandlen S, Costa A, Marques N, Nolasco G (2011): Identification of an RNA silencing suppressor encoded by *Grapevine leafroll-associated virus 3*. *Eur J Plant Pathol* 133 (1): 237-245.
- Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie DL, Fire A, Ruvkun G, Mello CC (2001): Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 106 (1): 23-34.
- Gu J, He T, Pei Y, Li F, Wang X, Zhang J, Zhang X, Li Y (2006): Primary transcripts and expressions of mammal intergenic microRNAs detected by mapping ESTs to their flanking sequences. *Mamm Genome* 17 (10): 1033-1041.
- Haas G, Azevedo J, Moissiard G, Geldreich A, Humber C, Bureau M, Fukuhara T, Keller M, Voinnet O (2008): Nuclear import of CaMV P6 is required for infection and suppression of the RNA silencing factor DRB4. *EMBO J* 27 (15): 2102-2112.
- Haasnoot PC, Cupac D, Berkhout B 2003: Inhibition of virus replication by RNA interference. *J Biomed Sci* 10: 607-616.
- Hamilton AJ, Baulcombe DC (1999): A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286 (5441): 950-995.
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ (2000): An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404 (6775): 293-296.

- Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN (2004): The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 18 (24): 3016-3027.
- Hanssen IM, Gutiérrez-Aquirre I, Paeleman A, Goen K, Wittermans L, Lievens, Vanachter ACRC, Ravnikar M, Thomma BPHJ (2010): Cross-protection or enhanced symptom display in greenhouse tomato co-infected with different *Pepino mosaic virus* isolates. *Plant Pathol* 59: 13-21.
- Havecker ER, Wallbridge LM, Hardcastle TJ, Bush MS, Kelly KA, Dunn RM, Schwach F, Doonan JH, Baulcombe DC (2010): The Arabidopsis RNA-directed DNA methylation argonauts functionally diverge based on their expression and interaction with target loci. *Plant Cell* 22 (2): 321-334.
- Hoffer P, Ivashuta S, Pontes O, Vitins A, Pikaard C, Mroczka A, Wagner N, Voelker T (2011): Posttranscriptional gene silencing in nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (1): 409-414.
- Ho T, Yasri P, Panyim S, Udomkit A (2011): Double-stranded RNA confers both preventive and therapeutic effects against *Penaeus stylirostris densovirus* (PstDENV) in *Litopenaeus vannamei*. *Virus Res* 155 (1): 131-136.
- Hu Q, Niu Y, Zhang K, Liu Y, Zhou X (2011): Virus-derived transgenes expressing hairpin RNA give immunity to Tobacco mosaic virus and Cucumber mosaic virus. *Virology* 41: 41.
- Hutvagner G, Zamore PD (2002): A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297 (5589): 2056-2060.
- Chapman EJ, Prokhnevsky AI, Gopinath K, Dolja VV, Carrington JC (2004): Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev* 18 (10): 1179-1186.
- Chellappan P, Vanitharani R, Pita J, Fauquet CM (2004): Short interfering RNA accumulation correlates with host recovery in DNA virus-infected hosts, and gene silencing targets specific viral sequences. *J Virol* 78 (14): 7465-7477.
- Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL, Wang DZ (2006): The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* 38 (2): 228-233.
- Jung HI, Zhai Z, Vatamaniuk OK (2011): Direct transfer of synthetic double-stranded RNA into protoplasts of *Arabidopsis thaliana*. *Methods Mol Biol* 744: 109-127.
- Kanazawa A, Inaba J, Shimura H, Otagaki S, Tsukahara S, Matsuzawa A, Kim BM, Goto K, Masuta C (2011): Virus-mediated efficient induction of epigenetic

