

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2012**

**Ludmila Brtišová**

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



# **Využití gun bombardment pro inokulaci rostlin viry jako nástroj ve studiu RNA interference**

**Bakalářská práce**

**Ludmila Brtišová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2012**

**Vedoucí práce: Mgr. Dana Šafářová, Ph.D.**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně a že uvádím veškerou použitou literaturu.

V Olomouci dne

Podpis.....

## Souhrn

RNA interference (RNAi) je mechanismus regulující genovou expresi prostřednictvím dvouvláknové RNA (dsRNA). Tento proces probíhá díky krátkým jednovláknovým fragmentům produkovaným z dsRNA prostřednictvím asociace dsRNA s enzymatickými komplexy, které jsou pak schopny rozpoznat příslušnou mRNA a následně ji degradovat. Ačkoliv je RNAi studována především na modelových organismech, jako je hlístice *C. elegans*, *Drosophila melanogaster* nebo *Arabidopsis thaliana*, vyskytuje se přirozeně i u ostatních rostlin, hub, nižších a vyšších živočichů.

Zásadní roli v RNAi hrají malé RNA molekuly. Tyto RNA mohou být exogenního či endogenního původu, a v tomto smyslu jsou rozlišovány dvě základní dráhy RNAi. První, exogenní dráha, je aktivována přítomností siRNA, jejíž antisense vlákno je začleněno do RISC komplexu, což vede ke štěpení komplementární mRNA. Druhou možností RNAi je endogenní dráha. Tady dochází ke vzniku miRNA z vlásenkového prekurzoru. Vedoucí vlákno miRNA je zapojeno do RISC komplexu, který je opět schopen rozeznat cílovou mRNA a štěpením ji degradovat.

V rámci experimentální části jsem se snažila ověřit, zda je možné, a případně s jakou efektivitou, infikovat rostliny hrachu setého (*Pisum sativum* L.) virem semenem přenosné mozaiky hrachu (PSbMV) metodou gun bombardmentu. U experimentálních rostlin byly aplikovány varianty inokula s různými vlastnostmi. Úspěšnost jednotlivých variant byla hodnocena nejprve na základě vizuálně pozorovaných symptomů, dále pak metodou DAS-ELISA a poté u vybraných vzorků pomocí RT-PCR.

Gun bombardment může vést k úspěšné inokulaci rostlin hrachu, tzn., že je možné touto metodou navodit virovou infekci. Podmínky, za kterých bylo dosaženo nejefektivnější aplikace inokula, byly následující: aplikace inokula ředěného v poměru 1:2 (listy z infekční rostliny : fosfátový pufr), použití karborunda (1% w/v) pro porušení povrchu listu a aplikace dvojnásobné infekční dávky (dva výstřely do jednoho listu, tzn. 2x20 $\mu$ l). Za dodržení těchto podmínek bylo 60% sledovaných rostlin hrachu úspěšně infikováno virem semenem přenosné mozaiky hrachu.

## Summary

RNA interference (RNAi) is a mechanism regulating gene expression through double-stranded RNA (dsRNA). This process is processed through short single-stranded fragments produced from the dsRNA via its association with enzymatic complexes that are able to recognize the corresponding mRNA and degrade it subsequently. Although RNAi is studied mainly in model organisms such as nematode *C. elegans*, *Drosophila melanogaster* and *Arabidopsis thaliana* it is known that occurs naturally also in other plants, fungi, lower and higher animals.

Small RNA molecules play the fundamental role in RNAi. They have exogenous or endogenous origin and in that sense can be distinguish two main pathways of RNAi. The first one, exogenous pathway, is activated by the presence of siRNA whose antisense strand is incorporated into the RISC complex. It leads to complementary mRNA cleavage. The second way of RNAi is endogenous pathway. For this pathway is typical formation of miRNA from stem-loop precursor. Leading strand of miRNA is recruited to RISC complex which is able again to recognize the target mRNA and degrade by cleavage.

In the experimental part of this bachelor thesis I was verifying possibility and the effectiveness of the gun bombardment in succesfull infection of pea plants (*Pisum sativum* L.) by *Pea seed borne mosaic virus* (PSbMV). Various types of inoculum were applied to experimental plants and positive detection was first evaluated by visually observed symptoms followed by DAS-ELISA and subsequently by RT-PCR in selected samples.

The gun bombardment can lead to succesfull inoculation of pea plants by the virus as well as their experimental infection. The most effective parameters of application were: inoculum dilution in the ratio 1:2 (leaves from source infected plants : phosphate buffer), using of carborundum (1% w/v) for leaf surface abrasion and application of double infectious dose (two shots into one leaf, it means 2x20µl). Under these conditions 60% of experimental pea plants were succesfully infected by the *Pea seed borne mosaic virus*.

#### Poděkování:

Chtěla bych poděkovat Mgr. Daně Šafářové, Ph. D. za pomoc, cenné rady, čas a trpělivost při zpracování této bakalářské práce. Dále bych také ráda poděkovala všem, kteří mi byli ochotni pomoci a poradit při mé práci v laboratoři.

Experimentální část mé bakalářské práce byla zpracována v rámci COST akce FA0806 za podpory projektu COST LD12071 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

# Obsah

<b>1. Úvod</b>	<b>9</b>
<b>2. Cíle práce</b>	<b>10</b>
<b>3. Současný stav řešené problematiky</b>	<b>11</b>
3.1. RNA interference	11
3.1.1. Historie objevu RNA interference	11
3.1.2. Mechanismus RNA interference	12
3.1.2.1. Exogenní cesta RNA interference	12
3.1.2.2. Endogenní cesta RNA interference	14
3.1.2.3. Nejvýznamnější rozdíly v RNA interferenci u rostlin a živočichů	16
3.2. Charakteristika role interferujících molekul RNA a jejich zapojení v umlčování genů	17
3.2.1. Detekce a identifikace malých RNA	17
3.2.2. Objevení malých interferujících RNA molekul	17
3.2.3. Typy malých RNA	18
3.2.3.1. Srovnání siRNA a miRNA	18
3.2.3.2. siRNA	19
3.2.3.3. miRNA	19
3.2.3.4. rasiRNA	20
3.2.3.5. tncRNA	20
3.2.3.6. tasiRNA	20
3.3. Umlčování genů (Gene silencing)	21
3.3.1. Umlčování genů na úrovni transkripce (TGS)	21
3.3.2. Posttranskripční umlčování genů (PTGS)	22
3.3.3. Viry indukované umlčování genů v rostlinách (VIGS)	23
3.3.3.1. Supresory umlčování genů	24
<b>4. Experimentální část</b>	<b>26</b>
4.1. Materiál a metody	26
4.1.1. Biologický materiál	26
4.1.2. Příprava inokula a vlastní inokulace experimentálních rostlin	26
4.1.3. DAS-ELISA	29
4.1.4. Izolace celkové RNA	29

4.1.5.	Reverzní transkripce	30
4.1.6.	PCR amplifikace	30
4.1.7.	Kvantitativní RT-PCR	31
4.2.	Výsledky a diskuze	32
<b>5.</b>	<b>Závěr</b>	<b>41</b>
<b>6.</b>	<b>Seznam použité literatury</b>	<b>42</b>
<b>7.</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů</b>	<b>47</b>
<b>8.</b>	<b>Přílohy</b>	<b>49</b>
8.1.	Složení roztoků	49



# 1. Úvod

RNA interference (RNAi) je v rámci molekulární biologie jedním z nejvýznamnějších objevů posledních let. Úkolem RNAi je regulace exprese endogenních genů, ale je aktivována také jako přirozený obranný mechanismus vůči napadení viry či transpozóny. Stala se i důležitou metodou uplatňující se na poli experimentální genetiky. Díky RNAi došlo k výraznému vylepšení dosavadních genetických analýz u modelových organismů. V praxi může být využita pro spuštění cílené genetické exprese nebo pro cílené umlčování genů s úmyslem vyřadit daný gen z činnosti a určit tak jeho funkci v organismu.

Teoretická část této bakalářské práce je zaměřena hlavně na mechanismus RNA interference, na jeho uplatnění se v interakci patogen – hostitel. Popisuje průběh RNAi na úrovni transkripční a posttranskripční a objasňuje zapojení malých RNA molekul v těchto procesech.

Cílem praktické části je experimentální ověření použití metody gun bombardmentu v inokulaci rostlin hrachu virem semenem přenosné mozaiky hrachu (PSbMV) a její optimalizace. K detekci viru PSbMV je použita imunoenzymatická metoda DAS-ELISA a molekulární metody, RT-PCR a kvantitativní RT-PCR.

## 2. Cíle práce

- vypracovat literární rešerši na téma RNA interference a její role v interakci patogen – hostitel
- charakteristika role přirozených a umělých interferujících molekul RNA a jejich zapojení v interakcích
- experimentální ověření a optimalizace metody gun bombardmentu v inokulaci rostlin viry

### 3. Současný stav řešené problematiky

#### 3.1. RNA interference

RNA interference (RNAi) je v oblasti genomiky jedním z nejvýznamnějších objevů posledních let, za který byli v roce 2006 Andrew Z. Fire a Craig C. Mello oceněni Nobelovou cenou za fyziologii a medicínu.

RNAi je proces sloužící k regulaci genové exprese prostřednictvím dvouvláknové RNA, dochází tedy k interferenci mezi dvouvláknovou RNA a komplementární mRNA, jež kóduje určitý gen. K utlumení genové exprese prostřednictvím RNAi dochází buď na transkripční úrovni, kdy je exprese genů ovlivněna již na úrovni DNA, nebo na úrovni posttranskripční, kdy je degradována cílová mRNA, čímž dojde k zastavení translace daného genu. Je známo, že RNAi se přirozeně vyskytuje u organismů, jako jsou hlístice, trypanosomy, rostliny, houby, nižší a vyšší živočichové (Mahmood-ur-Rahman *et al.*, 2008).

RNAi slouží k obraně vůči abiotickému stresu, k regulaci transpozomálních elementů či k regulaci chromatinu. Je dokázáno, že porucha v genech, zodpovídajících za RNAi vede u organismů často k poruchám morfologického vývoje nebo k poruchám diferenciaci buněk. RNAi je ale také prostředek k ochraně buněk před cizorodými molekulami, jako jsou nukleové kyseliny virového původu či transgeny (Grishok *et al.*, 2001).

RNAi se také velmi rychle stává důležitou metodou pro analýzu funkce genů u eukaryot. Selektivním vyřazením funkce určitého genu můžeme pozorovat utlumení příslušného fenotypového projevu. Důležitým využitím RNAi je i transgenoze, kdy vnesením určitého transgenu do rostlin můžeme navodit odolnost vůči virovým patogenům.

##### 3.1.1 Historie objevu RNA interference

Existenci fenoménu RNAi poprvé zaznamenali Napoli *et al.* (1990). Ve svých experimentech s petúniemi vnášeli do rostlin gen pro chalcon syntázu uplatňující se v biosyntéze flavonoidů. Získané transgenní rostliny ovšem neměly očekávané tmavě nachově zbarvené květy, ale vytvářely květy s bílými oblastmi na tmavém podkladu nebo květy kompletně bílé. Kontrolní rostliny, do kterých nebyl vpraven gen pro chalcon syntázu, vykazovaly přirozeně se vyskytující květy nachového zbarvení. Analýza RNA z květů

transformovaných rostlin prokázala oproti rodičovským rostlinám výrazně sníženou úroveň mRNA produkovanou genem pro chalcon syntázu.

Molekulární podstatu RNAi odhalil Fire *et al.* (1998) při pokusech prováděných na hlístici *C. elegans*. Jejich cílem bylo vnesení antisense vlákna RNA do *C. elegans* a zablokování genu *unc-22*, jehož mRNA byla komplementární k antisense RNA. Jak očekávali, jednovláknová antisense RNA se navázala na mRNA genu, vznikla dvouvláknová RNA (dsRNA) a translaci cílového proteinu bylo zabráněno. Současně však jako kontrolu vnesli do několika háďátek také sense RNA a zjistili, že aplikace sense RNA vyvolala taktéž inaktivaci genu *unc-22*. Důvodem byla kontaminace připraveného transkriptu malým množstvím dsRNA a právě ta způsobila degradaci mRNA cílového genu. Úspěšná inaktivace cílového genu prostřednictvím antisense RNA byla rovněž způsobena kontaminací transkriptu. Z uvedeného tedy vyplývá, že iniciátorem RNAi je bez diskuzí dsRNA.

