

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2014

Bc. Natálie Táborská

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Protein - protein interakce v průběhu virové
patogeneze rostlin**

Diplomová práce

Bc. Natálie Táborská

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2014

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

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou 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 metodické vedení práce, za odborné rady, připomínky a čas. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Daně Šafářové, Ph.D. a to především za zpracování statistické analýzy a také Janě Veselské. Stejně tak děkuji Interní grantové agentuře Univerzity Palackého (IGA PrF_2013_002) za podporu.

SOUHRN

Rostlinné viry jsou významnými patogeny zemědělských plodin. Způsobují významné ztráty na úrodě. Pěstování odrůd rezistentních k těmto patogenům může výrazně snížit ztráty na výnosech.

Rostliny si během evoluce vytvořily propracované a účinné mechanismy, kterými jsou schopné se bránit proti infekci virovými ale i jinými patogeny. Byla popsána řada antivirových mechanismů založených např. na zabránění samotné infekce nebo na zamezení pohybu viru v buňkách rostliny.

V praktické části práce byly testovány interakce mezi proteinem VPg viru semenem přenosné mozaiky hrachu (PSbMV) a eIF4E proteinem hrachu setého, které odpovídají za vnímavost nebo rezistenci. Interakce byly sledovány pomocí dvouhybridního kvasinkového systému. Nepodařilo se experimentálně potvrdit interakci mezi eIF4E kódovaným recesivní *sbm1* alelou vnímavého genotypu hrachu (Raman) a VPg proteinem PSbMV.

Porovnání dynamiky replikace PSbMV ve vnímavých homozygotech hrachu setého genotyp Raman (*SBM1/SBM1*) a vnímavých heterozygotech hrachu setého Raman x B99 F2 generace (*SBM1/sbm1*) prokázalo výrazně nižší koncentraci viru ve vnímavých heterozygotech desátý den po inokulaci a statisticky průkazný nárůst její koncentrace mezi 10. a 20. dnem ve srovnání s vnímavými homozygoty.

SUMMARY

Plant viruses are important pathogens of agricultural crops. They cause great losses to crops. Breeding of the species that are resistant to these pathogens can distinctly reduce crop losses.

During evolution plants obtained sophisticated and effective mechanisms that can prevent from viral or other pathogen infections.

Many antiviral mechanisms have been discovered. Plant resistance mechanism can be based on the prevention of an infection itself or the prevention of a viral translocation in plant cells.

In the experimental part of this work interactions between VPg protein of *Pea seed-borne mosaic virus* and eIF4E protein of *Pisum sativum* were tested. These interactions are responsible for their sensitivity and resistance. Interactions were observed with the yeast two-hybrid system. The interaction between eIF4E protein encoded by *sbm1* allele of sensitive genotype pea (Raman) and VPg protein of PSbMV.

Comparison of replication dynamics of PSbMV in sensitive homozygous (cv. Raman *SBM1/SBM1*) and heterozygous (cv. Raman x B99 *SBM1/sbm1*) pea plants of F2 generation strongly proved lower concentration of PSbMV in sensitive heterozygous plants 10 days per inoculation. As well it proved statistically significant increase of the concentration between 10th and 20th day after inoculation in comparison with sensitive homozygous pea plants.

OBSAH

1 ÚVOD	10
2 CÍLE PRÁCE	11
3 SOUČASNÝ STAV DANÉ PROBLEMATIKY	12
3.1 Charakteristika rodu <i>Potyvirus</i>	12
3.2 Charakterizace viru semenem přenosné mozaiky hrachu	19
3.3 Podstata přirozené rezistence rostlin k virům	20
3.3.1 Dominantní geny rezistence	20
3.3.2 Recesivní geny rezistence	24
3.4 Eukaryotický translační iniciační faktor 4E (eIF4E)	25
4. MATERIÁL A METODY	28
4.1 Biologický materiál	28
4.2 Sekvence <i>eIF4E</i> genu vybraných genotypů hrachu setého	28
4.3 Sekvence <i>VPg</i> genu vybraných izolátů PSbMV	28
4.4 Izolace RNA a kolonování <i>eIF4E</i> genu	29
4.4.1 Izolace celkové RNA	29
4.4.2 RT-PCR izolované RNA	30
4.4.3 Klonování PCR produktu	32
4.4.4 Sekvenování klonovaného <i>eIF4E</i> genu	35
4.5 Izolace RNA a klonování <i>VPg</i> genu	36
4.5.1 Izolace celkové RNA	36

4.5.2 RT-PCR izolované RNA	36
4.5.3 Klonování PCR produktu	37
4.5.4 Sekvenování klonovaného <i>VPg</i> genu	37
4.6 Testování v dvouhybridním kvasinkovém systému	38
4.6.1 Návrh specifických primerů s attB sekvencí	38
4.6.2 Optimalizace PCR reakce s primery s attB sekvencí	39
4.6.3 Plazmidy pro dvouhybridní kvasinkový systém	41
4.6.4 BP klonázová reakce	42
4.6.5 LR klonázová reakce	44
4.6.6 Transformace kvasinek destinačními vektory	45
4.6.7 Charakterizace transformovaných kvasinek	47
4.7 Stanovení koncentrace viru ve vnímavých rostlinách hrachu	48
4.7.1 Stanovení relativní koncentrace viru pomocí RT-PCR	48
4.7.2 Statistické hodnocení výsledků	49
4.8 Použité chemikálie	50
4.9 Použité roztoky a jejich složení	51
4.10 Použité přístroje	53
5. VÝSLEDKY	54
5.1 Sekvence <i>VPg</i> genu a návrh primerů k jejich amplifikaci	54
5.2 Izolace RNA a klonování <i>eIF4E</i> genu	56
5.3 Izolace RNA a klonování <i>VPg</i> genu	59

5.4 Návrh primerů s attB sekvencí pro BP rekombinaci	60
5.5 Optimalizace PCR reakce s primery s attB sekvencí	61
5.6 BP a LR klonázová reakce	63
5.7 Transformace kvasinek a charakterizace transformantů	64
5.8 Stanovení koncentrace viru ve vnímavých rostlinách hrachu	66
6 DISKUZE	70
7 ZÁVĚR	75
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	76
9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	79

1 ÚVOD

Rostliny jsou neustále napadány viry a jinými patogeny, což vede k jejich poškození. Především v zemědělství se pěstováním genotypů rostlin rezistentních k těmto patogenům lze alespoň částečně vyhnout ztrátám.

Dnes již známe řadu rostlinných genů rezistence, které umožňují rostlinám efektivní obranu vůči patogenu. Produkty těchto genů rozpoznávají efektorové molekuly patogenu během infekce. Rezistence je ve většině případů dána dominantním genem (Dangl a kol., 2001), existují však i recesivní geny rezistence. Příkladem je eIF4E protein hrachu setého kódovaný *sbm1* genem. Tento protein znemožňuje expresi potyvirů v hostitelských buňkách, produkt recesivní alely neinteraguje s efektorovou molekulou viru, tj. VPg proteinem (Ashby a kol., 2011) vázaným na 5' - konci virové RNA (Riechmann a kol., 1992).

Cenným biologickým nástrojem na zjišťování proteinových interakcí *in vivo* je kvasinkový dvouhybridní systém, který umožňuje vyhledávat interagující dvojice proteinů bez ohledu na to, jestli známe přesný princip chování nebo umístění cílových proteinů (Bartel a kol., 1997). Jednohybridním kvasinkovým systémem jsou sledovány interakce mezi DNA a proteinem, existuje i trihybridní kvasinkový systém, jímž jsou detekovány interakce mezi proteinem a RNA nebo léčivem. Potencionální interakce jsou identifikovány spuštěním exprese reportérového genu (Vidal a kol., 1999).

V roce 1997 byl kvasinkový dvouhybridní systém použit na skenování cDNA knihovny rostliny *Arabidopsis thaliana*. Účelem byla identifikace proteinů, které interagují s výše zmíněným VPg proteinem TuMV. Zde byla poprvé zaznamenána interakce mezi proteinem VPg potyvirusu a rostlinným eIF4E proteinem (Wittmann a kol., 1997).

V dnešní době je navržena široká škála modifikovaných hybridních systémů a to tak, aby byla snížena možnost vzniku falešných pozitivních identifikací. Původní hybridní systémy měly velkou nevýhodu právě v podobě falešných pozitivit, které mohou pramenit z nízké afinity cílového proteinu k mnoha různým proteinům, z nulové nebo velmi nízké afinity k promotorové oblasti reportérového genu nebo byl problém u proteinů, které běžně interagují s mnoha proteiny (HSP - heat shock protein) (Vidal a kol., 1996; 1999).

S využitím nových modifikací hybridního systému, dnes dostupného sekvenování, a možnosti cílové proteiny označit, např. 6xHIS histidinovou kotvou, je možné většinou snadnou a rychlou cestou identifikovat interakce mezi proteiny.

2 CÍLE PRÁCE

- Vypracování rešerše na téma 'Protein - protein interakce v průběhu virové patogeneze rostlin' s důrazem na procesy spojené se zahájením patogeneze.
- Izolace a klonování genů rezistence hrachu *sbm1/SBm1* a *VPg* genu viru mozaiky hrachu přenosné semenem (PSbMV).
- Stanovení protein - protein interakcí (*sbm1* x *VPg*, *SBm1* x *VPg*) pomocí kvasinkového dvouhybridního systému u vnímavých a rezistentních genotypů hrachu vůči PSbMV.
- Stanovení koncentrace viru ve vnímavých homozygotech (*sbm1/sbm1*) a heterozygotech (*sbm1/SBm1*) hrachu.
- Analýza výsledků a vypracování diplomové práce.

3 SOUČASNÝ STAV DANÉ PROBLEMATIKY

3.1 Charakteristika rodu *Potyvirus*

Rod *Potyvirus* se řadí do čeledi *Potyviridae*, která náleží do skupiny virů, jejichž genom je tvořen jednovláknovou RNA s pozitivní orientací ssRNA (+) o délce 9,6 kb. Zástupci tohoto rodu jsou rostlinné viry, jejichž tvar je vláknitý a nemají obálku. Částice dosahují délky 720 - 850 nm o průměru 12 - 15 nm (http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/50.html).

Genomická RNA je obalena asi 2 000 kopiemi plášťového proteinu (Carrington a kol., 1988), na 5' konci RNA je kovalentně vázán VPg protein, 3' konec je polyadenylován (polyA sekvence). RNA je exprimována do jednoho prekurzorového polyproteinu o délce 3 206 aminokyselin. Ten je postranslačně sestříhán pomocí tří virových proteináz od N' konce k C' konci do 10 funkčních proteinů. Konečnými genovými produkty jsou proteiny P1 (P1 Proteinase), HC-Pro (Helper Component Proteinase), P3 (P3 Proteinase), 6K₁ (6 kDa Protein 1), CI (Cytoplasmic Inclusion Protein), 6K₂ (6 kDa Protein 2), VPg (Viral Genome - Linked Protein), NIa (Nuclear Inclusion Protein A), NIb (Nuclear Inclusion Protein B) a CP (Coat Protein). Jednotlivé vzniklé proteiny se následně účastní mnoha procesů, hlavně replikace viru a jeho transportu z buňky a do buňky (<http://www.Uniprot.org/uniprot/P29152>; Riechmann a kol., 1992). Přehledný seznam jednotlivých proteinů a jejich funkce jsou zapsány v Tab. 1 (Smýkal a kol., 2010a; Riechmann a kol., 1992; Verchot a kol., 1991; Carrington a kol., 1989).

Tab. 1: Funkce proteinů rodu *Potyvirus*

Zkratka proteinu	Název proteinu	Poloha v řetězci aminokyselin	Délka - počet aminokyselin	Příklady funkcí
P1	P1 Proteinase, N - terminal Protein	1 - 397	397	sestříh prekurzorového proteinu
HC-Pro	Helper Component Proteinase	398 - 856	459	sestříh prekurzorového proteinu, role v přenosu mšicemi
P3	P3 Proteinase	857 - 1214	358	funkce není příliš objasněna

Tab. 1 Pokračování: Funkce proteinů rodu *Potyvirus*

Zkratka proteinu	Název proteinu	Poloha v řetězci aminokyselin	Délka - počet aminokyselin	Příklady funkcí
6K1	6 kDa Protein 1	1215 - 1266	52	účast při replikaci
CI	Cytoplasmic Inclusion Protein	1267 - 1902	636	účast při replikaci, interakce s membránou hostitelské buňky, helikázová aktivita
6K2	6 kDa Protein 2	1903 - 1955	53	účast při replikaci
VPg	Viral Genome - Linked Protein	1956 - 2149	194	účast při replikaci - jako primer
NIa	Nuclear Inclusion Protein A	2150 - 2395	246	sestřih prekurzorového proteinu, RNA vazebná aktivita, protein - protein interakce
NIb	Nuclear Inclusion Protein B	2396 - 2915	520	RNA - dependentní RNA polymeráza
CP	Coat Protein	2916 - 3206	291	obalení virové RNA, role ve vektorovém přenosu

Zpracování polyproteinového produktu virů rodu *Potyvirus* bylo pozorováno a popsáno například u A viru brambor (*Potato virus A*). Především byl sledován časový průběh zpracování polyproteinu na konečné produkty. Celý proces sestřihu je zajištěn třemi virem kódovanými proteinázami (NIa, HC-Pro a P1). P1 a HC-Pro proteinázy autokatalycky stříhají pouze příslušné C' konce polyproteinu. NIa proteináza - hlavní proteináza potyvirů katalyzuje sestřih zbylých proteolytických míst v polyproteinu. Místa stříhání polyproteinu (hranice mezi jednotlivými proteiny) jsou vidět na Obr. 1. Místo mezi P3 a 6K₁, CI a 6K₂

a VPg a NIa jsou stříhány pomaleji na rozdíl od ostatních, které jsou zpracovány několikanásobně rychleji (Merits a kol., 2002).

Intercelulární transport virů se děje skrze cytoplazmatické spoje - plazmodezmata, tento proces je nezbytný pro systémovou infekci rostlin virem. Pohyb přes spoje je řízen CI proteinem (Roberts a kol., 1998). Umístění CI v plazmodezmatech je regulováno nově objeveným PIPO proteinem, který s CI proteinem interaguje. Komplex CI a PIPO koordinuje tvorbu struktur umožňujících mezibuněčný pohyb potyvírů v infikované rostlině (Wei a kol., 2010).

Je nutné, aby se virus pohyboval nejen z buňky do buňky (pohyb na krátké vzdálenosti), ale také na dlouhé vzdálenosti. Pohyb virových částic na dlouhé vzdálenosti směřuje z mezofylu do floému, kde se částice pohybují pasivně a dochází k zakládání nových infekčních ložisek (Carrington a kol., 1996). Zdá se, že do tohoto typu pohybu jsou funkčně zakomponovány tři potyvirové proteiny (CP, HC-Pro a VPg). Analýzy mutantů všech těchto proteinů odhalily, že jsou esenciální pro pohyb potyvírů na dlouhé vzdálenosti nebo alespoň jejich nefunkčnost vede k redukci pohybu (Schaad a kol., 1997; Dolja a kol., 1994; Klein a kol., 1994).

Gen kódující P1 protein se nachází na 5' konci genomu potyvírů. P1 proteináza má schopnost samosestříhu z prekurzorového proteinu (Reichman a kol., 1992). P1 a P3 proteiny jsou nejméně konzervovanými proteiny potyvírů. Výjimkou jsou aminokyseliny na C' konci proteinu P1. Tato oblast koresponduje s katalytickou doménou P1 proteinázy. Vysoký stupeň polymorfizmu v sekvenci kódující P1 byl pozorován například u Y viru brambor (PVY) a u viru žluté mozaiky cukety (ZYMV) (Tordo a kol., 1995). Analýzou mutací genu pro P1 protein bylo zjištěno, že přítomnost funkční formy P1 proteinu není nutně vyžadována pro průběh virové infekce, i když amplifikaci a pohyb viru podporuje. Na druhou stranu, sestřih sekvence na hranici P1 a HC-Pro je pro životaschopnost viru nutný (Klein a kol., 1994).

