

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2012

Natálie Táborská

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Úloha dsRNA molekul v interakci virus – rostlina

Bakalářská práce

Natálie Táborská

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 bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Prof. RNDr. Milana Navrátila, CSc., dále prohlašuji, že veškeré podklady, ze kterých jsem čerpala, jsou uvedeny v přehledu literatury.

V Olomouci:

Podpis:

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce Prof. RNDr. Milanu Navrátilovi, CSc. za pomoc při tvorbě a metodickém vedení práce, za odborné rady, připomínky a čas. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Daně Šafářové, Ph.D., Janě Veselské a Bc. Pavlu Brázdovi.

SOUHRN

Rostlinné viry patří mezi významné patogeny v zemědělství a způsobují velké ztráty na úrodě. Šlechtění rostlinných odrůd rezistentních k těmto patogenům může vést ke snížení ztrát na plodinách. V dnešní době genetické inženýrství rychle nahrazuje klasické postupy šlechtění rostlin. Pomocí moderních metod genomiky jako je aktivace post-transkripčního umlčování genů a virem indukovaného umlčování genů je možné rychle získat rostliny odolné proti určitému viru.

V praktické části práce byla syntetizována dsRNA genu plášťového proteinu viru žluté mozaiky cukety, která by dále mohla být použita k vyvolání odolnosti rostlin čeledi *Cucurbitaceae* proti ZYMV.

SUMMARY

Plant viruses belong among important pathogens in agriculture and cause great losses to crops. Breeding of plant species which are resistant to these pathogens may lead to reduced losses in crops. Today, genetic engineering is rapidly replacing standard plant breeding methods. Modern methods of genomics such as activation of post-transcriptional gene silencing and virus-induced gene silencing are used for quick production of plants which are resistant against a specific virus.

In the experimental part of this work, dsRNA molecules of the coat protein of *Zucchini yellow mosaic virus* were synthesized. These molecules could also be used to induce resistance against ZYMV in plants of the *Cucurbitaceae* family.

OBSAH

1 ÚVOD	9
2 CÍLE PRÁCE	10
3 SOUČASNÝ STAV DANÉ PROBLEMATIKY	11
3.1 Charakteristika rodu <i>Poityvirus</i>	11
3.2 Virus žluté mozaiky cukety	13
3.3 RNA interference	17
3.3.1 Obejv RNAi	17
3.3.2 RNAi a další nástroje umlčování genů	17
3.3.3 Úloha dsRNA v RNA interferenci	18
3.3.4 Charakteristika a mechanismus RNAi	19
3.4 Post-transkripční umlčování genů (PTGS)	22
3.4.1 Mechanismus PTGS	22
3.4.2 Post-transkripční umlčování genů a viry	23
3.5 Virem indukované umlčování genů (VIGS)	23
3.5.1 Mechanismus VIGS	24
3.5.2 Výhody a nevýhody VIGS ve srovnání s metodami funkční genomiky	25
4 MATERIÁL A METODY	27
4.1 Biologický materiál	27
4.2 Použité chemikálie, roztoky a jejich složení	27
4.3 Použité přístroje	28
4.4 Srovnání sekvencí CP genu vybraných izolátů ZYMV a stanovení DNA polymorfizmu	28
4.5 Návrh a výběr primerů pro syntézu dsRNA	30
4.6 Příprava templátu pro syntézu dsRNA	31

4.6.1 Izolace celkové RNA	31
4.6.2 RT-PCR izolované RNA	32
4.6.3 Ligace DNA vzorků do plazmidu pGEM-T	35
4.6.4 Transformace bakterií <i>E. coli</i>	36
4.7 Příprava syntézy dsRNA	37
4.7.1 Izolace rekombinantního plazmidu – templátu pro syntézu dsRNA	37
4.7.2 Ověření sekvence templátové DNA pomocí sekvenování	38
4.8 Vlastní syntéza dsRNA	39
4.8.1 PCR izolované plazmidové DNA	39
4.8.2 Syntéza dsRNA	39
4.8.3 Srážení dsRNA chloridem litným (LiCl)	40
5 VÝSLEDKY	42
5.1 Srovnání sekvencí CP genu vybraných izolátů ZYMV a stanovení DNA polymorfizmu	42
5.2 Výběr vhodného páru navržených primerů pro syntézu dsRNA	43
5.3 Izolace celkové RNA	45
5.4 Příprava templátu pro syntézu dsRNA	46
5.4.1 Transformace bakterií <i>E. coli</i>	47
5.4.2 Ověření sekvence ligovaného inzertu pro syntézu dsRNA	47
5.5 Vlastní syntéza dsRNA	48
5.5.1 PCR plazmidové DNA	48
5.5.2 Syntéza dsRNA	48
6 DISKUZE	50
7 ZÁVĚR	52
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	53
9 SEZNAM LITERATURY	55

1 ÚVOD

Lidstvo studuje biologické metody, které umožňují indukovat v rostlinách nové vlastnosti od počátku své existence. Jednou z hlavních vlastností, které chce člověk v rostlinách vyvolat, je rezistence vůči určitému patogenu, protože během vývoje lidské společnosti se začaly zvyšovat nároky na výnos zemědělských plodin. Úroda rostlin byla a neustále je v ohrožení napadení patogeny, které jsou příčinou nízkého zemědělského výnosu, mezi tyto patogeny patří i rostlinné viry.

Základní a nejstarší technika k vytvoření nové vlastnosti např. k vyvolání odolnosti je šlechtění rostlin. Tato metoda je stejně stará jako pěstování zemědělských plodin samo. Během historie se tato technika vyvinula od nejprimitivnější až ke šlechtění využívanému od 20. století, při kterém dochází k záměrnému křížení genotypů za účelem zisku nové odrůdy, která by vykazovala a do dalších generací přenášela danou vlastnost např. odolnost (Graman a kol., 1998).

Další možnou využívanou metodou je transgenoze, pomocí níž vznikají tzv. GMO (geneticky modifikované organizmy). Základem této molekulárně biologické techniky je vnesení a exprese genu nebo naopak jeho vypnutí za účelem vyvolání cílové vlastnosti rostliny. V případě transgenoze rostlin se využívá např. bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, která do rostliny gen vnese (Procházka a kol., 1998). Do rostliny určené k transformaci je pomocí bakterie vnesena T-DNA (cílová sekvence), která je původně součástí Ti plazmidu. Zavedená T-DNA se inkorporuje do DNA hostitelské buňky a dále se chová jako její součást (Paul a kol., 2012).

Křížová ochrana ('cross protection') je další využívanou metodou při navozování rezistence rostlin vůči virům/patogenům. Základem je infekce hostitelského organismu slabým kmenem viru a tím navození odolnosti proti následné možné infekci silnějším příbuzným kmenem (Valle a kol., 1988).

V blízké budoucnosti bude hojně využívaná metoda aktivující proces PTGS, díky němuž dojde k vyvolání odolnosti rostlin především vůči virům. Základem je *in vitro* syntéza vakcíny mimo rostlinu ve formě molekul dsRNA, které obsahují část nukleotidové sekvence příslušného genu, jenž má být umlčen. Dvouvláknová RNA je injikována do organismu, ve kterém je nejprve zpracována a následně dojde k návázání homologní mRNA do komplexu RISC. Výsledkem je degradace nebo represe translace homologní cílové sekvence (Vaucheret a kol., 2001).

2 CÍLE PRÁCE

- Shromáždění literatury a vypracování rešerše na téma úloha dsRNA molekul v interakci virus – rostlina.
- Bioinformatická analýza dostupných sekvencí *Zucchini yellow mosaic virus*.
- Výběr vhodných genomických segmentů, návrh primerů a syntéza dsRNA interferující s *Zucchini yellow mosaic virus*.

3 SOUČASNÝ STAV DANÉ PROBLEMATIKY

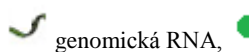

3.1 Charakteristika rodu *Potyvirus*

Rod *Potyvirus* náleží do čeledi Potyviridae, kterou lze zařadit mezi skupinu virů, jejichž genom je tvořen ssRNA pozitivní orientace. Zástupci patří mezi rostlinné viry, jejichž virové částice mají tyčkovitý nebo vláknitý tvar a dosahují velikosti kolem 760 nm. Stavba virionu potyviru je znázorněna na Obr. 1 (http://viralzone.expasy.org/all_by_species/50.html).

Obr. 1: Morfologie virionu – *Potyvirus*

(převzato a upraveno z http://viralzone.expasy.org/all_by_species/50.html)

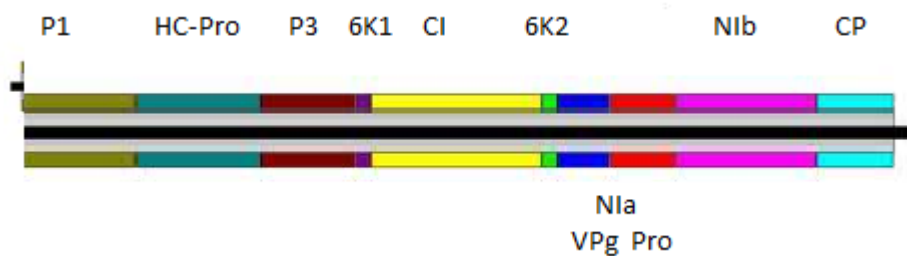


 genomická RNA,  pláštěvé proteiny tvořící kapsidu

Genom virů patřících do rodu *Potyvirus* je reprezentován jednovláknovou kódující RNA ('positive-sense' ssRNA), která se exprimuje do jednoho proteinového prekurzoru o délce 350 kDa (Riechmann a kol., 1992; Riechmann a kol., 1995), který je proteolyticky zpracován virovými proteázami na 7-10 menších proteinů (Langenberg, 1997). Patří mezi ně P1 (P1 proteinase), P3 (P3 protein), CI (Cylindrical Inclusion), HC-Pro (Helper-Component Proteinase), NIa (Nuclear Inclusion A), NIb (Nuclear Inclusion B), CP (Coat Protein) a ještě dva menší proteiny (6K1, 6K2). Všechny tyto proteiny se poté v buňce účastní mnoha podstatných procesů, které jsou shrnuty v Tab. I (Reichmann a kol., 1992; <http://www.uniprot.org/uniprot/Q89330>). P1, P3 a HC-Pro jsou ty virové proteiny, které se účastní zpracování jediného proteinu na jeho C konci ve virové částici (Carrington a kol., 1989; Verchot a kol., 1991). Obr. 2 potom znázorňuje genomickou mapu virů z rodu *Potyvirus*.

Obr. 2: Genomická mapa rodu *Potyvirus*

(převzato a upraveno z <http://www.dpvweb.net/potycleavage/index.html>)



P1 (P1 proteinase), **HC-Pro** (Helper-Component Proteinase), **P3** (P3 protein), **6K1/2** (6 kDa protein 1/2), **CI** (Cytoplasmic Inclusion Protein), **NIa-VPg** (Nuclear Inclusion Protein A – Viral genome-linked Protein), **NIa-Pro** (Nuclear Inclusion Protein A – 49 kDa Proteinase), **NIb** (Nuclear Inclusion Protein B), **CP** (Coat Protein)

Tab. I: Funkce proteinů zástupce rodu *Potyvirus* - *Zucchini yellow mosaic virus*

Zkratka proteinu	Název	Funkce
P1	P1 proteinase N-terminal protein	proteináza pohyb z buňky do buňky (zřejmě)
HC-Pro	Helper Component Proteinase	proteináza přenos zprostředkovaný mšicemi (interakce se styletem) potlačení PTGS
P3	Protein P3	patogenita, replikace
CI	Cytoplasmic Inclusion Protein	replikace přisednutí na membránu hostitelské buňky helikázová aktivita, stimulace ATP- ázové aktivity
CP	Coat Protein Capsid Protein	obalení RNA kapsidou zapojen do vektorového přenosu regulace amplifikace RNA pohyb z buňky do buňky
NIa-VPg	Nuclear Inclusion Protein A - Viral genome-linked Protein	replikace (primer pro iniciaci syntézy RNA)
NIa-Pro	Nuclear Inclusion Protein A - 49 kDa Proteinase	hlavní proteináza

Zkratka proteinu	Název	Funkce
NIb	Nuclear Inclusion Protein B	replikace (RNA-dependntní RNA polymeráza)
6K1/6K2	6 kDa protein 1/2	replikace

Virová RNA o velikosti 9,6 kb je obalená proteinovým pláštěm – kapsidou z pláštěvého proteinu (CP). Proteinový obal každé částice potyvirusu je tvořen asi 2000 identických kopií CP (Oruetebarria a kol., 2001). Kapsida už obalená není (Langenberg, 1997). Ribonukleová kyselina slouží jako genomová i virová mRNA (messenger RNA), genomová RNA je překládána do zmíněných polyproteinů (http://viralzone.expasy.org/all_by_species/50.html).

3.2 Virus žluté mozaiky cukety

Virus žluté mozaiky cukety (*Zucchini yellow mosaic virus – ZYMV*) se dnes systematicky řadí do čeledi Potyviridae, rod *Potyvirus*, proto se v literatuře setkáváme i s názvem *Zucchini yellow mosaic potyvirus* (<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>).

Primární a nejčastější způsob přenosu ZYMV je prostřednictvím mšic (*Aphididae*) a to neperzistentním způsobem. Přenos je výsledkem interakce mezi styletem mšic, CP (Coat Protein) a Hc-Pro (Helper-Component Proteinase). Méně frekventovaný typ přenosu je pomocí semen, je možný i experimentální přenos mechanickou inokulací (Simmons a kol., 2008). Mezi hostitele, jejichž buňky ZYMV nejčastěji napadá, patří hlavně hospodářské a pro člověka ekonomicky významné rostliny jako jsou zástupci čeledi tykvovité (*Cucurbitaceae*): cuketa/tykev (*Cucurbita pepo* L.), dýně (*Cucumis melo* L.), okurka (*Cucumis sativus* L.), vodní meloun (*Citrullus lanatus* L.), u kterých vytváří mozaiky, žloutnutí, zkroucení listů, zakrslost, deformace a blednutí semen i plodů (Simmons a kol., 2008; <http://www.agls.uidaho.edu/ebi/vdie/refs.htm>). Infekce ZYMV může způsobit velké ztráty při pěstování tykvovitých plodin po celém světě.

Poprvé byl ZYMV pozorován v Itálii v roce 1973, od té doby se šíří dál do zemědělských oblastí, kde se pěstují tykvovité plodiny. V bývalém Československu byla přítomnost ZYMV poprvé zaznamenána v roce 1991 (Glasa a kol., 2007). ZYMV byl z napadených rostlin izolována také v jiných částech světa a to například ve Francii, Německu, Izraeli, Libanonu, Velké Británii, Maroku, Španělsku, USA nebo v Austrálii, takže je patrné, že je tento virus rozšířen po celém světě (<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=282>).

Analýza molekulární variability tří odlišných oblastí genomu (P1, P3 a CP) ZYMV ukázala, že izoláty z České a Slovenské republiky vykazují pozoruhodně nízkou úroveň ve variabilitě těchto oblastí, izoláty ze střední Evropy jsou těm českým a slovenským blízce příbuzné. Izoláty z jiných částí světa (Asie) naopak vykazovaly obrovskou míru variability v nukleotidových sekvencích těchto tří oblastí genomu. České, slovenské a středoevropské izoláty jsou fylogeneticky zařazeny do úzce příbuzné skupiny. Úroveň variability nukleotidových sekvencí oblastí P1, P3 a CP není stejná, nejvyšší pozorovaná variabilita byla zjištěna v oblasti P1, P1 je tedy nejdivergentnějším regionem (Glasa a kol., 2007).