### 3.1.2 Mechanismus RNA interference

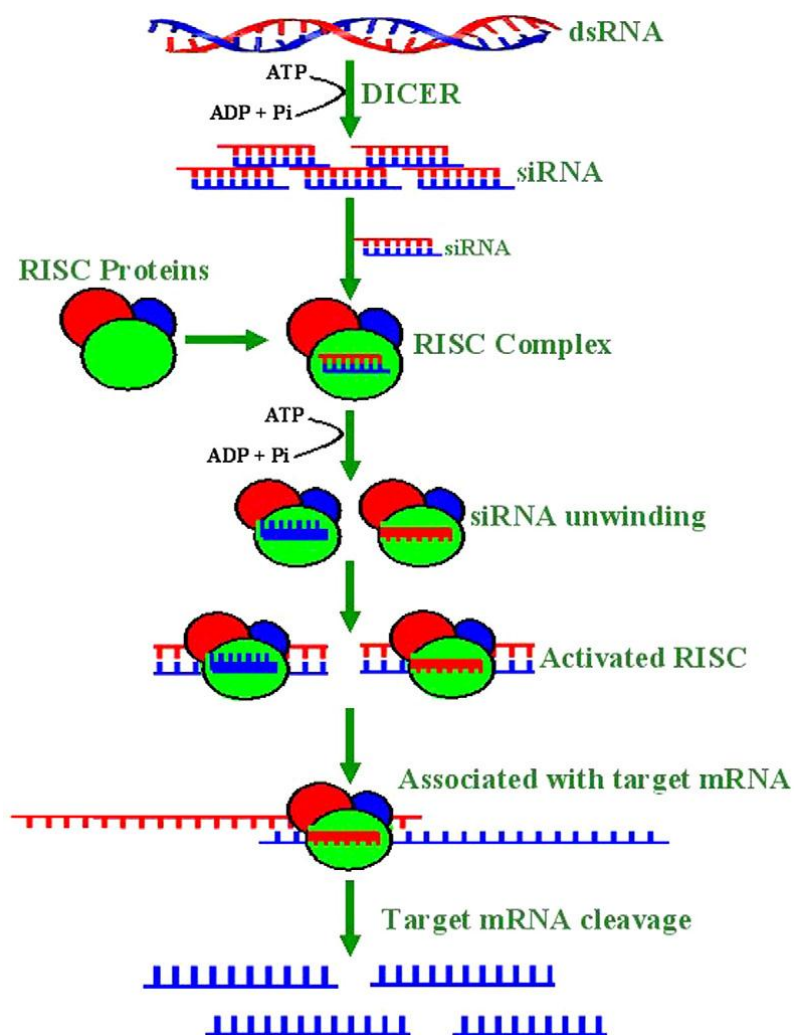
RNA interference se uplatňuje ve dvou odlišných procesech. Prvním z nich je aktivace RNAi prostřednictvím exogenní siRNA, kdy je cílová mRNA rozštěpána, což vede k pozastavení exprese odpovídajícího genu. Druhou možností je regulace exprese endogenních genů prostřednictvím miRNA. mRNA je rozpoznána za pomoci endogenní miRNA a výsledkem je zastavení translace (Berkhout *et Haasnoot*, 2006).

#### 3.1.2.1 Exogenní cesta RNA interference

Výzkumy prováděné na octomilce *Drosophila melanogaster* ukázaly, že sled reakcí u RNAi můžeme rozdělit na dvě základní fáze. Prvním krokem je iniciační fáze, kdy je dsRNA exogenního původu rozštěpána enzymatickým komplexem, který se nazývá Dicer (Mahmood-ur-Rahman *et al.*, 2008). Dicer je specifická dsRNA endoribonukleáza typu III nacházející se v cytoplazmě. Stejnou funkci jako Dicer plní u rostlin Dicer-like proteiny (DCL). Na rozdíl od savců, *C. elegans*, a kvasinek, pro které je typická přítomnost jednoho Diceru, se můžeme u *Drosophily* setkat se dvěma Dicery, u *Arabidopsis* byly objeveny čtyři různé typy DCL (DCL1, DCL2, DCL3 a DCL4), a u rýže dokonce deset typů DCL (Margis *et al.*, 2006). Součástí Diceru je 5 funkčních domén – N-terminální RNA helikázová doména, PAZ doména rozpoznávající dvounukleotidové přesahy na 3' konci pre-miRNA, doména vázající dsRNA a 2 RNázové domény, které regulují štípání siRNA a miRNA (Yu *et Kumar*, 2003). Výsledkem

štípání jsou malé fragmenty o velikosti 21 – 25 nukleotidů (nt). Tyto fragmenty se nazývají malé interferující RNA – siRNA a je pro ně typický dvounukleotidový přesah na 3'-koncích obou řetězců (Mahmood-ur-Rahman *et al.*, 2008).

Poté následuje efektorová fáze RNA interference. V té je siRNA začleněna do komplexu RISC (RNA-induced Silencing Complex). RISC je tvořen RNA a proteiny. Mezi nejznámější proteiny patří například AGO2 z rodiny Argonaut, FMRP nebo P100. RISC obsahuje několik podjednotek – PAZ a PIWI doménu, již zmiňovaný Dicer nebo R2D2 (Hutvagner *et* Zamore, 2002; Caudy *et al.*, 2003; Doench *et al.*, 2003, Zeng *et al.*, 2003). Začleněním siRNA je RISC aktivován a dvouvláknová siRNA je rozvolněna na jednotlivá vlákna. Po oddělení vláken od sebe je sense vlákno siRNA degradováno, antisense vlákno zůstává součástí RISC komplexu a naváže se na komplementární cílovou mRNA. siRNA zde tedy slouží jako vodítko k nalezení cílové sekvence. mRNA je naštipána a tyto fragmenty jsou poté degradovány nukleázami, což vede ke ztrátě exprese daného genu. Po degradaci cílové mRNA se RISC rozpadá na jednotlivé složky, vedoucí vlákno siRNA je z RISCu uvolněno a může se opět uplatnit (Zamore *et al.*, 2000; Meister *et* Tuschl, 2004).



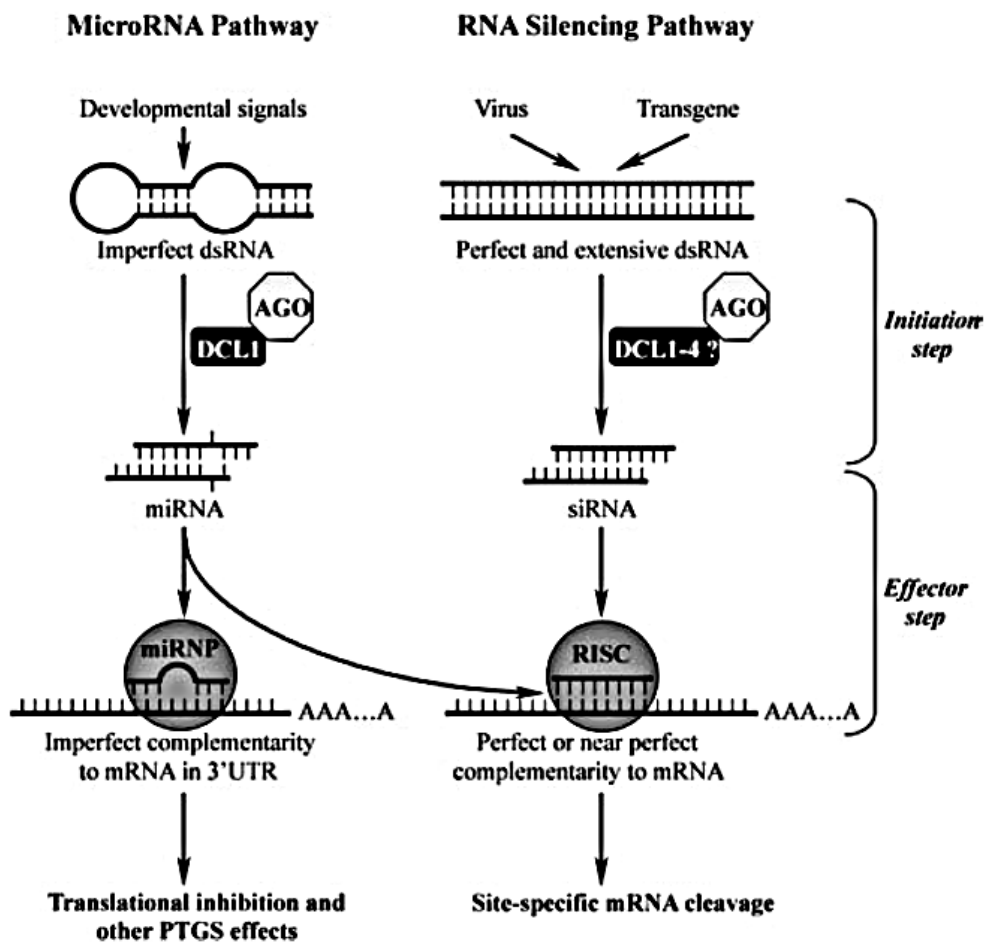
Obr. 1: Mechanismus RNA interference: umlčování virového genu prostřednictvím aktivace komplexu RISC. (převzato z Mahmood-ur-Rahman et al., 2008).

### 3.1.2.2 Endogenní cesta RNA interference

Významnou skupinou malých RNA molekul endogenního původu, které se zapojují v RNAi, jsou microRNA (miRNA). miRNA jsou v jádře exprimovány jako primární miRNA (pri-miRNA) a zpracovány enzymovým komplexem Drosha do 70 nukleotidového vlásenkového prekurzoru (pre-miRNA). Drosha patří stejně jako Dicer mezi dsRNA endoribonukleázy typu III a je součástí proteinového komplexu, který obsahuje také protein Pasha vázající dsRNA. Drosha kóduje tři domény – doménu vázající RNA a dvě RNázové domény (Denli et al., 2004). pre-miRNA je v cytoplazmě následně rozštěpána Dicerem na

dvouvláknové miRNA (mechanismus biogeneze miRNA je podrobněji popsán v podkapitole Typy malých RNA).

V dalším kroku je miRNA začleněna do RISC komplexu a dochází k degradaci sense vlákna, druhé vlákno (vedoucí) miRNA zůstává asociováno s komplexem RISC. Toto vedoucí vlákno je komplementární k cílové sekvenci určité mRNA, na tu se naváže a dojde k rozštěpání mRNA nebo ke znemožnění translace (Shimura *et* Pantaleo, 2011).



Obr. 2: Srovnání miRNA a siRNA dráhy RNA interference u *Arabidopsis*: V iniciační fázi siRNA dráhy je dsRNA, kódovaná virem nebo transgenem, zpracována Dicer-like proteinem na siRNA. V efektorové fázi je siRNA navázána do RISCu, který reguluje endonukleolytické štěpení cílové mRNA. miRNA dráha je spuštěna endogenním signálem, zahrnuje vznik miRNA za pomoci Dicer-like proteinu, začlenění miRNA do miRNA-ribonukleoproteinového komplexu (miRNP) a následnou inhibici translace, mRNA splicing a jiné procesy související s posttranskripčním umlčováním genů (převzato z Yu *et* Kumar, 2003).

### 3.1.2.3 Nejvýznamnější rozdíly v RNA interferenci u rostlin a živočichů

Ačkoli RNAi probíhá u rostlin a živočichů velmi podobně, existují rozdíly, kterými se od sebe rostliny a živočichové v tomto směru liší. Mezi nejvýznamnější rozdíly patří:

- 1) Zpracování jednovláknových transkriptů; Rostliny, kvasinky, hlístice a některé další organismy kódují pro zpracování jednovláknových transkriptů (ssRNA, ssDNA) RNA dependentní RNA polymerázu (RdRP), která dosyntetizuje druhé vlákno. Savci tyto RdRP nemají.
- 2) Multiproteinový komplex Dicer; Pro živočichy je typická přítomnost jen jednoho takového komplexu. Rostlinným homologem jsou Dicer-like (DCL) proteiny. Rostliny obvykle kódují více typů DCL proteinů (Margis *et al.*, 2006).
- 3) Metylace miRNA; miRNA rostlin a několika dalších organismů jsou na 3' konci metylovány, což zabraňuje degradaci malé RNA. miRNA savců metylovány nejsou (Li *et al.*, 2005).
- 4) Vazba endogenních miRNA na cílovou oblast; rostlinné miRNA se váží na cílovou mRNA s vysokou komplementaritou, zatímco miRNA se u živočichů váže na mRNA s komplementaritou mnohem nižší. Rostlinné miRNA se zaměřují na kódující oblasti mRNA, miRNA u živočichů se váží na více cílů a zpravidla ve 3' nepřekládané oblasti (Lewis *et al.*, 2005; Krek *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2005).
- 5) P-bodies ('processing bodies'); P-bodies jsou malé měchýřky, ve kterých je degradována nepotřebná mRNA nebo je sem směřována translačně potlačená mRNA, která ale může být v budoucnu opět translatována. Přítomnost P-bodies byla zatím prokázána jen u živočichů, ale u *Arabidopsis* už byly popsány tzv. Cajal bodies, jež by mohly plnit stejnou funkci, jako P-bodies u živočichů (<http://www.biolsci.org/v05p0097.htm>).