- modifications of endogenous genes with phenotypic changes in plants. *Plant J* 65 (1): 156-168.
- Kasschau KD, Cronin S, Carrington JC (1997): Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase. *Virology* 228 (2): 251-62.
- Kasschau KD, Xie Z, Allen E, Llave C, Chapman EJ, Krizan KA, Carrington JC (2003): P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA function. *Dev Cell* 4 (2): 205-217.
- Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH (2001): Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 15 (20): 2654-2659.
- Ketting RF (2011): The many faces of RNAi. *Dev Cell* 20 (2): 148-161.
- Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD (2003): Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115 (2): 209-216.
- Klahre U, Créte P, Leuenberger SA, Iglesias VA, Meins F Jr (2002): High molecular weight RNAs and small interfering RNAs induce systemic posttranscriptional gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (18): 11981-11986.
- Krol J, Busskamp V, Markiewicz I, Stadler MB, Ribí S, Richter J, Duebel J, Bicker S, Fehling HJ, Schübeler D, Oertner TG, Schratt G, Bibel M, Roska B, Filipowicz W (2010): Characterizing light-regulated retinal microRNAs reveals rapid turnover as a common property of neuronal microRNAs. *Cell* 141 (4): 618-631.
- Kubota K, Tsuda S, Tamai A, Meshi T (2003): Tomato mosaic virus replication protein suppresses virus-targeted posttranscriptional gene silencing. *J Virol* 77 (20): 11016-11026.
- Kurihara Y, Watanabe Y (2004): *Arabidopsis* micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (34): 12753-12758.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001): Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294 (5543): 853-858.
- Lamontagne B, Larose S, Boulanger J, Elela SA (2001): The RNase III family: a conserved structure and expanding functions in eukaryotic dsRNA metabolism. *Curr Issues Mol Biol* 3 (4): 71-78.
- Landthaler M, Yalcin A, Tuschl T (2004): The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol* 14 (23): 2162-2167.

- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993): The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75 (5): 843-854.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN (2003): The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing. *Nature* 425 (6956): 415-419.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN (2004): MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23 (20): 4051-4060.
- Lee YS, Nakahara K, Pham JW, Kim K, He Z, Sontheimer EJ, Carthew RW (2004): Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell* 117 (1): 69-81.
- Li H, Li WX, Ding SW (2002): Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science* 296 (5571): 1319-1321.
- Li J, Yang Z, Yu B, Liu J, Chen X (2005): Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 15 (16): 1501-1507.
- Li J, Chen Q, Lin Y, Jiang T, Wu G, Hua H (2011): RNA interference in *Nilaparvata lugens* (Homoptera: *Delphacidae*) based on dsRNA ingestion. *Pest Manag Sci* 67 (7): 852-859.
- Lipardi C, Paterson BM (2009): Identification of an RNA-dependent RNA polymerase in *Drosophila* involved in RNAi and transposon suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106 (37): 15645-15650.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25 (4): 402-408.
- Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ (2004): Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*. 305 (5689): 1437-1441.
- Liu S, Ding Z, Zhang C, Yang B, Liu Z (2010): Gene knockdown by intro-thoracic injection of double-stranded RNA in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Biochem Mol Biol* 40 (9): 666-671.
- Liu Y, Schiff M, Dinesh-Kumar SP (2002): Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J* 31 (6): 777-786.
- Llave C, Kasschau KD, Rector MA, Carrington JC (2002): Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell* 14 (7): 1605-1619.

- Luo Z, Chen Z (2007): Improperly terminated, unpolyadenylated mRNA of sense transgenes is targeted by RDR6-mediated RNA silencing in Arabidopsis. *Plant Cell* 19 (3): 943-958.
- MacRae IJ, Ma E, Zhou M, Robinson CV, Doudna JA (2008): *In vitro* reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2): 512-517.
- Mallory AC, Bartel DP, Bartel B (2005): MicroRNA-directed regulation of *Arabidopsis* AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *Plant Cell* 17 (5): 1360-1375.
- Maniataki E, Mourelatos Z (2005): A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev* 19 (24): 2979-2990.
- Marques JT, Kim K, Wu PH, Alleyne TM, Jafari N, Carthew RW (2010): Loqs and R2D2 act sequentially in the siRNA pathway in *Drosophila*. *Nat Struct Mol Biol* 17 (1): 24-30.
- Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Lührmann R, Tuschl T (2002): Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 110 (5):563-574.
- Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T (2004): Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 15 (2): 185-197.
- Mette MF, Aufsatz W, van der Winden J, Matzke MA, Matzke AJ (2000): Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J* 19 (19): 5194-5201.
- Miyoshi K, Tsukumo H, Nagami T, Siomi H, Siomi MC (2005): Slicer function of *Drosophila* Argonautes and its involvement in RISC formation. *Genes Dev* 19 (23): 2837-2848.
- Montgomery MK, Xu S, Fire A (1998): RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (26): 15502-15507.
- Myers JW, Jones JT, Meyer T, Ferrell JE Jr. (2003): Recombinant Dicer efficiently converts large dsRNAs into siRNAs suitable for gene silencing. *Nat Biotechnol* 21 (3): 324-328.
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R (1990): Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 2 (4): 279-289.