HC-Pro je multifunkční protein s proteinázovou aktivitou, který se vyskytuje jako dimer. Je zapojen do mnoha pro virus nezbytných procesů, jako jsou interakce s vektory, interakce s nukleovými kyselinami, replikace a pohyb, také je supresorem umlčování genů (PTGS - posttranscriptional gene silencing). Přítomnost HC-Pro je esenciální pro přenos viru mšicemi. Odlišné druhy mšic přenáší potyviry různě efektivně (Wang a kol., 1998). Pokud dojde k mutaci v sekvenci HC-Pro, má to negativní vliv na interakci se stylety mšic. Všechny potyviry obsahují na N' konci proteinu HC-Pro vysoce konzervovanou oblast (lysin -

izoleucin/leucin - threonin/serin - cystein), které se říká KITC (K - I/L - T/S - C). Například HC-Pro protein u C kmene viru brambor (běžně se vyskytující varianta PVY) vykazuje záměnu v sekvenci aminokyselin. Místo lysinu v KITC má kyselinu glutamovou a není mšicemi přenosný (Blanc a kol., 1998). Ale ne jen N' konec HC-Pro proteinu se účastní těchto interakcí, stejně důležitá je i jeho centrální část a C' konec. V centrální části se nachází PTK motiv složený z aminokyselin prolin - threonin - lysin (P - T - K). Jakákoli mutace této oblasti vede k redukci nebo k úplnému znemožnění přenosu mšicemi (Peng a kol., 1998). V centrální oblasti leží i vysoce konzervovaná sekvence IGN (izoleucin - glycin - asparagin) a CC/SC sekvence (cystein - cystein/serin - cystein), jejichž mutace vede k narušení RNA amplifikace nebo pohybu viru (Cronin a kol., 1995). Jelikož je HC-Pro zapojen i do amplifikace virového genomu, je nutné, aby vykazovala afinitu k RNA (Merits a kol., 1998). V centrální oblasti byly identifikovány 2 nezávislé domény, které vážou RNA. V této oblasti byly identifikovány motivy IGN, CC/SC a PTK v sekvenci, což jsou motivy ovlivňující amplifikaci RNA, pohyb viru a přenos mšicemi (Urcuqui-Inchima a kol., 2000). Jak bylo zmíněno, HC-Pro funguje i jako efektivní supresor PTGS (postranskripční umlčování genů). Rostliny využívají umlčování genů jako obranný nástroj proti virové infekci. Pokud HC-Pro protein není funkční, umlčování genů namířené proti virové RNA nebo meziproductům replikace virů účinně rostlinu ochrání. Ovšem přítomnost funkčního virového HC-Pro vede k zastavení umlčovacího procesu rostlin a k obnovení replikace viru. Virus se tak dokáže vyhnout ochranným mechanismům rostlin (Kasschau a kol., 1998).

P3 protein je nejméně prozkoumaný a charakterizovaný potyvirální protein. Tato absence informací vyplývá především z nízké homologie sekvence genu pro P3 protein mezi potyviry. V cytoplazmě infikovaných hostitelských buněk je P3 protein lokalizován asociovaný s CI proteinem. Dalším místem nálezu P3 proteinu je jádro a jadérko, kde je asociován s NIa. Z toho vyplývá, že by P3 protein mohl být zapojena do virové amplifikace (Rodríguez-Cezero a kol., 1993; Langenberg a kol., 1997). Viroví mutanti získaní indukci náhodných mutací v genu pro P3 protein nebyli schopni replikace (Klein a kol., 1994). Jelikož P3 protein (společně s 6K1 a 6K2) nevykazuje žádnou RNA vazebnou aktivitu (Merits a kol., 1998), jeho funkce při procesu replikace viru využívá interakce s CI proteinem (Rodríguez-Cezero a kol., 1993). CI protein je součástí replikačního komplexu potyvírů (Klein a kol., 1994).

6K1 peptid je normálně vázán na P3. Pokud nedojde k rozstřížení P3 a 6K1 proteinů od sebe, nemá to vliv na životaschopnost viru, ale dochází k bezpříznakové infekci (Reichmann a kol., 1995).

CI protein vykazuje NTP vazebnou, NTPázovou, RNA vazebnou a helikázovou aktivitu (Lain a kol., 1990). Je řazen mezi proteiny, které jsou charakteristické sedmi konzervativními segmenty. Tyto segmenty jsou lokalizovány na N' konci CI proteinu a u některých již byla identifikována funkce (VI, V, II, I). Segment VI je bohatý na přítomnost argininu. Tato oblast je schopná vázat nukleové kyseliny. Pro vazbu CI proteinu s RNA in vitro není tento segment nutně vyžadován (Fernández a kol., 1995). To se potvrdilo vnesením sady delecí do genu pro CI protein viru šarky švestky (*Plum pox virus*). Delece aminokyselin vzniklé za RNA vazebnou doménou segmentu VI v CI proteinu výrazně narušují jeho helikázovou a NTPázovou aktivitu. Avšak RNA vazebná aktivita zůstává nezměněna. Byla objevena i druhá RNA vazebná doména, je lokalizována mezi aminokyselinami 73 a 143 CI proteinu. Toto umístění odpovídá segmentu I, který hraje roli v NTP vazebné aktivitě (Fernández a kol., 1996). Segment II je nejspíš zapojen do NTPázové aktivity. Sousedí se segmentem VI a zřejmě interaguje s RNA vazebnou doménou právě v segmentu VI (Fernández a kol., 1997). Mutace segmentu V v CI proteinu vedou k značnému snížení helikázové aktivity, replikace viru tak nemůže probíhat normálně a nedochází k infekci hostitele. Segment V zřejmě odpovídá za aktivitu nutnou pro rozvinutí nukleové kyseliny (Fernández a kol., 1995). I když přesná funkce proteinu CI v replikačním mechanismu virů není příliš jasná, CI protein je pro replikaci viru nezbytný (Klein a kol., 1994). Výsledky genetických analýz také naznačují, že CI protein je zapojen do transportu viru z buňky do buňky skrz plazmodezmata. CI s plazmodezmaty interaguje a umožňuje tak pohyb virů na krátké vzdálenosti (Roberts a kol., 1998).

Žádná enzymatická funkce nebyla zatím objevena u proteinu 6K2. Ale lokalizace 6K2 v buňkách byla prostudována velmi podrobně. Při vazbě proteinu 6K2 na NIa protein dochází k zamezení transportu NIa do jádra. Zdá se tedy, že 6K2 protein je schopen regulovat transport NIa. Pokud dojde k mutaci 6K2, virus není životaschopný (Respreto-Hartwig a kol., 1992). Další funkcí 6K2 proteinu je účast na vazbě k membránám. Navázání 6K2 na membránu vzniká skrze hydrofobní doménu v centrální části proteinu. Dále se 6K2 může vázat na vezikuly odvozené z endoplazmatického retikula. 6K2 je totiž potřebný pro amplifikaci genomu, upevňuje replikační aparát na membrány podobné membránám ER.

Vazba na tato místa ale zřejmě vyžaduje 6K2-VPg, 6K2-NIa nebo možná větší polyprotein (Schaad a kol., 1997).

Dalším důležitým proteinem potyvirů je NIa. Tento protein nese 2 domény. Jedna je na N' konci a zahrnuje VPg protein, druhá je na C' konci a má proteinázovou aktivitu, takže je označován jako NIa-Pro. NIa je hlavní potyvirová proteináza, jejíž nejdůležitější funkcí je sestřih polyproteinu do funkčních produktů. Tento sestřih je regulovaný proces, různá místa jsou však sestřihávána různě rychle (Reichmann a kol., 1992). NIa je lokalizován s NIb v inkluzních tělískách v jádře infikovaných buněk, ale u různých potyvirů se toto umístění může lišit (Riedel a kol., 1998). V případě, že se netvoří inkluzní tělíska, NIa je lokalizován v jádře, zatímco NIb v cytoplazmě (Hajimorad a kol., 1996). V případě viru šarky švestky (PPV) NIa i NIb tvoří tělíska jak v jádře, tak v cytoplazmě (Martin a kol., 1992). NIa se také účastní proteinových interakcí a to jak mezi sebou samotným, tak interakcí s NIb. Interakce mezi NIa a NIb není ovlivněna mutacemi ve vysoce konzervované oblasti aminokyselin GDD (glycin - kyselina aspartová - kyselina asparagová) v NIb proteinu. Je ale narušena mutacemi v tyrozinovém reziduu, které váže VPg doménu k virové RNA. Interakce NIa a NIb nastává skrze vazbu s VPg doménou v NIa proteinu (Hong a kol., 1995). NIa také dokáže vázat RNA (Merits a kol., 1998). Zatím ale nebyly přesně charakterizovány specifické RNA vazebné domény (Blair a kol., 1996).

VPg protein má nezbytnou funkci v replikaci viru. Kovalentní vazba k virové RNA obsahuje tyrozinová rezidua (Reichmann a kol., 1992). Záměnou tyrozinů, které vážou VPg protein, dochází k znemožnění virové replikace (Murphy a kol., 1996). Byl vytvořen třidimenzionální model VPg proteinu Y viru brambor (PVY) a to na základě podobností v distribuci hydrofobních a hydrofilních reziduí mezi VPg proteinem a malátdehydrogenázou. Z modelu vyplývá, že kovalentní vazba VPg proteinu na RNA viru je zajištěna obnaženou hydroxylovou skupinou tyrozinu v pozici 64 (Plochocka a kol., 1996). 5' konec virové RNA s navázaným VPg je vystaven na povrchu a je volný, takže může interagovat s dalšími komponenty (Merits a kol., 1998). K interakcím mezi VPg proteinem a proteiny hostitelské buňky dochází také. VPg protein PSbMV byl identifikován jako determinant systémové infekce u různých virových patotypů, které způsobují různé symptomy na daném kultivaru rostliny (Keller a kol., 1998).

Jak již bylo zmíněno výše, funkcí NIb proteinu je tvorba inkluzních tělísek v jádře infikované rostliny, v cytoplazmě nebo v membránových útvarech spojených s replikačním

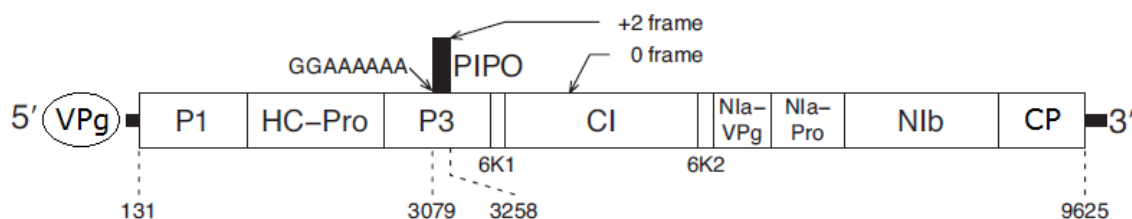
komplexe během syntézy virové RNA. Nib je RNA dependentní RNA polymeráza potyvírů, nese GDD sekvenci aminokyselin, která je pro RdRp typická (Hong a kol., 1996).

Dalším charakterizovaným funkčním proteinem rodu *Potyvirus* je CP protein. Je možné ho pomyslně rozdělit na 3 části. Dvě koncové (N' a C' koncová) domény, které jsou ve své sekvenci variabilní a jsou vystaveny na povrchu plášťového proteinu. Třetí část je spíše konzervativní, leží uprostřed mezi koncovými doménami. N' koncová doména obsahuje hlavní epitopy specifické pro virus. CP se účastní přenosu mšicemi, transportu z buňky do buňky, obaluje virovou RNA a ještě reguluje RNA amplifikaci. U všech potyvírů, které jsou přenosné mšicemi, je na N' konci CP proteinu vysoce konzervativní DAG motiv (kyselina asparagová - alanin - glycin) (Harrison a kol., 1988). DAG motiv u CP proteinu a PTK motiv u HC-Pro proteinu jsou zapojeny do interakce právě mezi CP a HC-Pro proteinem. Taková interakce je nezbytná pro přenos viru mšicemi (Blank a kol., 1997). CP protein je hlavním faktorem, který ovlivňuje transport viru mezi buňkami. V případě potyvírů, mechanismus transportu virové RNA není přesně popsán. Je ale zřejmé, že CP protein v tomto hraje velmi podstatnou roli. Pokud dojde k deleci na N' konci CP proteinu, viru je zabráněno v systémovém pohybu i transportu z buňky do buňky. Mutace v centrální části CP proteinu negativně ovlivňují spojení s virovou RNA. Mutace na obou koncích proteinu CP znemožňují transport viru. Je ale možné dysfunkci CP proteinu efektivně nahradit transgenním plášťovým proteinem. CP protein je úzce spojen s transportem viru z buňky do buňky a se systémovým pohybem. Každý z těchto procesů vyžaduje funkčnost odlišné domény CP proteinu. Hlavní funkcí CP proteinu je však obalení virové RNA. CP protein interaguje s RNA a stabilizuje virovou částici. Tuto funkci zajišťuje jeho centrální část. Mutace v konzervovaných oblastech centrální části CP vedou k tvorbě defektních částic, ty nejsou schopny transportu z buňky do buňky (Dolja a kol., 1994). Regulace amplifikace virové RNA je založena na interakci CP a Nib proteinu. Jejich interakce může být narušena mutacemi v konzervovaných oblastech (GDD) (Hong a kol., 1995).

Kromě 10 výše popsaných proteinů, které jsou typické pro potyviry a jsou kódovány jedním čtecím rámcem, byl objeven další otevřený čtecí rámeček. Tento nový čtecí rámeček je krátký a vložený do cistronu P3 potyvirového polyproteinu. Je translatován v tzv. + 2 čtecím rámcu. Nazývá se PIPO nebo P3N-PIPO (Walsh a kol., 2002). PIPO protein je pro potyviry esenciální. Nezbytná přítomnost PIPO proteinu u potyvírů byla prokázána přípravou cDNA infekčních klonů, které nesly synonymní mutace s ohledem na čtecí rámeček polyproteinu. Tyto mutace ale vnášely předčasné terminální kodony (UGA) do PIPO sekvence. Takto upravené

klony byly biolisticky vneseny do rostlin *Nicotiana benthamiana*. Žádná z testovaných rostlin nevykazovala známky infekce. Rostliny byly vysoké a zdravé. Předpokládá se, že funkcí PIPO je účast v replikaci, transportu, potlačování PTGS nebo kombinace všech (Chung a kol., 2008). Umístění PIPO sekvence v genomu TuMV (*Turnip mosaic virus*) je zobrazeno na Obr. 1.

Obr. 1: PIPO sekvence v genomu TuMV (převzato a upraveno z Chung a kol., 2008)



Kruh reprezentuje VPg protein, obdélník tvoří dlouhý čtecí rámec (131. - 9625. nukleotid v sekvenci), je tvořen malými obdélníky, které představují jednotlivé funkční proteiny vzniklé sestřihem prekurzorového polyproteinu. PIPO (3079. - 3258. nukleotid v sekvenci) je odvozen od P3 cistronu, je znázorněn černým obdélníkem, začíná vysoce konzervovanou sekvencí GGAAAAAA.

3.2 Charakterizace viru semenem přenosné mozaiky hrachu

Virus semenem přenosné mozaiky hrachu (*Pea seed-borne mosaic virus*, PSbMV) je systematicky řazen do čeledi *Potyviridae*, rod *Potyvirus* (<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>). Poprvé byl popsán v Československu v roce 1966 (Musil, 1966), tehdy ještě pod názvem *Pea leaf rolling virus*. Další názvy byly tomuto viru přiřazeny i v jiných zemích. V Německu mu byl přidělen název *False pea leaf roll virus* (Thottappilly a kol., 1968), v USA byl poprvé popsán jako *Pea fizzle top virus* (Mink a kol., 1969), v Japonsku *Pea seed-borne mosaic virus* (Inouye, 1967) a v Nizozemsku *Pea leaf roll mosaic virus* (Bos, 1970). Jednotný název byl stanoven v roce 1974 a to s ohledem na nejčastější způsob přenosu tohoto viru (Mink a kol., 1974).

PSbMV může být přenášen třemi způsoby a to semenem, mechanicky nebo hmyzími vektory - mšicemi (*Aphididae*). Nejčastějším typem je vektorový přenos hmyzem a to horizontálně mezi jednotlivými rostlinami téže generace, mšice jako vektor pokrývají 90 % přenosů (Smýkal a kol., 2010).

Společně s virem enační mozaiky hrachu (*Pea enation mosaic virus*) a virem žluté mozaiky fazolu (*Bean yellow mosaic virus*) tvoří skupinu hlavních virových patogenů, které napadají zemědělsky významné plodiny - luštěniny jako například hrách, bob, čočka a cizrna

(Aapola a kol., 1974). Rostliny pak vykazují velmi variabilní příznaky nákazy, které závisí jak na hostiteli, tak na patotypu viru, ale i na podmínkách okolního prostředí. Nejčastěji se objevují například chlorózy, deformace listů a úponků, žloutnutí žilek listů, mozaiky i zakrslost, poškození květů, semena se skvrnami a popraskanými obaly (Mink a kol., 1969).