## **3.2 Charakteristika role interferujících molekul RNA a jejich zapojení v umlčování genů**

Je zřejmé, že krátké, proteiny nekódující RNA, hrají důležitou roli v regulaci vývoje, sestřihu intronů či editaci RNA (Lorkovic *et al.*, 2000).

### **3.2.1 Detekce a identifikace malých RNA**

Na charakterizaci malých RNA molekul může být pohlédnuto ze dvou úhlů – záleží na tom, zda má být charakterizována exprese již známých malých molekul RNA, nebo zda je cílem objev nových malých RNA. Podle tohoto přístupu je také vybírána vhodná metoda.

Jestliže mají být detekovány již známé RNA molekuly, je nutná izolace celkové RNA. Vhodnými metodami pro detekci jsou postupy založené na hybridizaci nukleotidů, jako je Northern hybridizace, prodlužování primeru, real-time PCR, microarray hybridizace a další. V případě, že je potřeba znát informaci o přesné sekvenci neznámé malé RNA, je využito metody klonování a sekvencování populace malých RNA přítomných ve vzorku (Aravin *et Tuschl*, 2005).

### **3.2.2 Objevení malých interferujících RNA molekul**

Průběh umlčování genů řízený malou RNA byl poprvé popsán v roce 1993 u *Caenorhabditis elegans* (Lee *et al.*, 1993; Wightman *et al.*, 1993). Tehdy bylo prokázáno, že 21 nt velký produkt nekódujícího RNA transkriptu genu *lin-4* zprostředkovává represi *lin-14* mRNA. Represe byla závislá na částečné komplementaritě sekvence mezi *lin-4* 21-nt RNA a netranslatovanou oblastí (UTR) *lin-14* mRNA. O několik let později byla u *C. elegans* objevena další 21-nt dlouhá RNA odvozená od nekódujícího RNA transkriptu genu *let-7*, která regulovala expresi genu *lin-41* (Reinhart *et al.*, 2000). Malé RNA molekuly *lin-4* a *let-7* jsou sice sekvenčně nepříbuzné, ale dvouvláknový prekurzor molekuly *lin-4* i *let-7* má charakter 30 bp dlouhé vlásenky. Experimenty tedy prokázaly, že 21 nt dlouhé sekvence hrají důležitou roli v genovém umlčování.

Zatímco u *C. elegans* byly sledovány malé molekuly RNA, u rostlin byly studovány mechanismy jako je kosuprese, transkripční a posttranskripční umlčování genů a viry indukované umlčování genů (těmto mechanismům bude věnována samostatná kapitola), kde

se malé interferující RNA molekuly rovněž zapojují (Waterhouse *et al.*, 2001; Baulcombe, 2004).

Zapojení krátkých RNA molekul v posttranskripčním umlčování genů bylo objeveno, když 25-nt sense a antisense RNA byly detekovány pouze v těch transgenních rostlinách, které vykazovaly posttranskripční umlčování genů. Z toho bylo usouzeno, že se malé RNA musí umlčování genů v nějakém směru účastnit. I další studie ukázaly, že tyto krátké RNA jsou důsledně spjaty s posttranskripčním umlčováním genů v rostlinách (Mette *et al.*, 2000; Dalmay *et al.*, 2000).

### 3.2.3 Typy malých RNA

V současné době rozlišujeme několik typů malých molekul RNA, které souvisí s RNA interferencí, přičemž nejvýznamnější jsou miRNA (microRNA) a siRNA (small interfering RNA). Mezi další patří např. rasiRNA (repeat-associated small interfering RNA), tasiRNA (trans-acting small interfering RNA) a tncRNA (tiny non-coding RNA). Jednotlivé typy těchto krátkých RNA se mezi sebou navzájem odlišují svou strukturou, asociací s odlišnými efektorovými proteiny, biologickou funkcí, ale hlavně tím, jestli jsou exogenního či endogenního původu, s čímž souvisí i následný způsob jejich zpracování (Carthew *et al.*, 2009). Exogenního původu jsou siRNA. Mezi endogenní malé RNA řadíme miRNA, tasiRNA, rasiRNA, tncRNA a také některé siRNA.

#### 3.2.3.1 Srovnání siRNA a miRNA

siRNA a miRNA se odlišují skutečností, že miRNA je cíleně exprimována, jelikož řídí regulaci endogenních genů, zatímco siRNA je primárně exogenního původu a jejím zdrojem jsou invazivní nukleové kyseliny, jako jsou viry, transpozony či transgeny. Další rozdíl je ve vzniku těchto krátkých RNA. miRNA vzniká z vlásenkového prekurzoru, zatímco siRNA vzniká z dlouhé, zcela komplementární dvouvláknové RNA. Rozdílem mezi siRNA a miRNA je také přesnost jejich koncových sekvencí. Většina druhů miRNA má velmi přesné koncové sekvence, pouze s malou variabilitou. Oproti tomu siRNA má sklon k větší rozmanitosti, což se týče její koncové stavby. Přesnost koncových sekvencí je pravděpodobně důvodem, proč miRNA může velmi specificky interagovat s mRNA, aniž by k tomu byla potřeba striktní komplementarita sekvencí či dlouhé přesahy (Carthew *et al.*, 2009).

Na druhou stranu jsou si tyto molekuly v mnoha ohledech podobné – siRNA i miRNA jsou vystříhány ze svých prekurzorů pomocí enzymu Dicer a jednovláčková forma siRNA i miRNA asociuje s enzymovým komplexem RISC (Carthew *et* Sontheimer, 2009). 21-nt miRNA a siRNA jsou tvořeny proteinem DCL1, zatímco např. 24-nt rasiRNA je produkována proteinem DCL3 (Xie *et al.*, 2005).

### 3.2.3.2 siRNA

Molekuly siRNA jsou dlouhé 21-25 nt, s typickým dvounukleotidovým přesahem na 3'-konci. Vznikají v iniciační fázi RNA interference z prekurzoru, kterým je dlouhá, lineární, dvouvláčková dsRNA. dsRNA se může nacházet buď přímo v cytoplazmě, nebo se může do buňky dostat z vnějšího prostředí. siRNA byla dvojicí Mello a Conte (2004) původně pozorována během viry a transgeny indukovaného umlčování genů v rostlinách, kde sloužila k ochraně genomu před těmito elementy. V roce 2002 a 2003 byly jako další zdroje dsRNA, objeveny centromery, transpozony a jiné repetitivní sekvence (Lippman *et* Martienssen, 2004). dsRNA jako prekurzor siRNA může případně vzniknout zpracováním ssRNA RNA dependentní RNA polymerázou. siRNA vznikající z dsRNA jsou poté v efektorové fázi zapojeny do enzymového komplexu RISC.

Kromě těchto exogenních siRNA byly u ptáků, savců, hád'átek či rostlin objeveny také endogenní siRNA (endo-siRNA). Endogenní siRNA jsou v mnohém podobné miRNA, ale liší se způsobem vzniku. Mezi nejvýznamnější endo-siRNA u rostlin patří tasiRNA, dále jsou to 'natural antisense transkript' odvozený od siRNA (nat-siRNA) a heteromatičká siRNA (hc-siRNA), odvozená z repetitivních a transpozomálních elementů (Röther *et* Meister, 2011).

### 3.2.3.3 miRNA

miRNA jsou nejvíce zastoupeným typem RNA u rostlin a živočichů (Bartel, 2004; Ambros, 2004). U jednobuněčných eukaryot *Trypanosoma brucei* (Djikeng *et al.*, 2001) a *Schizosaccharomyces pombe* (Reinhart *et* Bartel, 2002) byly nalezeny pouze siRNA a rasiRNA, ale ne miRNA.

miRNA jsou vyštěpeny z primárního transkriptu (pri-miRNA), který vzniká transkripcí tzv. MIR genů. Pri-miRNA je nejprve v jádře zpracována enzymem Drosha (endoribonukleáza III) do podoby přibližně 70 nt dlouhé molekuly pre-miRNA ve tvaru vlásenky, s typickým dvounukleotidovým přesahem na 3'-konci. Poté je z pre-miRNA

vlásky vyštěpen duplex miRNA/miRNA, který opouští jádro a za pomoci importinového transporteru, proteinu Hasty (HST), vstupuje do cytoplazmy. Jedno z miRNA vláken je specificky rozpoznáno, např. proteinem Argonaut (AGO), druhé je degradováno. AGO protein je součástí RISC komplexu, který řídí štěpení cílové sekvence nebo inhibici translace (Shimura *et al.*, 2011). U živočichů se miRNA vážou nejčastěji na 3' UTR oblast cílové mRNA, zatímco u rostlin dochází k vazbě po celé kódující oblasti mRNA (Lewis *et al.*, 2005; Krek *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2005).

#### **3.2.3.4 rasiRNA**

rasiRNA jsou malé interferující RNA spojené s repeticemi a vznikají pravděpodobně prodlužováním sense a antisense transkriptů obsahující repetitivní sekvence (Reinhart *et al.*, 2002; Volpe *et al.*, 2002; Aravin *et al.*, 2003). Jejich zajímavou vlastností je šíření na dlouhé vzdálenosti. Velikost těchto molekul se u jednotlivých druhů liší a obecně jsou o něco delší než siRNA nebo miRNA, typická délka rasiRNA je 23 – 28 nt. rasiRNA jsou zapojeny při vytváření a udržování struktury heterochromatinu a při kontrole transkriptů formujících se z repetitivních sekvencí (Matzke *et al.*, 2004; Lippman *et al.*, 2004). U savců je existence funkčních rasiRNA diskutabilní, jejich přítomnost byla prokázána pouze v nízkých koncentracích (Pfeffer *et al.*, 2005).

#### **3.2.3.5 tncRNA**

'Tiny non-coding RNA' jsou zvláštností *C. elegans* a jsou méně časté než miRNA (Ambros *et al.*, 2003). Jejich velikost je 19 – 23 nt. Nejsou evolučně konzervované. Ačkoliv je přítomnost tncRNA závislá na Diceru, dvouvláknové prekurzorové molekuly tncRNA ještě nebyly experimentálně ani počítačově identifikovány. Funkce těchto molekul zatím nebyla objasněna (Aravin *et al.*, 2005).

#### **3.2.3.6 tasiRNA**

U rostlin byl nedávno popsán zajímavý typ endogenních siRNA, pojmenovaný *trans-acting siRNA* (tasiRNA) (Vazquez *et al.*, 2004; Allen *et al.*, 2005). tasiRNA byly z počátku zaměňovány s miRNA. tasiRNA se ale od miRNA, která je též endogenního původu, odlišuje tím, že vzniká z dsRNA. Bylo odhaleno, že specifické miRNA v rostlinách si cíleně vybírají

ke štěpení jednovláknové nekódující RNA transkripty, které jsou poté použity jako templát pro RNA dependentní RNA polymerázu. Vzniká dvouvláknová RNA, kterou Dicer-like proteiny zpracovávají na 21-nt dlouhé molekuly tasiRNA. Ty interagují s endogenní cílovou mRNA, což vede ke štěpení za pomoci stejného mechanismu jako u rostlinné miRNA a dochází tak k regulaci genové exprese (Aravin *et Tuschl*, 2005).

### **3.3 Umlčování genů (*Gene silencing*)**

Umlčování genů je proces, kdy dvouvláknová RNA má schopnost umlčovat geny prostřednictvím degradace homologní RNA. Tato degradace se může dít na úrovni transkripce (Transcriptional gene silencing, TGS), kdy v jádře dochází k metylaci DNA a k modifikaci chromatinu, nebo na úrovni posttranskripční (Post-transcriptional gene silencing, PTGS). Toto umlčování genů pak probíhá v cytoplazmě buňky (Jana *et al.*, 2004).