- Petersen CP, Bordeleau ME, Pelletier J, Sharp PA (2006): Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell* 21 (4): 533-542.
- Pfeffer S, Zavolan M, Grässer FA, Chien M, Russo JJ, Ju J, John B, Enright AJ, Marks D, Sander C, Tuschl T (2004): Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*. 304 (5671): 734-736.
- Qi Y, He X, Wang XJ, Kohany O, Jurka J, Hannon GJ (2006): Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature* 443 (7114): 1008-1012.
- Qu F, Ren T, Morris TJ (2003): The coat protein of turnip crinkle virus suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step. *J Virol* 77 (1): 511-522.
- Qu F, Ye X, Morris TJ (2008): *Arabidopsis* DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (38): 14732-14737.
- Ratcliff FG, MacFarlane SA, Baulcombe DC (1999): Gene silencing without DNA. RNA-mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell*. 11 (7): 1207-1216.
- Rawlings RA, Krishnan V, Walter NG (2011): Viral RNAi suppressor reversibly binds siRNA to outcompete Dicer and RISC via multiple turnover. *J Mol Biol* 408 (2): 262-276.
- Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A (2004): Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 14 (10A): 1902-1910.
- Rozas J, Sanchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003): DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19 (18): 2496-2497.
- Rozen S, Skaletsky HJ (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds). *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods Mol Biol*, Humana Press, Totowa, NJ, pp. 365-386.
- Saito K, Ishizuka A, Siomi H, Siomi MC (2005): Processing of pre-microRNAs by the Dicer-1-Loquacious complex in *Drosophila* cells. *PLoS Biol* 3 (7): e235.
- Shen B, Goodman HM (2004): Uridine addition after microRNA-directed cleavage. *Science* 306 (5698): 997.
- Schauer SE, Jacobsen SE, Meinke DW, Ray A (2002): DICER-LIKE1: blind men and elephants in *Arabidopsis* development. *Trends Plant Sci* 7 (11): 487-491.

- Schiebel W, Haas B, Marinković S, Klanner A, Sängler HL (1993): RNA-directed RNA polymerase from tomato leaves. II. Catalytic *in vitro* properties. *J Biol Chem* 268 (16): 11858-11867.
- Scholthof HB, Scholthof KB, Kikkert M, Jackson AO (1995): Tomato bushy stunt virus spread is regulated by two nested genes that function in cell-to-cell movement and host-dependent systemic invasion. *Virology* 213 (2): 425-438.
- Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD (2003): Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115 (2): 199-208.
- Silva AT, Nguyen A, Ye C, Verchot J, Moon JH (2010): Conjugated polymer nanoparticles for effective siRNA delivery to tobacco BY-2 protoplasts. *BMC Plant Biol* 10: 291.
- Sijen T, Vijn I, Rebocho A, van Blokland R, Roelofs D, Mol JN, Kooter JM (2000): Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. *Curr Biol* 11 (6): 436-440.
- Sijen T, Fleenor J, Simmer F, Thijssen KL, Parrish S, Timmons L, Plasterk RH, Fire A (2001): On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 107 (4): 465-476.
- Skalsky RL, Samols MA, Plaisance KB, Boss IW, Riva A, Lopez MC, Baker HV, Renne R (2007): Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes an ortholog of miR-155. *J Virol* 81 (23): 12836-12845.
- Skalsky RL, Corcoran DL, Gottwein E, Frank CL, Kang D, Hafner M, Nusbaum JD, Feederle R, Delecluse HJ, Luftig MA, Tuschl T, Ohler U, Cullen BR (2012): The viral and cellular microRNA targetome in lymphoblastoid cell lines. *PLoS Pathog* 8 (1): e1002484.
- Smardon A, Spoerke JM, Stacey SC, Klein ME, Mackin N, Maine EM (2000): EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. *Curr Biol* 10 (4): 169-178.
- Smith NA, Singh SP, Wang MB, Stoutjesdijk PA, Green AG, Waterhouse PM (2000): Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 407 (6802): 319-320.
- Smýkal P, Šafařová D, Navrátil M, Dostálová R (2010): Marker assisted pea breeding: *eIF4E* allele specific markers to *pea seed-borne mosaic virus* (PSbMV) resistance. *Mol Breed* 26 (3): 425-438.
- St Johnston D, Brown NH, Gall JG, Jantsch M (1992): A conserved double-stranded RNA-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (22): 10979-10983.