Izoláty PSbMV je možné rozdělit do 4 skupin - patotypů označovaných P-1, P-2, P-3 a P-4. Typickým představitelem patotypu P-1 je DPD1 izolát, patotypu P-2 L1 izolát, patotypu P-3 izolát NEP1 pocházející z bobu obecného z Nepálu a patotypu P-4 NY izolát (Johansen a kol., 1991; Alconero a kol., 1986; Anderson a kol., 1998).

Pro replikaci PSbMV v rostlině je klíčový VPg protein, který si sám virus kóduje. Tento protein je kovalentně vázán na 5' konec virové RNA a hraje velmi důležitou roli v životním cyklu viru a možnosti infekce. VPg protein se v hostitelské buňce váže s eIF4E proteinem (eukaryotic translation initiation factor 4E). Tato vazba umožňuje virovou expresi. VPg je tedy zodpovědný za interakci s hostitelem. Pokud je mutací eIF4E proteinu zabráněno vazbě s VPg proteinem, vir se nedokáže v hostiteli replikovat a tím pádem je rostlina rezistentní (Kang a kol., 2005). VPg gen je kódován sekvencí o délce 582 bází, vzniklý protein je 194 aminokyselin dlouhý. Referenční sekvence celého genomu PSbMV je v NCBI databázi uložena pod zkratkou NC_001671 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_001671).

3.3 Podstata přirozené rezistence rostlin k virům

Rezistence rostlin vůči virové infekci je zprostředkována přítomností určitého genu a to v dominantní nebo recesivní formě. Produkty těchto rostlinných genů se nezapojují do interakcí s virovými proteiny, zajišťují rostlinám rezistentní stav. U rostlin vnímavých se do těchto interakcí naopak proteiny zapojují a umožňují virovou expresi.

3.3.1 Dominantní geny rezistence

Většina charakterizovaných genů rezistence proti houbovým a bakteriálním patogenům je tvořena dominantní alelou (Hammond-Kosack a kol., 2003). Dangl a kol. však diskutují 12 dominantních alel, jejichž funkcí je zajištění rezistence vůči virům. Tyto alely byly identifikovány jak u zemědělských plodin (brambory, rajčata, tabák, sója, fazole), tak u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*. Jsou to geny *N*, *Tm2²*, *Rx1*, *Rx2*, *Y-1*, *Sw5*, *Rsv1*, *RT4-4*, *HRT*, *RTM1*, *RTM2*, *RCY1*. Všechny, kromě *RTM1* a *RTM2*, patří do skupiny genů, které obsahují vazebné domény, které jsou bohaté na leucinové repetice (NBS - LRR, nucleotide binding site - leucine rich repeat). Tyto geny lze dále rozdělit do dvou skupin.

Skupiny rozlišujeme podle domény, která vzniká na N' konci proteinu kódovaného těmito geny. Jedna skupina má na N' konci proteinu homologní doménu TIR1 (Toll - interleukin - 1 receptor), druhá má C - C doménu (coiled - coil). Dominantní geny rezistence pracují mechanismem založeným na rozpoznání patogenového avirulentního faktoru. Všechny produkty rostlinných genů rezistence nemají transmembránovou doménu, což koresponduje s životem viru uvnitř buněk a s lokalizací avirulentního faktoru (Dangl a kol., 2001). Seznam těchto genů s příslušnými informacemi je uveden v Tab. 2 (Maule a kol., 2007).

Tab. 2: Dominantní geny rezistence rostlin vůči virům

Dominantní gen rezistence	Rostlinný druh	Virus	Avirulentní faktor
<i>N</i>	tabák	<i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV)	replikáza/helikáza
<i>Tm2²</i>	lilek rajče	<i>Tomato mosaic virus</i> (TMV)	pohybový protein
<i>Rx1</i>	lilek brambor	<i>Potato virus X</i> (PVX)	plášťový protein
<i>Rx2</i>	lilek brambor	<i>Potato virus X</i> (PVX)	plášťový protein
<i>Y-1</i>	lilek brambor	<i>Potato virus Y</i> (PVY)	neznámý
<i>Sw5</i>	lilek rajče	<i>Tomato spotted wilt virus</i>	pohybový protein
<i>Rsv1</i>	sója	<i>Soybean mosaic virus</i>	-
<i>RT4-4</i>	sója	<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	gen 2a
<i>HRT</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>Turnip crinkle virus</i>	plášťový protein
<i>RTM1</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>Tobacco etch virus</i> (TEV)	-
<i>RTM2</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>Tobacco etch virus</i> (TEV)	-
<i>RCY1</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	plášťový protein

Neuvedeno -.

Produkt *N* genu tabáku interaguje s helikázovou doménou TMV virové replikázy (Ueda a kol., 2006). NBS - LRR geny rezistence rostlin proti virům vedou ke kompletní ochraně

proti infekci. Ale většinou nevedou k buněčné smrti a/nebo k nekróze rostlinných tkání, jako tomu může být v případě nákazy bakterií nebo houbovým patogenem. Důkazem toho je rezistence zajištěná *Rx* geny proti X viru brambor (PVX). Tyto geny rostlině udělují extrémní schopnost rezistence, která je založená na inhibici virové replikace a to bez zřejmé buněčné smrti (Bendahmane a kol., 1999). Stejně výsledky byly potvrzeny i u *Sw5* genu rajčat a *Rsv1* genu sóji (Brommonschenkel a kol., 2000). Je velmi pravděpodobné, že počet známých dominantních genů rezistence se v nejbližší budoucnosti zvýší. Tyto geny kódují proteiny nesoucí již zmíněnou specifickou oblast NBS - LRR. Ta je skvělým znakem pro identifikaci u nových druhů pomocí zkoumání homologie genů (Hayes a kol., 2004). Geny jako *RTM1* a *RTM2*, které tento znak nenesou (non - NBS - LRR), byly identifikovány fenotypicky jako geny, které inhibují pohyb na dlouhé vzdálenosti v případě *Tobacco etch virus* (TEV) (Chisholm a kol., 2000).

Velká většina proteinů, které zajišťují rezistenci rostlin vůči virovým patogenům, je aktivována bezprostředně po rozpoznání tzv. virového efektoru. Tyto rostlinné proteiny můžeme zařadit do jedné z pěti tříd. Třídy se od sebe liší strukturními motivy, pomocí nichž dochází k interakci mezi rostlinným proteinem navozujícím rezistenci a proteinem viru, bakterie nebo jiného patogenu.

Do první třídy je řazen pouze jeden člen a to Pto protein rajčat, který je charakteristický svou serin/threonin kinázovou katalytickou oblastí a myristoylovaným motivem na N' konci (Martin a kol., 1993). Druhá třída zahrnuje velké množství proteinů, které ve své aminokyselinové sekvenci obsahují oblast bohatou na leucinové repetice LRR (leucine - rich repeat), což je domnělé nukleotid vazebné místo (NBS). Dalším možným motivem je leucinový zip na N' konci nebo C - C doména (coiled - coil). Patří sem proteiny Bs2, Dm3, Gpa2^a, Hero, HRT^b, I2, Mi, M1a, Pib, Pi-ta, R1, Rp1, Rpm1, RPP8^b, RPP13, RPS2, RPS5, Rx1^a, Rx2, Sw-5 a Xa1. Třetí třída je podobná té druhé, ale místo C - C domény mají tyto proteiny na N' konci oblast podobnou TIR1 (Toll - interleukin receptor 1). Řadíme sem proteiny rezistence nazvané L, M, N, P, RPP1, RPP4, RPP5 a RPS4. Proteiny, které jsou řazeny do prvních 3 tříd, mají společný znak. Neobsahují transmembránové domény, všechny tyto proteiny jsou lokalizovány intracelulárně. Třída 4 je reprezentována Cf proteiny rajčat (Cf-2^c, Cf-4^d, Cf-5^c, Cf-9^d). Těmto proteinům chybí nukleotid vazebné místo (NBS), mají ale transmembránovou doménu a extracelulární LRR doménu (Dixon a kol., 1996). Pátá třída zahrnuje pouze jeden protein rýže - Xa21, který kromě extracelulárního LRR motivu

a transmembránové domény, obsahuje i v cytoplazmě lokalizovanou serin/treoninovou kinázovou doménu (Song a kol., 1995).

LRR oblast nebo LRR doména je přítomná v mnoha proteinech, které vykazují různé funkce. LRR je zapojena do proteinových interakcí. Aminokyselinová rezidua mají leucin na každé druhé nebo třetí pozici a tvoří flexibilní paralelní beta skládané listy (Dodds a kol., 2001). Rozsáhlé analýzy mutací proteinů rezistence ukázaly, že existuje několik esenciálních reziduí v LRR doméně. Na druhou stranu ale také to, že se u nich objevuje vysoký počet záměn v aminokyselinové sekvenci. Toto zjištění koresponduje s rozpoznávací funkcí LRR domén, které se neustále vyvíjí a pozměňují.

NBS (nukleotid vazebné) oblasti v proteinech mohou ovlivňovat jejich funkci. Analýzy mutací dokazují, že NBS jsou nepostradatelnou součástí proteinů při vykonávání jejich rozpoznávací funkce (Dinesh-Kumar a kol., 2000).

C - C motiv je opakující se sekvence v proteinu, která je proložená hydrofobními zbytky aminokyselin. Příkladem těchto reziduí může být leucinový zip. Skládá se ze dvou nebo více alfa helixů, které interagují a vytváří tak strukturu cívky. C - C motiv můžeme sledovat u mnoha proteinů, které jsou součástí různých biologických procesů a hrají roli v proteinových interakcích, jako například oligomerizace. Funkce této domény by mohla být více zaměřena na buněčnou signalizaci než na rozpoznávání efektoru (Warren a kol., 1999).

TIR domény jsou do rozpoznávání zahrnuty díky své podobnosti s cytoplazmatickou doménou Toll a IL - 1R. A stejně jako v případě C - C domény, se uvažuje o možné funkci TIR v buněčné signalizaci (Meyers a kol., 1999).

Serin/threonin kinázová doména (STK) byla identifikována například u Pto (Sessa a kol., 2000) a Xa21 (Liu a kol., 2002) proteinů. Pto protein interaguje s virovým efektozem označovaným jako AvrPto a jeho funkce je založena na rozpoznávání virových patogenů (Bogdanove, 2002), ale bylo také zjištěno, že reaguje například i s bakteriálními proteiny (Kim a kol., 2002).

3.3.2 Recesivní geny rezistence

U mnoha rostlinných druhů (rajče, salát, paprika, hrách, meloun, ječmen, rýže) byly identifikovány recesivní alely, které přirozenými mutacemi získaly schopnost navodit rezistenci vůči virovým patogenům. Tyto mutace byly nejčastěji sledovány v genu pro eIF4E protein. Nebo v dalších proteinech, jejichž přítomnost je nezbytně nutná pro vytvoření iniciačního translačního komplexu rostlin (Robaglia a kol., 2006). Funkce většiny recesivních

genů rezistence je namířena proti potyvirům nebo virům jim příbuzným, což je patrné z Tab. 3 (Maule a kol., 2007).

Tab. 3: Recesivní geny rezistence rostlin vůči virům

Recesivní gen rezistence - přirozená forma	Rostlinný druh	Virus
<i>pvr1, pvr 2¹, pvr2², pvr6</i>	<i>Capsicum</i>	<i>Potato virus Y (PVY), Tobacco etch virus (TEV), Potato vein mottling virus (PVMV)</i>
<i>pot-1</i>	<i>Lycopersicon</i>	<i>Potato virus Y (PVY), Tobacco etch virus (TEV)</i>
<i>sbm1</i>	<i>Pisum sativum</i>	<i>Pea seed-borne mosaic virus (PSbMV)</i>
<i>mol¹, mol²</i>	<i>Lactuca sativa</i>	<i>Lettuce mosaic virus (LMV)</i>
<i>rym4/5</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	<i>Barley mild mosaic virus, Barley yellow mosaic virus, Barley yellow mosaic virus 2</i>
<i>rymv1</i>	<i>Oryza sativa</i>	<i>Rice yellow mottle virus (RYMV)</i>
<i>nsv</i>	<i>Cucumis melo</i>	<i>Melon necrotic spot virus</i>
Recesivní gen rezistence - mutantní forma	Rostlinný druh	Virus
<i>At-eIF4E1</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>Clover yellow vein virus</i>
<i>At-eIF(iso)4E</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>Turnip mosaic virus, Lettuce mosaic virus (LMV), Tobacco etch virus (TEV),</i>
<i>At-eIF4E1 (cum1)</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>Cucumber mosaic virus (CMV)</i>
<i>At-eIF4G (cum2)</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>Cucumber mosaic virus (CMV), Turnip circle virus (TCV)</i>

Mechanismus rezistence založené na recesivním genu nese základ v drobných substitucích v sekvenci. Tyto substituce vedou ke změnám na povrchu vzniklých proteinů iniciačního translačního komplexu právě v místě, kde dochází k interakci s virovým faktorem. Virovým avirulentním faktorem je v tomto případě VPg protein (Kang a kol., 2005).

3.4 Eukaryotický translační iniciační faktor 4E (eIF4E)

Rostliny hrachu, stejně jako ječmene, papriky, salátu, melounu, cukety atd., kódují eukaryotický translační iniciační faktor 4E (eIF4E). Je to protein, který umožňuje replikaci potyvirů například viru semenem přenosné mozaiky hrachu (PSbMV). Pokud rostlina nese v genomu dominantní alelu genu pro eIF4E (*SBM1*), je k viru vnímavá. Některé rostliny nesou tuto alelu v recesivním stavu (*sbm1*). Produkt *sbm1* alely nedokáže interagovat s VPg proteinem PSbMV, což rostlině poskytuje přirozenou rezistenci vůči viru (Ashby a kol., 2011).

Kromě alely *sbm1*, byly u hrachu identifikovány i alely *sbm2*, *sbm3* a *sbm4*. Každá ze čtyř alel (respektive každý ze čtyř proteinových produktů kódovaných sbm alelou) je kompatibilní s některým patotypem PSbMV (P-1, P-2, P-3, P-4). Byly vytvořeny čtyři skupiny (I - IV) pro zařazení linií hrachu setého (*Pisum sativum*). Rozdělení linií je založeno na vnímavosti k jednotlivým patotypům PSbMV. I. skupina zahrnuje linie, které jsou vnímavé k P-1, P-2 i P-4 patotypu PSbMV. Linie hrachu z II. skupiny jsou rezistentní k P-1, P-2 a P-4 patotypu. III. skupina sdružuje linie rezistentní pouze k patotypu P-2, vnímavé k P-1 a P-4. A do IV. skupiny řadíme linie hrachu rezistentní k P-1 a P-2 a zároveň vnímavé k P-4 (Olsen a kol., 2001).

Nejpozději objevený patotyp PSbMV je P-3 reprezentovaný izolátem NEP1. Při jeho testování bylo zjištěno, že jeho infekční profil se liší od ostatních dříve popsanych patotypů PSbMV. NEP1 není schopen infikovat linie hrachu z III. skupiny, ale infikuje IV. skupinu hrachu. Proto nebyl zařazen k žádným již charakterizovaným patotypům, ale vytvořil nový samostatný. Přehled patotypů PSbMV a testovaných skupin linií hrachu je v Tab. 4 (Hjulsager a kol., 2002).

Tab. 4: Přehled patotypů PSbMV (převzato a upraveno z Hjulsager a kol., 2002)

	Patotyp PSbMV (izolát reprezentující patotyp)			
Skupina	P-1 (DPD1)	P-2 (L1)	P-4 (NY)	P-3 (NEP1)
I	V	V	V	V
II	R	R	R	R
III	V	R	V	R
IV	R	R	V	V

V = vnímavý, R = rezistentní. Rozdělení linií *Pisum sativum* do kategorií I - IV (příklad kultivarů): I (cv. Fjord, Brutus), II (cv. PI193586, PI347492), III (cv. Bonneville, Dark Skinned Perfection), IV (cv. PI269774, PI 269818).