TGS je primárně určeno k regulaci transpozónů a náhodné regulaci transgenů, které často svou strukturou, umístěním či nadbytkem transpozóny napodobují. PTGS naproti tomu hlavně reguluje virovou infekci a dodatečně také transgeny, které kódují aberantní RNA, jež je podobná virové RNA (Vaucheret *et Fagard*, 2001).

Donedávna byly TGS a PTGS považovány za zcela odlišné formy umlčování genů, dnes ovšem víme, že jsou si v mnoha krocích podobné. Existuje mnoho bodů společných pro oba, například změny v DNA metylaci. TGS je spojeno s hypermetylací sekvence promotoru, zatímco PTGS je spojováno s hypermetylací kódující sekvence (Sijen a Kooter, 2000). Rovněž viry i transgeny mohou kódovat dsRNA a způsobovat jak PTGS, tak i TGS. Havní rozdíl je ale v tom, zda se homologie mezi dsRNA a cílovým genem nachází v promotoru, nebo v sekvenci otevřeného čtecího rámce (ORF) (Vaucheret *et Fagard*, 2001).

#### **3.3.1 Umlčování genů na úrovni transkripce (Transcriptional gene silencing, TGS)**

U eukaryot je DNA metylace důležitá pro genovou expresi, organizaci a stabilitu genomu, pro genomický imprinting, inaktivaci chromozomu X a další vývojové procesy (Bird, 2002; Jones *et Takai*, 2001). V rostlinách je většinou metylována repetitivní DNA asociovaná s heterochromatinem (Kapoor *et al.*, 2005).

System DNA metylace je založený na dvou rozdílných aktivitách DNA metyltransferázy – *de novo* aktivitě, kde metyltransferáza přenáší metylovou skupinu na zcela nemetylovanou dvouvláknovou DNA, a aktivitě, která má za úkol jen udržet metylační systém u TGS. Zde dochází na komplementárním vlákně DNA k metylaci cytosinu v blízkosti metylcytosinu.

dsRNA, jež je svou sekvencí komplementární k sekvenci promotoru genu, který má být umlčen, je enzymaticky zpracována na 21-24 nt dlouhé molekuly, které slouží jako signál, a tento RNA signál pak řídí faktory přeskupování chromatinu a histonovou modifikaci enzymů. Dojde k zacílení určitých míst v genomu a vytváření chromatinových oblastí, které přitahují DNA metyltransferázy. DNA genu je poté metylována, což udržuje chromatin ve stabilním 'utlumeném' režimu (Kapoor *et al.*, 2005).

DNA metyltransferázy můžeme rozdělit na základě jejich strukturní a sekvenční podobnosti do několika skupin. Mezi nejvýznamnější patří: DNMT1, DNMT2, DNMT3, skupina metyltransferáz obsahující chromodoménový motiv, tzv. chromometyltransferázy (CMTs), či hlavní metyltransferáza u *Arabidopsis*, metyltransferáza 1 (MET1) (Henikoff *et Comai*, 1998).

### 3.3.2 Posttranskripční umlčování genů (Post-transcriptional gene silencing, PTGS)

Posttranskripční umlčování genů (PTGS) má primárně význam v ochraně rostlin proti virové infekci a transpozomálním elementům, uplatňuje se však i v regulaci endogenní exprese genů (Yu *et Kumar*, 2003). Vzhledem k tomu, že proces PTGS nastává posttranskripčně a zahrnuje degradaci mRNA, jsou RNA interference a PTGS v rostlinách považovány za související procesy. PTGS je vyvoláno přítomností dsRNA v cytoplazmě rostlinné buňky, bez ohledu na to, jakého je dsRNA původu (Dalmay *et al.*, 2000; Mourrain *et al.*, 2000).

Signál umlčování genů se šíří plazmodezmaty z buňky do buňky prostřednictvím cévního systému a řídí tak sekvenci-specifickou degradaci cílových RNA molekul. Tento mobilní signál je zprostředkován dsRNA, siRNA a aberantní RNA (Yu *et Kumar*, 2003).

Průběh PTGS je analogický RNA interferenci, v rámci jejího průběhu je opět rozeznávána endogenní a exogenní cesta. Endogenní cesta vede k inhibici translace a dalším efektům uplatňujícím se ve vývoji rostliny. Exogenní cesta se uplatňuje v reakci na infekci patogeny, vede ke specifické degradaci komplementární RNA a dsDNA virů či transpozomálních elementů. Důležitou charakteristikou RNA umlčování u rostlin je fakt, že se do něj zapojují dva funkčně odlišné druhy siRNA molekul (Hamilton *et al.*, 2002). 'Krátká'

siRNA o velikosti 21-22 nt zprostředkovává pomocí RISCu rozštěpení cílového transkriptu a je určena k signalizaci na krátké vzdálenosti. Druhá, 24-26 nt velká 'dlouhá' siRNA se uplatňuje v metylaci DNA a systémovém šíření umlčování (Hamilton *et al.*, 2002).

PTGS je nejčastěji aktivováno virovou RNA (tzv. viry indukované umlčování genů, VIGS) nebo transgeny (transgeny indukované umlčování genů) (Yu *et al.*, 2003). Endogenní geny mohou být umlčeny dodáním transgeny obsahující obrácené repetice. Dochází k metylaci endogenního genu, což může vést k předčasné terminaci nebo dokonce k prodloužení transkripce. To vede ke vzniku aberantních transkriptů, které mohou sloužit jako templáty pro RdRP. PTGS může být navozeno jednovláknovým transgenem, sense vláknem RNA však musí nejprve posloužit jako templát pro RdRP, která dá vzniknout dsRNA, která aktivuje PTGS. Nejvýraznějšího fenotypu je dosaženo, když jsou transgeny vloženy a transkribovány v obrácené orientaci (Kooter *et al.*, 1999).

Objev role genu *Silencing defective 1 (SDE1)* a jeho významu v aktivaci transgeny v rostlinách (Dalmay *et al.*, 2000) vedl k rozdělení PTGS na *SDE1* závislé a na *SDE1* nezávislé (Voinnet *et al.*, 2000). PTGS na *SDE1* závislé je aktivované transgenem, protože *SDE1* se podílí na zpracování RNA transgeny ve dvouvláknovou RNA. Naproti tomu PTGS indukované virem je na *SDE1* nezávislé, jelikož replikace virové RNA je zajištěna RNA dependentní RNA polymerázou (Dalmay *et al.*, 2000). Voinnet *et al.* (2000) dále rozlišil PTGS na lokální a systematické.

### 3.3.3 Viry indukované umlčování genů v rostlinách (VIGS)

K aktivaci viry indukovaného umlčování genů dochází v momentě, kdy virus napadne hostitelskou buňku (Ratcliff *et al.*, 1999). Většina rostlinných virů má RNA genomy produkující jednovláknové RNA molekuly se schopností vytvářet v hostitelské buňce duplexy. Dotsyntetizování druhého vlákna komplementárního k jednovláknové RNA zajistí RNA dependentní RNA polymeráza (RdRp) (Yu *et al.*, 2003).

Donedávna byla většina experimentů aplikována na rostlině *Nicotiana benthamiana*, v současné době se však s rozvojem nových metod a s použitím nových vektorů pracuje i s jinými rostlinnými druhy, například s *Arabidopsis thaliana* (Lu *et al.*, 2003).

Rostlinné viry pronikají do rostlinné buňky prostřednictvím vektoru nebo v místě drobného poškození, zde replikují, a poté se pohybují dále z buňky do buňky, dokud se nedostanou do cévních svazků. Těmi se šíří do všech částí rostlinného těla. Paralelně s tím, jak se šíří virus, se šíří také umlčující signál v podobě RNA. Jestliže se virus šíří rostlinou

rychleji, než umlčující signál, dojde ke vzniku virové infekce. A naopak, v případě, že je rychlejší umlčující signál, infekce se v rostlině dále nešíří (Vance *et Vaucheret*, 2001). Jinak je tomu ovšem u viroidů – ty jsou tvořeny malým RNA genomem a nekódují žádné proteiny. Přesto mohou rostlinu také infikovat a šířit se v ní. To se pravděpodobně děje prostřednictvím asociace s hostitelskými proteiny (Waterhouse *et al.*, 2001).

Kromě toho, že VIGS slouží jako obrana rostlin vůči virové infekci, je také velmi dobře experimentálně využitelný pro odhalení funkce genů. Princip spočívá v tom, že sekvence genu, který má být umlčen, je vložena do virového vektoru nesoucího dále promotor, virovou DNA (u DNA viru) nebo cDNA (u RNA viru) a terminátor. Tento vektor je posléze vnesen do rostliny za pomoci *Agrobacterium tumefaciens*, biolistickou metodou nebo mechanickou inokulací. Dojde k degradaci cílového transkriptu, což vede k umlčení příslušného genu (Purkayastha *et Dasgupta*, 2009). Vůbec první VIGS vektor byl vytvořen za použití *Tobacco mosaic virus* (TMV), jenž patří mezi RNA viry. Cílem bylo inaktivovat enzym phytoen desaturázu (PDS), jejímž úkolem je chránit chlorofyl před 'vyblednutím'. Transkript rekombinantního TMV nesoucí sekvenci genu *pds* byl připraven *in vitro* a inokulací vnesen do rostlin *Nicotiana benthamiana*. To vedlo k úspěšnému vyřazení funkce genu *pds*. Listy rostlin vykazovaly 'vyblednutí' barviva (Kumagai *et al.*, 1995).

### 3.3.3.1 Supresory umlčování genů

Mnoho rostlinných virů kóduje proteiny, které inhibují umlčování genů tím, že zasahují do jednoho či více kroků dráhy PTGS. Tyto proteiny nejsou produkovány, dokud se virus v infikované buňce nezačne replikovat. Jestliže se virus akumuluje v buňce ve vysoké koncentraci a po delší dobu, vypovídá to o silné supresorové aktivitě. A naopak, jestliže se virus vyskytuje v buňce v nízké koncentraci, můžeme očekávat slabou supresorovou aktivitu (Lu *et al.*, 2003).

Příkladem supresorových proteinů může být HC-Pro protein (helper component proteinase) potyvirů, 2b protein viru *Cucumber mosaic virus* (CMV), protein p19 viru *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV) či protein p25 viru *Potato virus X* (PVX).

HC-Pro protein zvyšuje akumulaci celé řady rostlinných virů (Vance *et Vaucheret*, 2001). Zabraňuje viry indukovanému umlčování genů i umlčování genů indukované transgeny, ale na rozdíl od p25 nepotlačuje systémové umlčování (Voinnet *et al.*, 2000).

Protein p19 na sebe váže volnou siRNA za vzniku komplexu p19-siRNA a snižuje tak množství volné siRNA, která by jinak mohla být začleněna do systému RISC a uplatnit se tak



v mechanismu umlčování genů. Kromě toho také dočasné snížení volné siRNA v infikovaných buňkách zabrání šíření mobilního umlčovacího signálu (Vance *et Vaucheret*, 2001).

Protein p25 potlačuje jak lokální PTGS, tak systémové PTGS. Lokální PTGS potlačuje ale jen v případě, že bylo navozeno transgenem, tedy dráhou závislou na *SDE1*; lokální PTGS aktivováno virovým vektorem zastaveno nebylo. U systémového umlčování genů byl p25 účinným inhibítoem bez ohledu na to, zda bylo PTGS spuštěno virem či transgenem (Voinnet *et al.*, 2000).

## **4. Experimentální část**

Cílem praktické části mé bakalářské práce bylo experimentální ověření použití a optimalizace metody gun bombardmentu v inokulaci rostlin hrachu virem semenem přenosné mozaiky hrachu (*Pea seed-borne mosaic virus*, PSbMV).

### **4.1 Materiál a metody**

#### **4.1.1 Biologický materiál**

Pro zvolené experimenty byly použity rostliny hrachu setého (*Pisum sativum* L.), k viru vnímavého kultivaru Merkur. Semena byla vysévána v substrátu Klasmann 4 v pěstebních nádobách o průměru 10 cm. Experimentální rostliny byly pěstovány ve fytotronu při fotorežimu dlouhého dne (16/8 h - den/noc) a teplotě 22 °C /18 °C (den/noc).