- Stern-Ginossar N, Elefant N, Zimmermann A, Wolf DG, Saleh N, Biton M, Horwitz E, Prokocimer Z, Prichard M, Hahn G, Goldman-Wohl D, Greenfield C, Yagel S, Hengel H, Altuvia Y, Margalit H, Mandelboim O (2007): Host immune system gene targeting by a viral miRNA. *Science* 317 (5836): 376-381.
- Su J, Zhu Z, Wang Y, Zou J, Wang N, Jang S (2009): *Grass carp reovirus* activates RNAi pathway in rare minnow, *Gobiocypris rarus*. *Aquaculture* 289 (1-2): 1-5.
- Suzuki K, Shijuuku T, Fukamachi T, Zaunders J, Guillemin G, Cooper D, Kelleher A (2005): Prolonged transcriptional silencing and CpG methylation induced by siRNAs targeted to the HIV-1 promoter region. *J RNAi Gene Silencing* 1 (2): 66-78.
- Szittyta G, Molnár A, Silhavy D, Hornyik C, Burgyán J (2002): Short defective interfering RNAs of tombusviruses are not targeted but trigger post-transcriptional gene silencing against their helper virus. *Plant Cell* 14 (2): 359-372.
- Šafařová D, Navrátil M, Petrusová J, Pokorný R, Piáková Z (2008): Genetic and biological diversity of the Pea seed-borne mosaic virus isolates occurring in Czech Republic. *Acta Virol* 52 (1): 53-57.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007): MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24 (8): 1596-1599.
- Tang G, Reinhart BJ, Bartel DP, Zamore PD (2003): A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev* 17 (1): 49-63.
- Tougou M, Furutani N, Yamagishi N, Shizukawa Y, Takahata Y, Hidaka S (2006): Development of resistant transgenic soybeans with inverted repeat-coat protein genes of soybean dwarf virus. *Plant Cell Rep* 25 (11): 1213-1218.
- Valkonen J. (2009): Plant virus control employing RNA-based vaccines: a novel non-transgenic strategy. Abstract Book. COST FA0806 1st Working Group (WG1-3) meetings, September 11-12, 2009. Helsinki, Finland.
- Valli A, Martín-Hernández AM, López-Moya JJ, García JA (2006): RNA silencing suppression by a second copy of the P1 serine protease of *Cucumber Vein Yellowing Ipomovirus*, a member of the family *Potyviridae* that lacks the cysteine protease HCPro. *J Virol* 80 (20): 10055-10063.
- Valli A, Dujovny G, García JA (2008): Protease activity, self interaction, and small interfering RNA binding of the silencing suppressor P1b from *Cucumber Vein Yellowing Ipomovirus*. *J Virol* 82 (2): 974-986.