Srovnáním aminokyselinové sekvence proteinu eIF4E u rezistentních a vnímavých linií hrachu bylo dokázáno, že sledovaný protein rezistentních a vnímavých hrachů se liší pouze v pěti aminokyselách - substituce v aminokyselinové sekvenci. Aminokyselinové záměny byly prokázány v poloze 62 (rezistentní linie - leucin, vnímavé linie - tryptofan), v poloze 73 a 74 (rezistentní linie - kyselina aspartová, vnímavé linie - alanin), dále poloha 107 (rezistentní linie - arginin, vnímavé linie - glycin) a 169 (rezistentní linie - lysin, vnímavé linie - asparagin). Analýza aminokyselinové sekvence u linie PI269818 objevila pouze tři rozdíly od sekvence vnímavých linií. A to v poloze 73 a 74 (PI269818 - prolin a kyselina aspartová, vnímavé linie - alanin, alanin) a 77 (PI269818 nese delecii, vnímavé linie - serin). Z toho vyplývá, že i malé, ale přesné změny v aminokyselinové sekvenci proteinu eIF4E ovlivňují spektrum rezistence (Gao a kol., 2004).

Stejně jako vedou mutace v genu pro eIF4E ke vzniku rezistence rostlin k PSbMV (nebo potyvirovům obecně), tak i mutace vedoucí k záměně v aminokyselinovém řetězci virového proteinu VPg jsou velmi podstatné. Ovlivňují taktéž interakci mezi virem a rostlinou. Mutace VPg genu mohou vést k tvorbě pozměněného VPg proteinu, a tím k schopnosti viru překonat rezistenci rostliny a úspěšně infikovat hostitele (Moury a kol., 2004).

Rostlina může kódovat dva různé eIF4E proteiny, které se vážou na VPg protein na 5' konci virové RNA. Je to již zmíněný eIF4E a dále eIF(iso)4E. Tyto proteiny jsou paralogové, oba způsobují rezistenci k potyvirové infekci (Sonenberg a kol., 1998). Protein eIF(iso)4E interaguje s VPg u viru mozaiky řepy TuMV (Wittman a kol., 1997). Z recentních studií vyplývá, že viry využívají buď jeden z nich, nebo oba dva zároveň. K zahájení virové

infekce není třeba jen jednoduchá interakce mezi dvěma proteiny (VPg a eIF4E), ale je nutné, aby se vytvořil translační iniciační komplex proteinů v rostlině. K eIF4E se musí navázat eIF4G protein (nebo jejich izoformy) (Sonenberg a kol., 1998). Spojení eIF4E a eIF4G vede k vytvoření pevné konstrukce, na kterou se můžou vázat další komponenty komplexu - eIF4A, což je RNA dependentní ATPáza a RNA helikáza (Robaglia a kol., 2006). Je tedy vytvořen komplex eIF4E, eIF4G a eIF4A. Ten interaguje s 5' čepičkou (VPg) na mRNA přes podjednotku eIF4E a RNA je vedena k ribozomu. K tomuto komplexu se váže další komponent a to eIF4B, což je kofaktor potřebný pro helikázovou aktivitu eIF4A. Díky helikázové aktivitě dochází k uvolnění sekundární struktury u čepičky a následně dojde k vazbě ribozomální podjednotky k mRNA (Zhang a kol., 2006).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Virus semenem přenosné mozaiky hrachu (*Pea seed-borne mosaic virus*) izolát 'L1' pocházející z Pakistánu byl poskytnut Prof. Elisabeth Johansen (Danish Institute of Plant and Soil Science, 2800 Lyngby, Dánsko), český izolát '117' pocházel ze sbírky Katedry buněčné biologie a genetiky (Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého Olomouc). Izoláty viru byly udržovány na rostlinách hrachu setého *Pisum sativum* L., odrůda Raman. Experimentální rostliny hrachu setého byly inokulovány mechanicky podle Šafářová a kol. (2008).

Semena hrachu setého *Pisum sativum* L. genotypy Raman (vnímavý k PSbMV P-1), PI269818, PI193835 a ATC6928 (rezistentní genotypy k PSbMV P-1) poskytnul Ing. Petr Smýkal, Ph.D. (Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého Olomouc).

Semena hrachu byla sazena do substrátu Klassman č. 4 a kultivována ve fytotronu při 22 °C přes den (18 hodin) a při 18 °C přes noc (8 hodin).

Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* kmen MaV203 byly zakoupeny od firmy Invitrogen.

4.2 Sekvence *eIF4E* genu vybraných genotypů hrachu setého

V práci byly použity čtyři genotypy hrachu setého - Raman, PI269818, PI193835 a ATC6928. Sekvence *eIF4E* genu všech genotypů poskytnul Ing. Petr Smýkal, Ph.D. (Katedra botaniky, PřF, UPOL).

Sekvence cDNA genu *eIF4E* genotyp Raman je stejná jako sekvence Fjord, je dlouhá 687 bp, sekvencí o stejné délce je tvořen *eIF4E* gen genotypu PI193835. Gen *eIF4E* u PI269818 o 3 bp kratší.

Primery pro amplifikaci genu *eIF4E* (eIF4E-ATG-F a eIF4E-end-R) výše popsaných genotypů hrachu setého byly poskytnuty Ing. Petrem Smýkalem, Ph.D. (Katedra botaniky, PřF, UPOL).

4.3 Sekvence *VPg* genu vybraných izolátů PSbMV

Pro lokalizaci *VPg* genu v sekvenci genomu PSbMV u vybraných izolátů byla použita referenční sekvence izolátu DPD1 (NC_001671) z NCBI databáze. Pomocí programu MEGA

5.05 (funkce 'alignment') byla zjištěna poloha a přesná nukleotidová sekvence *VPg* genu u izolátů 117 (sekvenci poskytl Mgr. Dana Šafářová, Ph.D.) a L1 (AJ252242).

Primery pro amplifikaci *VPg* genu u PSbMV (L1) byly navrženy pomocí programu Primer - BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Primery byly navrženy tak, aby nezasahovaly přímo do sekvence *VPg*, ale aby ležely v oblasti 100 nt před (pro 'forward' primer) a 100 nt za (pro 'reverse' primer) sekvencí *VPg*.

Podmínky pro návrh páru primerů pro *VPg* gen byly nastaveny takto: výsledná velikost produktu amplifikovaného těmito primery bude 500 - 800 nt, T_m (primer melting temperature) bude v rozmezí 55 - 65 °C, optimálně 60 °C. Velikost požadovaných primerů by měla dosahovat délky 17 - 25 nt a optimální délka byla stanovena na 20 nt. Poslední podmínkou, která měla být splněna, byl obsah CG (cytosin, guanin) párů mezi 40 - 60 %.

Navržené páry primerů byly následně analyzovány v programu OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>).

Primery byly syntetizovány firmou Generi Biotech a označeny jako PSbMV_NAT1f a PSbMV_NAT1r.

4.4 Izolace RNA a klonování *eIF4E* genu

Pro účely této práce - sledování proteinových interakcí - bylo třeba izolovat a naklonovat geny *eIF4E* pro testování v dvouhybridním kvasinkovém systému (Y2H).

4.4.1 Izolace celkové RNA

Celková RNA byla izolována z listů rostlin hrachu setého *Pisum sativum* L. - genotypy Raman, PI269818, PI193835 a ATC6928. Tato RNA sloužila k amplifikaci genu *eIF4E* zmíněných genotypů.

Izolace byla provedena podle Postupu 1 pomocí kitu NucleoSpin[®] RNA Plant firmy Macherey - Nagel. Pro každou izolaci bylo použito 50 - 90 mg listu rostlin. Vyizolovaná genomická RNA byla nakonec rozpuštěna v 60 μ l RNase-free vody. Takto připravenou RNA je možné skladovat v - 80°C. Koncentrace připravených vzorků byla změřena spektrofotometricky na nanodropu.

Postup 1: Izolace celkové RNA (kit NucleoSpin[®] RNA Plant)

1. 50 - 90 mg rostlinného materiálu (listu) bylo homogenizováno v tekutém dusíku v třecí misce na ledu.
2. Homogenát byl přenesen do mikrozkušavky o objemu 1,5 ml s keramickou kuličkou, bylo přidáno 350 μ l RA1 lyzačního 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 mikrozkušavce a centrifugován 1 minutu při 11 000 g.
4. Filtrát byl přemístěn do nové mikrozkušavky o objemu 2 ml, bylo přidáno 350 μ l 70% etanolu. Vzorek byl protřepán a stočen na stolní centrifuze.
5. Vzorek byl přenesen na kolonku (NucleoSpin RNA Plant Column) a centrifugován 30 sekund při 11 000 g. Kolonka byla přemístěna do nové mikrozkušavky o objemu 2 ml.
6. Na kolonku bylo aplikováno 350 μ l MDB (Membrane Desalting Buffer), vzorek byl centrifugován 1 minutu při 11 000 g.
7. Následně 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 v kolonce.
8. Vzorek byl inkubován 15 minut v pokojové teplotě.
9. Do kolonky bylo přidáno 200 μ l RA2 a centrifugováno 30 sekund při 11 000 g. Kolonka byla přemístěna do nové mikrozkušavky o objemu 2 ml.
10. Do kolonky bylo přidáno 600 μ l RA3 a centrifugováno 30 sekund při 11 000 g. Filtrát byl odstraněn a kolonka byla vložena zpět do mikrozkušavky.
11. Do kolonky bylo přidáno 250 μ l RA3 a centrifugováno 2 minuty při 11 000 g. Kolonka byla přenesena do nové nuclease-free mikrozkušavky o objemu 1,5 ml.
12. RNA byla z kolonky vymyta 60 μ l RNase-free vody centrifugací po dobu 1 minuty při 11 000 g.

4.4.2 RT-PCR *eIF4E* genu

Reverzní transkripce a polymerázová řetězová reakce *eIF4E* genu byla provedena jako jednokroková reakce pomocí RobusT II RT-PCR Kit firmy Finnzymes. Příprava RT-PCR reakční směsi je uvedena v Tab. 5, podmínky pro amplifikaci pak v Tab. 6.

Tab. 5: Reakční směs pro RT-PCR *eIF4E* genu (1 reakce = 25 µl)

Reagencie	Objem (µl)
10x RobusT reakční pufr	2,5
50 mM MgCl ₂	0,8
10 mM dNTP mix	0,5
40 U/µl Rnase inhibitor	0,5
20 pmol/µ eIF4E-ATG-F primer	0,25
20 pmol/µl eIF4E-end-R primer	0,25
5 U/µl M-MuLV	1
1 U/µl DynNAzyme DNA polymeráza	2
RNase-free voda	12,3
Izolovaná RNA	5

dNTP = směs deoxyribonukleotidů, M-MuLV = Moloney Murine Leukemia Virus RT RNáza H⁺.

Tab. 6: Podmínky amplifikace během RT-PCR *eIF4E* genu

Teplota (°C)	Čas	Opakování
45	60 minut	
94	2 minuty	
94	30 sekund	34x
52	30 sekund	
72	1 minuta	
72	10 minut	
12	∞	

RT-PCR produkty byly rozděleny elektroforetickou separací v 1% agarózovém gelu/TAE během 20 minut při 80 V stejnosměrného napětí za účelem kontroly přítomnosti a velikosti RT-PCR produktů.

Dále byly amplifikované produkty izolovány z agarózového gelu pomocí QIAquick Gel Extraction Kit podle návodu v QIAquick Spin Handbook (11/2006) - Postup 2.

Postup 2: Izolace RT-PCR produktu z gelu (QIAquick Gel Extraction Kit)

1. Byla provedena elektroforetická separace RT-PCR amplikonů v 1% agarózovém gelu/TAE s etidium bromidem za 20 minut při stejnosměrném napětí 90 V. Během separace byly připraveny mikrozkušavky o objemu 2 ml a byly zváženy.
2. Gel po elektroforetické separaci byl umístěn na UV transluminátor určený pro řezání gelu.
3. Sterilním skalpelem byly produkty vyřezány ve formě bločků, umístěny do mikrozkušavek a zváženy. Stejně vzorky vždy do jedné mikrozkušavky.

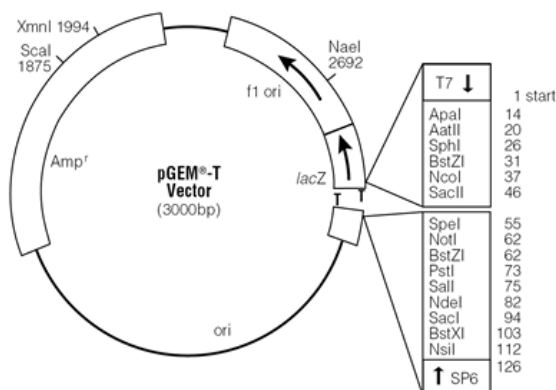
4. Váha gelu byla zjištěna odečtením hmotnosti mikrozkušavky před a po vložení vyřezaných bločků.
5. Byl přidán QG pufr do každé mikrozkušavky v poměru 3:1 a to vzhledem k hmotnosti gelu, tzn. na 1 mg gelu byly přidány 3 μ l QG pufru. Vzorek v QG byl inkubován v termobloku po dobu 10 minut při 50 °C, během inkubace byly vzorky 3x promíchány převrácením mikrozkušavky. Vzorek musel zežloutnout.
6. Následně byl přidán izopropanol v poměru 1:1 k původní váze gelu.
7. Směs byla pipetováním přenesena na kolonku pro izolaci DNA ve sběrné zkumavce.
8. Směs na kolonce byla centrifugována 1 minutu při 16 000 g. Proteklá část byla vylita do odpadu.
9. Na kolonku bylo přidáno 500 μ l QG pufru, směs byla centrifugována 1 minutu při 16 000 g. Proteklá část byla vylita do odpadu.
10. Následně bylo přidáno 750 μ l PE pufru na kolonku. Směs byla centrifugována 1 minutu při 16 000 g. Proteklá část byla vylita do odpadu.
11. Kolonka byla opět centrifugována 1 minutu při 16 000 g, poté byla přemístěna do nové mikrozkušavky o objemu 1,5 ml.
12. Na kolonku bylo přidáno 30 μ l DEPC vody. Voda se nechala nasát do membrány 1 minutu, nakonec byla směs centrifugována 1 minutu při 16 000 g.
13. Izolované vzorky se zakoncentrovaly vysušením ve SpeedVacu (cca 50 minut při 55 °C).
14. Vysušné vzorky byly rozpuštěny v 10 μ l DEPC vody v termobloku při 37 °C během 5 minut. Vzorky byly promíchány a stočeny. Koncentrace vzorku se tak zvýšila 3x.

4.4.3 Klonování *eIF4E* genu

Dalším krokem přípravy vzorků pro testování v Y2H bylo zaklonování RT-PCR produktů do vektoru, který následně sloužil k transformaci bakteriálních buněk.

Pro zaklonování ampliconů byl vybrán vektor pGEM-T (Promega), jehož struktura je schématicky zobrazena na Obr. 2.

Obr. 2: Schéma pGEM-T vektoru (převzato z http://www.promega.com/products/pcr/pcr-cloning/pgem_t-vector-systems/)



Produkty izolované z gelu byly ligovány do vektoru pomocí kitu pGEM-T Vector System (Promega, USA). Pro každý vzorek byla připravena ligační směs smícháním 5 μ l ligačního pufru, 1 μ l T4 ligázy, 0,5 μ l pGEM-T plazmidu a 3,5 μ l PCR produktu v 0,2ml mikrozkuhavce. Směs byla opatrně promíchána špičkou a lehce stočena. Ligace probíhala přes noc v teplotě 4 °C.

Rekombinantní plazmid pGEM-T byl následně použit k transformaci kompetentních bakteriálních buněk *E. coli* kmen DH5 α . K transformaci byla použita metoda teplotního šoku, celá reakce byla provedena podle Postupu 3.

Postup 3: Transformace bakterií *E. coli* teplotním šokem

1. Kompetentní bakterie *E. coli* (DH5 α) byly rozmrazeny na ledu. 75 μ l těchto buněk bylo napipetováno do mikrozkuhavky o objemu 1,5 ml.
2. Ke kompetentním buňkám bylo přidáno 5 μ l ligační směsi, směs byla lehce promíchána a inkubována na ledu po dobu 20 minut.
3. Následně byla mikrozkuhavka se směsí umístěna do termobloku (42 °C) na přesně 45 sekund, proběhl tak teplotní šok. Poté byla zkuhavka okamžitě přemístěna na led alespoň na 2 minuty.
4. Do zkuhavky bylo přidáno 850 μ l SOC média a směs byla inkubována 1,5 hodiny při 37 °C za stálého pozvolného otáčení.
5. V průběhu inkubace byly připraveny Petriho misky s LB médiem s antibiotikem ampicilin (100 μ g/ml). Na LB/Amp médium byl aplikován induktor IPTG (4 μ l/misku) a substrát X-gal (40 μ l/misku).