Pro inokulace byl použit izolát viru semenem přenosné mozaiky hrachu PSB204, který pochází ze sbírek Laboratoře molekulární biologie mikroorganismů, Univerzita Palackého v Olomouci. Tento izolát je v laboratoři dlouhodobě udržován na rostlinách hrachu Merkur. Infikované rostliny, zdroj infekčního agens, byly udržovány za stejných podmínek jako experimentální rostliny.

#### **4.1.2 Příprava inokula a vlastní inokulace experimentálních rostlin**

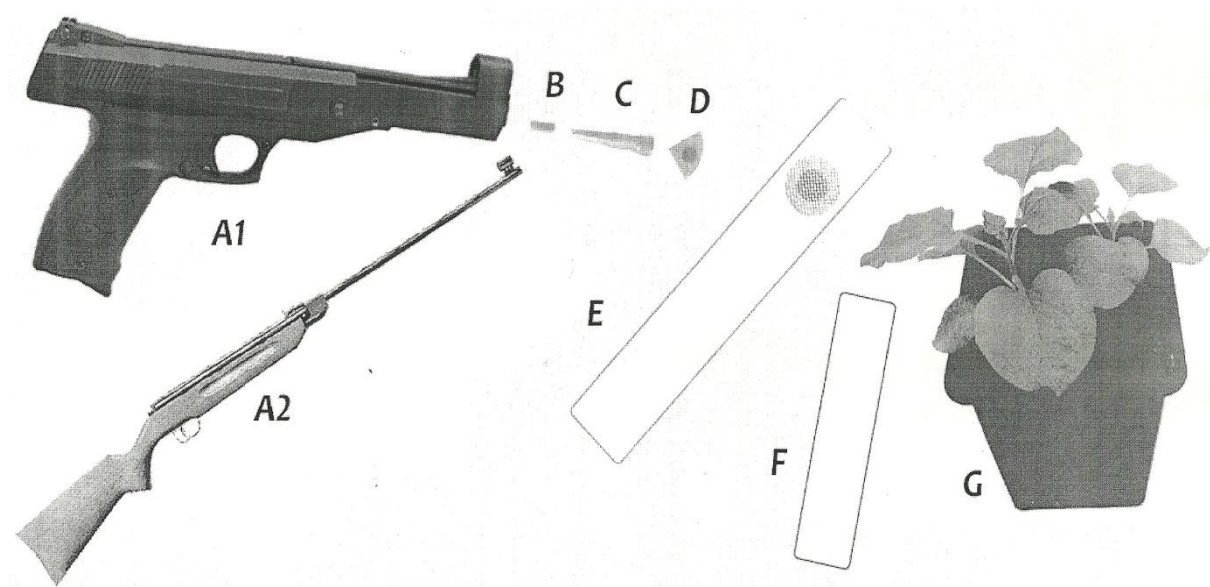
Pro přípravu inokula byly použity listy hrachu infikovaného izolátem PSbMV, vykazující typické příznaky infekce virem PSbMV. Jako pro inokulace nejvhodnější stádium byly zvoleny rostliny 12-14 dnů od výsevu, ve stádiu 2-3 pravého listu. Jelikož cílem této práce bylo ověření účinnosti a optimalizace metody gun bombardmentu v inokulaci rostlin virem, bylo v průběhu práce testováno několik různých variant inokulace. Rozdíl spočíval v různém množství v jedné dávce použitého inokula, v jeho různých koncentracích (ředění), odlišných abrazivech použitých při aplikaci, v množství aplikované infekční dávky (tj. výstřelů) či v tom, jestli bylo inokulum aplikováno na svrchní či spodní stranu listu (viz Tab. 1). V rámci experimentu byly jako kontrola zařazeny rostliny inokulované standardní mechanickou cestou, pomocí houbičky.

Tab. 1: Schéma laboratorního experimentu

	Varianty inokulace							
Parametry	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
Počet inokulovaných rostlin	5	5	5	5	5	5	15	10
Množství inokula (μl) na 1 výstřel	50	20	20	20	20	20	20	20
Ředění inokula	1:4	1:4	1:2	1:4	1:4	1:4	1:2	1:2
Druh abraziva	bez abraziva	bez abraziva	celit	celit	karborundum	karborundum	karborundum	karborundum
Aktivní uhlí	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
Strana listu	svrchní	svrchní	svrchní	svrchní	svrchní	spodní	svrchní	svrchní
Počet výstřelů na list	1	1	1	1	1	1	1	2

K přípravě inokula bylo použito přibližně 0,5 g listů z infikované rostliny. Zvážený list byl homogenizován v třecí misce s fosfátovým pufrem (0,01 M; pH 8) v poměru 1:2 nebo 1:4 společně s přísadkou aktivního uhlí. Aktivní uhlí tvořilo 1% celkového objemu. Homogenát byl centrifugován 5 min při 10 000 g při 4°C, K supernatantu bylo poté – v závislosti na variantě – přidáno abrazivo, opět tvořilo 1% celkového objemu.

Do hlavně nabité pistole byla důkladně upevněna zastříhnutá pipetovací špička a dovnitř špičky bylo napipetováno odpovídající množství inokula. Inokulum musí být pipetováno opatrně na okraj špičky, aby bylo zabráněno jeho případnému vtečení do hlavně pistole, ztrátě objemu nebo kontaminace vzduchové pistole. Pro aplikaci inokula byl zvolen druhý pravý list rostliny. K listu byla ze svrchní strany přiložena plastová destička umístěná ve stojanu. Ta obsahovala kruhový otvor, ve kterém bylo vloženo plechové sítko. Pod sítko se nasměroval list vhodný k inokulaci a ze spodní strany byl podložen krycím sklíčkem (viz Obr. 3). Z bezprostřední vzdálenosti bylo přes sítko pistolí nastřeleno inokulum. Po každém výstřelu bylo sítko i plastová destička očištěna buničitou vatou. Zbytek inokula byl po pěti minutách opláchnut jemným postříkáním listů vodou a rostliny byly umístěny zpět do fytotronu.



Obr. 3: Schéma inokulace rostliny za použití vzduchové pistole (převzato z Predajňa et al., 2010)

### 4.1.3 DAS-ELISA

Přítomnost viru PSbMV v rostlině byla zjišťována pomocí DAS-ELISA testu postupem podle Loewe Biochemica, GmbH, 14 dní po inokulaci rostlin.

Do jamek v ELISA destičce bylo nejprve napipetováno 200 μl směsi protilátek proti viru PSbMV a koutovacího pufru (v poměru 1:200). Takto byla destička inkubována 3 hodiny při 35 °C a poté byly jamky destičky třikrát promyty promývacím pufrem. Vzorky listů pro analýzu byly odebírány ze třetího patra (shora) experimentálních rostlin a taktéž ze zdravé rostliny (negativní kontrola) a z kontrolní virem infikované rostliny (pozitivní kontrola). Listy byly homogenizovány v extrakčním pufru (v poměru 1:10). Do každé jamky pak bylo napipetováno 250 μl extraktu, do jedné jamky bylo napipetováno pouze 250 μl extrakčního pufru ('slepý' vzorek). Vzorky byly inkubovány přes noc při teplotě 4 °C. Následující den byly vzorky vymyty pomocí promývacího pufru a do každé jamky bylo napipetováno 200 μl protilátek značených enzymem a konjugačního pufru (v poměru 1:200). Destička byla inkubována 3 hodiny při 35 °C a následně promyta promývacím pufrem. Do jamek bylo nanášeno 200 μl barvicí směsi (0,75 mg Na<sub>2</sub>PNP / 1 ml substrátového pufru) a destička byla inkubována ve tmě při pokojové teplotě a následně byla po 1, 2 a 24 hodinách vyhodnocena absorbance (vlnová délka 405 nm) pomocí ELISA readeru BioTek. Za pozitivní výsledek (+) u DAS-ELISA byla považována hodnota absorbance 0,100 a vyšší (po odečtu absorbance 'slepého' vzorku, extrakčního pufru).

### 4.1.4 Izolace celkové RNA

Celková RNA byla izolována pomocí NucleoSpin® RNA Plant kitu (Macherey-Nagel). 50 – 100 mg listů analyzovaných rostlin bylo homogenizováno v RA1 pufru s přidavkem merkaptoethanolu pomocí Lysing matrix (Q-BIOgene) v homogenizátoru FastPrep (ThermoSavant) a celková RNA byla dále izolována podle pokynů výrobce. Izolovaná RNA byla rozpuštěna v 60 μl RNase-free vody.

Koncentrace a čistota izolované RNA byla stanovena spektrofotometricky (UV-VIS, Beckman Coulter, DU 730). Jednotlivé vzorky RNA byly dlouhodobě uchovávány při -80 °C.

#### 4.1.5 Reverzní transkripce

Virová RNA byla přepsána do cDNA pomocí 'dvoukrokové' reverzní transkripce za použití 'random' primerů (Promega).

Pro reakci byly připraveny dvě reakční směsi – premix I a premix II. Premix I (množství na jeden vzorek) byl složen z 9 µl dEPC destilované vody a 1 µl 'random' primerů (0,5 µM, Promega). 10 µl směsi bylo pipetováno do tenkostěnné PCR zkumavky o objemu 0,5 ml, následně bylo přidáno 5µl vzorku. Celkový objem tedy byl 15 µl. Reakční směs byla inkubována 5 min při 70 °C, poté byla okamžitě přenesena na led. Následně bylo do zkumavky připipetováno 25 µl premixu II, který byl tvořen 11,5 µl dEPC destilované vody, 8 µl AMV RT reakčního pufru (5x, Promega), 4 µl dNTP (10mM, Fermentas), 0,5 µl Rnasin® inhibitoru (40 U/µl, Promega) a 1 µl AMV reverzní transkriptázy (10 U/µl, Promega).

Reverzní transkripce probíhala v celkovém objemu 40 µl směsi po dobu 60 min při teplotě 37 °C v termocyleru Thermal Cycler Gene E (Techne). Získané vzorky cDNA byly následně dlouhodobě uchovávány při -20 °C.

#### 4.1.6 PCR amplifikace

Virová cDNA získaná reverzní transkripcí byla amplifikována polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) za použití kombinace specifických primerů PSB8812 (5'-TTGAGAAATACACGGAAGC-3') a PSB9440 (5'-CATTATCTGTCTGAAAGTTGG-3') podle Šafářová *et al.* (2008). PCR reakční směs obsahovala (množství na jeden vzorek): 4 µl Go-Taq® Flexi reakčního pufru (5x, Promega), 1,2 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM, Promega), 9,2 µl destilované vody, 2 µl dNTP (2 mM, Fermentas), 0,2 µl každého primeru (20 pmol/µl), 0,2 µl Go-Taq® DNA polymerázy (5 U/µl, Promega) a 3 µl cDNA příslušného vzorku. Celkový objem reakce byl tedy 20 µl.

PCR amplifikace probíhala za následujících podmínek:

- Počáteční pre-denaturace 94 °C, 2 min
- Amplifikace (40 cyklů):
  - Denaturace 94 °C, 1 min
  - Hybridizace primerů (annealing) 52 °C, 1 min
  - Syntéza (extension) 72 °C, 1 min
- Závěrečná elongace 72 °C, 10 min

Detekce a vyhodnocení velikosti PCR produktů probíhalo pomocí elektroforetické separace (ELFO) v 1,5% agarózovém gelu (Amresco) v prostředí TAE pufru. DNA byla barvena pomocí barviva GelRed Nucleic Acid Stain (ředění 10000x ve vodě, Biotium, Ltd.), které bylo přidáváno přímo do agarózového gelu před vlastní elektroforetickou separací (3  $\mu$ l/50ml gelu). Do první jamky na gelu bylo vždy nanášeno 2  $\mu$ l velikostního markeru GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas), do následujících jamek bylo nanášeno 5  $\mu$ l vzorku. Migrace vzorků probíhala při stejnosměrném napětí 80 V po dobu 45 min. PCR produkty byly následně vizualizovány a dokumentovány s použitím UV transluminátoru a dokumentačního zařízení SynGene (Synoptics Ltd., UK).