- Van der Vlugt RAA, Steffens P, Barg E, Leseman D-E, Bos L, Vetten HJ (1999): Further Evidence that Shallot Yellow Stripe Virus (SYSV) Is a Distinct Potyvirus and Reidentification of Welsh Onion Yellow Stripe Virus as a SYSV Strain. *Phytopathology* 89 (2): 148-155.
- Voinnet O. (2005): Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat Rev Genet* 6 (3): 206-220.
- Wang B, Love TM, Call ME, Doench JG, Novina CD (2006): Recapitulation of short RNA-directed translational gene silencing in vitro. *Mol Cell* 22 (4): 553-560.
- Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA, Wang MB, Rouse DT, Liu Q, Gooding PS, Singh SP, Abbott D, Stoutjesdijk PA, Robinson SP, Gleave AP, Green AG, Waterhouse PM (2001): Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J* 27 (6): 581-590.
- Wu L, Fan J, Belasco JG (2006): MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (11): 4034-4039.
- Wu-Scharf D, Jeong B, Zhang C, Cerutti H (2000): Transgene and transposon silencing in *Chlamydomonas reinhardtii* by a DEAH-box RNA helicase. *Science* 290 (5494): 1159-1162.
- Xie Z, Johansen LK, Gustafson AM, Kasschau KD, Lellis AD, Zilberman D, Jacobsen SE, Carrington JC (2004): Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol.* 2 (5): e104.
- Yang D, Buchholz F, Huang Z, Goga A, Chen CY, Brodsky FM, Bishop JM (2002): Short RNAduplexes produced by hydrolysis with *Escherichia coli* RNase III mediate effective RNA interference in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99 (15): 9942-9947.
- Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR (2003): Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17 (24): 3011-3016.
- Yu D, Fan B, MacFarlane SA, Chen Z (2003): Analysis of the involvement of an inducible *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerase in antiviral defense. *Mol Plant Microbe Interact* 16 (3): 206-216.
- Zha W, Peng X, Chen R, Du B, Zhu L, He G (2011): Knockdown of midgut genes by dsRNA-transgenic plant-mediated RNA interference in the hemipteran insect *Nilaparvata lugens*. *PLoS One* 6 (5): e20504.

- Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP (2000): RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101 (1): 25-33.
- Zilberman D, Cao X, Jacobsen SE (2003): ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* 299 (5607): 716-769.
- Zilberman D, Cao X, Johansen LK, Xie Z, Carrington JC, Jacobsen SE (2004): Role of *Arabidopsis* ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation triggered by inverted repeats. *Curr Biol* 14 (13): 1214-1220.

10 PŘÍLOHY

Šafářová D, Brázda P, Navrátil M (2011): Artificial dsRNA as a nontransgenic tool in plant virus control. Zborník z 18. vedeckej konferencie Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín, Piešťany, 8.-9. listopad 2011, pp. 49-51. (ISBN 978-80-89417-29-2).



„Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov ES“.

NOVÉ POZNATKY Z GENETIKY A ŠL'ACHTENIA POĽNOHOSPODÁRSKÝCH RASTLÍN



centrum výskumu rastlinnej výroby piešťany

Piešťany, 2011

UMĚLÉ dsRNA MOLEKULY – NETRASGENNÍ NÁSTROJ PRO KONTROLU ROSTLINNÝCH VIRŮ

ARTIFICIAL dsRNA AS A NONTRANSGENIC TOOL IN PLANT VIRUS CONTROL

DANA ŠAFÁŘOVÁ, PAVEL BRÁZDA, MILAN NAVRÁTIL

Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Plant virus epidemics cause the serious damages of quality and yield of agricultural crops. Therefore their effective control is necessary for the agricultural production. With the increasing knowledge about the endogenous plant defense mechanisms the induction of RNA-silencing by application of artificial dsRNA molecules seems to be promising tools to. In this work the coat protein gene genomic fragment of PSbMV was chosen and artificial dsRNA was successfully produced.

Key words: *Pea seed-borne mosaic virus*, plášťový protein, RNA vakcína, produkce in vitro.

ÚVOD

Epidemie řady rostlinných virů mají často negativní dopad na zemědělskou produkci, vedoucí až k velmi významným ekonomickým ztrátám. Nejlepším řešením je získání rezistentních odrůd zemědělských plodin. K tomuto cíli je možné využít jak klasického šlechtění, tak indukované rezistence – tedy genotypů získaných genovými manipulacemi (GMO). Rostlinné viry však vykazují ve srovnání s jinými patogeny vyšší proměnlivost, a tedy lepší schopnost přizpůsobení se na nové ekologické podmínky a hostitele (Garcia-Arenal et al. 2003). Neznají hranice a vykazují silný potenciál šíření v případě, že nejsou fyto-sanitární opatření aplikována koordinovaně v mezinárodním měřítku. Primární strategií pro kontrolu šíření rostlinných chorob je zcela jistě prevence. Za nejtrvanlivější a nejlépeší strategií je považována hostitelská rezistence. Tradiční metoda vnášení genů rezistence do jednotlivých kultivarů prostřednictvím klasického šlechtění, je časově velmi náročná, a není vždy spojená s nejvyšší kvalitou produkce nebo růstovými vlastnostmi rostlin, navíc v řadě případů nejsou dostupné nebo známe vhodné progenitory rezistence. S pokrokem dosaženým v současnosti v oblasti genetiky modifikovaných (transgenních) rostlin se ukázalo, že rostliny odolné vůči virové infekci mohou být vytvořeny tímto způsobem. Tento molekulárně-šlechtitelský proces je rychlejší a geneticky lépe kontrolovatelný (Prins et al. 2008). Nicméně současná opatření Evropské Unie omezují využití transgenních rostlin v EU a tyto restriktce budou, vzhledem k obecnému konzervativnímu postoji společnosti, pravděpodobně uplatňovány v dlouhodobém horizontu.