Příčinou rozdílů v biologických vlastnostech mezi izoláty ZYMV jsou změny v nukleotidových sekvencích CP, HC-Pro a P3 genu. Změnami v pořadí nukleotidů CP genu dochází k rozrůznění např. v projevu příznaků nákazy, okruhu hostitelských organizmů nebo přenosu mšicemi. Díky postupnému získávání nových sekvencí CP genu byly vytvářeny skupiny, do kterých se řadily různé izoláty z různých míst a zemí světa. Coutts a kol. (2011) seřadili izoláty ZYMV do 3 velkých skupin, které ještě podrobněji rozdělili na podskupiny. Zařadili sem pouze izoláty, u kterých byl gen pro CP osekvenován celý. Patří sem 42 nových kompletních nukleotidových sekvencí CP genu získaných z australských izolátů. Vzorky listů tykvovitých rostlin, které trpěly příznaky napadení ZYMV, byly odebrány v 5 oblastech ve 4 státech v Austrálii. Dále se k těmto vzorkům přidalo celkem 101 kompletně osekvenovaných genů pro CP z dalších kontinentů. Celkem bylo seřazeno 143 izolátů podle fylogenetické podobnosti CP sekvencí. Vznikly tak 3 hlavní skupiny A, B a C. Skupina A obsahuje čtyři podskupiny (I-IV), do skupiny B se řadí dvě podskupiny (I a II), C skupina se dále nedělí. Tab. II procentuálně popisuje podobnost/identitu v nt sekvencích izolátů všech tří skupin.

Tab. II: Podobnost izolátů ZYMV v nukleotidové sekvenci CP genu [%]

Skupina	A				B		C
Podobnost sekvencí ve skupině [%]	≥88,9				≥85,6		≥85,8
Podskupina	I.	II.	III.	IV.	I.	II.	
Podobnost v podskupině [%]	≥95,9	≥93,2	≥91,8	≥95,3	≥86,5	≥98,7	≥85,8

Do podskupiny A-I se řadí 23 izolátů ze západního pobřeží a 2 z východního, sekvence těchto nových izolátů se v 95,9-98,9 % shodovaly s izoláty z Japonska a Evropy.

Do A-II patří 3 sekvence ze severní části Austrálie společně s vzorky z USA, Íránu, Číny a Japonska s podobností 94,6-99,0 %.

B-II podskupina zahrnuje 16 sekvencí odebraných na jediném místě na severozápadě Austrálie.

A-I a B-II izoláty vyvolávají v napadených rostlinách chlorózy, na rozdíl od izolátů A-II, které způsobují infekci bez příznaků.

Všechna tato zjištění naznačují, že do Austrálie byly zavlečeny nejméně 3 separované ZYMV, ve vzdálených odlehlých oblastech Austrálie se izoláty liší. Ale ze zmíněných číselných údajů vyplývá, že izoláty pocházející ze stejné lokality se v sekvenci CP genu liší jen minimálně (Coutts a kol., 2011).

Hc-Pro je dalším klíčovým proteinem, který je kódován rostlinnými viry rodu *Potyvirus*. Zapojuje se do různých procesů v průběhu životního cyklu viru (Plisson a kol., 2003). Testování mnoha izolátů ZYMV prokázalo souvislost mezi mutacemi částí genu pro HC-Pro a úrovní projevu symptomů infekce tímto virem. U některých izolátů ZYMV, které vyvolávají u tykvovitých rostlin pouze mírné příznaky infekce, byla zjištěna mutace v konzervované oblasti genomu (CDNQLD), která je součástí sekvence kódující HC-Pro. Tato oblast se nachází blízko oblasti (FRNK), která ovlivňuje závažnost symptomů, které je vir schopen v rostlině vyvolat. Mutace v této oblasti genomu může vést až k úplné ztrátě příznaků napadení virem. Je tedy zřejmé že FRNK-CDNQLD je součástí většího motivu, který je konzervovaný u rodu *Potyvirus* a hraje roli při projevu symptomů (Desbiez a kol., 2010).

Jedná se o bodovou mutaci ve 3 aminokyselinách v konzervované oblasti o celkové délce 455 AK. Byly srovnávány sekvence genu pro HC-Pro mezi kmeny patřící mezi ZYMV-NAT ('non-aphid transmissible'), které vyvolávají v hostitelském organismu těžké příznaky a ZYMV-WK, které jsou zodpovědné pouze za mírné projevy infekce (Desbiez a kol., 2010; Gal-On a kol., 2000). Tab. III poukazuje na rozdíly 3 AK a jejich pozic v sekvenci genu HC-Pro u ZYMV-NAT a ZYMV-WK (Gal-On a kol., 2000).

Tab. III: Mutace HC-Pro genu a jejich pozice u ZYMV-NAT a ZYMV-WK

Pozice mutace v HC-Pro genu	ZYMV-NAT	ZYMV-WK
148	D E	G E
180	F R N K	F I N K
308	P T K	P A K

D (kyselina asparagová), E (kyselina glutamová), G (glycin), F (fenylalanin), R (arginin), N (asparagin), K (lysin), I (izoleucin), P (prolin), T (treonin), A (alanin)

Při testování projevů napadení ZYMV mutantem v pozici 180 (izoleucin místo argininu), bylo zjištěno, že u 3 genotypů okurky, melounu a vodního melounu nezpůsobují projevy infekce. U tykví vyvolává mírné příznaky stejně jako ZYMV-WK (mírná mozaika mladších listů, ale žádné deformace plodů).

Rozdílné bylo zjištění u mutantů v pozici 148. Kyselina asparagová byla nahrazena glycinem, což způsobilo těžké projevy infekce podobně jako u ZYMV-NAT.

Zaměněním alaninu místo treoninu na 308. pozici v jedné z konzervovaných oblastí genu HC-Pro dochází k poklesu přenášení ZYMV-WK pomocí mšic (Gal-On a kol., 2000).

HC-Pro patří mezi supresory umlčování genů. Wu a kol. (2010) zkoumali spojitost mezi 3 vysoce konzervovanými aminokyselinami HC-Pro a miRNA/siRNA dráhami. Sledovali mutace genu pro HC-Pro v pozicích 180, 205 a 396, které jsou kritickými a důležitými místy co se týče mi/siRNA a PTGS procesů (Wu a kol., 2010). Pozice označené jako 180 a 205 leží v centrální oblasti genu pro HC-Pro, která je zodpovědná za amplifikaci genomu, vazby s RNA a zastavení PTGS a VIGS (Plisson a kol., 2003). Mutace HC-Pro v pozici 180 vede mimo jiné k nižší afinitě k miRNA duplexu (Shibolet a kol., 2007). Pozice 396 leží na C konci HC-Pro a je místem proteínázové aktivity (Wu a kol., 2010). Mutace v jedné z těchto oblastí nevede ke změně množství siRNA, 2 mutace z celkových 3 mají pouze mírný vliv na koncentraci siRNA, ale pokud jsou mutována všechna 3 zmíněná kritická místa genu pro HC-Pro, dochází ke kompletní inaktivaci HC-Pro. Bylo zjištěno, že jsou třeba nejméně 2 ze 3 mutací v těchto oblastech, aby nastalo zablokování funkcí spojených s potlačením VIGS. Takže trojití ZYMV mutanti (180/205/396) nejsou schopni blokovat miRNA regulaci rostlin, což vede k projevu lehčích symptomů. Tyto tři mutace stačí k potlačení mi/siRNA a VIGS, ale ne k potlačení PTGS, což naznačuje, že HC-Pro má různé domény umožňující umlčení mi/siRNA, VIGS a PTGS.

Tato zjištění vedou k možnosti využití mutací HC-Pro genu ve 3 kritických oblastech k zablokování PTGS v transgenních rostlinách bez morfologických změn. Protože HC-Pro má různé inhibiční účinky na různých místech v drahách krátkých RNA, mutanti mohou být využiti jako nástroj k pozorování a rozebírání mechanismů těchto drah (Wu a kol., 2010).

3.3 RNA interference

3.3.1 Objev RNA interference

RNA interference (RNAi) byla poprvé zmíněna při zkoumání funkce *par-1* genu *Caenorhabditis elegans* (Guo a kol., 1995). Guo a Kempfues injikovali 'antisense' *par-1* RNA do hlístů. Výsledkem byla letální embrya, což fenotypově potvrdilo jejich teorii, že 'antisense' RNA může umlčet *par-1* gen, jenže u embryí, která byla injikována 'sense' *par-1* RNA – kontrolou, došlo k projevu naprosto stejného fenotypu, embrya byla také letální.

Klíčovým byl rok 1998, kdy Fire a Mello, kteří již potvrdili, že 'sense i antisense' RNA dokáže umlčet funkci genu, zkusili injikovat směs obou typů RNA ('sense i antisense'). Tímto byl objev a název RNAi potvrzen a od té doby je RNAi velmi intenzivně studována jako forma potlačení genové exprese (Hammond a kol., 2001). Celý experiment A. Firea byl založen na myšlence zavedení 'antisense' ssRNA (jednovláknová RNA) do buněk *Caenorhabditis elegans* a tím k interferenci určitého endogenu. Předpokládalo se, že dojde k hybridizaci mezi vloženou ssRNA a mRNA endogenu. Kontrolou měla být zvířata injikovaná 'sense' RNA, jenže se u nich projevil stejný mutantní fenotyp. Vědci zjistili, že mnohem efektivnější umlčení genu nastává po injekci dsRNA (dvouvláknové RNA) než po vpravení jednotlivých ssRNA ('sense nebo antisense'). Směs 'sense a antisense' ssRNA umlčuje expresi cílového genu až s 10x vyšší účinností (Hammond a kol., 2001). K vyvolání RNAi v buňce stačí pouze několik málo molekul směsi dsRNA.

Fireho tým si vybral gen *unc-22* k pozorování účinků experimentu, jelikož fenotypový projev mutace/umlčení tohoto genu je dobře pozorovatelný. Inhibice exprese tohoto genu vede k prudkým záškubům svalstva. 'Sense a antisense' molekuly RNA komplementární k sekvenci *unc-22* genu mají jen malou interferující aktivitu a bylo potřeba zavést velkou dávku ssRNA, aby mohl být efekt interference pozorován. Naopak po zavedení směsi 'sense a antisense' RNA (dsRNA) došlo k vysoce efektivní interferenci funkce *unc-22* genu. Kromě *unc-22* genu byly zkoumány RNAi u třech dalších genů (*unc-54*, *fem-1*, *hlh-1*), u kterých byl efekt dsRNA zřetelný, efekt ssRNA pozorován nebyl (Fire a kol., 1998).

3.3.2 RNAi a další nástroje umlčování genů

Umlčování genů ('gene silencing') bylo do dnešní doby pozorováno u celé řady druhů organismů od rostlin, přes houby až po zvířata. Jelikož ke zkoumání tohoto jevu byly použity

různé experimentální metody, během let se začaly používat různé názvy pro umlčování exprese genů, i když často popisují stejný jev. Existuje více forem umlčování a jejich dělení závisí především na 2 hlavních faktorech. Je to mechanismus umlčování a typ molekuly/činidla, které umlčování vyvolá.

Patří sem RNAi, která je vyvolána molekulami dsRNA, poprvé byla pozorována u *C.elegans* a po mechanické stránce jsou RNAi totožné s PTGS u rostlin.

PTGS (post-transkripční umlčování genů) je charakteristické především pro rostliny, ale i živočichy, v tomto případě nebývá zasazen průběh transkripce, genová exprese je zastavena až na úrovni molekuly mRNA, která se stává nestabilní.

VIGS (virem indukované umlčování genů) je vyvoláno přítomností virové genomické RNA ve formě dsRNA, která umlčování navodí.

TGS (transkripční umlčování genů) je možné pozorovat obecně u rostlin, ale i zvířat. Genová exprese je v tomto případě zastavena na úrovni transkripce a to zřejmě modifikací chromatinu nebo metylací DNA.

Transgenem vyvolané umlčování ('Transgene-induced silencing') je vyvoláno přítomností transgenu v genomu. Tandemově uspořádané kopie transgenu jsou mnohem silnějším induktorem umlčování než kopie roztroušené a pokud obsahují obrácené repetice, jsou neefektivnější. K tomuto typu umlčování dochází na úrovni transkripce i post-transkripčně.

Dále existuje tzv. quelling - termín používaný pro PTGS u hub (*Neurospora crassa*).

U RNAi popsané u *C. elegans* bylo zjištěno, že jde o stejný princip jako je u PTGS rostlin, tzn. že RNAi byly poprvé popsány u rostlin, ale pod jiným názvem.

RNAi dnes slouží jako účinný nástroj ke změně genové exprese u mnoha organismů (*Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, rostliny, trypanozoma, ploštěnky), RNAi lze uplatnit u některých organismů nebo u myších embryí, ale s určitými limity, které je omezují. Předmětem intenzivních studií je RNAi v kulturách savčích buněk (Hammond a kol., 2001).

3.3.3 Úloha dsRNA v RNA interferenci

Molekuly dsRNA patří mezi důležité regulátory genové exprese u eukaryot. Účastní se mnoha mechanismů umlčování genů. Molekuly dsRNA jsou upraveny na krátké RNA duplexy ('short RNAs') o délce 21-28 nt (nukleotidy), které poté vedou k rozpoznání a rozstříhání ssRNA (mRNA, virové genomické RNA). Tyto krátké RNA se běžně v přírodě vyskytují například ve formě miRNA - microRNA (Meister a kol., 2004)

a siRNA - krátké interferující RNA, kam patří i 'trans-acting short interfering RNAs' - tasiRNA, 'repeat-associated short interfering RNAs' - rasi-RNAs, 'scan RNA' - scn RNA a 'long siRNAs' - lsiRNAs (Naqvi a kol., 2009).

Molekuly dsRNA mají schopnost vyvolávat umlčování genů, je to vlastnost, kterou si tyto molekuly dochovaly skrz průběh celé evoluce, což značí, že tato biologická vlastnost je v přírodě velmi důležitá. Lze říci, že se jejich funkce uplatňuje jako všeobecný obranný mechanismus proti virové nebo cizí nukleové kyselině. Například u rostlin je umlčování genů ve formě PTGS obranou proti virovému napadení (Hammond a kol., 2001).

Dlouhé dsRNA nebo siRNA jsou dnes syntetizovány uměle a jsou vkládány do buněčných kultur i živých organismů k inaktivaci genové exprese, používají se jako účinný nástroj pro záměrné umlčování genů (Meister a kol., 2004).

3.3.4 Charakteristika a mechanismus RNA interference

RNAi je základním eukaryotickým systémem na regulaci genů. V rostlinách a u hmyzu jsou RNAi hlavní odpovědí při napadení virem a tvoří základy antivirové imunity (Berry a kol., 2009).