#### 4.1.7 Kvantitativní RT-PCR

S cílem kvantifikace virové infekce (nebo pro zjištění rozdílů v koncentraci viru v jednotlivých rostlinách) byla použita metoda kvantitativní RT-PCR. Reakce probíhala za obdobných podmínek jako standardní RT-PCR, cDNA byla syntetizována pomocí random primerů (Promega), kvantifikace byla provedena pomocí specifických primerů PSB8812 a PSB9440. Reakční směs pro kvantitativní PCR obsahovala (množství na jeden vzorek): 2  $\mu$ l Platinum Taq pufru (10x, Invitrogen), 0,6  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (50 mM, Promega), 13,2  $\mu$ l destilované vody, 1  $\mu$ l dNTP (2 mM, Fermentas), 0,1  $\mu$ l f primeru (20 pmol/ $\mu$ l), 0,1  $\mu$ l r primeru (20 pmol/ $\mu$ l), 0,8  $\mu$ l SYBR Green (2x, Invitrogen), 0,2  $\mu$ l Platinum Taq® DNA polymerázy (5 U/ $\mu$ l, Invitrogen) a 2  $\mu$ l cDNA příslušného vzorku. Konečný objem reakce byl 20  $\mu$ l a reakce proběhla v Real-time cycleru RotorGene 3000 (Corbett Research, Austrálie).

Kvantitativní RT-PCR probíhala za následujících podmínek:

- Aktivace polymerázy 95 °C, 3 min
- Amplifikace (45 cyklů):
  - Denaturace 95 °C, 45 s
  - Hybridizace primerů (annealing) 52 °C, 45 s
  - Syntéza (extension) 72 °C, 45 s
- Analýza teploty tání PCR produktů:
  - Stabilizace 72 °C, 45 s
  - Teplotní gradient (1 °C) 72 – 95 °C, 5 s

## **4.2 Výsledky a diskuze**

U inokulovaných experimentálních rostlin byly nejprve vizuálně hodnoceny symptomy virové infekce. Přítomnost/absence typických symptomů naznačila, zda byla inokulace rostlin pomocí gun bombardmentu úspěšná, či nikoliv.

Kontrolní rostliny, inokulované standardní mechanickou cestou, vykazovaly typické symptomy infekce PSbMV jako svinutku listů, chlorotickou mozaiku, prosvětlování žilek nebo celkovou zakrslost rostlin.

U experimentálních rostlin byly 14 dnů po inokulaci (dpi) pozorovány taktéž typické příznaky infekce PSbMV, i když většinou jen v mírné formě (viz Tab. 2). Vyskytlo se však i šest rostlin zcela bez typických příznaků infekce. Po 27 dnech od inokulace došlo u většiny rostlin k rozšíření virové infekce. Rostliny vykazovaly buď silnější formu příznaku, nebo na nich byly pozorovány další symptomy typické pro infekci rostliny PSbMV. Čtyři rostliny nevykazovaly příznaky ani po 27 dnech od inokulace.





Obr. 4: Porovnání zdravé rostliny hrachu (vlevo) a rostliny vykazující příznaky infekce PSbMV – svinutka listů (vpravo). Zdroj: <http://www.inra.fr/hyp3/images/6034232.jpg>

Za účelem ověření možnosti použití a optimalizace metody gun bombardmentu při inokulaci rostlin virem byly testovány různé podmínky aplikace inokula (viz Tab. 1). Úspěšnost inokulace/aplikace, tzn. přítomnost a replikace viru v rostlině, byla hodnocena DAS-ELISA testem a u vybraných vzorků pomocí RT-PCR (viz Tab. 2).

Podmínky experimentu, při kterých bylo inokulum aplikováno:

1) Množství aplikované infekční dávky

Byly provedeny dva experimenty. V prvním experimentu bylo na list pěti pokusných rostlin hrachu aplikováno jednorázově 50  $\mu$ l inokula (varianta 1) a na dalších pět rostlin aplikováno pouze 20  $\mu$ l inokula (varianta 2). DAS-ELISA test prokázal v případě nastřelování dávkou 50  $\mu$ l jednu úspěšnou inokulaci, u druhé varianty (20  $\mu$ l) nebyl virus detekován v žádném případě. Jednorázová aplikace 50  $\mu$ l dávky inokula tedy nebyla považována za výrazně efektivnější, proto bylo v dalších experimentech pracováno s dávkou 20  $\mu$ l. U druhého experimentu (varianta 8) bylo testováno použití dvojnásobné infekční dávky. Nešlo však o jednu aplikaci inokula o objemu 40  $\mu$ l, ale bylo nastřelováno dvakrát 20  $\mu$ l do jednoho listu. Všechny rostliny v tomto experimentu vykazovaly čtrnáct dnů po inokulaci příznaky infekce o různé intenzitě, virus byl pomocí DAS-ELISA testu detekován u 60% pokusných rostlin. Z toho tedy vyplývá, že dvojitá aplikace infekční dávky na tentýž list je efektivnější, než aplikace pouze jedné dávky inokula.

## 2) Použití abraziva

Byly porovnávány tři varianty abraziva – tj. aplikace bez abraziva, aplikace celitu nebo karborunda.

Pro úspěšnou inokulaci rostlin hrachu virem semenem přenosné mozaiky hrachu bylo nezbytné narušit povrch listu. Do inokulační směsi bylo přidáno buď jedno (objemové) procento celitu (varianty 3 a 4), nebo karborunda (varianty 5 – 8).

Aplikace celitu se neukázala jako vyhovující, u experimentálních rostlin nedošlo k infekci žádné rostliny virem. Jako vhodnější abrazivum, jehož aplikací došlo pravděpodobně k výraznějšímu povrchovému poškození listu, se ukázalo karborundum. U většiny rostlin variant 5 – 8 byly pozorovány po 14ti dnech první příznaky infekce. Virus byl detekován pomocí DAS-ELISA testu u dvanácti z dvaceti devíti ovlivněných rostlin.

V případě, že do inokulační směsi nebylo přidáno abrazivum (varianty 1 a 2), většina pokusných rostlin nebyla infikována virem a na ovlivněných rostlinách nebyly pozorovány žádné příznaky infekce PSbMV. Přítomnost viru se podařilo prokázat DAS-ELISA testem pouze v jednom případě z celkových deseti.

## 3) Ředění inokula

Byla testována koncentrace aplikovaného inokula, a to v poměru 1:2 nebo 1:4.

S ředěním listů virového izolátu fosfátovým pufrem v poměru 1:4 bylo pracováno u variant 1, 2, 4, 5 a 6. Varianty 1, 2, 4 byly neúspěšné, stejně tak varianta 5, u které rostliny buď nevykazovaly příznaky vůbec, nebo jen v mírné formě. Virus nebyl pomocí DAS-ELISA testu detekován v žádném vzorku této varianty (viz Tab. 2). U šesté varianty, tj. v kombinaci s použitím karborunda a s aplikací 20 µl inokula na spodní stranu listu, vykazovaly typické příznaky infekce o různé intenzitě tři rostliny z pěti. U těchto symptomatických rostlin byl virus detekován DAS-ELISA testem u jedné rostliny, která vykazovala nejsilnější příznaky infekce (rostlina č. 6, viz Tab. 2). Prostřednictvím RT-PCR pak byla přítomnost viru dokázána u všech tří symptomatických rostlin – virus se pravděpodobně nevyskytoval v listech odebraných pro DAS-ELISA test v tak vysoké koncentraci, aby mohl být detekován.

Koncentrovanější inokulum, tj. ředění 1:2, bylo použito u variant 3, 7 a 8. Inokulace rostlin varianty 3 vedla k nulové efektivitě, nicméně u variant 7 a 8 byl virus detekován v jedenácti z dvaceti pěti případech, příznaky vykazovaly až na jednu všechny sledované rostliny.

Na základě hodnocení úspěšnosti inokulace (Tab. 2) můžeme říci, že vyšší koncentrace virových částic vede k efektivnější inokulaci rostlin.

#### 4) Aplikace inokula

Byly testovány dvě možnosti aplikace infekční dávky na list - na svrchní stranu (varianta 1, 2, 3, 4, 5, 7 a 8) a na spodní stranu listu (varianta 6 – viz předchozí bod).

U všech variant kromě varianty 6 bylo inokulum aplikováno na svrchní stranu listu, tento postup byl použit jako standardní aplikace a vedl opakovaně k úspěšné inokulaci virem. Při dvou srovnatelných aplikacích, varianta 5 a 6, byla zjištěna větší úspěšnost při aplikaci na spodní stranu listu. S ohledem na malý počet opakování však nelze jednoznačně rozhodnout, zda má tento způsob aplikace zásadní vliv na úspěšnou inokulaci rostliny, tj. na efektivnější vniknutí virových částic do listu a následné pomnožení viru v rostlině.

K úspěšné inokulaci rostlin, i když s různou efektivitou, došlo v případě tří variant (varianta 6, 7 a 8, viz Tab. 2). Jako nejvhodnější se však jevila varianta 8, kdy byla přítomnost viru detekována v šesti rostlinách z deseti. Inokulum bylo ředěno 1:2 (listy z virového izolátu:fosfátový pufr), bylo použito jedno objemové procento karborunda jako abraziva a byla aplikována dvojnásobná infekční dávka (dva výstřely do jednoho listu, tzn. 2x20 $\mu$ l) na svrchní stranu listu.

Metodu gun bombardmentu za použití vzduchové pistole použil poprvé jako alternativní metodu k inokulaci rostlin virem Predajňa *et al.* (2010). Jeho experimenty byly založeny na inokulaci rostlin tabáku *Nicotiana benthamiana* infekčním klonem viru šarky švestky *Plum pox virus* (PPV), jehož cDNA byla navázána na wolframové mikroprojektily. Na listy rostlin bylo aplikováno 10  $\mu$ l suspenze mikroprojektilů s navázanou DNA a nejčastěji byly infikovány 2 – 3 týdenní rostliny. První příznaky infekce PPV u rostlin, které byly inokulovány ve stáří dvou týdnů od výsevu, byly pozorovány již po sedmi dnech od aplikace infekční dávky. To je podstatně dříve, než u mého experimentu, kdy byly první symptomy PSbMV vizuálně pozorovány většinou až 14 dnů po inokulaci. Vzhledem ke zcela odlišným podmínkám umělého patosystému (virus/rostlina) jsou ale obě pozorování v souladu s pozorováním příznaků infekce při mechanické inokulaci virem. Při nastřelování inokula na listy dvoutýdenních rostlin bylo u experimentu Predajni *et al.* dosaženo úspěšnosti 88%, v

případě mých experimentů vykazovala nejúspěšnější varianta inokulace 13ti denních rostlin (varianta 8, viz Tab. 1 a Tab. 2) úspěšnost 60%.

Pro ověření výsledků detekce přítomnosti viru v rostlinách pomocí vizuálního hodnocení symptomů inokulovaných rostlin a DAS-ELISA testu a s ohledem na výrazně slabší symptomy infekce pozorované na experimentálních rostlinách byly u rostlin odebrány vzorky listů 14 dnů (varianty 5, 6, 7 a 8) a 27 dnů po inokulaci (dpi) (varianty 5, 6, a 7). Pro detekci viru byla použita RT-PCR. Vizuální hodnocení symptomů virové infekce a výsledky detekce viru v rostlinách pomocí DAS-ELISA metody a RT-PCR jsou shrnuty v následující tabulce:

Tab. 2: Hodnocení úspěšnosti inokulace

Varianta inokulace	14 dpi				27 dpi	
	Rostlina	Symptomy	DAS-ELISA	RT-PCR	Symptomy	RT-PCR
č. 5	1	bez příznaků	-	-	bez příznaků	-
	2	bez příznaků	-	-	bez příznaků	-
	3	bez příznaků	-	-	bez příznaků	-
	4	SL MOZ	-	-	SL SV, SL MOZ	-
	5	SL SV	-	-	SL SV	-
č. 6	6	SL SV, MOZ, Z	+	+	SV, MOZ, Z	+
	7	bez příznaků	-	-	PŽ	-
	8	bez příznaků	-	-	bez příznaků	-
	9	SL MOZ	-	+	PŽ	-
	10	Z	-	+	SL SV, SL MOZ, Z	-
č. 7	11	SL SV	-	-	SV, SL MOZ	-
	12	SV	-	+	SV, SL MOZ	-
	13	SL SV	-	-	SV, SL MOZ	-
	14	bez příznaků	-	-	SL SV	-
	15	SL SV	-	-	SV, SL MOZ	-
	16	SL SV, MOZ	+	nt	nt	nt
	17	SL SV, MOZ	-	nt	nt	nt
	18	SL SV, MOZ	-	nt	nt	nt
	19	SL MOZ	+	nt	nt	nt
	20	PŽ	-	nt	nt	nt
	21	SL SV, SL MOZ	-	nt	nt	nt
	22	SL MOZ, Z	+	nt	nt	nt
	23	SL SV, MOZ	-	nt	nt	nt
	24	SL SV, MOZ	+	nt	nt	nt
25	SL SV, MOZ	+	nt	nt	nt	
č. 8	26	SV, MOZ	+	nt	nt	nt
	27	SL SV, MOZ	-	nt	nt	nt
	28	SL SV, MOZ	-	nt	nt	nt
	29	SL SV, MOZ	+	nt	nt	nt
	30	SL SV, MOZ	-	nt	nt	nt
	31	SL MOZ	+	nt	nt	nt
	32	SL SV, MOZ	+	nt	nt	nt
	33	SV, SL MOZ	+	nt	nt	nt
	34	SL SV, MOZ	+	nt	nt	nt
	35	SV, PŽ	-	nt	nt	nt