V případě, že nemáme k dispozici rezistentní odrůdy, se kontrola rostlinných virů mnohdy soustředí jen na extenzivním využití agrochemikálií v boji proti virovým vektorům (např. členovci, háďátka), což jednak zvyšuje výrobní náklady, jednak vystavuje zdravotním rizikům jak zemědělce, tak konzumenty (v důsledku vyšší hladiny chemických reziduí přítomných v konečném produktu). Nezanedbatelné je i potlačení jiných prospěšných zástupců hmyzu. Je zřejmé, že je velmi žádoucí vyvinout nové metody pro rychlou a proaktivní kontrolu viru, které umožní vyhnout se výše zmíněným problémům a nevýhodám.

Rostliny na rozdíl od živočichů nemají vyvinutý imunitní systém. Současné poznatky ale potvrdily, že rostliny využívají k obraně vůči virům sekvenčně specifický mechanismus degradace mRNA (RNA-silencing). Tento mechanismus označovaný jako posttranskripční genové umlčování (PTGS) je buňkou využíván ke kontrole genové exprese u široké škály organismů. Zároveň je RNA-umlčování považováno za jeden z nejučinnějších přirozených mechanismů obrany rostlin vůči akumulaci virů. Proces je iniciován dvouvláknovými RNA molekulami, které jsou produkovány v průběhu virové replikace. Tyto dsRNA jsou rozeznány rostlinou jako „cizí“ a následně jsou štípány rostlinou kódovanými Dicer-like enzymy za vzniku siRNA molekul o délce 21-25nt. Vzniklé siRNA pak vyvolávají sekvenčně specifickou RNA degradaci pomocí siRNA-indukovaného umlčovacího komplexu (RISC), který zničí virové RNA (Baulcombe 1996, Lin et al. 2007).

Pokroky v genovém inženýrství společně s objevem patogenem odvozené rezistence, kdy vnesení patogenu vlastního genetického materiálu může sloužit k ochraně vůči němu samotnému, otevřely cestu k použití transgenních rostlin v úspěšné kontrole rostlinných virů. Úspěšnost tohoto přístupu byla nejdříve prokázána u tabáku, kdy rostliny s vneseným genem pro plášťový protein TMV nevykazovaly příznaky infekce (Beachy 1999). Tato tzv. proteinem zprostředkovaná rezistence byla s menším nebo větším úspěchem využita i u dalších rostlinných virů a plodin. V řadě případů však u transgenních rezistentních genotypů nebylo možné detekovat přítomnost transgenního proteinu, tj.

např. plášťového virového proteinu. Při detailních analýzách bylo posléze prokázáno, že pro vyvolání rezistence je dostačující přítomnost malých interferujících RNA, a to jak siRNA, tak miRNA (Baulcombe 1996, Smith et al. 2000). V současnosti se tohoto principu RNA-zprostředkované rezistence úspěšně využívá pro konstrukci transgenů, při jejichž expresi v transgenních rostlinách dochází k tvorbě dvouvláknové RNA, které slouží jako induktory mechanismu umlčování genů, který je využit pro degradaci virové RNA a navození rezistence (Chen et al. 2004, Niu et al. 2006). Přestože mechanismus RNA-interference je považován za obranný systém rostliny, je nezbytné si uvědomit, že se jedná o složitý dynamický systém, ve kterém se uplatňují vedle dalších buněčných faktorů i virové supresory umlčování genů. Indukovaná rezistence na něm založená nemusí mít stoprocentní účinek (Smith et al. 2000, Waterhouse a Helliwell 2003).

Cílem práce je vybrat genomický fragment PSbMV vhodný pro indukci rezistence vůči viru semenem přenosné mozaiky hrachu, navrzení podmínek a syntéza umělých dsRNA molekul.