6. Po inkubaci byla směs 3 minuty centrifugována při 5 000 g. Většina supernatantu byla odpipetována (cca 880 µl), ve zbytku tekutiny byly bakterie resuspendovány.
7. Resuspendovaná směs byla vyseta na připravené misky s LB/Amp médiem.
8. Misky byly kultivovány dnem vzhůru při 37 °C přes noc ve tmě.
9. Následující den byly bílé (nesoucí inzert) kolonie přeočkovány na LB/Amp médium ve formě malých plošek.

Poté byla provedena 'colony' PCR pro kontrolu úspěšnosti ligace a transformace buněk *E. coli*. Pro amplifikaci inzertů v tomto kroku byly použity primery M13. Sekvence M13f primeru byla 5'- GTAAAACGACGGCCA-3' a M13r primeru 5'- CAGGAAACAGCTAT GAC-3' (Invitrogen). Jako templát byly použity vybrané bílé kolonie transformovaných bakterií. PCR proběhla podle specifických podmínek (Tab. 7). Rozpis reakční směsi je uveden v Tab 8. Poté byly amplikony rozděleny elektroforetickou separací v 1% agarózovém gelu/TAE, jejíž výsledek sloužil jako kontrola přítomnosti a velikosti ligovaných amplikonů.

Tab. 7: Podmínky amplifikace při 'colony' PCR

Teplota (°C)	Čas	Opakování
95	5 minut	35 x
95	1 minuta	
55	1 minuta	
72	1 minuta	
72	7 minut	
12	∞	

Tab. 8: Reakční směs pro 'colony' PCR (1 reakce = 25 µl)

Reagencie	Objem (µl)
5 x MyTaq polymerázový reakční pufr	5
destilovaná voda	19,2
20 pmol/µl M13f primer	0,3
20 pmol/µl M13r primer	0,3
5 U/µl MyTaq polymeráza	0,2

Z pozitivních kolonií byly připraveny konzervy k uskladnění podle Postupu 4.

Postup 4: Příprava konzerv bakteriálních buněk

1. Podle počtu kolonií, které měly být zakonzervovány, byl připraven stejný počet mikrozkuvek o objemu 1,5 ml. Do každé mikrozkuvky byl pipetován 1 ml LB média s ampicilinem.
2. Kolonie byly sterilním párátkem přeneseny do média.
3. Směs byla inkubována přes noc v 37 °C za stálého třepání.
4. Druhý den bylo smícháno 850 µl suspenze a 150 µl sterilního 15% glycerolu.
5. Směs byla dobře promíchána, aby se vytvořily vrstvy.
6. Konzervy byly uskladněny v - 70 °C.

4.4.4 Sekvenování klonovaného *eIF4E* genu

Sekvenování amplifikovaného *eIF4E* segmentu hrachu setého (Raman, PI269818, PI193835 a ATC6928) bylo provedeno ve spolupráci s Ústavem experimentální botaniky (Olomouc), účelem bylo vyloučit vznik mutací v sekvenci. Porovnání sekvencí bylo provedeno v programu MEGA 5.05 pomocí funkce 'alignment'.

Vzorky po 'colony' PCR amplifikaci byly rozděleny elektroforetickou separací v 1% agarózovém gelu/TAE (80 V, 40 minut) a následně vyizolovány z gelu pomocí QIAquick Gel Extraction Kit podle návodu výrobce (Postup 2). Koncentrace izolovaných vzorků byla změřena spektrofotometricky.

Následovala sekvenační reakce pomocí BigDye[®] Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit. Pro každý vzorek byly připraveny vždy dvě reakční směsi, do jedné směsi byl přidán M13f a do druhé M13r primer. Jako templát bylo do každé reakce pipetováno 35 ng DNA izolované z gelu.

Rozpis reakční směsi je zapsán v Tab. 9. Pro následnou PCR amplifikaci byly nastaveny specifické podmínky, jsou shrnuty v Tab. 10.

Tab. 9: Reakční směs pro PCR před sekvenováním (1 reakce = 10 µl)

Reagencie	Objem (µl)
5x sekvenační pufr	1
bigdye	1
1,6 pmol primer	2
destilovaná voda	do 10
Templátová DNA	35 ng

Primer = M13f v jedné směsi, M13r v druhé směsi.

Tab. 10: Specifické podmínky pro PCR před sekvenováním

Teplota (°C)	Čas	Opakování
96	1 minuta	25 x
96	10 sekund	
50	5 sekund	
60	4 minuty	

U takto připravených vzorků bylo provedeno oboustranné sekvenování v Ústavu experimentální botaniky.

4.5 Izolace RNA a klonování VPg genu

Pro sledování proteinových interakcí bylo třeba izolovat a naklonovat i VPg gen pro testování v dvouhybridním kvasinkovém systému (Y2H).

4.5.1 Izolace celkové RNA

Celková RNA byla izolována z listů hrachu setého *Pisum sativum* L. infikovaných PSbMV - izolát L1. Tato RNA sloužila k následné amplifikaci VPg genu PSbMV. Izolace byla provedena stejně jako v kapitole 4.4.1 podle Postupu 1.

4.5.2 RT - PCR VPg genu

Reverzní transkripce a polymerázová řetězová reakce izolované RNA byla provedena jako jednokroková reakce pomocí RobusT II RT-PCR Kit firmy Finnzymes. Příprava RT-PCR reakční směsi je uvedena v Tab. 11, podmínky pro amplifikaci v Tab. 12.

Tab. 11: Reakční směs pro RT-PCR VPg genu (1 reakce = 25 µl)

Reagencie	Objem (µl)
10x RobusT reakční pufr	2,5
50 mM MgCl ₂	0,8
10 mM dNTP mix	0,5
40 U/µl Rnase inhibitor	0,5
20 pmol/µ PSbMV_NAT1f primer	0,25
20 pmol/µl PSbMV_NAT1r primer	0,25

Tab. 11 Pokračování: Reakční směs pro RT-PCR *VPg* genu (1 reakce = 25 μ l)

Reagencie	Objem (μ l)
5 U/ μ l M-MuLV	1
1 U/ μ l DynNAzyme DNA polymeráza	2
RNase-free voda	12,3
Izolovaná RNA	5

dNTP = směs deoxyribonukleotidů, M-MuLV = Moloney Murine Leukemia Virus RT RNáza H.

Tab. 12: Podmínky amplifikace během RT-PCR *VPg* genu

Teplota ($^{\circ}$ C)	Čas	Opakování
45	60 minut	
94	2 minuty	
94	30 sekund	34x
50	30 sekund	
72	1 minuta	
72	10 minut	
12	∞	

RT-PCR produkty byly rozděleny elektroforetickou separací v 1% agarózovém gelu/TAE během 20 minut při 80 V stejnosměrného napětí za účelem kontroly přítomnosti a velikosti produktů.

Dále byly amplifikované produkty izolovány z agarózového gelu pomocí kitu QIAquick Gel Extraction Kit podle návodu v QIAquick Spin Handbook (11/2006) - Postup 2.

4.5.3 Klonování *VPg* genu

Ligační reakce, transformace bakteriálních buněk DH5 α i kontrolní PCR reakce s použitím M13 primerů byla provedena pro *VPg* gen naprosto totožným způsobem jako tomu bylo v případě klonování *eIF4E* genu v kapitole 4.4.3.

4.5.4 Sekvenování klonovaného *VPg* genu

Sekvenování amplifikovaného *VPg* segmentu PSbMV (L1) bylo provedeno ve spolupráci s Ústavem experimentální botaniky (Olomouc), účelem bylo vyloučit vznik mutací v sekvenci. Příprava *VPg* genu pro sekvenování proběhla stejně jako u *eIF4E* genu v kapitole 4.4.4.

4.6 Testování v dvouhybridním kvasinkovém systému

Pro sledování proteinových interakcí v Y2H byly vybrány a připraveny 2 geny - *eIF4E* gen hrachu a virový *VPg* gen.

K testování v dvouhybridním systému byly použity kompetentní buňky *Saccharomyces cerevisiae* kmen MaV203 (*MAT α* ; *leu2-3,112*; *trp1-901*; *his3 Δ 200*; *ade2-101*; *cyh2^R*; *can1^R*; *gal4 Δ* ; *gal80 Δ* ; *GAL1::lacZ*; *HIS3_{UASGALI}::HIS3@LYS2*; *SPAL10_{UASGALI}::URA3*). Genom těchto kvasinek je adaptován na použití v dvouhybridním systému založeném na *GAL4* doméně (Vidal, 1997).

Kvasinky MaV203 dodané firmou Invitrogen byly vysety na tuhé YPAD médium a inkubovány 2 dny ve tmě při 28 °C. Následně byly z narostlých kolonií vytvořeny konzervy určené k dlouhodobému skladování: do 12ml zkumavky se šroubovacím víčkem byly napipetovány 3 ml tekutého LB média a kvasinková kolonie byla sterilním párátkem přemístěna do média. Směs byla inkubována 2 dny při 28 °C za stálého mírného třepání. Nakonec bylo smícháno 850 μ l suspenze a 150 μ l 15% sterilního glycerolu, promícháno a uskladněno v - 70 °C.

4.6.1 Návrh specifických primerů s attB sekvencí

K amplifikaci genů testovaných v Y2H byly navrženy specifické primery, které amplifikují produkty vhodné pro Gateway systém. Primery byly navrženy podle návodu (Gateway Technology, Version E, 2010) tak, aby bylo možné vzniklé amplikony použít v BP rekombinaci. Schématický návrh primerů s attB sekvencemi je znázorněn na Obr. 3.

Obr. 3: Schéma návrhu primerů s attB sekvencemi

FP: 5' - GGGG-ACA-AGT-TTG-TAC-AAA-AAA-GCA-GGC-TNN- specifická sekvence - 3'
attB1 sekvence

RP: 5' - GGGG-AC-CAC-TTT-GTA-CAA-GAA-AGC-TGG-GTN- specifická sekvence - 3'
attB2 sekvence

Podtržená část sekvence = attB místo. N = přidáný nukleotid.

Primery syntetizovala firma Generi Biotech. Primery pro amplifikaci genu *eIF4E* byly následně označeny názvem Y2H_eIF4Ef a Y2H_eIF4Er. Primery pro amplifikaci *VPg* izolát

117 byly pojmenovány Y2H_PSBM117_VPGf a Y2H_PSBM117_VPGr, pro VPg izolátu L1 to byly primery Y2H_PSBL1_VPGf a Y2H_PSBL1_VPGr.

4.6.2 Optimalizace PCR reakce s primery s attB sekvencí

Po dodání navržených primerů s rekombinačními attB místy bylo nutné otestovat jejich funkci a optimalizovat PCR reakci tak, aby byl její výtěžek co nejlepší. Pomocí gradientové PCR byla optimalizována T_a (annealing temperature), následovala optimalizace množství templátu.

Reakční směs pro gradientovou PCR je uvedena v Tab. 13. Gradient byl nastaven v rozmezí teplot 65 - 45 °C, bylo testováno 8 vzorků, každému byla přidělena jiná T_a . Rozdělení T_a vzorkům je rozepsáno v Tab. 14. Nastavené podmínky gradientové PCR jsou uvedeny v Tab. 15. Jako templát byly použity plazmidy pGEM-T nesoucí cílový inzert (*eIF4E* gen genotypu Raman; VPg gen izolátů 117 a L1). Plazmidy byly izolovány z bakteriálních konzerv podle Postupu 5.

Tab. 13: Reakční směs pro gradientovou PCR (1 reakce = 20 μ l)

Reagencie	Objem (μ l)
5x MyTaq polymerázový reakční pufr	5
destilovaná voda	12,3
20 pmol/ μ l attB FP	0,25
20 pmol/ μ l attB RP	0,25
5 U/ μ l MyTaq polymeráza	0,2
10 ng/ μ l izolovaný plazmid	2

FP = forward primer s attB1 sekvencí, RP = reverse primer s attB2 sekvencí.

Tab. 14: Rozdělení T_a při gradientové PCR

Číslo vzorku	1	2	3	4	5	6	7	8
T_a (°C)	65	63,4	60,9	57,1	52,6	48,8	46,4	45

T_a = annealing temperature.

Tab. 15: Podmínky gradientové PCR

Teplota (°C)	Čas	Opakování
94	3 minuty	
94	30 sekund	34 x
65 - 45	30 sekund	
72	1 minuta	
72	5 minut	
12	∞	

65 - 45 = rozmezí nastaveného gradientu.

Postup 5: Izolace DNA pGEM-T plazmidu (QIAprep Spin Miniprep Kit)

1. Prvním krokem bylo oživení bakteriálních konzerv (*E. coli* transformované pGEM-T plazmidem nesoucím cílový inzert): na plotnu s tuhým LB/Amp médiem byla sterilní kapilárou naočkována zředovací řada bakterií z konzerv.
2. Miska byla inkubována přes noc při 37 °C.
3. Další den bylo do Erlenmayerovy baňky (objem 25 ml) nalito 10 ml tekutého LB/Amp média a párátkem byla přenesena 1 kolonie z misky.
4. Baňka se suspenzí byla inkubována přes noc při 37 °C za stálého třepání.
5. Následující den byl odebrán 1 ml suspenze Pasteurovou pipetou do 1,5ml mikrozkušavky, suspenze byla centrifugována 5 min při 6 000 rpm.
6. Supernatant byl odstaněn (cca 990 µl).
7. K peletu bylo přidáno 250 µl P1 pufru, peletované buňky byly v pufru resuspendovány.
8. Dále bylo přidáno 250 µl pufru P2, zkumavka byla okamžitě 5x převrácena (roztok byl viskózní a skoro průhledný).
9. Bylo přidáno 350 µl N3 pufru, zkumavka byla ihned 5x převrácena (roztok se zakalil).
10. Vzorek byl centrifugován 10 minut při 13 000 rpm.
11. Supernatant (cca 880 µl) byl přepipetován na QIAprep spin kolonu.
12. Vzorek byl centrifugován 1 minutu při 13 000 rpm. Proteklá tekutina byla odstraněna.
13. Na kolonu bylo přidáno 500 µl PB pufru, vzorek byl centrifugován 1 minutu při 13 000 rpm. Co proteklo, bylo odstraněno.
14. Dále bylo přidáno 750 µl PE pufru opět na kolonu, vzorek byl centrifugován 1 minutu při 13 000 rpm. Co proteklo, bylo odstraněno.
15. Vzorek byl ještě jednou centrifugován 1 minutu při 13 000 rpm, aby byl odstraněn zbytkový promývací pufr.

16. Kolona byla umístěna do nové 1,5ml mikrozkušavky, do středu kolony bylo přidáno 50 μ l EB pufru, pufr se během 1 minuty vsál do filtru a nakonec byla kolona centrifugována 1 minutu při 13 000 rpm.
17. Koncentrace izolovaného plazmidu byla změřena na nanodropu.

Následovala elektroforetická separace v 1% agarózovém gelu/TAE. Podle výsledků separace byla vybrána optimální T_a .

Tato T_a byla použita pro následnou PCR amplifikaci, která sloužila k optimalizaci množství templátu. Zde bylo testováno 6 reakcí pro každý vzorek, templátem byly opět izolované plazmidy s cílovými inzerty, do PCR reakce bylo pipetováno různé množství templátu. Množství templátu v jednotlivých reakcích je uvedeno v Tab. 16. Podmínky amplifikace byly použity stejné jako v Tab. 15, pouze $T_a = 60$ °C. Rozpis reakční směsi platil stejný jako v Tab. 13.

Tab. 16: Množství templátu ve vzorcích pro optimalizaci PCR

Číslo vzorku	1	2	3	4	5	6
Množství templátu	10 ng/ μ l	1 ng/ μ l	100 pg/ μ l	10 pg/ μ l	1 pg/ μ l	0,1 pg/ μ l

Opět následovala elektroforetická separace v 1% agarózovém gelu/TAE, z níž bylo odečteno optimální množství templátu.

Optimální T_a a množství templátu bylo použito při přípravě PCR produktů pro BP rekombinaci - amplifikovaných specifickými primery s attB rekombinačním místem.