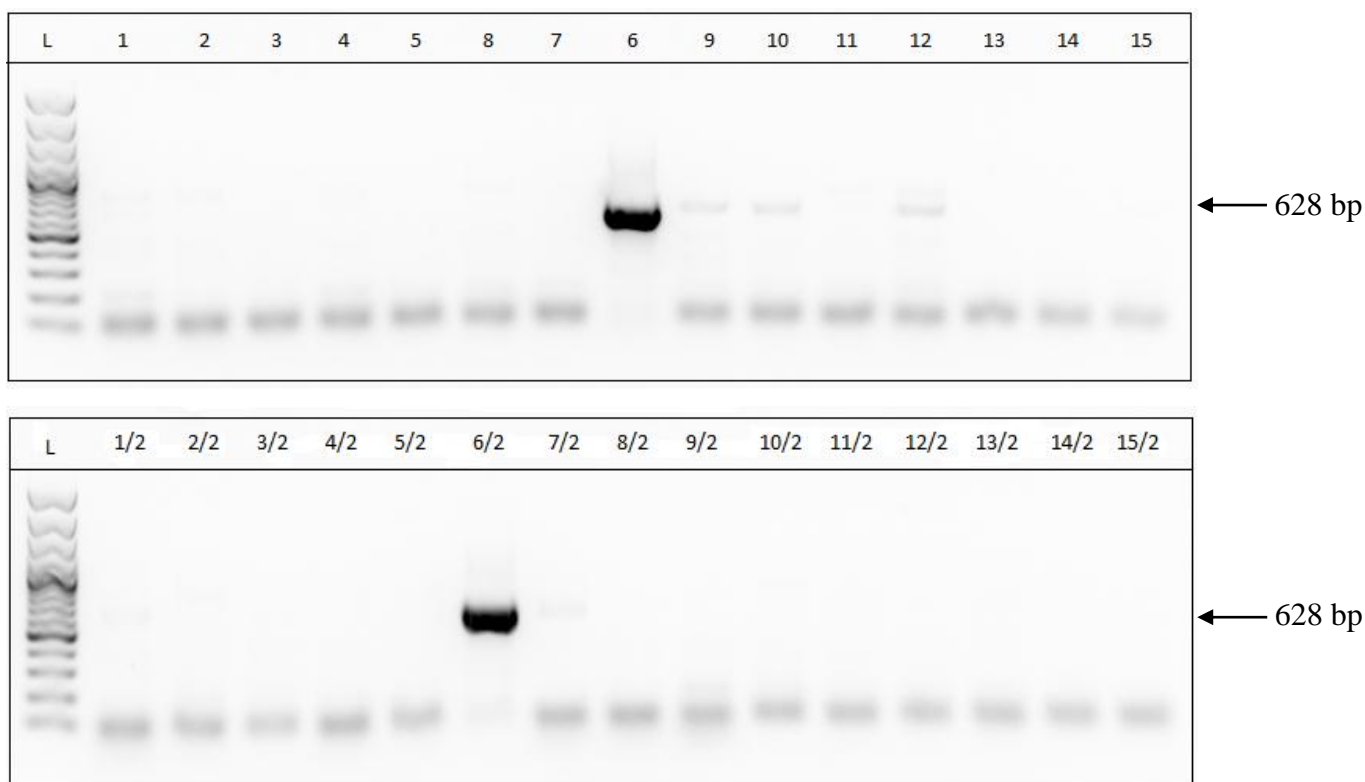
Vysvětlivky: SL SV – slabá svinutka, SL MOZ – slabá mozaika, SV – svinutka, MOZ – mozaika, Z – zakrslost, PŽ – prosvětlování žilek

+ : pozitivní, - : negativní, nt: netestováno

Pro detekci viru v rostlině byla použita metoda RT-PCR za pomoci reverzní transkripce s použitím random primerů a PCR s primery PSB8812 a PSB9440 specifickými pro počátek genu pro plášťový protein viru. Očekávaná velikost PCR produktu byla 628 bp.

Přítomnost viru byla detekována pouze u rostliny č. 6 (ve vzorcích odebíraných 14 i 27 dpi, viz Obr. 5), což je v souladu s pozitivním DAS-ELISA testem a se symptomy, které rostlina vykazovala v obou odběrech. Dále byl detekován slabý produkt ve vzorcích 9, 10 a 12 (viz Obr. 5). To odpovídá příznakům na rostlinách pozorovaných 14 dpi i 27 dpi, ne však detekci viru prostřednictvím DAS-ELISA testu (viz Tab. 2).

Dá se také předpokládat, že jestliže byl PCR produkt přítomen u vzorků č. 9, 10 a 12 z odběru 14 dpi, bude tento PCR produkt detekován i u vzorků odpovídající odběru 27 dpi, jelikož při úspěšné inokulaci by mělo dojít k pomnožení viru v rostlině. To se ovšem neprokázalo. Příčinou bude s největší pravděpodobností nedostačující kvalita vyizolované RNA, která byla pro RT-PCR použita, nebo kontaminace vzorků v průběhu RT-PCR.



Obr. 5: Detekce PSbMV ve vzorcích 1 – 15

(L: 100 bp DNA ladder, Fermentas; dráhy 1 – 15, 1/2-15/2: vzorky č. 1 – 15; šipka označuje velikost specifického produktu)

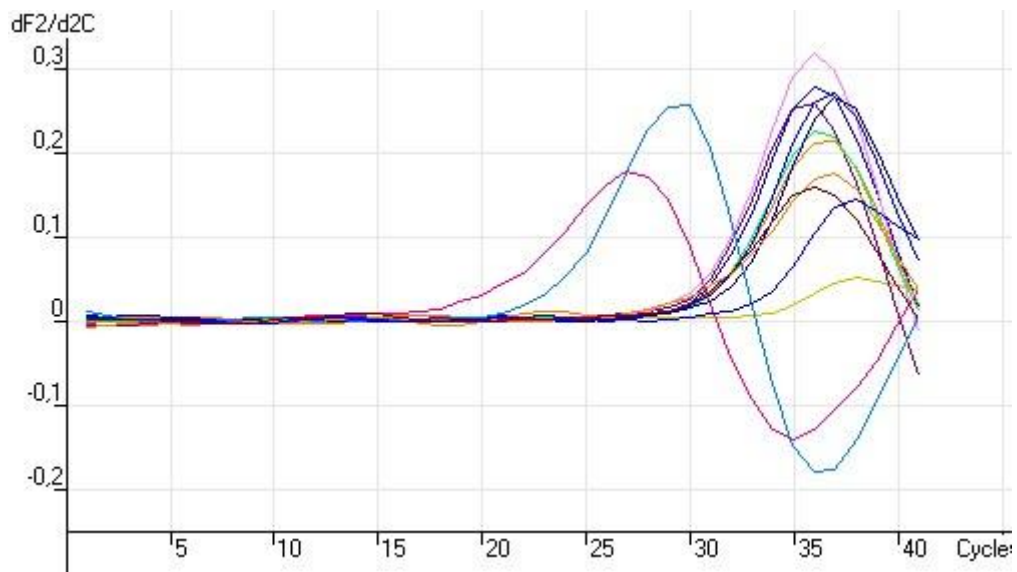
Koncentrace viru ve sledovaných rostlinách a jejich změny byly analyzovány také pomocí kvantitativní RT-PCR. Pro tuto analýzu bylo vybráno patnáct rostlin, varianty 5, 6 a 7.

Nejvyšší koncentrace viru byla zjištěna u rostliny vykazující již 14 dnů po inokulaci typické příznaky (rostlina č. 6), u dalších rostlin - č. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 13, 14 byla detekována 14 dnů i 27 dnů po inokulaci výrazně nižší koncentrace (viz Tab. 3, Graf. 1), na hranici detekce pomocí standardní RT-PCR.

Tab. 3: Stanovení koncentrace viru ve vybraných pozitivních vzorcích

Označení vzorku	Popis vzorku	Relativní koncentrace viru na 1 mg listu
2	rostlina č. 2 varianty 5, 14 dpi (73 mg)	0,06%
3	rostlina č. 3 varianty 5, 14 dpi (57 mg)	0,50%
4	rostlina č. 4 varianty 5, 14 dpi (43 mg)	1,08%
5	rostlina č. 5 varianty 5, 14 dpi (80 mg)	0,28%
6	rostlina č. 6 varianty 6, 14 dpi (74 mg)	100,00%
7	rostlina č. 7 varianty 6, 14 dpi (58 mg)	0,43%
13	rostlina č. 13 varianty 7, 14 dpi (39 mg)	0,95%
14	rostlina č. 14 varianty 7, 14 dpi (56 mg)	0,37%
3/2	rostlina č. 3 varianty 5, 27 dpi (77 mg)	0,14%
6/2	rostlina č. 6 varianty 6, 27 dpi (51 mg)	34,32%
7/2	rostlina č. 7 varianty 6, 27 dpi (72 mg)	0,39%
14/2	rostlina č. 14 varianty 7, 27 dpi (57 mg)	0,14%
15/2	rostlina č. 15 varianty 7, 27 dpi (57 mg)	0,65%

Vysvětlivky: vzorek č. 6 slouží jako kalibrátor



Graf 1: Kvantifikace virové infekce pomocí komparativní analýzy (zobrazeny pouze pozitivní vzorky)



## 5. Závěr

Teoretická část této práce shrnuje aktuální poznatky k tématu RNA interference a její role v interakci patogen – hostitel. Je také zaměřena na zapojení interferujících RNA molekul v interakcích a na umlčování genů.

Princip RNA interference je založen na umlčení genové exprese prostřednictvím interakce dvoušroubovice RNA s homologním transkriptem. RNA interference se přirozeně uplatňuje v regulaci endogenní exprese genů prostřednictvím miRNA, ale svou roli hraje i v ochraně organismu před nežádoucím patogenem, kdy se do buňky dostává jednovláknová nebo dvouvláknová RNA exogenního původu.

Proces, kdy má dvouvláknová RNA schopnost umlčovat geny prostřednictvím degradace homologní RNA, se nazývá umlčování genů (gene silencing). Tento mechanismus je charakteristický tím, že provádí změny v metylaci DNA. U transkripčního umlčování genů (TGS) dochází k hypermetylaci promotoru, kdežto u posttranskripčního umlčování genů (PTGS) je iniciována hypermetylace kódující sekvence. Ačkoli se PTGS uplatňuje také v regulaci endogenní exprese genů, jeho primární význam spočívá v ochraně rostlin proti transpozomálním elementům a virové infekci. Jestliže je PTGS aktivováno virovou RNA, hovoříme o viry indukovaném umlčování genů (VIGS). Většina virů obsahuje ve svém genomu jednovláknovou RNA, k níž je v hostitelské buňce pomocí RNA dependentní RNA polymerázy dosyntetizováno druhé komplementární vlákno a vzniká tak dvoušroubovice RNA.

Gun bombardment je nástroj, který se dá beze sporu využít ke studiu RNA interference. K tomu, aby tato metoda vedla k úspěšné inokulaci experimentálních rostlin virem, je však potřeba dodržet určité podmínky. V experimentech prováděných v rámci mé práce jsem došla k závěru, že pro úspěšnou inokulaci rostlin hrachu virem semenem přenosné mozaiky hrachu je nezbytné narušit povrch listu pomocí abraziva, nejlépe karborunda. Jako efektivní se dále ukázala být aplikace inokula s poměrem ředění virového izolátu fosfátovým pufrem v poměru 1:2 a taktéž použití dvojnásobné infekční dávky, aplikované na list ve dvou výstřelech, tedy 2 x 20  $\mu$ l.

## 6. Seznam použité literatury

Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A. M., Carrington, J. C. (2005): MicroRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* 121: 207-221.