MATERIÁL A METODY

Fylogenetická analýza

Fylogenetická analýza byla provedena metodou neighbor-joining analýzy (MEGA 5.0) na souboru dříve charakterizovaných vlastních (Šafařová et al., 2008) a v databázi GenBank dostupných sekvencí genu pro plášťový protein (*cp*) izolátů viru PSbMV. Získaná matice izolátů příslušejících k biologickému patotypu P-1 byla využita pro analýzu DNA polymorfismu pomocí DNAsp ver. 4.0.

Návrh a analýza primerů

Ve zjištěné konzervativní oblasti *cp* genu byly pomocí programu PrimerSelect (Lasergene) navržena kombinace primerů vhodných pro syntézu dsRNA. Jejich vlastnosti byly stanoveny pomocí IDT OligoAnalyzer ver. 3.1.

Příprava umělé dsRNA

Pro syntézu cílové molekuly byl použit pGEM-T plazmid nesoucí kompletní sekvenci genu pro plášťový protein. Umělá dsRNA byla syntetizována pomocí kitu Replicator RNAi (Finnzymes), podle pokynů výrobce. Koncentrace a kvalita nasyntetizované dsRNA byla stanovena spektrofotometricky (NanoDrop 1000).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Byla studována možnost aplikace *in vitro* syntetizovaných indukčních molekul, umělých dsRNA, s cílem navození odolnosti rostlin vůči viru. Pro experiment byl zvolen patosystém PSbMV (biologický patotyp P-1) a hostitel, hrách setý (*Pisum sativum* L.).

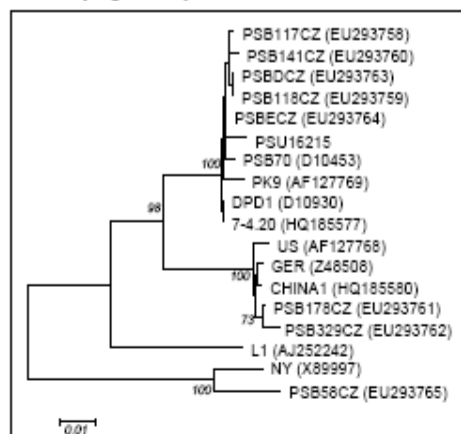
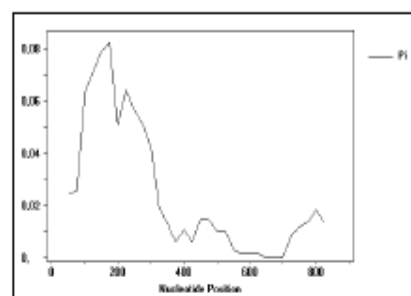
V rámci dostupných nukleotidových sekvencí izolátů PSbMV byla zjištěna variabilita genu pro plášťový protein, genomické části potenciálně vhodné pro navození odolnosti vůči viru. Fylogenetická analýza pomocí NJ-metody prokázala příbuznost mezi izoláty příslušejícími ke stejnému, v Evropě se běžně vyskytujícímu, patotypu P-1. Tyto izoláty vytvářejí dva signifikantní klastery, průkazně odlišné od izolátů zbývajících patotypů P-2 (např. izolát L1) a P-4 (např. izoláty NY a PSB58CZ) (Obr. 1). Analýza DNA polymorfismu *cp* genu původních českých a dalších izolátů PSbMV patotypu P-1 umožnila identifikaci variabilních a konzervativních částí genu. Byla zjištěna vysoká variabilita 5' oblasti a naopak identifikována konzervativní oblast ve 3' oblasti genu (Obr. 2).

Ve zjištěné konzervativní oblasti (*cp*³⁰⁰⁻⁸³⁷) byly navrženy kombinace primerů nesoucích i sekvence promotorů nezbytných pro správný průběh syntézy. Z navržených kombinací byla vybrána dvojice primerů - PSB117cp0_F a PSB117cp0_R - vhodných pro syntézu umělé dsRNA, které nevytvářely vlásenky v úseku promotorů a Gibsova volná energie vytvořených dimerů a heterodimerů byla vyšší než -8 kcal/mol (Tabulka 1). Navržené primery byly následně úspěšně použity k syntéze specifických umělých dsRNA molekul o délce ca 500 bp. Při použití 1 µg templátové DNA bylo získáno 0,97 – 3,87 µg dsRNA o koncentraci 21,6 – 86,1 ng/µl.