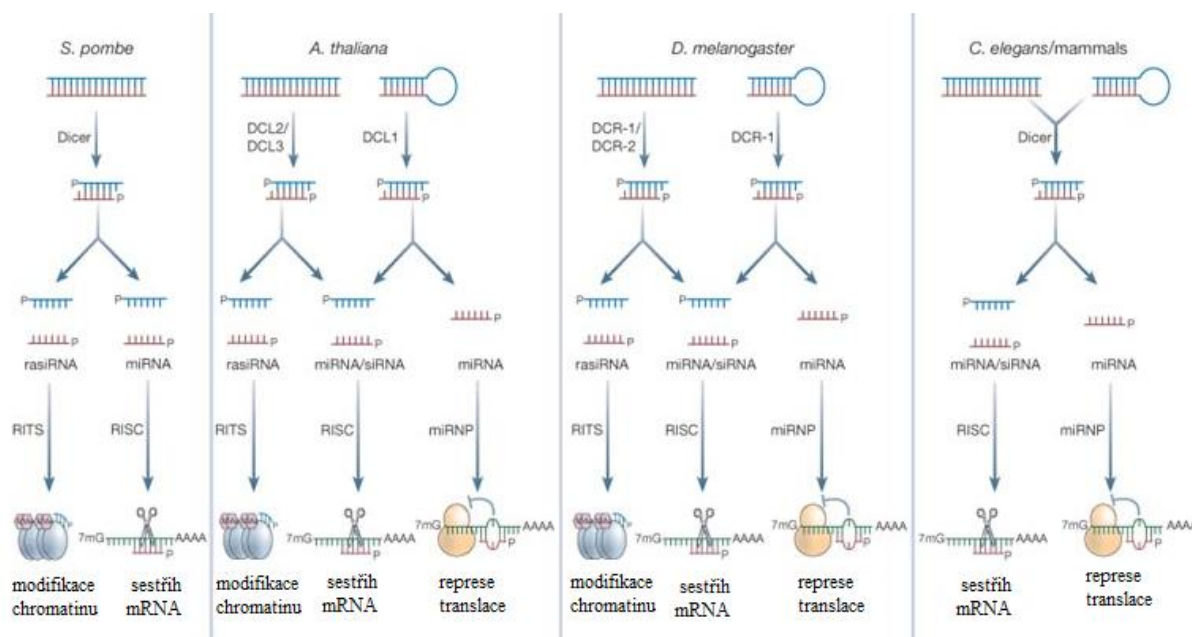
Základem mechanismu RNAi jsou 2 kroky. První je iniciační, kdy je vložená dsRNA zpracována pomocí enzymů na krátké molekuly (tzv. 'guide') o délce 21-23 nt a nastává druhý efektorový krok, kdy jsou 'guide' molekuly inkorporovány do nukleázového komplexu RISC ('RNA-induced silencing complex'), který slouží k destrukci mRNA, která je rozpoznána pomocí 'guide' RNA na základě párování bází (Hammond a kol., 2001).

Zpracování dsRNA prekurzorů na krátké ('guide') RNA molekuly je proces katalyzovaný dsRNA-specifickým Rnaza-III-typem endonukleáz - Drosha a Dicer. Drosha je enzym katalyzující sestřih molekul miRNA v jádře (Lee a kol., 2003; Lee a kol., 2002), tento napůl zpracovaný prekurzor se pak přemístí do cytoplazmy, kde se dostává do reakce s enzymem Dicer. Po interakci s oběma enzymy má produkt přesah na obou koncích: na 3'konci jsou to 2 nt a na 5'konci fosfát (Lee a kol., 2003). RNAi mechanismy se svými detaily a přesnými průběhy liší u různých organismů. U kvasinek (*Schizosaccharomyces pombe*), rostlin (*Arabidopsis thaliana*) nebo u *Drosophila melanogaster* jsou dlouhé dsRNA a miRNA prekurzory zpracovány za vzniku siRNA/miRNA/rasiRNA molekul pomocí Diceru. Krátké dsRNA jsou rozvolněny a vytváří se z nich efektorové komplexy RISC, RITS ('RNA-induced transcriptional silencing') nebo miRNP ('Ribo-Nucleo-Protein'). RISC zprostředkovává degradaci mRNA (rozstřížení RNA), miRNP molekuly vedou k represí translace dané mRNA

a RITS způsobí modifikaci heterochromatinu. U živočichů jako *C. elegans* nebo u savců dochází k degradaci mRNA pomocí miRNA/siRNA, které jsou integrované do RISC komplexu, ale miRNA mohou zapříčinit i represi translace. *Schizosaccharomyces pombe*, *C. elegans* a savci mají pouze jeden gen pro Dicer. Kromě různých typů Dicerů si mohou organizmy vytvářet i tzv. DCL ('Dicer-like proteiny'), což jsou proteiny podobné Diceru s enzymatickou aktivitou.

Z tohoto vyplývá, že existují 3 základní cesty RNA interferencí (Obr. 3). Všechny mají stejný první krok, kdy je dsRNA Dicerem upravena na krátké jednovláknové molekuly s přesahem. Molekuly, které takto vzniknou, dávají základ kroku druhému. Pokud vznikne rasiRNA vždy se vytvoří RITS a dojde k modifikaci chromatinu. Pokud vznikne mi/siRNA, vytvoří se komplex RISC a konečným výsledkem RNAi bude degradace mRNA. Vznikne-li miRNA může také dojít k vytvoření miRNP a tím k zablokování translace příslušné mRNA (Meister a kol., 2004).

Obr.: 3 Základní cesty RNAi demonstrovány na modelových organizmech (převzato a upraveno z http://www.nature.com/nature/journal/v431/n7006/fig_tab/nature02873_F1.html)



Molekuly siRNA ('short-interfering RNA') jsou 21-24 nt dlouhé. Patří mezi regulační molekuly, jejichž funkcí je především ochrana buňky před vniknutím exogenní NK (nukleová kyselina), například virová NK, ale také musí udržovat integritu genomu buňky pomocí

umlčování transkripce genů pocházejících z nežádoucích míst v DNA buňky (retrotranspozón, repetice).

Pro vytvoření siRNA v buňce je zapotřebí dlouhá dsRNA molekula, která může vzniknout pomocí RNA-dependentní RNA polymerázy (RdRP) z transkriptu (z ssRNA do dsRNA), který je aberantní nebo z transkriptu a komplementární sekvence. Dlouhá dsRNA molekula je rozpoznána a rozštěpována jaderným Dicerem. Živočichové obvykle kódují jeden typ Diceru, rostliny více typů Diceru nebo jemu podobné proteiny. Každý typ Diceru vytváří siRNA o různé délce. Vzniká tak komplex Diceru s endogenní siRNA (dvouvláknová), který putuje ven z jádra do cytoplazmy. Ke komplexu se připojí protein Argonaut, který umožní vznik si-RISC (někdy RITS) tím, že rozvolní dsRNA na ssRNA ('guide' molekula v komplexu). Produkty transkripce (mRNA), které jsou komplementární ke 'guide' ssRNA v RISC, jsou štěpeny díky RNázové aktivitě enzymu Argonaut 2. Z transgenní dsRNA Dicer nastříhá exogenní siRNA duplexy, vytvoří s nimi RITS a celý komplex přechází do jádra, dsRNA se v komplexu rozvolní na ssRNA a dojde k modifikaci heterochromatinu (Meister a kol., 2004; Naqvi a kol., 2009).

Geny pro miRNA (microRNA) představují 1% ze všech kódujících genů, tím se řadí mezi nejrozsáhlejší skupinu regulačních molekul. Molekuly miRNA jsou jednovláknové o délce 19-23 nt, vytvořené z jednovláknového transkriptu, který vznikl přepisem pomocí enzymu polymeráza II. Tvorba miRNA začíná v jádře a končí v cytoplazmě (Bartel, 2004).

Gen pro miRNA je transkribován do pri-miRNA s vlásenkou, která reaguje s enzymem Drosha, jehož aktivita je spjata s enzymem Pasha (Lee a kol., 2003), vzniká tak pre-miRNA. Pomocí exportinu 5 jsou tyto prekurzory vyvedeny z jádra do cytoplazmy. Zde enzym Dicer nastříhá prekurzor na mi-RNA duplexy, které jsou inkorporovány do mi-RNP komplexu/RISC. Jedno vlákno z duplexu je odstraněno a druhé slouží jako 'guide' ssRNA vedoucí komplex k cílové molekule mRNA a degraduje ji nebo se účastní regulace translace tím, že ovlivní příslušnou mRNA. Molekuly mRNA, jejichž translace byla potlačena, se ukládají do tzv. P-tělísek. U savců může obsahovat miRNA sekvenci umožňující vrátit se do jádra a tím zřejmě i umožnit modifikaci heterochromatinu. Existují i další způsoby vzniku miRNA molekul a to například tak, že miRNA jsou produkovány z intronových sekvencí. Rozdíl je v tom, že při tomto způsobu vzniku není potřeba enzym Drosha (Naqvi a kol., 2009; Meister a kol., 2004).

3.4 Post-transkripční umlčování genů (PTGS)

PTGS patří mezi mechanismy sloužící k degradaci RNA v rostlinách. Lze jej charakterizovat jako systém inaktivující geny na post-transkripční úrovni, který se podobá RNAi u živočichů (Fire a kol., 1998; Vaucheret a kol., 2001). Výsledkem procesu PTGS je specifická degradace skupiny mRNA molekul v cytoplazmě rostlinných buněk. Tento typ umlčování genů nezasahuje přímo transkripci, ale až její produkt – mediátorovou RNA (Vaucheret a kol., 2001). Iniciačními molekulami jsou dsRNA nebo transgen, které po zavedení spouští celý mechanismus (Baulcombe, 1996; Chicas a kol., 2001). RNAi a PTGS jsou podobné právě stejnou iniciační molekulou (dsRNA), to znamená, že pochází ze stejného předkovského mechanismu degradace RNA (Vaucheret a kol., 2001). V rostlinách je možné také spustit systém VIGS, jenž je nastartován vniknutím virové částice do buňky (Baulcombe, 1996; Chicas a kol., 2001).

Hlavním rozdílem mezi PTGS a RNAi je fakt, že na to, aby PTGS proběhlo, je zapotřebí přítomnost genů kódujících specifické proteiny, navíc při experimentu na rostlinách *Arabidopsis thaliana*, které vykazovaly nefunkční nebo narušený PTGS mechanismus, vědci zjistili, že jsou přecitlivělé na CMV (*Cucumber mosaic virus*), z čehož plyne, že tito mutanti měli narušenou rezistenci vůči virům. Což PTGS přímo spojuje s obranyschopností rostlinných buněk vůči virové infekci.

3.4.1 Mechanismus PTGS

Základním předpokladem pro vyvolání PTGS v buňce je přítomnost iniciátoru - dsRNA, která může vzniknout 2 základními způsoby. Molekula dsRNA může být vytvořena přímo a to virem nebo transgenem ve formě převrácených repetit, pak je nastříhána DNázou (jako Dicer u živočichů), čímž se vytvoří siRNA molekuly, které mohou vést komplementární mRNA do komplexu proteinů zajišťujících degradaci. Nebo vznikají nepřímo z transgenů (1 kopie), který je silně exprimován a transkripce vznikají aberantní molekuly RNA (abRNA) díky strukturním změnám chromatinu (Vaucheret a kol., 2001), jejichž příčinou je absence DDM1 genu kódující proteiny remodelující chromatin (Jeddeloh a kol., 1999). Tyto abRNA slouží jako templát pro RdRP. Polymeráze při syntéze napomáhají další proteiny jako SGS3 a AGO1 (Vaucheret a kol., 2001) a RNA-helikáze podobný protein, který umožní rozvolnění dsRNA na ssRNA a tím i párování 'antisense' siRNA s mRNA. Molekuly dsRNA mohou

vyvolat metylaci DNA transgenu, což vede ke zvýšené schopnosti produkovat abRNA (Vaucheret a kol., 2001).

3.4.2 Post-transkripční umlčování genů a viry

V rostlinných buňkách napadených virem mohou virové částice ovlivnit PTGS, mohou sloužit jako inhibitory, induktory nebo jsou cílem mechanismu PTGS (Vaucheret a kol., 2001). Rostliny, ve kterých transgen projde mechanismem PTGS před infekcí, jsou imunní. U rostlin, v jejichž buňkách proběhne PTGS až po infekci virem, dojde k zotavení.

V obou případech jsou rostliny imunní při sekundárním napadení stejným virem nebo rekombinantním virem nesoucím část genomu viru, který rostlinu napadl jako první (Ratcliff a kol., 1999).

Viry mohou být příčinou inhibice PTGS, může ji totiž způsobit přítomnost virových proteinů v buňce (Anandalakshmi a kol., 1998).

Jak již bylo zmíněno, zotavení je spuštěno až po infekci virem, z čehož plyne, že viry mohou spouštět PTGS, jelikož endogenní gen nebo transgen mohou být umlčeny tím, že je rostlina napadena rekombinantním virem, který má ve svém genomu sekvenci nebo alespoň část sekvence transgenu. Tomuto jevu se říká VIGS a je podrobněji popsán v kapitole 3.5 (Ruiz a kol., 1998).

Dnes je již jisté, že umlčování genů je součástí vrozené antivirové obrany vyšších rostlin. Na druhou stranu, rostlinné viry přetvořily své proteiny tak, aby byly schopné potlačit průběh genového umlčování na různých úrovních. Taková adaptace jim umožňuje replikovat se a šířit v buňkách rostlin (Voinnet a kol., 2001).

3.5 Virem indukované umlčování genů (VIGS)

VIGS patří mezi nedávno zavedené techniky sloužící k zjišťování funkce genů a následnému vytvoření proti virům rezistentních rostlin, především pak zemědělských plodin, čehož se využívá ke snížení ztrát úrody. Tato metoda je založena na mechanismu obranného systému, který běžně probíhá v rostlinách a dalších organizmech při napadení patogenem. VIGS je založen na PTGS zprostředkovaném molekulami RNA (Burch-Smith a kol., 2004). Poprvé byl termín VIGS zmíněn v roce 1997, tehdy popisoval zotavení se rostlin po napadení virem (van Kammen, 1997). A od této doby je pod názvem VIGS označována technika využívající rekombinantní virové částice k ovlivnění exprese endogenních genů (Baulcombe, 1999). Dnes se VIGS považuje za užitečnou techniku určenou

k ovlivnění/supresi exprese endogenních genů a následnému zjištění jejich funkcí. Již od roku 1995 se vědci věnují konstruování virových vektorů (Huang a kol., 2011), které by mohly sloužit k infekci rostliny a následnému sledování přirozené obrany rostlin a projevu fenotypů. Tato metoda je rychlá, umožňuje rozeznávat změny fenotypů a nabízí možnost umlčovat jednotlivé geny nebo více genů náležících do jedné genové rodiny (Burch-Smith a kol., 2004).

3.5.1 Mechanismus VIGS

V rostlinných buňkách napadaných virem dochází k vyvolání obranného mechanismu založeného na VIGS, který je namířen proti genomu viru. Jedná se o rozpoznání dsRNA struktury pocházející z virové nukleové kyseliny, která je nasyntetizována po infekci hostitelské buňky. Molekula dsRNA je rozstřížena rostlinnými enzymy na fragmenty o délce kolem 21-25 nt, které následně vedou k degradaci homologní ssRNA (virová RNA, mRNA) dalšími hostitelskými enzymy (RNázový komplex). Výsledkem je částečná inhibice virové replikace a šíření, pouze zřídka dochází k naprosté eliminaci viru v hostiteli (Ratcliff a kol., 1999).

Zmíněné 21-25 nt krátké sekvence – siRNA vedou k specifickému sestřihu nebo supresi cílové mRNA na post-transkripční úrovni (Fire a kol., 1998).

VIGS je považován v dnešní době za velice účinný nástroj analýzy funkce genů. Tato metoda našla uplatnění především v reverzní genetice. Dnes se již vytváří virové vektory umožňující užití VIGS metody v rostlinné genomice (Huang a kol., 2012).