Ambros, V. (2004): The functions of animal microRNAs. *Nature* 431: 350–355.

Ambros, V., Lee, R. C., Lavanway, A., Williams, P. T., Jewell, D. (2003): MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr. Biol.* 13: 807-818.

Aravin, A. A., Lagos-Quintana, M., Yalcin, A., Zavolan, M., Marks, D., Snyder, B., Gaasterland, T., Meyer, J., Tuschl, T. (2003): The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev. Cell* 5: 337–350.

Aravin, A., Tuschl, T. (2005): Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing. *FEBS Letters* 579: 5830–5840.

Bird, A. (2002): DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16: 6–21.

Bartel, D. P. (2004): MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 116: 281–297.

Baulcombe, D. (2004): RNA silencing in plants. *Nature* 431: 356–363.

Berkhout, B., Haasnoot, J. (2006): The interplay between virus infection and the cellular RNA interference machinery. *FEBS Letters* 580: 2896-2902.

Carthew, R. W., Sontheimer, E. J. (2009): Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNA. *Cell* 136: 642–655.

Caudy, A. A., Ketting, R. F., Hammond, S. M., Denli, A. M., Bathorn, A. M., Tops, B. B. (2003): A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes. *Nature* 425: 411–414.

Dalmay, T., Hamilton, A. J., Rudd, S., Angell, S., Baulcombe, D. C. (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: 543–553.

Denli, A. M., Tops, B. B., Plasterk, B. B., Ketting, R. F., Hannon, G. J. (2004): Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432: 231-235.

Djikeng, A., Shi, H., Tschudi, C., Ullu, E. (2001): RNA interference in *Trypanosoma brucei*: cloning of small interfering RNAs provides evidence for retroposon-derived 24-26-nucleotide RNAs. *RNA* 7: 1522–1530.

Doench, J. G., Petersen, C. P., Sharp, P. A. (2003): siRNAs can function as miRNAs. *Genes. Dev.* 17: 438–442.

- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., Mello, C. C. (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.
- Grishok, A., Pasquinelli, A. E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I. (2001): Genes and mechanisms related to RNA regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 106: 23–34.
- Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L., Baulcombe, D. (2002): Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *The EMBO Journal* 17: 4671-4679.
- Henikoff, S., Comai, L. (1998): A DNA methyltransferase homolog with a chromodomain exists in multiple polymorphic forms in *Arabidopsis*. *Genetics* 149: 307-318.
- Hutvagner, G., Zamore, P. D. (2002): A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297: 2056–2060.
- Jana, S., Chakraborty, Ch., Nandi, S. (2004): Mechanisms and roles of the RNA-based gene silencing. *Electronic Journal of Biotechnology*: 324-333.
- Jones, L., Hamilton, A. J., Voinnet, O., Thomas, C. L., Maule, A. J., Baulcombe, D. C. (1999): RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. *Plant Cell* 11: 2291-2302.
- Jones, P. A., Takai, D. (2001): The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 293: 1068–1070.
- Kapoor, A., Agius, F., Zhu, J. (2005): Preventing transcriptional gene silencing by active DNA demethylation. *FEBS Letters* 579: 5889–5898.
- Kooter, J. M., Matzke, M. A., Meyer, P. (1999): Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. *Trends in plant science*: 340-347.
- Krek, A., Grün, D., Poy, M. N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E. J., MacMenamin, P., da Piedade, I., Gunsalus, K. C., Stoffel, M., Rajewsky, N. (2005): Combinatorial microRNA target predictions. *Nat. Genet.* 37: 495–500.
- Kumagai, M. H., Donson, J., Della-Cioppa, G., Harvey, D., Hanley, K., Grill, L. K. (1995): Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1679–1683.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., Ambros, V. (1993): The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843–854.
- Lewis, B. P., Burge, C. B., Bartel, D. P. (2005): Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120: 15–20.

- Li, J., Yang, Z., Yu, B., Liu, J., Chen, X. (2005): Methylation Protects miRNAs and siRNAs from a 3'-End Uridylation Activity in Arabidopsis. *Current Biology* 16: 1501-1507.
- Lippman, Z., Martienssen, R. (2004): The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* 431: 364–370.
- Lorkovic, Z. J., Kirk, D. A. W., Lamberson, M. H. L., Filipowicz, W. (2000): Pre-mRNA splicing in higher plants. *Trends in Plant Science* 4:160-167.
- Lu, R., Martin-Hernandez, A. M., Peart, J. R., Malcuit, I., Baulcombe, D. C. (2003): Virus-induced gene silencing in plants. *Methods* 30: 296-303.
- Mahmood-ur-Rahman, Ali, I., Husnain, T., Riazuddin, S. (2008): RNA interference: the story of gene silencing in plants and humans. *Biotechnology Advances* 26: 202-209.
- Margis, R., Fusaro, A. F., Smith, N. A., Curtin, S. J., Watson, J. M., Finnegan, E. J., Waterhouse, P. M. (2006): The evolution and diversification of Dicers in plants. *FEBS Letters* 10: 2442-2450.
- Marathe, R., Smith, T. H., Anandalakshmi, R., Bowman, L. H., Fagard, M., Mourrain, P., Vaucheret, H., Vance, V. B. (2000): Plant viral suppressors of posttranscriptional silencing do not suppress transcriptional silencing. *Plant J* 22: 51-59.
- Matzke, M., Aufsatz, W., Kanno, T., Daxinger, L., Papp, I., Mette, M. F., Matzke, A. J. (2004): Genetic analysis of RNAmmediated transcriptional gene silencing. *Biochim. Biophys. Acta* 1677: 129–141.
- Meister, G., Tuschl, T. (2004): Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431: 343–349.
- Mello, C. C., Conte, D. Jr. (2004): Revealing the world of RNA interference. *Nature* 431: 338–342.
- Mette, M. F., van der Winden, J., Matzke, M., Matzke, A. J. (2002): Short RNAs Can Identify New Candidate Transposable Element Families in Arabidopsis. *Plant Physiology* 1: 6-9.
- Mourrain, P., Beclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J., Jouette, D., Lacombe, A., Nikic, S., Picault, N., Remoue, K., Sanial, M., Vo, T., Vaucheret, H. (2000): *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for post-transcriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 101: 533-542.
- Napoli, C., Lemieux, Ch., 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: 279-289.
- Padmanabhan, Ch., Zhang, X., Jin, H. (2009): Host small RNAs are big contributors to plant innate immunity. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 465-472.

- Pfeffer, S., Sewer, A., Lagos-Quintana, M., Sheridan, R., Sander, C., Grässer, F. A., van Dyk, L. F., Ho, C. K., Shuman, S., Chien, M., Russo, J. J., Ju, J., Randall, G., Lindenbach, B. D., Rice, C. M., Simon, V., Ho, D. D., Zavolan, M., Tuschl, T. (2005): Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat. Meth.* 2: 269-276.
- Predajňa, L., Nagyová, A., Šubr, Z. (2010): Simple and efficient biolistic procedure for the plant transfection with cDNA clones of RNA viruses. *Acta Virologica* 54: 303-306.
- Purkayastha, A., Dasgupta, I. (2009): Virus-induced gene silencing: A versatile tool for discovery of gene functions in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 967–976.
- Ratcliff, F. G., MacFarlane, S. A., Baulcombe, D. C. (1999): Gene silencing without DNA. RNA-mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell* 11: 1207–1216.
- Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., Horvitz, H. R., Ruvkun, G. (2000): The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403: 901–906.
- Reinhart, B. J., Bartel, D. P. (2002): Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats. *Science* 297: 1831.
- Röther, S., Meister, G. (2011): Small RNAs derived from longer non-coding RNAs. *Biochimie* 93: 1905-1915.
- Sijen, T., Kooter, J. M. (2000): Post-transcriptional gene-silencing: RNAs on the attack or on the defense? *Bioessays* 22: 520-531.
- Shimura, H., Pantaleo, V. (2011): Viral induction and suppression of RNA silencing in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1809: 601–612.
- 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 virologica* 52: 53-57.
- Vance, V., Vaucheret, H. (2001): RNA Silencing in Plants--Defense and Counterdefense. *Science* 292: 2277-2280.
- Vaucheret, H., Fagard, M. (2001): Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends in Genetics* 1: 29-35.
- Vazquez, F., Vaucheret, H., Rajagopalan, R., Lepers, C., Gascioli, V., Mallory, A. C., Hilbert, J. L., Bartel, D. P., Crété, P. (2004): Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of *Arabidopsis* mRNAs. *Mol. Cell* 16: 69-79.
- Voinnet, O., Lederer, C., Baulcombe, D. C. (2000): A Viral Movement Protein Prevents Spread of the Gene Silencing Signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* 103: 157–167.

Volpe, T. A., Kidner, C., Hall, I. M., Teng, G., Grewal, S. I., Martienssen, R. A. (2002): Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* 297:1833–1837.

Waterhouse, P. M., Wang, M. B., Lough, T. (2001) Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 411: 834–842.

Wightman, B., Ha, I., Ruvkun, G. (1993): Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75: 855–862.

Xie, X., Lu, J., Kulbokas, E. J., Golub, T. R., Mootha, V., Lindblad-Toh, K., Lander, E. S., Kellis, M. (2005): Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature* 434: 338–345.

Yu, H., Kumar, P. P. (2003): Post-transcriptional gene silencing in plants by RNA. *Plant Cell Rep.* 22: 167-174.

Zamore, P. D., Tuschli, T., Sharp, P. A., Bartel, D. P. (2000): RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21–23nucleotide intervals. *Cell* 101: 25–33.

Zeng, Y., Yi, R., Cullen, B. R. (2003): MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 9779–84.

<http://www.biolsci.org/v05p0097.htm>

## 7. Seznam použitých zkratek a symbolů

AGO	Argonaut
bp	base pairs, páry bází
cDNA	komplementární DNA
CMV	Cucumber mosaic virus
CymRSV	Cymbidium ringspot virus
DAS-ELISA	double antibody sandwich ELISA
dEPC	diethylpyrokarbonát
DCL	Dicer-like
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleosidtrifosfát
dsRNA	dvouvláknová RNA
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ELFO	elektroforéza
ELISA	enzym-linked immunosorbent assay
f-primer	forward primer, přímý primer
HC-Pro	helper component protease
hc-siRNA	heterochromatická siRNA
mRNA	mediátorová RNA
miRNA	mikro RNA
nt	nukleotid(y)
ORF	open reading frame, otevřený čtecí rámec
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDS	phytoene desaturase
PPV	Plum pox virus
pre-miRNA	prekurzor miRNA
pri-miRNA	primární transkript miRNA
PSbMV	Pea seed-borne mosaic virus, virus semenem přenosné mozaiky hrachu
PTGS	post-transcriptional gene silencing, posttranskripční umlčování genů
PVX	Potato virus X
rasiRNA	repeat-associated siRNA

r-primer	reverse primer, zpětný primer
RdRp	RNA dependentní RNA polymerasa
RISC	RNA-induced silencing komplex
RNA	ribonukleová kyselina
RNAi	RNA interference
RT-PCR	reverzní transkripce - polymerázová řetězová reakce
siRNA	malá interferující RNA
ssRNA	jednovláknová RNA
Taq polymeráza	termostabilní plymeráza
TGS	transcriptional gene silencing, transkripční umlčování genů
TMV	Tobacco mosaic virus
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan



## 8. Přílohy

### 8.1 Složení roztoků

#### **Koutovací pufr (pH 9,6; 1000 ml):**

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,59 g
NaHCO <sub>3</sub>	2,93 g

#### **PBS pufr (pH 7,4; 1000 ml):**

NaCl	8 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	2,9 g
KCl	0,2 g

#### **Extrakční pufr (pH 7,4; 1000 ml):**

PBS	1000 ml
PVP K-25	20 g
Tween 20	0,5 ml
vaječný albumin	10 g

#### **Konjugační pufr (pH 7,4; 1000 ml):**

PBS	1000 ml
PVP K-25	20g
Tween 20	0,5 ml
vaječný albumin	2 g

#### **Promývací pufr:**

1/5 PBS	1000 ml
Tween 20	0,5 ml

#### **Substrátový pufr (pH 9,8; 1000 ml):**

diethanolamin	97 ml
---------------	-------

pH se upraví koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou

**5x TAE pufr:**

Tris	24,2 g
ledová kyselina octová	5,71 ml
0,5 M EDTA	10 ml

pH pufru se upravuje na hodnotu 8,0 kyselinou octovou a následně se doplní do 1000 ml.