Studium účinku umělých dsRNA na replikační cyklus viru a jeho přenos semenem bylo zahájeno.

ZÁVĚR

Byly úspěšně připraveny umělé dsRNA molekuly vhodné pro studium indukované odolnosti rostlin vůči virové infekci a pro jejich praktické využití v ochraně rostlin.

Obr. 1: Fylogenetický strom izolátů PSbMV konstruovaný na základě sekvence *cp* genu.Obr. 2: Analýza DNA polymorfismu *cp* genu izolátů PSbMV patotypu P-1

Tabulka 1: Vlastnosti primerů PSB117cp0_F a PSB117cp0_R navržených pro syntézu dsRNA

Název primeru	Délka [nt]	Obsah GC [%]	T _m [°C]	ΔG homo-dimeru [kcal/mol]	ΔG hetero-dimeru [kcal/mol]	ΔG vlásenky [kcal/mol]
PSB117cp0_F	40	50,0	66,3	-6,59 až -0,96	-6,69 až -1,34	-0,36 až 0,44
PSB117cp0_R	29	48,3	63,0	-4,64 až -1,47		-0,95

Poděkování: Tato práce byla realizována za podpory projektu MŠMT MSM6198959215 a díky spolupráci v rámci projektu COST FA0606.

LITERATURA

- BAULCOMBE, D.C. 1996. Mechanisms of Pathogen-Derived Resistance to Viruses in Transgenic Plants. In *Plant Cell* vol. 8, 1996, no. 10, pp. 1833–1844.
- BEACHY, R.N. 1999. Coat-protein-mediated resistance to tobacco mosaic virus: discovery mechanisms and exploitation. In *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.* vol. 354, 1999, pp. 659–664.
- GARCIA-ARENAL, F. – MCDONALD, B.A. 2003. An analysis of the durability of resistance to plant viruses. In *Phytopathology* vol. 93, 2003, pp. 941–952.
- CHEN, Y.K. – LOUIS, D. – GOLDBACH, R. – PRINS, M. 2004. High frequency induction of RNA-mediated resistance against Cucumber mosaic virus using inverted repeat constructs. In *Molecular Breeding* vol. 14, 2004, pp. 215–226.
- LIN, S.S. – HENRIQUES, R. – WU, H.W. – NIU, Q.W. – YEH, S.D. – CHUA, N.H. 2007. Strategies and mechanisms of plant virus resistance. In *Plant Biotechnology Reports* vol. 1, 2007, pp. 125–134.
- NIU, Q.W. – LIN, S.S. – REYES, J.L. – CHEN, K.C. – WU, H.W. – YEH, S.D. – CHUA, N.H. 2003. Expression of artificial microRNAs in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers virus resistance. In *Nature Biotechnology* vol. 24, 2003, pp. 1420–1428.
- PRINS, M. – LAIMER, M. – NORIS, E. – SCHUBERT, J. – WASENEGGER, M. – TEPFER, M. 2008. Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. In *Molecular Plant Pathology* vol. 9, 2008, pp. 73–83.
- SMITH, N.A. – SINGH, S.P. – WANG, M.B. – STOUTJESDIJK, P.A. – GREEN, A.G. – WATERHOUSE, P.M. 2000. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. In *Nature* vol. 47, 2000, pp. 319–320.
- SAFAROVA, D. – NAVRATIL, M. – PETRUSOVA, J. – POKORNY, R. – PIAKOVA, Z. 2008. Genetic and biological diversity of the Pea seed-borne mosaic virus isolates occurring in Czech Republic. In *Acta virologica* vol. 52, 2008, pp. 53–57.
- WATERHOUSE, P.M. – HELLIWELL, C.A. 2003. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. In *Nature Reviews Genetics* vol. 4, 2003, pp. 29–38.

Adresa autora:

Mgr. Dana Šafářová, Ph.D., Bc. Pavel Brázdá, Prof. RNDr. Milan Navrátil, CSc., Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Štechičtělá 11, 783 71 Olomouc-Holice, milan.navratil@upol.cz.