VIGS je v rostlinných buňkách vyvolán zavedením vektoru ve formě rostlinného viru nesoucího fragment, který koresponduje s rostlinným (hostitelským) genem, který má být umlčen. Po infekci takovýmto vektorem dochází k umlčení vložené sekvence rostlinného genu, virové sekvence, ale dojde i k umlčení korespondující rostlinné mRNA (Petersen a kol., 2005). Z toho vyplývá, že je možné pomocí virového vektoru navodit rezistenci v rostlině, k níž dochází procesem PTGS, který je především zaměřen na RNA molekuly vzniklé transkripcí transgenu. Transgen je sice v jádře přepsán do mRNA, ale její množství v cytoplazmě jasně naznačuje, že dochází k degradaci většiny mRNA transgenu. Jak již bylo zmíněno, virová RNA je také zničena, protože s ní vykazuje homologii (van Kammen, 1997).

3.5.2 Výhody a nevýhody VIGS ve srovnání s metodami funkční genomiky

Nejjednodušší cestou determinace funkce genu/proteinu je utlumení jeho exprese nebo vytvoření mutanta, který cílový protein vůbec nekóduje. Dnes vědci mohou používat různé metody vyvolávající ztrátu funkce genu (Dinesh-Kumar a kol., 2003), základní metody jsou stručně popsány v Tab. IV.

Genomické metody jsou postiženy nejrůznějšími omezeními, které je nutné zvážit. Kromě VIGS jsou zatíženy nutností vytvořit velkou populaci, aby bylo možné kontrolovat a zkoumat mutace v určitém genu (Bouche a kol., 2001). Při vytváření populace obsahující T-DNA nebo transpozónovou mutagenezi je nutné vypěstovat obrovskou generaci transgenních rostlin, což je časově náročný proces, který je možné uplatnit pouze na pár druhů rostlin. Další potíže mohou nastat, pokud se v genomu objevují genové duplikace nebo jsou přítomny velké genové rodiny, to totiž znamená, že bodové mutace a inserce se nemusí odlišit obvyklým fenotypovým projevem (Bouche a kol., 2001). V takovýchto případech nastávají potíže s určováním funkce genů.

VIGS je ze zmíněných metod nejrychlejší, další důležitou výhodou je schopnost identifikovat fenotyp vzniklý ztrátou funkce specifického genu během jedné generace, není nutné tedy kontrolovat rozsáhlou populaci. Problém velkých genových rodin lze také lehce vyřešit pomocí VIGS, je možné umlčet všechny členy určité genové rodiny použitím cílové sekvence odvozené od vysoce konzervativní oblasti v genové rodině, naopak jednotlivé geny můžeme zasáhnout použitím unikátních sekvencí (Baulcombe, 1999; Liu a kol., 2002).

S využíváním 'Virus-induced gene silencing' techniky mohou přijít i problémy a to především ve formě fenotypu, který nemusí být pozorovatelný. Tato situace může nastat snadno, protože VIGS jen málokdy kompletně umlčí transgen, ve většině případů dochází ke snížení počtu kopií transkriptu a to v různé míře. I z nízké koncentrace mRNA může vzniknout dostatek funkčního proteinu translací v cytoplazmě a tím pádem nemůže být pozorován fenotypový znak typický pro rostlinu s umlčeným určitým genem. V takovém případě nastávají potíže s výkladem výsledků experimentu. Navíc se může objevit rozdíl v míře umlčení genu v rostlině a *in vitro* během experimentu (Ekenger a kol., 2003; Liu a kol., 2004).

Tab. IV: Srovnání VIGS s ostatními genomickými metodami studia funkce genů

Název metody	Popis	Transformace	Příčina ztráty funkce genu	Náklady + výdaje
VIGS	R infikovaný virem nesoucím fragment endogenu	ne	PTGS genu homologního k cílové sekvenci	nízké (PCR na potvrzení umlčení)
Chemická/fyzikální mutagenese	semena nebo rostliny ošetřeny chemickým mutagenem/radiací	ne	bodové mutace nebo delece	vysoké (mapování a sekvenování)
TILLING	chemická mutagenese, mutace identifikovány pomocí SNP analýzy	ne	bodové mutace	vysoké (drahá PCR a sekvenování)
T-DNA inserce	R transformovány pomocí <i>Agrobacterium</i> , v genomu R vložena T-DNA	ano	aktivace sousedních genů nebo narušení kódující sekvence nebo UTR	střední (sekvenování a PCR)
Aktivace transpozónu	R transformovány transpozónem – mobilizován k vyvtáření inzercí nebo výřezy	ano	narušení kódující sekvence	střední (sekvenování a PCR)

R (rostliny), **VIGS** ('Virus-induced gene silencing'), **TILLING** ('targeting induced local lesions in genomes'), **T-DNA** (transferová DNA), **SNP** (jednonukleotidový polymorfismus), **PTGS** ('Post-transcriptional gene silencing'), **UTR** (netransitovaná oblast)

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Zucchini yellow mosaic virus izolát „H“ byl získán od Ing. Miroslava Glasy, PhD. z Virologického ústavu SAV, Bratislava. Izolát viru byl udržován na rostlinách tykve - cuketa *Cucurbita pepo* L. odrůda STARTGREEN F1.

4.2 Použité chemikálie, roztoky a jejich složení

Agaróza	Agarose I, Amresco, Biotechnology Grade
Bromfenolová modř (0,1% roztok) v 30% glycerínu	Fluka, Sigma
Etidium bromid (2,5 mg/ml)	Serva
GelRed	NA Stain, 10 000x v DMSO, Biotium
GoodView	NA Stain, HGV – II, SBS Genetech Co. Ltd.
IPTG:	IPTG 2 g voda 10 ml
LB médium (1 l)	kasein hydrolyzát 10 g kvasničný autolyzát 5 g pepton 5 g NaCl 10 g voda 1000 ml agar 17 g (tuhé LB médium) pH 7,2 - 7,4
Loading Dye	Chroma Track Dye Marker, Sigma
SOC médium (pro pGEM-T kit)	pepton 2 g kvasničný extrakt 0,5 g 1M NaCl 1 ml 1M KCl 0,25 ml 2M Mg ²⁺ roztok 1 ml 2M glukóza 1 ml voda 97,75 ml T
TAE pufr (5x)	TRIS 24,2 g ledová kyselina octová 5,71 ml

	0,5 M EDTA 10 ml
	pH upravit kys. octovou na 8,
	a doplnit do 1 000 ml destilovanou vodou
X-gal	X-gal 20 mg
	dimetylformamid 1 ml

4.3 Použité přístroje

Spektrofotometr	Nanodrop 1000, Thermo Scientific, Biotech
Minitřepačka	TTS 2 – 9008200, Yellowline 231, IKA Works Inc.
Centrifuga	Universal 32, Hettich, GMI Biofuge Pico, Heraeus, Kendro Laboratory products Spectrafuge Mini Centrifuge, Labnet International, Inc. Spectrafuge 16M Microcentrifuge, Labnet International, Inc.
Lyofilizátor	SpeedVac SPD 111, Thermo Savant
Termocyclerly	XP Thermal Cycler, Bioer T-Personal Thermal Cycler, Biometra
Elektroforetická komora	MIDI I, Roth
Zdroj stejnosměrného napětí	PowerPack P25, Biometra Power Station 300, Labnet International, Inc.
PCR parocní stanice s UV	Herolab clean cab plus, Schoeller s.r.o.
Inkubátor	TH-30, Edmund Bühler GmbH, Trigon plus
Orbitální třepačka	Multi Bio RS-24, Biosan
Homogenizátor	FastPrep FP120 / BIO101, Thermo Savant
Termoblok	Dri-Block Heater DB2D, Techne Accublock Digital Dry-Bath, Labnet International, Inc.

4.4 Srovnání sekvencí CP genu vybraných izolátů ZYMV a stanovení DNA polymorfizmu

Z databáze NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) bylo vybráno celkem 36 sekvencí CP genu různých izolátů ZYMV. Patří mezi ně i sekvence získaná z izolátu „H“ ZYMV, se kterou se dále pracuje. Pomocí programu MEGA 5.05 byl proveden 'alignment' získaných sekvencí. Seznam všech použitých sekvencí společně s názvy jednotlivých izolátů ZYMV

a pozicemi, ve kterých se CP gen nachází je uveden v Tab. V. DNA polymorfismus CP genu, který umožnil určit konzervativní a polymorfní oblasti CP genu sekvencí poskytnutých databází NCBI, byl stanoven pomocí programu DNAsp 5.

Tab. V: Seznam porovnávaných sekvencí CP genu a celých genomických sekvencí ZYMV

Název sekvence podle NCBI	Pozice CP genu v sekvenci	Název izolátu ZYMV
AB063251	1-840	M39
AB458595	260-1099	SYZY-1
AB458596	260-1099	SYZY-3
AF435425	1-840	HANGZHOU
AF486822	1-840	DONGYANG
AF486823	1-840	HAINAN
AF513550	1-840	SHANGYU
AF513551	1-840	NINGBO
AF513552	1-840	SHANDONG
AJ251527	305-1141	10
AJ420012	101-937	AUSTRIA 2
AJ420013	98-934	AUSTRIA 5
AJ420014	95-931	AUSTRIA 6
AJ420015	101-937	AUSTRIA 10
AJ420016	101-937	AUSTRIA 11
AJ420017	101-937	AUSTRIA 12
AJ420018	88-924	SLOVENIA 1
AJ420019	101-937	BERLIN 1
AJ420020	98-934	ITALY 1
AJ459954	1-837	H266-2
AJ459955	1-837	H272-5
AJ459956	1-837	H272-8
AY074808	1-840	SHANXI
AY074809	1-840	BEIJING
AY074810	1-840	NINGBO
D13914	894-1730	FLORIDA
DQ124244	239-530	H
EF178505	1-837	ZUG

Název sekvence podle NCBI	Pozice CP genu v sekvenci	Název izolátu ZYMV
EU999757	92-940	SYR-B2
EU999758	94-942	JOR-B3
EU999759	3-941	SYR-B4
GU586790	1-837	ZTRICH
M35095	1-1164	-
X62662	1-1038	SINGAPORE
NC003224	8542-9378	taiwanský
DQ124239	8543-9382	KUCHYNA

4. 5 Návrh a výběr primerů pro syntézu dsRNA

Primery pro přípravu templátu nezbytného pro následnou syntézu dsRNA byly navrženy pomocí programu Primer-BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome) na sekvenci CP genu izolátu „H“ ZYMV (DQ124244).

Parametry pro návrh primerů byly specifikovány následovně: výsledná velikost PCR produktu při použití těchto primerů bude 350-650 nt, dále T_m (‘primer melting temperature’) bude dosahovat v optimálním případě 56°C, minimálně 50°C a maximálně 63°C. Velikost primeru byla nastavena v rozmezí 17-22 nt, optimální délka byla stanovena na 20 nt. Další zadanou podmínkou byl obsah CG (cytosin, guanin) párů mezi 40-60 %. K oboum primerům musí náležet přesahy ve formě promotorových sekvencí pro polymerázu, u „forward“ primeru je to T7 promotor na 5'konci 5'-TAATACGACTCACTATAGGGN₍₁₇₋₂₂₎-3', u „reverse“ primeru je to $\phi 6$ RdRP promotor na 3'konci 5'-GGAAAAAAN₍₁₇₋₂₂₎-3' (Replicator RNAi Kit, DOUBLE-STRANDED RNA PRODUCTION FOR PLANT BIOTECHNOLOGY – COST FA0806 dsRNA, Helsinki 2009).

Pomocí Primer-Blast programu a zmíněných požadavků bylo vygenerováno celkem 10 párů primerů. Ke každému primeru byly připsány přesahy a takto upravené návrhy se hodnotily v programu OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>).

4.6 Příprava templátu pro syntézu dsRNA

4.6.1 Izolace celkové RNA

Celková RNA byla izolována z cukety *Cucurbita pepo* L. infikované ZYMV izolátem „H“. Izolace byla provedena pomocí kitu NucleoSpin[®] RNA Plant firmy Macherey-Nagel podle přiloženého návodu (postup 1). Pro izolaci bylo použito 70-90 mg listu rostlin, genomická RNA získaná izolací byla nakonec rozpuštěna v 60 μ l RNase-free vody. Výsledná koncentrace RNA byla změřena spektrofotometricky na nanodropu.

Postup 1: Izolace RNA pomocí kitu NucleoSpin[®] RNA Plant

1. 70-90 mg vzorku listu bylo homogenizováno v tekutém dusíku v třecí misce na ledu.
2. Homogenát byl přenesen do 1,5ml mikrozkušavky s keramickou kuličkou a bylo přidáno 350 μ l RA1 lyzovacího pufru a 3,5 μ l β -merkaptoetanolu. Vzorek byl protřepán a stočen na stolní centrifuze.
3. Lyzát byl aplikován na filtr (Place NucleoSpin Filtr) umístěný ve sběrné zkumavce a centrifugován 1 minutu při 10 000 g.
4. Filtrát byl přemístěn do nové 2ml mikrozkušavky a k němu bylo přidáno 350 μ l 70% etanolu. Vzorek byl lehce protřepán a stočen na centrifuze.
5. Vzorek byl přenesen na kolonku (NucleoSpin RNA Plant Column) a centrifugován 30 sekund při 11 000 g. Poté byla kolonka přemístěna do nové 2 ml mikrozkušavky.
6. Na kolonu bylo nanášeno 350 μ l MDB (Membrane Desalting Buffer), vzorek byl centrifugován 1 minutu při 11 000 g.
7. Byla připravena DNase reakční směs smícháním 90 μ l DNase reakčního pufru a 10 μ l DNase I ve sterilní mikrozkušavce. 95 μ l DNase reakční směsi bylo aplikováno na střed membrány kolonky.
8. Vzorek byl inkubován 15 minut při pokojové teplotě.
9. Do kolonky bylo přidáno 200 μ l RA2 a centrifugováno 30 sekund při 11 000 g. Kolonka byla přemístěna do nové 2ml mikrozkušavky.

10. Do kolonky bylo přidáno 600 μ l RA3 a centrifugováno 30 sekund při 11 000 g. Filtrát byl odstraněn a kolonka vložena zpět do mikrozkuhavky.
11. Do kolonky bylo přidáno 250 μ l RA3 a centrifugováno 2 minuty při 11 000 g. Kolonka byla přenesena do nové nuclease-free 1,5ml mikrozkuhavky.
12. RNA byla z kolonky vymyta přidáním 60 μ l RNase-free vody a následnou centrifugací po dobu 1 minuty při 11 000 g.

4.6.2 RT-PCR izolované RNA

Reverzní transkripce byla provedena jako součást přípravy vzorků, které budou následně sloužit jako templátové pro syntézu dsRNA, provedení je uvedeno v postupu 2. Nejprve byly vzorky izolované celkové jednovláknové RNA o koncentraci 922,5 ng/ μ l a 1837 ng/ μ l pomocí RT přepsány na ssDNA za použití ZYPP4R primeru (5'-GGAAAAAACTT CGAAAGACGCGGCACAA-3'), který byl navržen a vybrán pro další využití při přípravě templátu pro syntézu dsRNA.

Postup 2: Reverzní transkripce

1. Ve 0,2ml mikrozkuhavkách byla připravena reakční směs I: 5 μ l vzorku RNA, 0,8 μ l ZYPP4R primeru (20 pmol/ μ l), 9,2 μ l DEPC vody. Směs byla promíchána a krátce stočena na centrifuze, vzorek byl zakápnut minerálním olejem.
2. Vzorek byl inkubován 5 minut při teplotě 70 °C v termobloku, poté byl umístěn na 5 minut na led.
3. Byla připravena reakční směs II v 0,5ml mikrozkuhavce podle Tab. VI, směs byla promíchána a krátce stočena.
4. Z reakční směsi II byl pipetován objem 25 μ l do každé mikrozkuhavky ke vzorku, celková směs byla promíchána a krátce stočena na centrifuze.
5. Celková směs byla inkubována 60 minut při 42 °C v termobloku.