4.6.3 Plazmidy pro kvasinkový dvouhybridní systém

Pro použití v Y2H byly připraveny jak kontrolní, tak klonovací plazmidy potřebné pro klonázové reakce (BP a LR). Konzervy bakteriálních buněk *E. coli* transformovaných plazmidy pro Y2H byly oživeny vysetím na misky s LB médiem s příslušným antibiotikem a inkubovány přes noc při 37 °C. Následující den byly kolonie přeočkovány do 10 ml tekutého LB média s antibiotikem a opět inkubovány přes noc v 37 °C za stálého třepání. Další den byly plazmidy izolovány z narostlé tekuté kultury podle Postupu 5. Koncentrace izolovaných plazmidů byly změřeny spektrofotometricky. Všechny použité plazmidy, příslušná antibiotika k selekci a kmen *E. coli* jsou v Tab. 17.

Tab. 17: Přehled použitých kontrolních a klonovacích vektorů pro Y2H

Název kontrolního vektoru	Antibiotikum k selekci	Kmen <i>E. coli</i>
pEXP32/Krev1	gentamycin	TOP10
pEXP22/RalGDS-m2	ampicilin	TOP10
pEXP22/RalGDS-wt	ampicilin	TOP10
Název klonovacího vektoru	Antibiotikum k selekci	Kmen <i>E. coli</i>
pDEST22	ampicilin	DB3.1
pDEST32	gentamycin	DB3.1
pDONR221	kanamycin	DB3.1

4.6.4 BP klonázová reakce

VPg gen (L1 a 117) a *eIF4E* gen (Raman, PI269818, PI193835 a ATC6928) byly klonázovou reakcí rekombinovány do vektoru pDONR221.

PCR produkt, který je možný do tohoto vektoru zaklonovat, je nutné nejprve amplifikovat specifickými primery s attB sekvencemi. Použité podmínky PCR reakce jsou zapsány v Tab. 15, T_a byla nastavena na 60 °C. Rozpis reakční směsi byl stejný jako v Tab. 13. Jako templát zde byl použit izolovaný pGEM-T plazmid nesoucí cílový gen ($c = 10 \text{ pg}/\mu\text{l}$).

Pak byly attB PCR produkty purifikovány izolací z gelu (Postup 2) a následně rozděleny elektroforetickou separací v 1% agarózovém gelu/TAE - kontrola velikosti produktu.

Vybrané attB PCR produkty byly zaklonovány do pDONR221 a to smícháním BP reakční směsi: 6 μl attB PCR produktu, 2 μl izolovaného pDONR221 (70 $\text{ng}/\mu\text{l}$) a 2 μl BP klonázy. Směs byla lehce promíchána, stočena na stolní centrifuze a inkubována přes noc v pokojové teplotě. Další den byl ke směsi přidán 1 μl proteinázy K, následovala inkubace 10 minut při 37 °C. V této fázi bylo možné směs po BP rekombinaci skladovat v -20 °C nebo ji použít k okamžité transformaci bakterií. Vzorky byly ihned použity k transformaci bakterií metodou teplotního šoku (Postup 6).

Postup 6: Transformace bakterií vektorem pDONR221 s klonovaným attB produktem

1. 5 μl směsi po BP reakci bylo smícháno se 100 μl kompetentních buněk *E. coli* (DH5 α) v 1,5ml mikrozkuhavce. Směs byla inkubována na ledu po dobu 30 minut.

2. Vzorčky následně podstoupily teplotní šok v termobloku při 42 °C po dobu 45 sekund. Ihned poté byly vloženy do ledu alespoň na 2 minuty.
3. K transformovaným bakteriím bylo přidáno 800 µl tekutého LB média. Buňky byly inkubovány při 37 °C 1 hodinu. Během inkubace byly vzorky 4x promíchány překlopením zkumavky.
4. Narostlá bakteriální kultura byla centrifugována 1 minutu při 6 000 rpm.
5. Supernatant byl odstraněn. Bylo přidáno 100 µl čerstvého LB média a buňky v něm byly resuspendovány. Směs byla vyseta na plotny s tuhým LB médiem s kanamycinem.
6. Plotny byly inkubovány přes noc při 30 °C.

Následující den byly náhodně vybrané kolonie přeočkovány do 1 ml tekutého LB média s kanamycinem a inkubovány přes noc při 37 °C. Z narostlé kultury byly izolovány plazmidy pDONR221 nesoucí attB produkty (Postup 5), jejich koncentrace byla změřena na nanodropu.

Izolovaný pDONR221 sloužil jako templát v kontrolní PCR reakci. Rozpis reakční směsi je uveden v Tab. 18, PCR specifické podmínky v Tab. 19. Nakonec byly amplikony rozděleny elektroforeticky v 1% agarózovém gelu/TAE a byla zkontrolována velikost attB produktů. Z pozitivních kolonií byly vytvořeny konzervy k uskladnění (Postup 4)

Tab. 18: Reakční směs pro kontrolní PCR po BP reakci (1 reakce = 25 µl)

Reagencie	Objem (µl)
10x Taq reakční pufr	2,5
25mM MgCl ₂	4
destilovaná voda	14
2mM dNTP	1
20 pmol/µl attB FP	1
20 pmol/µl attB RP	1
5 U/µL Taq polymeráza	0,5
izolovaný pDONR221 nesoucí attB produkt	1

FP = forward primer s attB1 sekvencí, RP = reverse primer s attB2 sekvencí, dNTP = směs deoxynukleotidů.

Tab. 19: Specifické podmínky kontrolní PCR po BP reakci

Teplota (°C)	Čas	Opakování
94	3 minuty	
94	30 sekund	34x
50	30 sekund	
72	1 minuta	
72	5 minut	
12	∞	

Plazmidy pDONR221 nesoucí attB produkty byly odeslány k osekvenování na Ústav experimentální botaniky v Olomouci, kde sekvenování provedla Ing. Beáta Petrovská, Ph.D.

4.6.5 LR klonázová reakce

Klonázovou reakcí byly cílové geny rekombinovány z vektoru pDONR221 do destinačních vektorů (pDEST22 a pDEST32). Do pDEST22 byl klonován VPg gen (117), do pDEST32 byly klonovány eIF4E geny (Raman, PI269818 a ATC6928).

LR klonázová směs byla připravena smícháním 150 ng pDONR221 vektoru s cílovým genem, 150 ng pDEST22/pDEST32 tak, aby bylo této směsi 8 µl, následně byly přidány 2 µl LR klonázy. Směs byla lehce promíchána, stočena na stolní centrifuze a inkubována přes noc v pokojové teplotě.

Další den byl ke směsi přidán 1 µl proteinázy K, následovala inkubace 10 minut při 37 °C. V této fázi je možné směs po LR rekombinaci skladovat v -20°C nebo ji použít k okamžité transformaci bakterií. Vzorky byly ihned použity k transformaci bakterií metodou teplotního šoku (Postup 7).

Postup 7: Transformace bakterií pDEST22/pDEST32 vektorem s cílovým genem

1. 5 µl směsi po LR reakci bylo smícháno se 100 µl kompetentních buněk *E. coli* (DH5α) v 1,5ml mikrozkuhavce. Směs byla inkubována na ledu po dobu 30 minut.
2. Vzorky následně podstoupily teplotní šok v termobloku při 42 °C po dobu 45 sekund. Ihned byly vloženy do ledu alespoň na 2 minuty.
3. K transformovaným bakteriím bylo přidáno 800 µl tekutého LB média. Buňky byly inkubovány při 37 °C 1 hodinu. Během inkubace byly vzorky 4x promíchány překlopením zkumavky.
4. Narostlá bakteriální kultura byla centrifugována 1 minutu při 6 000 rpm.

5. Supernatant byl odstraněn. Bylo přidáno 100 μl čerstvého LB média a buňky v něm byly resuspendovány. Směs byla vyseta na plotny s tuhým LB médiem s antibiotikem (pDEST 22 - ampicilin, pDEST32 - gentamycin).
6. Plotny byly inkubovány přes noc při 30°C.

Narostlé kolonie sloužily jako templát pro kontrolní PCR reakci. Bylo otestováno 10 kolonií od každého vzorku. Rozpis reakční směsi je uveden v Tab. 20. PCR specifické podmínky jsou sepsány v Tab. 21. Nakonec byly amplikony rozděleny elektroforeticky v 1% agarózovém gelu/TAE a byla zkontrolována velikost produktů. Z pozitivních kolonií byly vytvořeny konzervy k uskladnění (Postup 4). Také z nich byly izolovány plazmidy pDEST22/pDEST32 (Postup 5), jejich koncentrace byla změřena na nanodropu.

Tab. 20: Reakční směs pro kontrolní PCR po LR reakci (1 reakce = 20 μl)

Reagencie	Objem (μl)
5 x MyTaq polymerázový reakční pufr	5
destilovaná voda	14,3
20 pmol/ μl attB FP	0,25
20 pmol/ μl attB RP	0,25
5 U/ μl MyTaq polymeráza	0,2

FP = forward primer s attB1 sekvencí, RP = reverse primer s attB2 sekvencí.

Tab. 21: Specifické podmínky kontrolní PCR po LR reakci

Teplota ($^{\circ}\text{C}$)	Čas	Opakování
94	5 minut	
94	30 sekund	34x
60	30 sekund	
72	1 minuta	
72	5 minut	
12	∞	

4.6.6 Transformace kvasinek destinačními vektory

Kvasinky *S. cerevisiae* kmen MaV203 byly transformovány oběma destinačními vektory najednou podle návodu ProQuest Two-Hybrid System (version A, 2005) - Postup 8. Kombinace vektorů pro transformaci kvasinek jsou v Tab. 22.

Postup 8: Transformace kvasinek destinačními vektory

1. 10 ml tekutého YPAD média bylo inokulováno kolonií kvasinek MaV203 a inkubováno přes noc při 30 °C za mírného třepání.
2. Druhý den byla změřena OD₆₀₀ kultury, ta byla následně naředěna médiem na OD₆₀₀ = 0,4. Poté proběhla kultivace kultury další 2,5 hodiny, aby OD₆₀₀ narostla na 0,6 - 0,8.
3. Kultura byla centrifugována při 2 500 rpm 5 minut v 20 °C.
4. Supernatant byl odstraněn a buňky resuspendovány v 40 ml 1x TE pufru.
5. Kultura byla opět centrifugována při 2 500 rpm 5 minut v 20 °C.
6. Supernatant byl odstraněn a buňky resuspendovány ve 2 ml 1x LiAc/0,5x TE.
7. Směs byla inkubována v pokojové teplotě 10 minut.
8. Následovala transformace smícháním 100 µl kvasinkové suspenze z předchozího kroku, 0,5 µg pDEST22 a 0,5 µg pDEST32 vektoru a 100 µg salmon sperm DNA.
9. Ke směsi bylo přidáno 700 µl 1x LiAc/40% PEG-3350/0,5 x TE a dobře promícháno.
10. Roztok byl inkubován 30 minut při 30 °C.
11. Dále bylo přidáno 88 µl DMSO, směs byla promíchána a byl proveden teplotní šok (7 minut při 42 °C).
12. Transformované kvasinky byly centrifugovány 10 sekund a supernatant byl dostraněn.
13. Buňky byly resuspendovány v 1 ml 1x TE a znovu centrifugovány 10 sekund.
14. Supernatant byl dostraněn a kvasinky byly resuspendovány v 50 µl 1x TE.
15. Takto připravená směs byla vyseta na plotny s SC médiem a inkubována 2 dny při 28 °C.
16. Narostlé kolonie byly přeočkovány na plotny s SC médiem ve tvaru čtverečků - 10 kusů od každého vzorku a inkubovány 2 dny při 28 °C.

Tab. 22: Přehled kvasinkových kultur transformovaných destinačními vektory + kontroly

Kultura kvasinek	Vektor	Gen	Izolát/Genotyp
1	pDEST22	<i>VPg</i>	117
	pDEST32	<i>eIF4E</i>	Raman
2	pDEST22	<i>VPg</i>	117
	pDEST32	<i>eIF4E</i>	PI269818
3	pDEST22	<i>VPg</i>	117
	pDEST32	<i>eIF4E</i>	ATC6928
4 pozitivní kontrola	pEXP32/Krev1		
	pEXP22/RalGDS-wt		
5 negativní kontrola	pEXP32/Krev1		
	pEXP22/RalGDS-m2		

4.6.7 Charakterizace transformovaných kvasinek

Proteinové interakce mezi *VPg* a *eIF4E* byly sledovány pomocí testu na aktivitu galaktosidázy (substrát X-gal), který byl proveden podle ProQuest Two-Hybrid Systém - version A, 2005 (X-gal assay). Návod je shrnut v Postupu 9:

Postup 9: 'X-gal assay' transformovaných kvasinek

1. Pro každý vzorek bylo nutné připravit Petriho misku a namíchat směs: 10 mg X - gal, 100 µl DMF, 60 µl merkaptoetanolu a 10 ml Z pufu.
2. Do každé Petriho misky byly vloženy 4 kolečka filtračního papíru, které byly zality 10 ml připraveného roztoku.
3. Z nylonové membrány byly vystřiženy čtverce, které svými rozměry odpovídaly miskám. Membrána byla přitížena na přeočkované kolonie transformovaných kvasinek, bakteriologickou hokejkou byly odstraněny bubliny.
4. Membrána s otištěnými koloniemi byla pomocí pinzety vložena do tekutého dusíku cca na 20 sekund.
5. Zmrzlá membrána byla položena na připravený filtrační papír koloniemi vzhůru.
6. Misky byly uzavřeny a ve vodorovné poloze inkubovány ve tmě 24 hodin při 37 °C.
7. Následující den byla stanovena přítomnost či absence interakce (modrá kolonie = proběhla interakce mezi testovanými proteiny, bílá kolonie = interakce neproběhla).

4.7 Stanovení koncentrace viru ve vnímavých rostlinách hrachu

Relativní koncentrace viru v listech hrachu setého inokulovaných virem PSbMV (izolát 117) byla stanovena pomocí kvantitativní RT-PCR. K experimentu byly použity dva genotypy hrachu, genotyp Raman (vnímavý homozygot *SBMI/SBMI*) a vybraní vnímaví heterozygoti (*SBMI/sbm1*) F2 generace vzniklé samosprášením hybridů Raman/B99 (*SBMI/sbm1* x *SBMI/sbm1*). Jako referenční byl použit gen pro β -tubulin.

Do substrátu Klassman č. 4 bylo vyseto 10 semínek každého genotypu a rostliny byly kultivovány ve fytotronu při 22 °C přes den (18 hodin) a při 18 °C přes noc (8 hodin). Dvanáctý den po vysetí (ve stádiu dvou pravých listů) byla provedena mechanická inokulace (Šafářová a kol., 2008). Vzorke listů byly odebírány 10., 15., 20., 25. a 29. den po inokulaci korkovrtem o průměru 8 mm z druhého a třetího patra plně vyvinutých listů shora. Odebrané vzorky byly uchovávány v - 80 °C. Každá rostlina byla vizuálně hodnocena v den odběru a intenzita příznaků infekce byla zaznamenána.

4.7.1 Stanovení relativní koncentrace viru pomocí RT-PCR

Pro stanovení relativní koncentrace viru v pokusných variantách byla izolována RNA z hrachových listů infikovaných PSbMV (Postup 1), průměrné vzorky byly připraveny z 8 - 9 rostlin a celková izolovaná RNA byla naředěna 10x. Následovala kvantitativní RT-PCR, při které byly pro amplifikaci *CP* genu PSbMV použity primery PSBcpF (5' - CAA AGGCGGAATGGCTATCA - 3') a PSBcpR (5' - ACCCCGTACTCTTGCGGACT - 3') navržené Mgr. Danou Šafářovou, Ph.D. Tyto primery amplifikují segment o velikosti 132 nt. Kontrolní gen pro β -tubulin byl amplifikován pomocí primerů bTubF (5' - GCTCCC AGCAGTACAGGACTCT - 3') a bTubR (5' - TGGCATCCCACAT TTGTTGA - 3') (Die a kol., 2010). Podmínky amplifikace pro kvantitativní RT-PCR jsou uvedeny v Tab. 23, složení reakční směsi v Tab. 24. Relativní koncentrace byla stanovena a vyhodnocena metodou $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak a kol., 2001). Průměrné hodnoty koncentrace viru v daném termínu byly vztaženy ke koncentraci virů ve vnímavém homozygotu 29. den.