Tab. VI: Složení reakční směsi II pro reverzní transkripci (25 µl)

Reagencie	[µl]
DEPC voda	12,5
RT pufr 5x	8
dNTPs 10 mM	2,5
RNAsin	1
AMV	1

DEPC (dietyl pyrokarbonát), **RT** (reverzní transkripce), **dNTPs** (deoxyribonukleotidy), **RNAsin** (inhibitor RNáz), **AMV** (Avian myeloblastosis virus – reverzní transkriptáza)

Polymerázová řetězová reakce byla provedena jako další krok přípravy templátu pro syntézu dsRNA. Reakční směs byla připravena podle Tab. VII a amplifikace byla provedena v termocycleru s podmínkami pro reakci (5 min - 94 °C; 35x: 1 min - 94 °C, 45 s - 54 °C, 1 min - 72 °C; 10 min - 72 °C) a s použitím navržených ZYPP1F (5'- AATACGA CTCACTATAGGGTGGGGACACACCGAGC-3') a ZYPP4R (5'- GGAAAAAACTTCG AAAGACGCGGCACAA-3') primerů. RT-PCR produkty byly rozděleny elektroforetickou separací v 1,5% agarózovém gelu/TAE za 30 minut při 80 V stejnosměrného napětí, aby byla zkontrolována účinnost amplifikace a přítomnost vzorků.

Tab. VII: Reakční směs pro PCR (20 µl)

Reagencie	[µl]
Pufr 1x	4
PCR voda	10,3
dNTPs 200 µM	2
ZYPP1F primer 0,25 µM	0,25
ZYPP4R primer 0,25 µM	0,25
Taq pol 1 U/µl	0,2
Vzorek ssDNA	3

dNTPs (deoxyribonukleotidy)

Amplikony byly dále izolovány z agarózového gelu pomocí kitu QIAquick Gel Extraction Kit podle QIAquick Spin Handbook (07/2002), provedení je popsáno v postupu 3. Následně byla provedena elektroforetická separace za účelem kontroly přítomnosti vzorků o dané velikosti (cca 500 bp).

Postup 3: Izolace RT-PCR produktu z gelu pomocí kitu QIAquick Gel Extraction Kit

1. Během elektroforetické separace byly připraveny 2ml mikrozkušavky a byly zváženy.
2. Gel z ELFO byl umístěn na UV transluminátor určený pro vyřezávání z gelu.
3. Pomocí sterilního skalpelu byly vyřezány RT-PCR produkty ve formě pásků, umístěny do zkumavek (stejně vzorky do 1 zkumavky společně) a zváženy.
4. Váha gelu byla zjištěna výpočtem rozdílů hmotností zkumavky před a po vložení gelových pásků.
5. QG pufr byl přidán do každé zkumavky vzhledem k hmotnosti gelu v poměru 3:1 (3 μ l:1 mg). Vzorek byl takto inkubován v termobloku po dobu 10 minut při 50 °C (za občasného promíchání), vzorek musí zežloutnout.
6. Byl přidán izopropanol v poměru 1:1 k původní váze gelu.
7. Směs byla napipetována na kolonku pro izolaci DNA vloženou do sběrné zkumavky.
8. Směs byla centrifugována 1 minutu při 16 000 g. Proteklá část byla vylita.
9. 500 μ l QG pufru bylo přidáno do kolonky. Směs byla centrifugována 1 minutu při 16 000 g. Proteklá část byla vylita.
10. 750 μ l PE pufru bylo přidáno do kolonky. Směs byla centrifugována 1 minutu při 16 000 g. Proteklá část byla vylita.
11. Kolonka byla centrifugována 1 minutu při 16 000 g, poté kolonka umístěna do nové 1,5ml mikrozkušavky.
12. Na kolonku bylo pipetováno 30 μ l DEPC vody a nechalo se vpít vodu do membrány cca 1 minutu, směs byla centrifugována 1 minutu při 16 000 g.
13. Vzorky byly zakonzervovány vysušením ve SpeedVac-u (cca 20 minut, 50 °C).
14. Následně rozpuštěny v 10 μ l DEPC vody během 5 minut při 37 °C v termobloku, vzorky byly nakonec promíchány, stočeny v centrifuze. Koncentrace vzorku se tak zvýšila 3x.

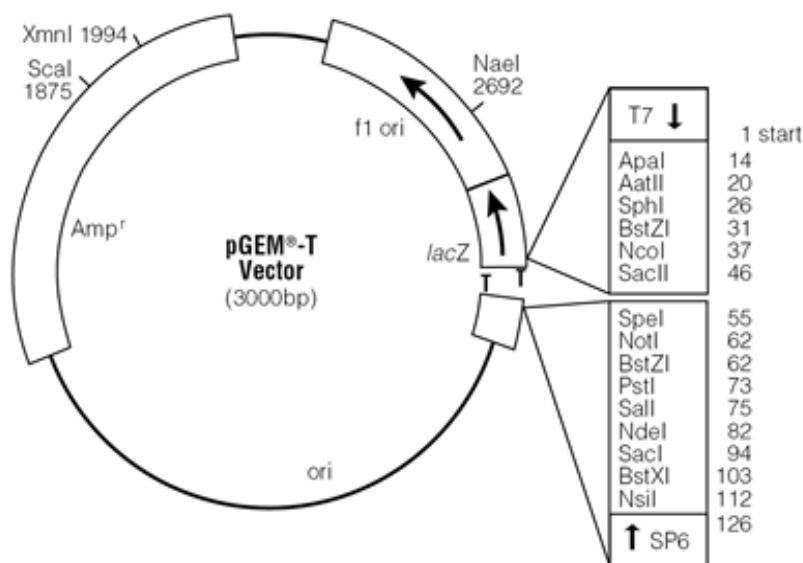
4.6.3 Ligace DNA vzorků do plazmidu pGEM-T

Jako další krok přípravy templátu pro syntézu dsRNA byl amplifikovaný PCR produkt zabudován do vektoru k následné transformaci bakteriálních buněk.

Pro klonování amplikonu (ZYPP1F/ZYPP4R) izolovaného z gelu byl vybrán vektor pGEM-T plazmid firmy Promega (Obr. 4). Výhodou při použití tohoto vektoru pro ligaci PCR produktů je jednotymidinový přesah na obou koncích linearizovaného plazmidu. Přesahy zabraňují opětovnému spojení vektrem do kruhové molekuly a umožňují jednoduchou ligaci PCR vzorků amplifikovaných pomocí příslušné termostabilní polymerázy, která na 3' konec syntetizovaného vlákna přidá deoxyadenosin. Multiklonovací místa, kam je cílová DNA ligována, jsou mezi T7 a SP6 promotory pro polymerázu, což je uvnitř oblasti kódující enzym β -galaktosidáza. Díky takovému umístění je možné po klonování využít tzv. modro-bílou selekci k rozlišení rekombinovaných a nerekombinovaných kolonií (pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems – instructions for use, 12/2010).

Izolovaná DNA byla ligována do plazmidu pomocí kitu pGEM-T Vector System, Promega, USA podle návodu pro uživatele. Ligační reakce proběhla přes noc v teplotě 4 °C, směs obsahovala 5 μ l legačního pufru, 1 μ l T4 ligázy, 0,5 μ l pGEM-T plazmidu a 3,5 μ l PCR produktu.

Obr. 4: pGEM-T plazmidový vektor (převzato z http://www.promega.com/products/pcr/pcr-cloning/pgem_t-vector-systems/)



4.6.4 Transformace bakterií *E. coli*

Amplifikovaný rekombinantní pGem-T plazmid nesoucí PCR produkt byl použit na transformaci kompetentních bakteriálních buněk *E. coli* (kmen JM 119) metodou teplotního šoku (postup 4).

Postup 4: Transformace bakterií *E. coli* teplotním šokem

1. Do 1,5ml mikrozkušavky bylo napipetováno po 75 μ l rozmražených kompetentních buněk JM 119.
2. Dále bylo přidáno 5 μ l ligační směsi se vzorkem, obsah byl jemně promíchán špičkou a inkubován 20 minut na ledu.
3. Poté byla mikrozkušavka umístěna do termobloku na přesně 45 sekund při teplotě 42 °C – teplotní šok a ihned na to umístěna na led na 2 minuty minimálně.
4. Dále bylo přidáno 850 μ l výživného SOC média a směs byla inkubována při 37 °C 1,5 hodiny za stálého pomalého otáčení.
5. Poté byla směs 3 minuty centrifugována při 5 000 g, 880 μ l supernatantu bylo odstraněno a ve zbylém objemu byly transformované bakterie resuspendovány.
6. Povrch LB média v připravených Petriho miskách byl potřen 40 μ l X-Gal a 4 μ l IPTG.
7. Resuspendovaná směs byla přenesena na LB médium s přidavkem ampicilinu (100 μ g/ml).
8. Misky byly inkubovány ve tmě dnem vzhůru při 37 °C přes noc.
9. Následující den byly pozitivní (bílé) kolonie přeočkovány na LB/Amp médium a rozetřeny do malé plošky.

Efektivita ligace cílového amplikonu do vektoru a transformace bakteriálních buněk byla ověřena pomocí 'colony' PCR reakce s použitím M13f (5'- GTAAAACGACGGCCA-3') a M13r (5'- CAGGAAACAGCTATGAC-3') primerů (Invitrogen) při dodržení specifických podmínek PCR reakce (5 min - 94 °C; 35x 1 min - 94 °C, 2 min - 55 °C, 3 min - 72 °C; 10 min - 72 °C). Vzorky vybraných transformovaných kolonií byly přeneseny sterilním párátkem do PCR reakční směsi, jejíž rozpis je v Tab. VIII. Úspěšnost 'colony' PCR byla ověřena elektroforetickou separací v 1% agarózovém gelu/TAE.

Tab. VIII: Rozpis PCR reakční směsi při použití M13f/M13r primerů (25 µl)

Reagencie	[µl]
Colony PCR pufr 1x	5
MgCl ₂ 1,5 mM	1,5
PCR voda	15,3
dNTP 200 µM	2,5
M13f primer 0,2 µM	0,25
M13r primer 0,2 µM	0,25
Taq polymeráza 1U/reakce	0,2

dNTPs (deoxyribonukleotidy)

4.7 Příprava syntézy dsRNA

4.7.1 Izolace rekombinantního plazmidu - templátu pro syntézu dsRNA

Pro získání templátu na syntézu dsRNA byla izolována plazmidová DNA pomocí kitu QIAprep Spin Miniprep a mikrocentrifugy podle návodu pro uživatele z přesnoční kultury transformované bakteriální kolonie *E. coli* v LB médiu (postup 5). Purifikace proběhla při pokojové teplotě a zahrnovala postupně alkalickou lýzi a navázání plazmidové DNA na QIAGEN 'Resin' za odpovídajícího pH a nízkého obsahu solí. Nečistoty a příměsy (RNA, barviva, nízkomolekulární látky) byly odstraněny postupně promytím.

Koncentrace izolované DNA byla změřena spektrofotometricky a takto připravený vzorek DNA byl nachystán pro syntézu dsRNA, kde slouží jako templát.

Postup 5: Izolace rekombinantního plazmidu pomocí kitu QIAprep Spin Miniprep

1. Odebrané 2 ml bakteriální suspenze byly centrifugovány 5 minut při 3 500 g.
2. Peletované bakteriální buňky byly resuspendovány v 250 µl pufru P1 a přemístěny do mikrocentrifugační zkumavky.
3. Bylo přidáno 250 µl pufru P2, obsah byl okamžitě promíchán převrácením mikrozkuavky cca 5x, aby byl roztok čirý a viskózní, dále byl srážen 3 minuty.
4. Dále bylo přidáno 350 µl pufru N3 a obsah byl ihned promíchán převrácením mikrozkuavky cca 5x, roztok se zakalil.
5. Vzorek byl centrifugován 10 minut při 18 000 g, vytvořil se bílý pelet.

6. Supernatant (cca 800 μ l) byl přepipetován na QIAprep spin kolonku.
7. Vzorek byl centrifugován 1 minutu. To, co proteklo, bylo odstraněno.
8. Kolonka byla promyta 0,5 ml pufru PB aplikovaným na membránu kolonky a následně centrifugována 1 minutu. Co proteklo, bylo odstraněno.
9. Dalé byla kolonka promyta přidáním 0,75 ml pufru PE a následnou centrifugací 1 minutu. Co proteklo, bylo vylito.
10. Následovala opět centrifugace po dobu 1 minuty, aby byl odstraněn zbytkový promývací pufr.
11. Kolonka byla umístěna do čisté 1,5ml mikrozkuhavky a promyta 50 μ l sterilní destilované vody a ponechána 1 minutu stát, nakonec 1 minutu centrifugována, aby byla DNA vymyta z membrány.

4.7.2 Ověření sekvence templátové DNA pomocí sekvenování

Sekvenování amplifikovaného a k transformaci bakterií použitého segmentu CP genu ZYMV izolátu „H“ bylo provedeno ve spolupráci s Ústavem experimentální botaniky, Olomouc za účelem ověření délky a mutací sekvence.

Sekvence byly nejprve rozděleny gelovou elektroforetickou separací v 1% agarózovém gelu/TAE (80 V, cca 45 minut) a izolovány z gelu pomocí QIAquick Gel Extraction Kit podle QIAquick Spin Handbook (07/2002). Koncentrace izolovaných vzorků byla změřena pomocí spektrofotometru.

Následně byla provedena sekvenační reakce pomocí BIGDYE[®] Terminator V3.1 Cycle sequencing Kit. Byly připraveny dvě reakční směsi, každá z nich obsahovala odlišný primer, jedna M13f a druhá M13r. Množství DNA použité do reakční směsi bylo odvozeno od koncentrace vzorků naměřené spektrofotometrem.

Na 1 reakci bylo potřeba smíchat 1 μ l sekvenačního pufru 5x, 1 μ l bigdye, 3,2 pmol daného primeru, 30 ng templátové DNA a doplnit na celkový objem 10 μ l destilovanou PCR vodou. Nakonec byla provedena PCR reakce za specifických podmínek (1 min - 96 °C; 25x 10 s - 96 °C, 5 s - 50 °C, 4 min - 60 °C). Následně pracovníci ÚEB provedli oboustranné sekvenování.

4.8 Vlastní syntéza dsRNA

Příprava na syntézu dsRNA i samotný proces produkce dsRNA byl proveden pomocí Replicator RNAi Kitu podle návodu DOUBLE-STRANDED RNA PRODUCTION FOR PLANT BIOTECHNOLOGY – COST FA0806 dsRNA, Helsinki 2009.

4.8.1 PCR izolované plazmidové DNA

Za účelem amplifikace byla provedena PCR reakce izolované plazmidové DNA. Optimální časové a teplotní parametry byly nastaveny podle nejlepších výsledků gradientové PCR (30 s - 98 °C; 35x 10 s - 98 °C, 30 s - 55/60,5/64,5/72 °C, 30 s - 72 °C; 5 min - 72 °C) pro amplifikaci vzorku DNA s primery ZYPP1F a ZYPP4R.

Pro 1 PCR reakci byla připravena reakční směs, do které bylo dodáno vždy 50 ng templátové DNA (izolovaný plazmid). Rozpis reakční PCR směsi je v Tab. IX. Optimální podmínky pro průběh PCR byly nastaveny takto: 30 s - 98 °C; 35x 10 s - 98 °C, 30 s - 65 °C, 30 s - 72 °C; 5 min - 72 °C.