Tab. 23: Podmínky kvantitativní RT-PCR

PCR s PSBcpF/R primery		
Čas	Teplota (°C)	Opakování
25 minut	45	
15 minut	95	
30 sekund	95	40x
30 sekund	55	
30 sekund	72	
45 sekund/5sekund	72 - 95	

PCR s bTubF/R primery		
Čas	Teplota (°C)	Opakování
30 minut	45	
15 minut	95	
20 sekund	95	45x
20 sekund	55	
20 sekund	72	
45 sekund/5sekund	72 - 95	

45 sekund/5 sekund = 45 sekund v prvním kole, v ostatních jen 5 sekund.

Tab. 24: Reakční směs pro kvantitativní RT-PCR (1 reakce = 20 µl)

Reagencie	Objem (µl)
2x QRT SybrMix	10
DEPC voda	6,5
20 pmol/µl FP	0,1
20 pmol/µl RP	0,2
1,25/25 µl Enhancer	1
0,25/25 µl enzymová směs	0,2
vzorek	2

FP = forward primer, RP = reverse primer.

4.7.2 Statistické hodnocení výsledků

Statistická analýza byla provedena analýzou rozptylu (variance) ANOVA s interakcemi a následným Tukey HSD (Honestly Significant Differences) testem, na hladině průkaznosti $p = 0,05$. Analýzu provedla Mgr. Dana Šafařová, Ph.D. pomocí programu STATISTICA CZ 12 firmy StatSoft s.r.o.

4.8 Použité chemikálie

Adenin hemisulfát (Duchefa, A0908.0005)
Agar (Duchefa, 009007.03)
Agaróza (Amresco, 0710)
BP klonázový mix (Invitrogen, 11789-013)
Bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, 114391)
DMF (Serva, 20270)
DMSO (Serva, 20385)
DNA ladder 100 bp, 100 bp plus (GeneRuler, Fermentas)
Etanol (Lachema)
Etidium bromid (Serva, 21238)
Glukóza monohydrát (Duchefa, G0802.1000)
Glycerol (Lachema)
GoodView (SBS Genetech Co. Ltd., HGV-II)
IPTG (Thermo Scientific)
KCl (Lachema, 30547)
Kvasničný extrakt (Duchefa, Y1333.0500)
Litium acetát dihydrát (Sigma-Aldrich, L6883)
LR klonázový mix (Invitrogen, 11791-019)
Luria Broth (LB) Base (Duchefa, 1717.0500)
MgSO₄·7H₂O (Lachema, 30802)
MyTaq DNA Polymeráza (Bioline, BIO-21105)
NaCl (Lachema, 20584)
Na₂HPO₄·12H₂O (Lachema)
NaH₂PO₄·H₂O (Lachema)
Pepton (Duchefa, P1328.0500)
Polyetylglykol (Sigma-Aldrich, P3640)
Salmon sperm DNA (Sigma-Aldrich, D1626)
Taq DNA Polymeráza (QIAGEN, 201203)
X-gal (Thermo Scientific)
Yeast Nitrogen Base Without Amino Acids (Sigma-Aldrich, Y0626)
Yeast Synthetic Drop-out Supplements (Sigma-Aldrich, Y0750)

β -Merkaptoetanol (Serva, 28625)

4.9 Použité roztoky a jejich složení

LiAc (10x = 1M):	LiAc.2H ₂ O.....	10,2 g
	destilovaná voda.....	100 ml
1xLiAc/0,5xTE:	1x TE.....	1 ml
	1M LiAc.....	200 μ l
	destilovaná voda.....	800 μ l
1xLiAc/40% PEG3350/0,5xTE:	10x LiAc.....	70 μ l
	10x TE.....	35 μ l
	60% PEG.....	462 μ l
	destilovaná voda.....	133 μ l
LB médium (250 ml):	destilovaná voda.....	250 ml
	LB Base.....	6,2 g
	agar (pro tuhé LB médium).....	4,5 g
SC médium (250 ml):	Yeast Synthetic Drop-out Supplements.....	0,2 g
	Yeast Nitrogen Base Without AA.....	6,7 g
	agar.....	5 g
	destilovaná voda.....	240 ml
	50% glukóza.....	10 ml
SOC médium (100 ml):	pepton.....	2 g
	kvasničný extrakt.....	0,5 g
	1 M NaCl.....	1 ml
	1M KCl.....	0,25 ml
	2M Mg ²⁺ roztok.....	1 ml
	2M glukóza.....	1 ml
	destilovaná voda.....	97,75 ml
TAE pufr (1x):	destilovaná voda.....	800 ml
	5x TAE pufr.....	200 ml

TAE pufr (5x):	TRIS.....	24,2 g
	ledová kyselina octová.....	5,71 ml
	0,5M EDTA.....	10 ml
	pH 8	
	destilovaná voda.....	do 1000 ml
TE pufr (1x):	1M TRIS.....	10 ml
	0,5M EDTA.....	2 ml
	destilovaná voda.....	do 1000 ml
TE pufr (10x):	1M TRIS.....	100 ml
	0,5M EDTA.....	20 ml
	destilovaná voda.....	do 1000 ml
TNE (10x):	TRIS.....	12,1 g
	EDTA.....	3,7 g
	NaCl.....	116,8 g
	pH 7,4	
	destilovaná voda.....	do 1000 ml
TRIS (1M):	TRIS.....	12,1 g
	pH 7,5	
	destilovaná voda.....	do 100 ml
YPAD médium (250 ml):	kvasničný extrakt.....	2,5 g
	pepton.....	5 g
	glukóza.....	5 g
	adenin sulfát.....	25 mg
	agar (pro tuhé YPAD médium).....	5 g
Z pufr (250 ml):	Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O.....	4 g
	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O.....	1,4 g
	KCl.....	187 mg
	MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	62,5 mg
	β-merkaptóetanol.....	675 µl

destilovaná voda.....do 250 ml
pH 7,0

4.10 Použité přístroje

Centrifuga Spectrafuge Mini a Spectrafuge 16M (Labnet International, Inc.)

Centrifuga Biofuge Pico (Heraeus)

Centrifuga MR22 (Jouan)

Dokumentační systém G:Box (Syngene)

Elektroforetická komora MIDI 1 (Carl Roth)

Flow box PV100 (Telstar)

Homogenizátor FP120 (Thermo Savant)

Inkubátor TH30 + SM30 (Edmund Buhler GmbH)

Lyofilizátor SPD 111V (Thermo Savant)

Minitřepačka TTS 2 (Yellowline)

Nanodrop 1000 (Thermo Scientific)

Orbitální třepačka Multi Bio RS-24 (Biosan)

pH metr 210 (HANNA instruments)

Termoblok DB2D (Techne)

Termoblok Dry-Bath (Labnet International, Inc.)

Thermocycler Rotor-Gene RG-3000A (Corbett Research)

Thermocycler T-Personal (Biometra)

Thermocycler T100 (BIO-RAD)

UV transluminátor UVT-22 (Herolab)

UV/VIS spektrofotometr DU730 (Beckman Coulter)

Vodní lázeň Sub6 (Grant Instruments)

Zdroj stejnosměrného napětí PowerPack P25 (Biometra)

Zdroj stejnosměrného napětí Power Station 300 (Labnet International, Inc.)

5. VÝSLEDKY

5.1 Sekvence *VPg* genu a návrh primerů pro jejich amplifikaci

Pomocí programu MEGA 5.05 byl lokalizován *VPg* gen v sekvenci izolátu 117 a L1 PSbMV. Poloha *VPg* v DPD1 (NC_001671) je 6 009 - 6 590 (celkem 582 bp). Sekvence *VPg* izolátu DPD1 je:

```
gggaagtcgaaagctaaaactttgcgttttagacaggctcgcgacaacaatgccaagatgaagtgttgcagatgaagacacaaaac
gccattatgttgaggcatacacaagaagggaagaaagtggtaaggcacgagggatgggtgtgaaaacaagaagttcgtga
atgtgtatggtttgatccatgtgaatattccctgttcgattcgttgatccactcactgggttgacttatgatagacacccatggaacacatg
atggacgtgcaggagactataggtgatgatcgcagggaggccatgtggaacgatgaactcgataaacaattgtttgtgaccagaccca
caattgaagcgtactatataaaagacaaaaccacgccagcactcaagatcgattgaaccctcacaatccaatgagggtctgcgataaa
gctgaaactattgctgattccagaacgtgaattcgaattgagacaatctggctctgcaacattagtccatacagtgaagtaccagtcg
aaaacgagaacaagaatttgacgaggagcatgtgcaacggag
```

Sekvence izolátu L1 (AJ252242) je také celogenomová (9 905 bp), *VPg* gen byl lokalizován v poloze 5 994 - 6 575 (582 bp). Sekvence *VPg* u izolátu L1 je:

```
ggaaagtcgaaggcgaaaacattgcgtttcagacaagcccgtgacaataatgccaagatgaagtgttgcagatgaagactcaaaac
gccattatgttgattcatacacaagaaggtagtaaaagcggcaaggcaagaggaatgggtgtgaaaacaagaagttcgtgaat
gtgtatggtttgacctatgtgagtattccctgttcgattcgttgacctcactggttgacttatgacaggcaccccatggagcacatg
atggacgtgcaggatgcaataggtgatgatcgaaggcagatgaagatcttgataagcaattgtggtgggctagacctacggttgaag
cactacataaaggacaaaaccacgccagcgttaaaatcgacttaactccacacaatccaatgagagtctgcgacaaagtgagac
aattgctggattccggaacgtgagttgaattgagacaatctggcctgcaacattggtccatacagtgaggtaccagtgcaaaacga
aaagaaggagtctgatgaggagcacgtgcaacggagcagcgtcg
```

Sekvence izolátu 117 je dlouhá 696 bp. *VPg* gen byl lokalizován v poloze 36 - 618 (582 bp), sekvence je:

```
gggaagtcgaaagctaaaactttgcgttttagacaggctcgcgacaacaatgccaagatgaagtgtatgcagatgaagactcaaaac
gccattatgttgaggcatacacaagaagggaagaaagtggtaaggcacgagggatgggtgtgaaaacaagaagttcgtga
atgtgtatggtttgatccatgtgaatattctctgttcgattcgttgatccactcactgggttgacttatgatagacacccatggaacacatg
atggacgtgcaggagactataggtgatgatcgcagggaggccatgtggaacgatgaactcgataaacaattgtttgtgaccagaccca
caattgaagcgtactatataaaagacaaaaccacgccagcactcaagatcgattgaaccctcacaatccaatgagggtttgcgataaa
```

gctgaaactattgctggattcccagaacgtgaattcgaattgagacaatctggctctgcaacattagttccgtacagtgaagtaccagtgc
 aaaacgagaacaagaatttgacgaggagcatgtgccaacggag

Pomocí programu Primer - BLAST byly navrženy primery pro amplifikaci *VPg* genu (Tab. 25). Páry primerů byly analyzovány pomocí programu OligoAnalyzer 3.1. Požadovaným parametrům nejvíce vyhovoval pár č. 1.

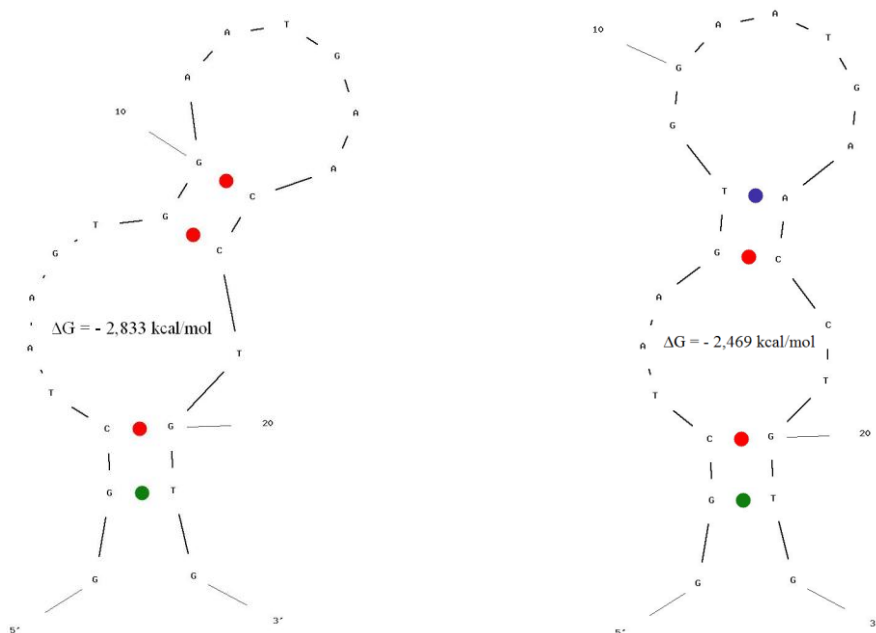
Tab. 25: Sekvence navržených párů primerů pro *VPg* gen PSbMV izolátu L1

Primer pair	5'-„Forward“ primer-3'	5'-„Reverse“ primer-3'
1	GGCTAAGTGGAATGAACCTGTG	GGGTTGTAATCACGCAAACCG
2	GTGGAATGAACCTGTGAAACTGG	GGTTGTAATCACGCAAACCGA
3	GGCTAAGTGGAATGAACCTGT	AATCACGCAAACCGAAATGC
4	TGGAATGAACCTGTGAAACTGGA	AGGGTTGTAATCACGCAAACC
5	TGGAATGAACCTGTGAAACTGG	GGTTGTAATCACGCAAACCG

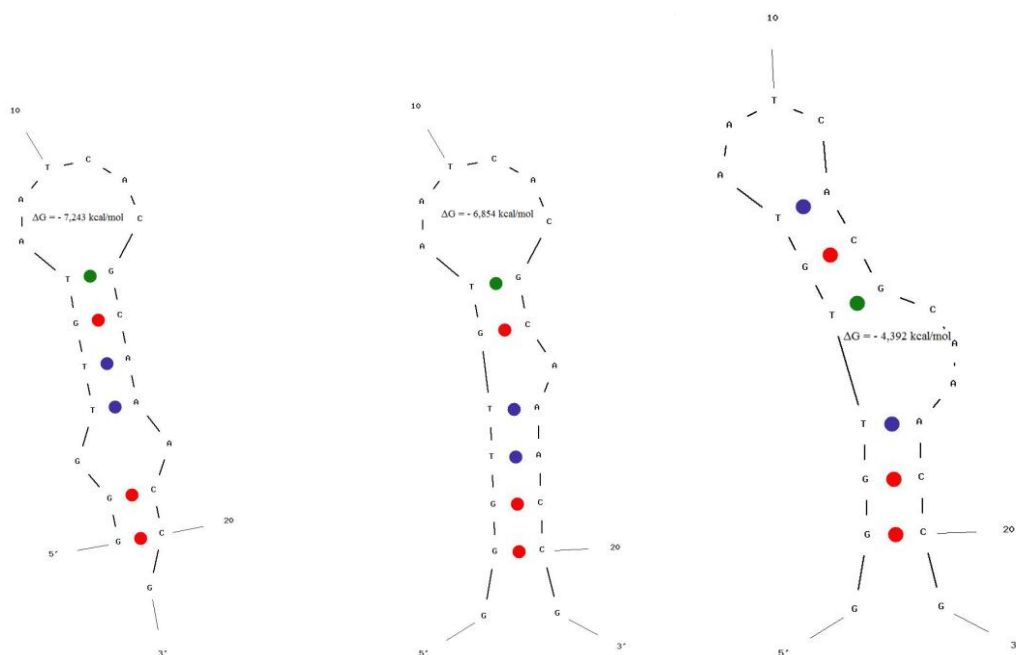
Velikost amplifikovaného produktu: 500 - 800 nt. T_m (primer melting temperature): 55 - 60 - 65°C.

Primery pro amplifikaci *VPg* byly označeny jako PSbMV_NAT1f (5'- GGCTAAGTG GAATGAACCTGTG - 3') a PSbMV_NAT1r (5'- GGGTTGTAATCACGCAAACCG - 3'). V Tab. 26 jsou k primerům pro *VPg* dodané informace od výrobce. Obr. 4 a 5 zobrazují možnou strukturu vlásenek primerového páru č. 1.

Obr. 4: Struktura vlásenek PSbMV_NAT1f primeru (program OligoAnalyzer 3.1)



Obr. 5: Struktura vlásenek u PSbMV_NAT1r primeru (program OligoAnalyzer 3.1)



Tab. 26: Vlastnosti nasyntetizovaných primerů pro VPg gen PSbMV - izolát L1

Parametr	PSbMV_NAT1f	PSbMV_NAT1r
Počet bází	22	21
T _m (°C)	52,49	52,66
CG (%)	50	52,4
Koncentrace (pmol/μl)	100	100

T_m = primer melting temperature, CG = procentuální zastoupení CG párů bází.