Tab. IX: Reakční směs pro PCR amplifikaci izolovaného rekombinovaného plazmidu (50 µl)

Reagencie	[µl]
Phusion HF pufr 5x	10
dNTPs (10 mM)	1
ZYPP1F primer (10 µM)	2,5
ZYPP4R primer (10 µM)	2,5
Plazmidová DNA (10 ng/µl)	5
Phusion HF polymeráza	0,5
DEPC voda	28,5

DEPC (dietyl pyrokarbonát), dNTPs (deoxyribonukleotidy)

PCR amplikony byly rozděleny gelovou elektroforézou v 1% agarózovém gelu/TAE a následně izolovány z gelu pomocí QIAquick PCR Purification Kitu (Qiagen). Nakonec byla spektrofotometricky změřena koncentrace vzorků izolované DNA.

4.8.2 Syntéza dsRNA

Připravený templát DNA byl použit pro syntézu dsRNA. Produkce dsRNA zahrnuje DNA transkripci dsDNA na ssRNA za využití funkce T7 RNA polymerázy a replikaci, při které $\phi 6$ RNA polymeráza syntetizuje druhé vlákno k ssRNA, takže vznikají molekuly dsRNA.

Reakční směs (Tab. X) byla připravena za pokojové teploty, byl použit 1 µg templátové DNA. Reakční směs byla inkubována přes noc (18 hodin) při teplotě 35 °C.

Tab. X: Reakční směs pro syntézu dsRNA z templátové DNA

Reagencie	[µl]
DEPC voda	doplnit do 50
dsRNA pufr pro syntézu 10x	5
NTPs 5x	10
DNA templát (1 µg)	x
MnCl ₂ (50 mM)	1,5
Pyrofosfatáza	1
T7 RNA polymeráza	1,5
φ6 RNA polymeráza	1,5

DEPC (dietyl pyrokarbonát), NTPs (nukleotidy), x (množství podle koncentrace vzorku)

4.8.3 Srážení dsRNA chloridem litným (LiCl)

Nasyntetizovaná dsRNA byla získána konečným srážením pomocí LiCl (postup 6), byla tak odstraněna zbylá templátová DNA a ssRNA. Reakce byla provedena na ledu.

Postup 6: Srážení chloridem litným - získání dsRNA

1. Z celkového objemu 50 µl bylo odebráno 5 µl a zmrazeno v - 20 °C, tento vzorek byl označen S1.
2. Zbylých 45 µl bylo umístěno do 1,5ml mikrozkušavky a bylo k nim přidáno 15 µl (1/3 objemu vzorku) 8 M LiCl, směs byla promíchána a inkubována v - 20 °C 30 minut.
3. Poté byl vzorek centrifugován 20 minut při 19 700 g v teplotě 4 °C.
4. ssRNA tím byla sražena na dno zkumavky a dsRNA byla v supernatantu přemístěna do nové 1,5ml mikrozkušavky se zámkem.
5. Neporušený pelet (ssRNA) byl nesuspendován ve 45 µl DEPC vody, označen jako S2 a zamražen v - 20 °C.

6. K supernatantu bylo přidáno 25 μ l (1/2 objemu vzorku) 8 M LiCl, směs byla promíchána a inkubována 30 minut v - 20 °C.
7. Poté byl vzorek centrifugován 20 minut při 19 700 g v teplotě 4 °C.
8. V peletu byla tímto sražena dsRNA a supernatant obsahoval DNA a nukleotidy, proto byl odpipetován.
9. K peletu bylo přidáno 500 μ l studeného 70% etanolu.
10. Vzorek byl centrifugován 5 minut při 19 700 g v teplotě 4 °C.
11. Etanol byl opatrně odstraněn.
12. Krok 9. - 11. byl zopakován.
13. Otevřená mikrozkušavka s peletem dsRNA byla sušena v pokojové teplotě po dobu 8 minut, nakonec byl pelet resuspendován v 45 μ l DEPC vody a označen jako S3.
14. Koncentrace vzorků byla změřena spektrofotometricky.

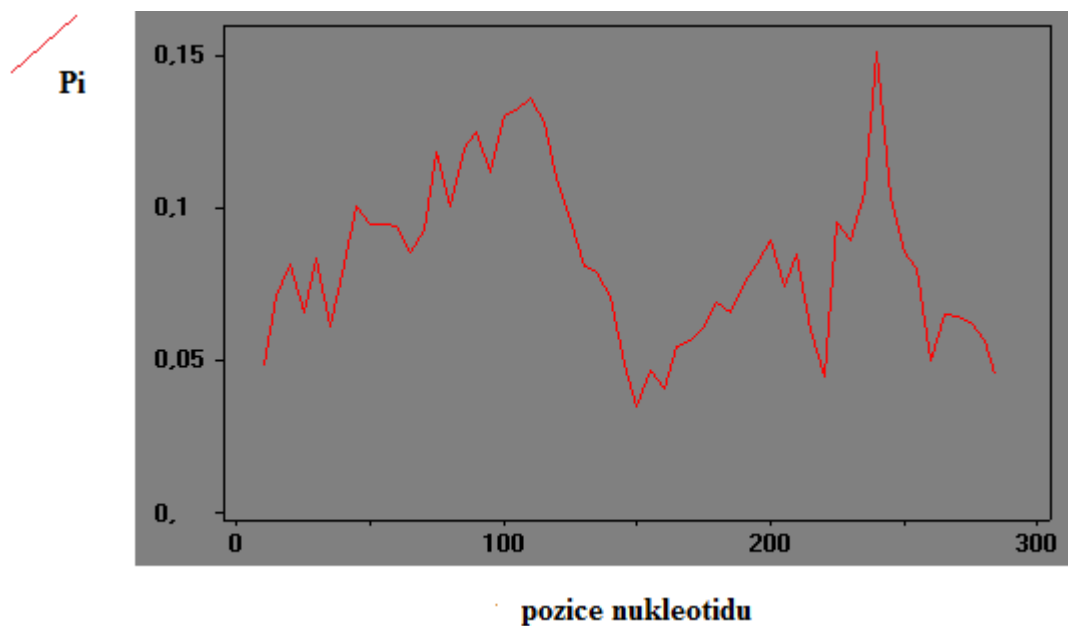
5 VÝSLEDKY

5.1 Srovnání sekvencí CP genu vybraných izolátů ZYMV a stanovení DNA polymorfizmu

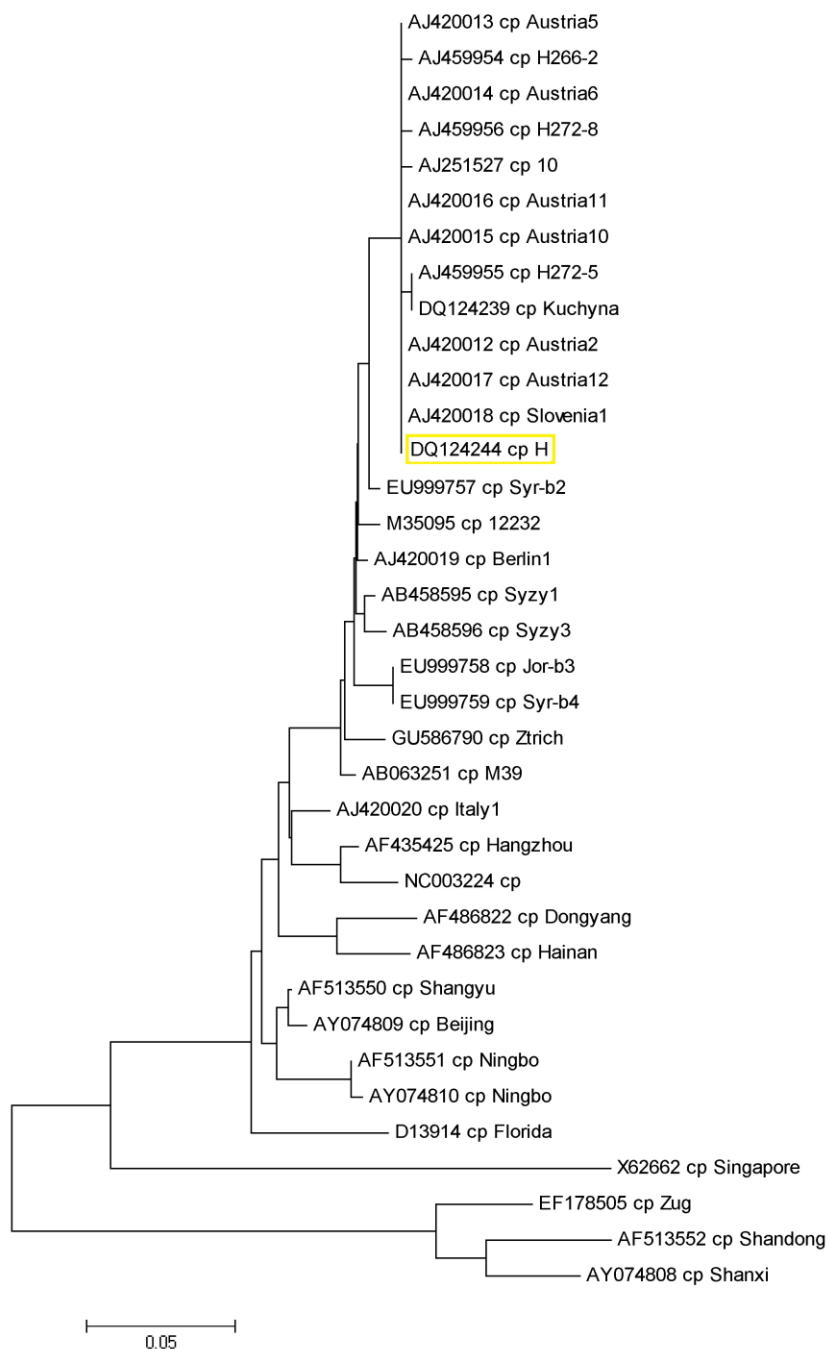
Pomocí funkce Neighbor - Joining v programu MEGA 5.05 byl odvozen fylogenetický strom (Obr. 6) vypovídající o sekvenční podobnosti/příbuznosti CP genu jednotlivých izolátů *Zucchini yellow mosaic virus*. Izolát „H“ (DQ124244) byl programem zařazen do klastru společně s izoláty AJ20013, AJ459954, AJ420014, AJ59956, AJ251527, AJ420016, AJ420015, AJ459955, DQ124239, AJ420012, AJ420017, AJ420018. Izoláty seřazené na Obr. 6 jsou popsány pomocí přístupového čísla a názvu izolátu z NCBI databáze.

DNA polymorfizmus sekvencí CP genu o velikosti 836 bp byl stanoven pomocí programu DNAsp 5. Nejdivergentnější oblast CP genu sekvencí získaných z NCBI byla určena mezi pozicemi 231 - 250 ($P_i = 0,15$). Mezi nukleotidy 141 - 160 je nejkonzervativnější oblast ($P_i = 0,03$). Na Obr. 5 jsou v grafu zachyceny indexy polymorfizmu (P_i) měnící se v závislosti na pozici nukleotidu.

Obr. 5: DNA polymorfizmus CP genu



Obr. 6: Fylogenetický strom porovnávaných sekvencí CP genu ZYMV



DQ124244 – izolát „H“ ZYMV byl označen žlutým okrajem. Úsečka znázorňuje procento substitucí.

5.2 Výběr vhodného páru navržených primerů pro syntézu dsRNA

Ze všech navržených primerových sekvencí byl vybrán primerový pár dále použitý při přípravě templátu pro syntézu dsRNA. Jak „forward“, tak „reverse“ primery jsou shrnuty v Tab. XI., kde jsou seřazeny od kombinací nejlépe spňujících zadané podmínky. Detailnějšímu zkoumání byly podrobeny „forward“ primer z páru 1 a „reverse“ primer

z páru 4. OligoAnalyzer 3.1 umožnil zjistit podrobnější informace o chování primerů při dalších reakcích, takováto analýza zahrnuje především sledování možného vzniku intramolekulárních a intermolekulárních struktur, mezi něž patří vlásenky (intramolekulární struktury) a dimery (intermolekulární struktury mezi stejně nebo rozdílně orientovanými sekvencemi primerů).

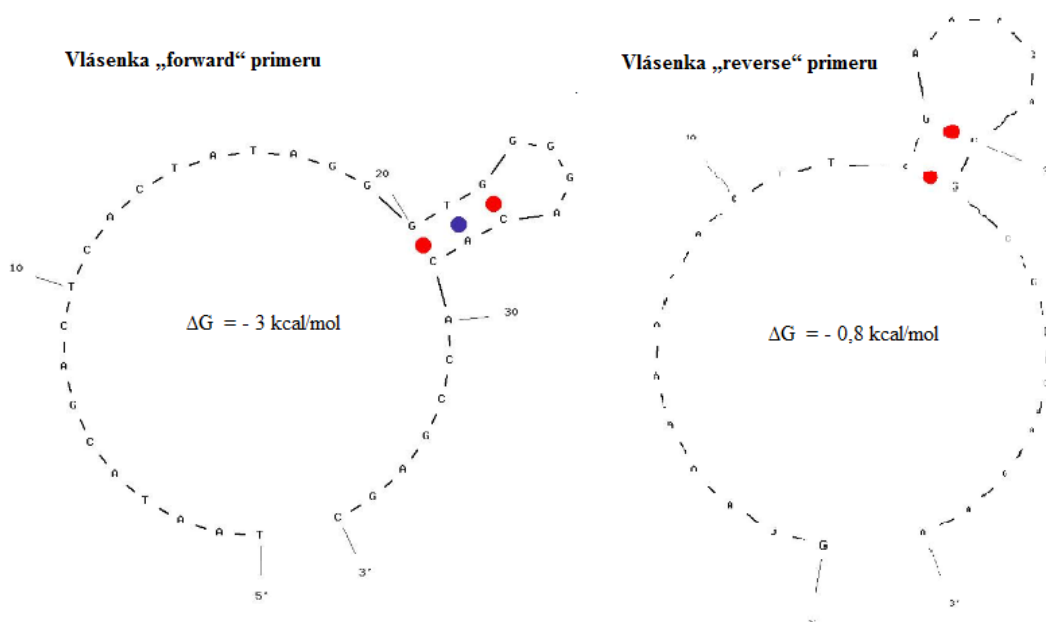
Tab. XI: Sekvence navržených párů primerů pro CP gen ZYMV izolát „H“ s připsanými přesahy

	5'-„Forward“ primer-3'	5'-„Reverse“ primer-3'
1	TAATACGACTCACTATAGGGTGGGGACACACCGAGCTTTT	GGAAAAAAAAATCCTTCGTGACAGCTGCCAT
2	TAATACGACTCACTATAGGGGAGAATTAGCCGCCCTCGGA	GGAAAAAAAAATTCCTTTCACGCGTGCCAG
3	TAATACGACTCACTATAGGGATGGGGACACACCGAGCTTT	GGAAAAAAAAAGACGCGGCACAATTTTCCC
4	TAATACGACTCACTATAGGGTTGAGGCATGGGGACACACC	GGAAAAAAAAACTTCGAAAGACGCGGCACAA
5	TAATACGACTCACTATAGGGCATGGGGACACACCGAGCTT	GGAAAAAAAAATCCTTCGAAAGACGCGGCAC
6	TAATACGACTCACTATAGGGAGAATTAGCCGCCCTCGGAA	GGAAAAAAAAACGCGTGGCAGTGACATCTTC
7	TAATACGACTCACTATAGGGAAGTGCAGAGAATTAGCCGCC	GGAAAAAAAAATTCCTTTCACGCGTGCCCA
8	TAATACGACTCACTATAGGGTGATTGAGGCATGGGGACACA	GGAAAAAAAAACGCGGCACAATTTTCCCAT
9	TAATACGACTCACTATAGGGTGCAGAGAATTAGCCGCCCTC	GGAAAAAAAAACTTTCACGCGTGCCAGTGAC
10	TAATACGACTCACTATAGGGATGGGGACACACCGAGCTTTT	GGAAAAAAAAAGACGCGGCACAATTTTCCCA

přesahy – normální písmo, sekvence primerů – tučné písmo, velikost produktu 350-650 nt, T_m (primer melting temperature) 50-56-60 °C

Po zhodnocení návrhů byl vybrán „forward“ primer (5'-TAATACGACTCAC TATAGGGTGGGGACACACCGAGC-3') z páru 1, který byl zkrácen o 4 T (tymin) na svém 3' konci. „Reverse“ primer (5'-GGAAAAAAAAACTTCGAAAGACGCGGCACAA-3') byl zvolen z navrženého páru 4. Tento primerový pár byl zvolen k provedení amplifikace. Obr. 7 ilustruje možnou strukturu vlásenky u vybraného páru primerů. Maximální možná hodnota ΔG (Gibbsova energie) potřebná k destabilizaci vlásenky se pohybuje obvykle mezi hodnotami -5 a -6 kcal/mol. Obě vlásenky, které mohou vzniknout u vybraných primerů, splňují stanovené podmínky.

Obr. 7: Struktura vlásenky u vybraných primerů vytvořená programem OligoAnalyzer 3.1



Primery byly nasyntetizovány a dodány firmou IDT (INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES) pod názvem ZYPP1F („forward“ primer) a ZYPP4R („reverse“ primer). Popis vlastností dodaný s primery je shrnut v Tab. XII.

Tab. XII: Vlastnosti nasyntetizovaného páru primerů pro CP gen ZYMV izolát „H“

Parametr	ZYPP1F	ZYPP4R
Počet bp	36	29
Tm	65,9 °C	61,9 °C
CG obsah	52,70%	44,80%
Koncentrace	100 pmol/μl	100 pmol/μl

bp – páry bází, Tm - 'primer melting temperature', CG (cytosin, guanosin)

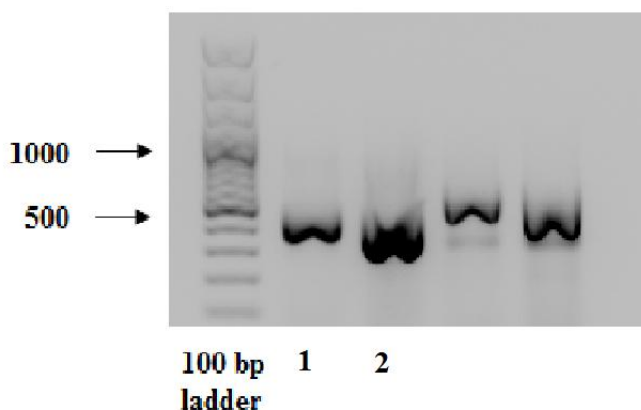
5.3 Izolace celkové RNA

RNA byla izolována pomocí kitu NucleoSpin[®] RNA Plant firmy Macherey-Nagel z rostlin *Cucurbita pepo* infikovaných izolátem „H“ ZYMV. Pracovalo se se dvěma vzorky listů z téže rostliny, která vykazovala nejsilnější příznaky nákazy. Bylo naváženo 73,2 mg vzorku V₁ a 87,1 mg vzorku V₂. Koncentrace RNA byly naměřeny spektrofotometricky: V₁ = 922,5 ng/μl (A₂₆₀/A₂₈₀ = 2,22), V₂ = 1837 ng/μl (A₂₆₀/280 = 2,18).

5.4 Příprava templátu pro syntézu dsRNA

Vzorky izolované celkové RNA podstoupily reverzní transkripci a následně PCR pro amplifikaci. RT-PCR proběhla za použití ZYPP1F/ZYPP4R primerů. Přítomnost produktů RT-PCR byla potvrzena pomocí výsledků elektroforetické separace (Obr. 8).

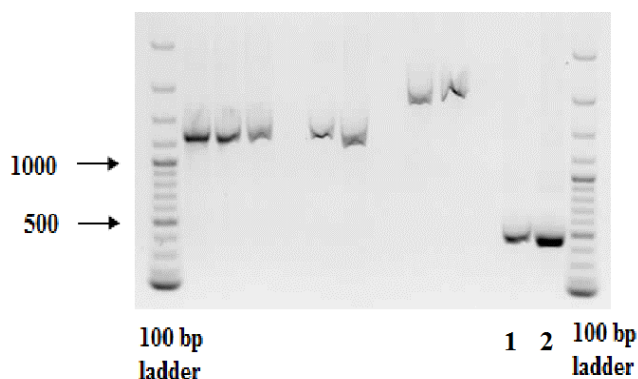
Obr. 8: Potvrzení přítomnosti produktů RT-PCR o velikosti 438 bp



100 bp ladder (100 bp DNA Ladder GeneRuler, Fermentas), **1, 2** (vzorek amplifikované ZYPP1F/ZYPP4R primery)

Vzorky byly po elektroforetické separaci izolovány z gelu pomocí kitu QIAquick Gel Extraction Kit. Následná elektroforetická separace potvrdila přítomnost vyizolované DNA (Obr. 9) o očekávané velikosti 438 bp, která může být následně použita jako inzert do vektoru pro transformaci kompetentních bakteriálních buněk.

Obr. 9: Výsledky izolace RT-PCR produktů o velikosti 438 bp z gelu

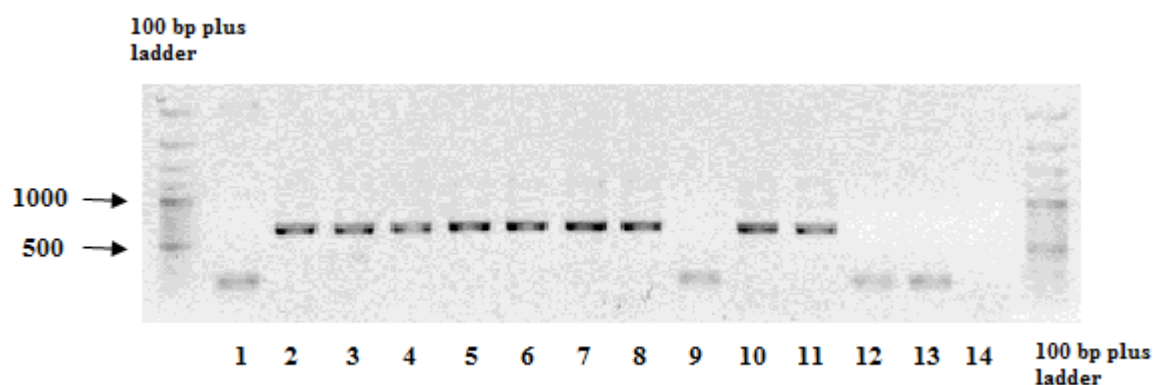


100 bp ladder (100 bp DNA Ladder GeneRuler, Fermentas), **1** (V_1+ ZYPP1F/ZYPP4R primery), **2** (V_2+ ZYPP1F/ZYPP4R primery)

5.4.1 Transformace bakterií *E. coli*

Plazmidy pGEM-T s ligovanou sekvencí cílové DNA byly teplotním šokem vloženy do kompetentních buněk bakterií *E. coli* (kmen JM 119). Následně byla provedena PCR reakce, ve které byly použity pozitivní kolonie (14 z cca 100) transformovaných bakterií jako vzorek, do reakční směsi byly přeneseny sterilním párátkem. Potvrzení/vyvrácení úspěchu transformace označených kolonií byla zakončena gelovou elektroforetickou separací PCR produktu (Obr. 10) v 1% agarózovém gelu/TAE při 70 V (cca 40 minut). Předpokládaná délka sekvence genu pro CP je cca 500 bp, univerzální primery M13f/M13r jsou 17+17 bp dlouhé a multiklonovací místa zabírají 104 bp. Velikost insertu v plazmidu byla tedy stanovena na 737 bp a tato velikost se potvrdila u 9 vzorků ze 14.

Obr. 10: Výsledek elektroforetické separace PCR produktů – amplifikovaný inzert (M13f/M13r) ze 14 bakteriálních kolonií



100 bp plus ladder (100 bp Plus DNA Ladder GeneRuler, Fermentas), **1 – 14** vzorky pozitivně transformovaných buněk *E. coli* plazmidem pGEM-T s ligovanou sekvencí CP genu izolovanou z rostlin cukety nakažené ZYMV

5.4.2 Ověření sekvence ligovaného insertu pro syntézu dsRNA

Sekvenování bylo provedeno za účelem ověření délky a mutací inzertované sekvence CP genu. Výsledkem byla sekvence o délce 438 bp, což přesně délkou odpovídá sekvenci CP genu izolátu „H“ amplifikované pomocí ZYPP1F/ZYPP4R primerů. Délka sekvence se tedy postupnou přípravou templátu pro syntézu dsRNA nezměnila. Bodové mutace byly zjišťovány pomocí programu MEGA 5, kde byla srovnána původní sekvence CP genu izolátu „H“ s pořadím nukleotidů ligovaného insertu. Mutace zjištěny nebyly.

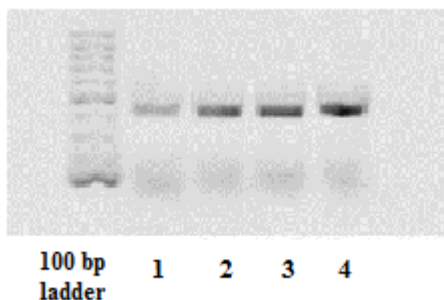
5.5 Vlastní syntéza dsRNA

Příprava na syntézu dsRNA i samotný proces produkce dsRNA byl proveden podle DOUBLE-STRANDED RNA PRODUCTION FOR PLANT BIOTECHNOLOGY – COST FA0806 dsRNA, Helsinki 2009 pomocí Replicator RNAi Kitu.

5.5.1 PCR izolované plazmidové DNA

Provedením gradientové PCR byla stanovena optimální teplota přisedání primerů ZYPP1F/ZYPP4R na templátovou DNA a to 64,5 °C. Výsledek gradientové PCR je na Obr. 11. Pro další zpracování byly vybrány vzorky, které prošly amplifikací s teplotou přisedání primerů 64,5 °C.

Obr. 11: Výsledek elektroforetické separace gradientové PCR



100 bp ladder (100 bp DNA Ladder GeneRuler, Fermentas), **vzorky 1** (55 °C), **2** (60,5 °C), **3** (64,5 °C), **4** (72 °C)

Vybraný vzorek DNA vykazující nejvyšší stupeň amplifikace při 64,5 °C opět prošel gelovou elektroforetickou separací v 1% agarózovém gelu/TAE a byl izolován z gelu pomocí QIAquick PCR Purification Kitu (Qiagen). Koncentrace izolovaného vzorku DNA naměřené spektrofotometrem byly 74,3 ng/μl ($A_{260/280} = 1,95$) a 89,4 ng/μl ($A_{260/280} = 1,99$).

5.5.2 Syntéza dsRNA

Vzorky plazmidové dsDNA amplifikované polymerázovou řetězovou reakcí s nastavenou teplotou přisedání primerů 65 °C sloužily jako templátový vzorek pro syntézu dsRNA.

Reakční směs pro syntézu dsRNA byla inkubována 18 hodin při teplotě 35 °C v termobloku, následující den byla nasyntetizovaná dsRNA vysrážena.

Vzorek dsRNA byl získán postupným srážením nežádoucích molekul a následnou precipitací vlastní dsRNA pomocí LiCl.

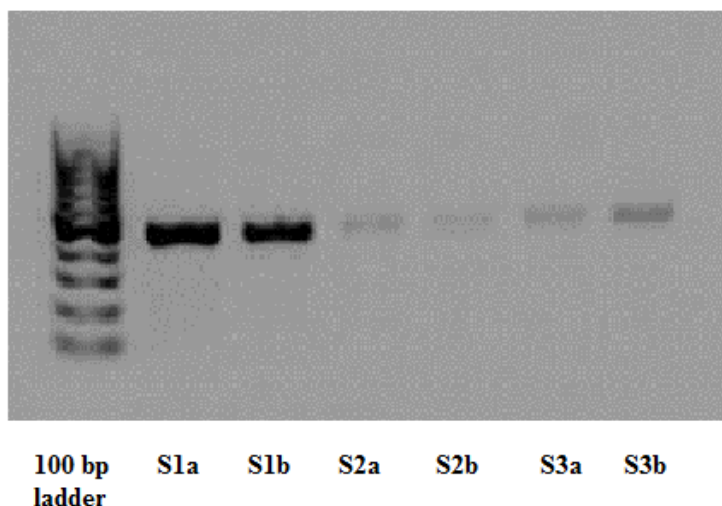
Soupis S1 (směs ssRNA, dsRNA, DNA, nt), S2 (ssRNA) a S3 (dsRNA) vzorků je v Tab. XIII. Vzorky byly rozděleny elektroforetickou separací při 80 V, jejíž výsledek (Obr. 12) posloužil jako kontrola přítomnosti/absence nasyntetizovaných vzorků. Z Obr. 12 je patrné, že frakce S2 vykazují stejnou velikost jako S3, z čehož vyplývá, že u S2 se nejedná o vzorek ssRNA, jak bylo předpokládáno, ale o nevysráženou dsRNA.

Tab. XIII: Přehled vzorků a jejich koncentrací

Koncentrace templátové DNA pro syntézou dsRNA	Koncentrace S1 [ng/μl]	Koncentrace S2 [ng/μl]	Koncentrace S3 [ng/μl]
74,3 ng/μl	S1a = x	S2a = 190,6	S3a = 4,1
89,4 ng/μl	S1b = x	S2b = 119,9	S3b = 6,8

x (neměřeno), S1 (směs ssRNA, dsRNA, DNA, nt), S2 (ssRNA) a S3 (dsRNA)

Obr. 12: Detekce vzorků S1, S2 a S3



100 bp ladder (100 bp DNA Ladder GeneRuler, Fermentas), **S1** (směs ssRNA, dsRNA, DNA, nt), **S2** (ssRNA) a **S3** (dsRNA), **a** - koncentrace templátové DNA pro syntézou dsRNA byla 74,3 ng/μl, **b** - koncentrace templátové DNA pro syntézou dsRNA byla 89,4 ng/μl

Ze vzorku dsDNA o koncentraci 74,3 ng/μl bylo získáno 4,1 ng/μl ($A_{260}/A_{280} = 1,52$) dsRNA, ze vzorku dsDNA o koncentraci 89,4 ng/μl bylo získáno 6,8 ng/μl ($A_{260}/A_{280} = 1,84$) dsRNA, což je 7 -10x méně než bylo predikováno v návodu při použití Replicator RNAi Kitu.

6 DISKUZE

Syntéza molekul dsRNA, které je teoreticky možné využít k vyvolání post-transkripčního umlčování genů, byla provedena pomocí ReplicatorTM RNAi Kitu firmy Finnzymes. Výrobce kitu zaručuje výtěžnost dsRNA o koncentraci minimálně 40 µg/ml až miligramové množství, které je podle návodu možné nasyntetizovat při dodržení podmínek syntézy, mezi které patří především použití Thermo Scientific Phusion® High-Fidelity DNA polymerázy při PCR amplifikaci DNA templátu, která zaručí vysokou míru přesnosti, je také nutné zohlednit použitý objem (0,5-2 µl/objem reakce 50 µl) polymerázy vzhledem k délce PCR produktu, v tomto experimentu bylo použito minimální množství (0,5 µl) k amplifikaci sekvence o délce cca 500 nt. Při vlastní syntéze dsRNA byl použit 1 µg templátové DNA, což odpovídá pokynům výrobce (0,5-2 µg). Další podmínky jako práce na ledu/při pokojové teplotě i časová a teplotní nastavení pro PCR reakci v termocycleru byly také dodrženy podle návodu.

I přes to byla výsledná koncentrace nasyntetizované dsRNA 7-10x menší než předpovídal výrobce, tedy mezi 4-7 µg/ml. Manuální chyba mohla nastat při posledním kroku, kdy je od precipitované dsRNA odsáván supernatant, takže pelet mohl být porušen a částečně odsán. Na druhou stranu, ne příliš vědeckých článků se zmiňuje o práci s tímto kitem, takže není možné jednoduše ohodnotit opravdovou výtěžnost a funkčnost kitu. Gouveia a kol. (2012) publikovali článek, ve kterém se zmiňují o použití RNAi Replicator Kitu, ale jelikož článek nebyl zaměřen primárně na syntézu dsRNA jako takové, ve výsledcích ani koncentraci nasyntetizované dsRNA nezmínil.

Další komerčně prodávané kity, které je možné využít k syntéze dsRNA, je MEGAscript® T7 kit firmy Ambion a T7 RiboMAXTM Express RNAi systém od firmy Promega. V obou případech se podle výrobce jedná o kit na syntézu molekul ssRNA, které jsou následně vhodné pro použití při RNAi v savcích i nesavcích systémech, syntéza má trvat velmi krátký čas (0,5-2 hodiny). Pokud templát pro syntézu tvoří sekvence v orientaci 'sense a antisense', jednovláknová RNA vytvoří dsRNA vlásenku.

U MEGAscript® T7 kitu jsem nenašla konkrétní koncentrace experimentálně nasyntetizované dsRNA, zmínky o využití tohoto kitu jsou však hojné a na problémy s nízkou výtěžností si autoři nestěžují (Clemens a kol., 2000). Výrobce kitu slibuje výtěžnost 100 µg dsRNA z jedné 20µl reakce. Templátovým vzorkem pro syntézu dsRNA je v tomto případě linearizovaná DNA nebo PCR produkt.

V případě použití T7 RiboMAX™ Express RNAi systému je očekáván výtěžek 2 mg/ml. Lze syntetizovat dlouhé dsRNA (přes 200 bp) pro RNAi v nesavčích systémech a siRNA v savčích systémech. Templátový vzorek může být tvořen linearizovaným plazmidem nebo PCR produktem. Při hledání číselných hodnot koncentrací nasyntetizované dsRNA pomocí tohoto kitu nastal stejný problém, autoři se taktéž zmiňují o jeho použití, ale jelikož není cílem jejich práce samotná syntéza dsRNA molekul, nerozebírají její nasyntetizované množství. Příkladem může být práce Joo a kol. (2008), kde popisuje syntézu siRNA molekul pomocí zmíněného kitu, avšak dále se k jeho výtěžnosti nezmiňuje.

Kromě *in vitro* syntézy pomocí T7 RNA a ϕ 6 RdRP polymerázy, na které je založeno fungování všech zmíněných kitů, je možné dsRNA syntetizovat i *in vivo*.

7 ZÁVĚR

Byly navrženy primery pro amplifikaci sekvence CP genu ZYMV izolátu „H“. Takto nasyntetizovaná sekvence byla základem přípravy templátu pro syntézu dsRNA pro plášťový protein viru mozaiky cukety. Sekvencí CP genu ligovanou do plazmidového vektoru pGEM-T byly transformovány kompetentní buňky *E. coli* (kmen JM 119). Izolovaný plazmid sloužil jako vstupní templátová DNA pro syntézu dsRNA.

Koncentrace dsRNA, kterou jsem nasyntetizovala, byla průměrně 5,5 ng/μl, což je cca 7x menší hodnota než byl předpokládaný výnos při použití Replicator RNAi Kitu.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

abRNA	aberrantní RNA
AGO	argonaut
AK	aminokyselina
AMV	<i>Avian myeloblastosis virus</i> , virus ptačí myeloblastózy
bp	páry bazí
CI	protein cytoplazmatických inkluzí
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>
CP	plášťový protein
DCL	Diceru podobné proteiny
DDM1	protein snižující metylaci DNA
DEPC	dietyl pyrokarbonát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotid trifosfát
ds	dvouvláknová
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
ELFO	elektroforetická separace
GMO	geneticky modifikovaný organizmus
HC-Pro	Helper-Component Protein
IPTG	5-brom-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranozid
LB	Luria – Bertani médium
lsiRNA	dlouhá siRNA
miRNA	microRNA
mRNA	mediátorová RNA
NIa-Pro	jaderný inkluzní protein A – 49 kDa proteináza
NIa VPg	jaderný inkluzní protein A – s virovým genomem spjatý protein
NIb	jaderný inkluzní protein B
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NK	nukleová kyselina
nt	nukleotid
NTPs	směs nukleotidů (ATP, GTP, CTP, TTP)

PCR	polymerázová řetězová reakce
PTGS	post-transkripční umlčování genů
P1	P1 proteináza
P3	P3 protein
ra ^{si} RNA	'repeat-associated' krátká interferující RNA
RdRP	RNA-dependentní RNA polymeráza
RISC	RNA-indukovaný umlčující komplex
RITS	RNA-indukované transkripční umlčování
RNAi	RNA interference
RNA	ribonukleová kyselina
RNP	ribonukleoproteiny
RT	reverzní transkripce
siRNA	krátká interferující RNA
scnRNA	malá scanRNA
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
ss	jednovláknová
TAE	pufr Tris báze, kyselina octová a EDTA
tasiRNA	'trans-acting' krátká interferující RNA
T-DNA	oblast DNA Ti plazmidu u <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
TGS	transkripční umlčování genů
Tris	tris(hydroxymetyl)aminometan
UTR	nepřekládaná koncová oblast
VIGS	virem indukované umlčování genů
ZYMV	<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>
6K1	6 kDa velký protein 1
6K2	6 kDa velký protein 2
ΔG	Gibbsova energie

9 SEZNAM LITERATURY

- Anandalakshmi, R., Pruss, G.J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A.C., Smith, T.H., Vance, V.B. (1998): A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95(22):13079-13084.
- Baulcombe, D.C. (1999): Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Current Opinion in Plant Biology* 2:109-113.
- Baulcombe, D.C. (1996): RNA as a target and an initiator of post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Plant molecular Biology* 32:79-88
- Berry, B., Deddouche, S., Kirschner, D., Imler, J.-L., Antoniewski, Ch. (2009): Viral Suppressors of RNA Silencing Hinder Exogenous and Endogenous Small RNA Pathways in *Drosophila*. *PLoS ONE* 10;4(6):e586
- Bouche, N., Bouchez, D. (2001): *Arabidopsis* gene knockout: phenotypes wanted. *Current opinion in plant biology* 2:111-117.
- Burch-Smith, T.M., Anderson, J.C., Martin, G.B., Dinesh-Kumar, S.P. (2004): Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *The Plant Journal* 39:734–746.
- Carrington J.C., Freed, D.D., Sanders, T.C. (1989): Autocatalytic processing of the potyvirus helper component proteinase in *Escherichia coli* and in vitro. *Journal of Virology* 63:4459-4463.
- Clemens, J.C., Worby, C.A., Simmons-Leff, N., Muda, M., Maehama, T., Hemmings, B.A., Dixon, J.E. (2000): Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(12): 6499-6503.
- Cogoni, C., Macino, G. (2000): Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. *Curr Opin Genet Dev.* 10(6):638-43.
- Coutts, B.A., Kehoe, M.A., Webster, C.G., Wylie, S.J., Jones, R.A.C. (2011): Zucchini yellow mosaic virus: biological properties, detection procedures and comparison of coat protein gene sequences. *Archives of virology* 156(12):2119-2131.
- Dalmay, T., Horsefield, R., Braunstein, T.H., Baulcombe, D.C. (2001): SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *EMBO Journal* 20:2069-2078.

- Desbiez, C., Girard, M., Lecoq, H. (2010): A novel natural mutation in HC-Pro responsible for mild symptomatology of *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV, *Potyvirus*) in cucurbits. *Arch Virol.* 155:397-401.
- Dinesh-Kumar, S.P., Anandalakshmi, R., Marathe, R., Schiff, M., Liu, Y. (2003): Virus-induced gene silencing. *Methods in Molecular biology* 236:287-294.
- Ekenger, S.K., Liu, Y., Schiff, M., Dinesh-Kumar, S.P., Martin, G.B. (2003): Two MAPK cascades, NPR1, and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato. *Plant Journal* 36:905-917.
- Fire, A., Xu, SiQun, 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(6669):806-11.
- Gal-On, A., Raccach, B. (2000): A point mutation in FRNK motif of the potyvirus helper component-protease gene alters symptom expression in cucurbits and elicits protection against the severe homologous virus. *Phytopathology* 90:467-437.
- Glasa, M., Svoboda, J., Nováková, S. (2007): Analysis of the molecular and biological variability of zucchini yellow mosaic virus isolates from Slovakia and Czech Republic. *Virus Genes* 35:415-421.
- Graman, J., Čurn, V. (1998): Šlechtění rostlin (obecná část), Jihočeská univerzita - zemědělská fakulta, České Budějovice
- Guo, S., Kemphues, K.J. (1995): par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 81(4):611-20.
- Hammond, S.M., Caudy, A.A., Hannon, G.J. (2001): Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nature Reviews Genetics* 2(2):110-9.
- Huang, C., Qian, Y.J., Li, Z., Zhou, X. (2011): Virus-induced gene silencing and its application in plant functional genomics. *Science China. Life Science* 55(2):99-108.
- Chicas, A., Macino, G. (2001): Characteristics of post-transcriptional gene silencing. *EMBO reports* 2(11):992-996.
- Jeddeloh, J.A., Stokes, T.L., Richards E.J. (1999): Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. *Nature Genetics* 22:94 – 97.
- Joo, S.S., Yoo, Y.M., Ahn, B.W., Nam, S.Y., Kim, Y.B., Hwang, K.W., Lee, D.I. (2008): Prevention of Inflammation-Mediated Neurotoxicity by Rg3 and Its Role in Microglial Activation. *Biological and pharmaceutical bulletin* 31(7):1392-1396.

- Langenberg, W.G., Zhang, L. (1997): Immunocytology shows the presence of tobacco etch virus P3 protein in nuclear inclusions. *Journal of Structural Biology* 118:243-247.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., Kim, N. (2003): The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 25(425):415-419.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.T., Kim, S., Kim, V.N. (2002): MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO Journal* 21:4663-4670.
- Liu, Y., Schiff, M., Dinesh-Kumar, S.P. (2002): Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant Journal* 31:777-786.
- Liu, Y., Schiff, M., Marathe, R. and Dinesh-Kumar, S.P. (2002b): Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant Journal* 30:415-429.
- Liu, Y., Schiff, M., Dinesh-Kumar, S.P. (2004): Involvement of MEK1 MAPKK, NTF6 MAPK, WRKY/MYB transcription factors, *COII* and *CTR1* in N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant Journal* 38:800-809.
- Meister, G., Tuschl, T. (2004): Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431:343-349.
- Naqvi, A.R., Islam, N., Choudhury, N.R., Rizwanul, Q.M. (2009): The Fascinating World of RNA Interference. *International journal of Biological Sciences* 5(2): 97-117.
- Oruetxebarria, I., Guo, D., Merits, A., Makinen, K., Saarma, M., Valkonen, J.P. (2001): Identification of the genome-linked protein in virions of Potato virus A, with comparison to other members in genus Potyvirus. *Virus research* 73(2):103-112.
- Paul, A., Bakshi, S., Sahoo, D.P., Kalita, M.C, Sahoo, L. (2012): Agrobacterium-Mediated Genetic Transformation of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. Using Leaf Explants: Bactericidal Effect of Leaf Extracts and Counteracting Strategies. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 21:10.1007/s12010-012-9612-0.
- Petersen, B.O., Albrechtsen, M. (2005): Evidence implying only unprimed RdRP activity during transitive gene silencing in plants. *Plant molecular biology* 58(4):575-583.
- Plisson, C., Drucker, M., Blanc, S., German-Renata, S., Le Gall, O., Thomas, D., Bron, P. (2003): Structural Characterization of HC-Pro, a Plant Virus Multifunctional Protein. *The Journal of Biological Chemistry* 278:23753-23761.
- Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šebánek, J. (1998): *Fyziologie rostlin*, Akademie, Praha

- Ratcliff, F.G., MacFarlane, S.A., Baulcombe, D.C. (1999): Gene Silencing without DNA: RNA-Mediated Cross-Protection between Viruses. *The Plant Cell* 11:1207-1215.
- Riechmann, J.L., Cervera, M.T., Garcia, J.A. (1995): Processing of the plum pox virus polyprotein at the P3-6K1 junction is not required for virus viability. *Journal of General Virology* 76:951-956.
- Riechmann, J.L., Lain, S., Garcia, J.A. (1992). Review Article: Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *Journal of General Virology* 73:1-16.
- Ruiz, M.T., Voinnet, O., Baulcombe, D.C. (1998): Initiation and Maintenance of Virus-Induced Gene Silencing. *Plant Cell* 10:937-946
- Shiboleth, Y.-M., Haronsky, E., Leibman, D., Arazi, T., Wassenegger, M., Whitham, S.A., Gaba, V., Gal-On, A. (2007): The Conserved FRNK Box in HC-Pro, a Plant Viral Suppressor of Gene Silencing, Is Required for Small RNA Binding and Mediates Symptom Development. *Journal of Virology* 81(23):13135-13148.
- Simmons, H.E., Holmes, E.C., Stephenson, A.G. (2008): Rapid evolutionary dynamics of zucchini yellow mosaic virus. *Journal of General Virology* 89:1081-1085.
- Valle, R.P., Skrzeczkowski, J., Morch, M.D., Joshi, R.L., Gargouri, R., Drugeon, G., Boyer, J.C., Chapeville, F., Haenni, A.L. (1988): Plant viruses and new perspectives in cross-protection. *Biochimie* 70(5):695-703.
- van Kammen (1997): Virus-induced gene silencing in infected and transgenic plants. *Trends in Plant Science* 2(11):409-411.
- Vaucheret, H., Béclin, C., Fagard, M. (2001): Post-transcriptional gene silencing in plants. *Journal of Cell Science* 114:3083-3091.
- Verchot, J., Koonin, E.V., Carrington, J.C. (1991): The 35-kDa protein from the N-terminus of the potyviral polyprotein functions as a third virus-encoded proteinase. *Virology* 185:527-535.
- Voinnet, O. (2001): RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends in Genetics* 17(8):449-459.
- Wu, H.-W., Lin, S.-S., Chen, K.-C., Yeh, S.-D., Chua, N.-H. (2010): Discriminating Mutations of HC-Pro of Zucchini yellow mosaic virus with Differential Effects on small RNA Pathways Involved in Viral Pathogenicity and Symptom Development. *Molecular plant-microbe interactions* 23(1):17-28.