5.2 Izolace RNA a klonování *eIF4E* genu

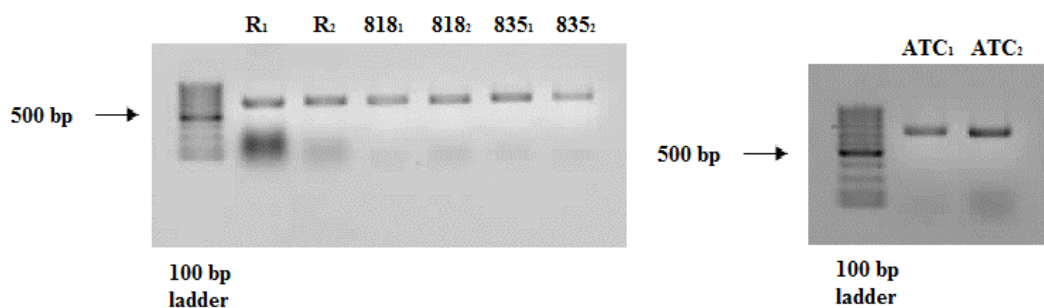
Celková RNA hrachu setého byla úspěšně izolována pomocí NucleoSpin[®] RNA Plant Kit firmy Macherey - Nagel z rostlin *Pisum sativum*. U každého genotypu byly zpracovány dva vzorky. Spektrofotometricky stanovené koncentrace izolované RNA jsou shrnuty v Tab. 27.

Tab. 27: Koncentrace izolované RNA 4 genotypů hrachu setého

Genotyp - označení vzorku	Koncentrace izolované RNA (ng/μl)	A260/A280
Raman - R ₁	397,1	2,19
Raman - R ₂	114,2	2,25
PI269818 - 818 ₁	17,6	2,16
PI269818 - 818 ₂	36,9	2,23
PI193835 - 835 ₁	28,6	2,27
PI193835 - 835 ₂	11,2	2,34
ATC6928 - ATC ₁	22,1	2,01
ATC6928 - ATC ₂	73,1	2,16

Gen *eIF4E* byl úspěšně amplifikován pomocí kitu RobusT II u všech vzorků (Tab. 27). Následná elektroforetická separace (Obr. 6) potvrdila očekávanou velikost RT-PCR produktů (687 bp).

Obr. 6: RT-PCR produktů *eIF4E* gen (Raman, PI269818, PI193835, ATC6928)



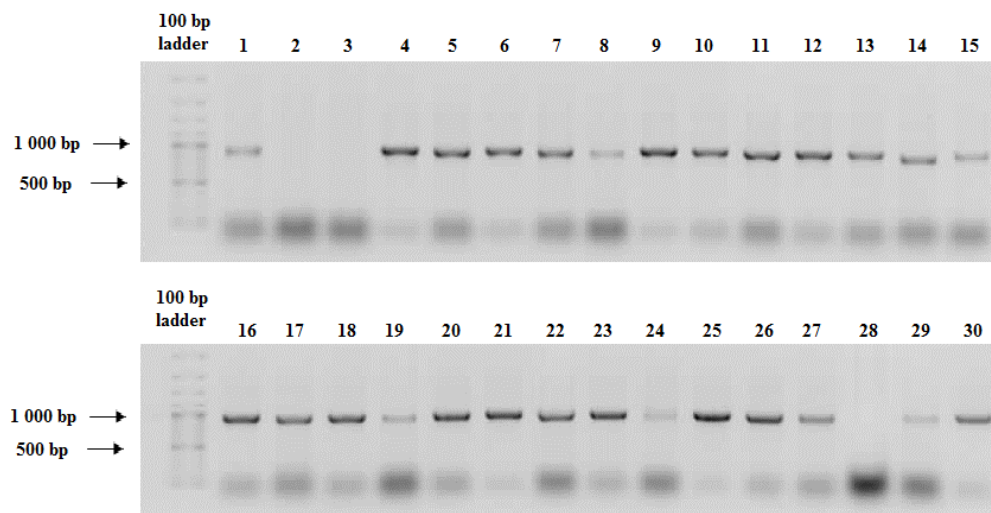
100 bp ladder = 100 bp DNA Ladder GeneRuler, Fermentas. R₁, R₂ = Raman; 818₁, 818₂ = PI269818; 835₁, 835₂ = PI193835; ATC₁ a ATC₂ = ATC6928; všechny vzorky = RT-PCR produkty amplifikované primery *eIF4E*-ATG-F a *eIF4E*-end-R. Nanášecí pufr - 6x Loading Dye, barvivo NK - GoodView.

RT-PCR produkty odpovídající genu *eIF4E* (Raman, PI269818, PI193835 a ATC6928) byly v následující práci byly klonovány do vektoru pGEM-T pro transformaci kompetentních buněk.

Kontrolní 'colony PCR' (za použití M13 primerů) byla provedena u 10 kolonií (Raman, PI269818, PI193835) a u 15 kolonií v případě genotyp ATC6928. Následná elektroforetická

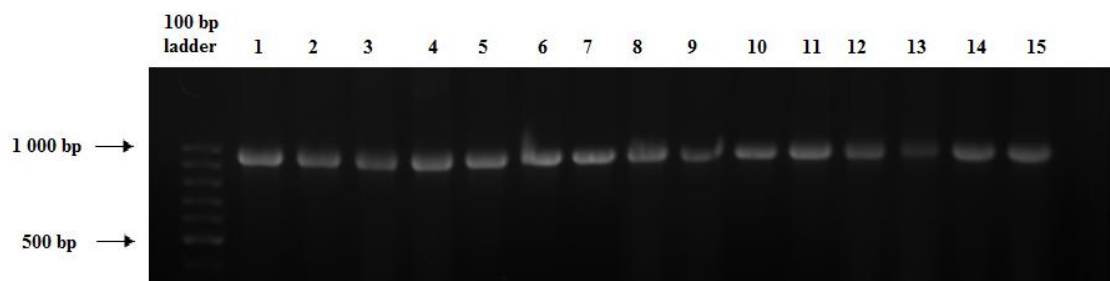
separace potvrdila očekávanou velikosti PCR produktu cca 920 bp u 8 kolonií - Raman a PI269818, u 9 kolonií - PI193835 (Obr. 7a) a u všech 15 kolonií - ATC6928 (7b).

Obr. 7a: 'Colony' PCR *eIF4E* genu (Raman, PI269818, PI193835)



100 bp ladder = 100 bp DNA Ladder GeneRuler, Fermentas. Vzorke 1 -10 = genotyp Raman, 11-20 = genotyp PI269818, vzorky 21 - 30 = genotyp PI193835. Nanášecí pufr – 6x Loading Dye, barvivo NK - GoodView.

Obr. 7b: 'Colony' PCR *eIF4E* genu (ATC6928)



100 bp ladder = 100 bp DNA Ladder GeneRuler, Fermentas. Vzorke 1 -15 = genotyp ATC6928. Nanášecí pufr -6x Loading Dye, barvivo NK - GoodView.

Kontrola ligovaných inzertů sekvenováním potvrdila jejich očekávanou velikost 924 bp (687 bp klonovaný *eIF4E* gen + 237 bp plazmid) v případě genotypu Raman, PI193835 a ATC6928 a 921 bp (684 bp klonovaný *eIF4E* gen + 237 bp plazmid) u PI269818. Mutace v klonovaných genech nebyly zaznamenány.

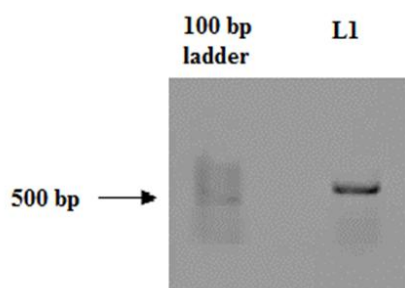
5.3 Izolace RNA a klonování VPg genu

Celková RNA z hrachu setého infikovaného PSbMV (izolát L1) byla úspěšně izolována pomocí NucleoSpin® RNA Plant Kit firmy Macherey - Nagel. Koncentrace izolované RNA byla $L1 = 89,7 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ($A260/A280 = 2,09$).

Gen *VPg* byl úspěšně amplifikován pomocí kitu RobusT II. Následná elektroforetická separace (Obr. 8) potvrdila očekávanou velikost RT-PCR produktů (642 bp).

RT-PCR produkt odpovídající genu *VPg* (L1) byl v následující práci byl klonován do vektoru pGEM-T pro transformaci kompetentních buněk.

Obr. 8: RT-PCR *VPg* gen (L1)

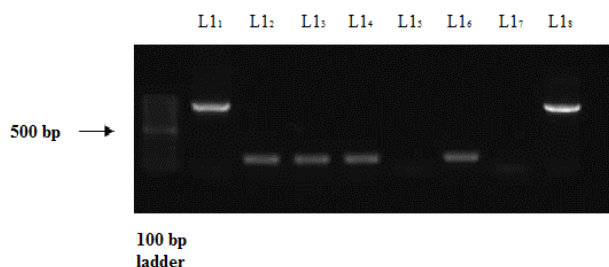


100 bp ladder = 100 bp DNA Ladder GeneRuler, Fermentas, $L1_1$ = RT-PCR produkt amplifikovaný primery PSbMV_NAT1f a PSbMV_NAT1r. Nanášecí pufr – 6x Loading Dye, barvivo NK - GoodView.

Zaklonovaný *VPg* gen PSbMV izolátu 117 byl připraven Mgr. Danou Šafařovou, Ph.D. a přidán k experimentu ve formě bílých kolonií na LB médiu.

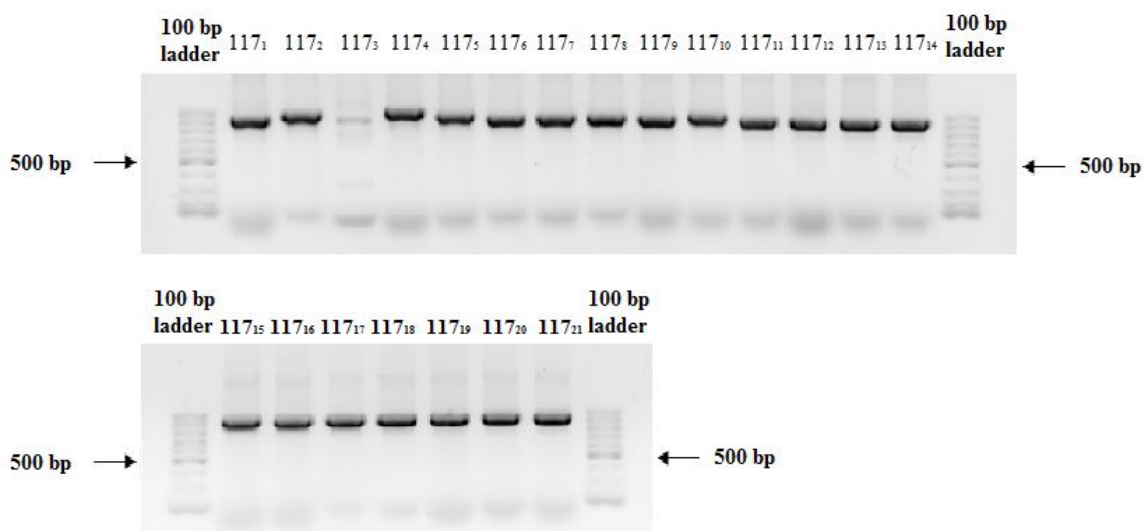
Kontrolní 'colony PCR' (za použití M13 primerů) byla provedena u 8 kolonií (L1) a 21 kolonií (117). Následná elektroforetická separace potvrdila přítomnost inzertu o očekávané velikosti (879 bp) u 2 kolonií - L1 (Obr. 9) a u všech 17 kolonií - 117 (Obr. 10).

Obr. 9: 'Colony' PCR *VPg* genu (L1)



100 bp ladder = 100 bp DNA Ladder GeneRuler, Fermentas. $L1_1 - L1_8$ = 8 vybraných bílých kolonií testovaných pomocí 'colony' PCR. Barvivo NK - GoodView.

Obr. 10: 'Colony' PCR *Vpg* genu (117)



100 bp ladder = 100 bp DNA Ladder GeneRuler, Fermentas. 117₁ - 117₂₁ = 21 vybraných bílých kolonií testovaných pomocí 'colony' PCR. Barvivo NK - GoodView.

Kontrola ligovaných inzertů sekvenováním potvrdila jejich očekávanou velikost 819 bp (582 bp klonovaný *VPg* gen + 237 bp plazmidu). Srovnáním sekvencí *VPg* genu před a po klonování pomocí programu MEGA 5.05 nebyly zjištěny žádné bodové mutace

5.4 Návrh primerů s attB sekvencí pro BP rekombinaci

Primery pro amplifikaci genu *eIF4E* a *VPg* byly navrženy tak, aby byly výsledné amplikony použitelné v BP rekombinaci.

Primery pro *eIF4E* gen byly dodány pod názvem Y2H_eIF4Ef a Y2H_eIF4Er. Primery pro *VPg* izolát 117 byly pojmenovány Y2H_PSbM117_VPGf a Y2H_PSbM117_VPGr, pro *VPg* izolátu L1 to byly primery Y2H_PSbL1_VPGf a Y2H_PSbL1_VPGr. V Tab. 28 jsou zaznamenány sekvence jednotlivých primerů.

Tab. 28: Sekvence primerů pro amplifikaci genů do BP rekombinace

Název primeru	5' - sekvence - 3'
Y2H_eIF4Ef	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAT GGT TGT AGA AGA CAC CCC CAA ATC
Y2H_eIF4Er	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TTG CTA GTT TGC TAC CAT GTA AGA ACG
Y2H_PsBm117_VPGf	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CGG GAA GTC GAA AGC TAA AAC TTT GC
Y2H_PsBm117_VPGr	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TCA CTC CGT TCG CAC ATG CT
Y2H_PsBl1_VPGf	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CGG AAA GTC GAA GGC GAA AAC ATT GC
Y2H_PsBl1_VPGr	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TCA CGA CGC TGC TTC CGT GC

Podtržené sekvence = attB sekvence (rozdílné u forward a reverse primeru).

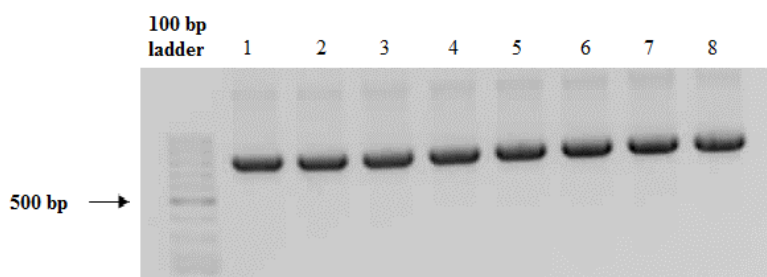
5.5 Optimalizace PCR reakce s primery s attB sekvencí

Optimální T_a při PCR s primery obsahujícími attB sekvence byla stanovena pomocí gradientové PCR. Templátovými vzorky byly izolované plazmidy (Tab. 29). Pomocí gradientové PCR byla optimální T_a stanovena na 60,9 °C (Obr. 11 a 12).

Tab. 29: Koncentrace izolovaných plazmidů pGEM-T nesoucích cílové geny

Inzert v pGEM-T plazmidu	Koncentrace (ng/μl)	A260/A280
<i>eIF4E</i> gen (genotyp Raman)	69,5	1,9
<i>eIF4E</i> gen (genotyp PI269818)	70,2	1,97
<i>eIF4E</i> gen (genotyp PI 193835)	84,7	1,9
<i>eIF4E</i> gen (genotyp ATC6928)	77,7	1,96
<i>VPg</i> gen (izolát 117)	100,3	1,91
<i>VPg</i> gen (izolát L1)	42,6	1,93

Obr. 11: Gradientová PCR *eIF4E* genu (Raman)



100 bp ladder = 100 bp DNA Ladder GeneRuler, Fermentas. Vzorky 1 = T_a 65 °C, 2 = T_a 63,4 °C, 3 = T_a 60,9 °C, 4 = T_a 57,1 °C, 5 = T_a 52,6 °C, 6 = T_a 48,8 °C, 7 = T_a 46,4 °C, 8 = T_a 45 °C. Předpokládaná velikost produktu = 787 bp. Barvivo NK - GoodView.

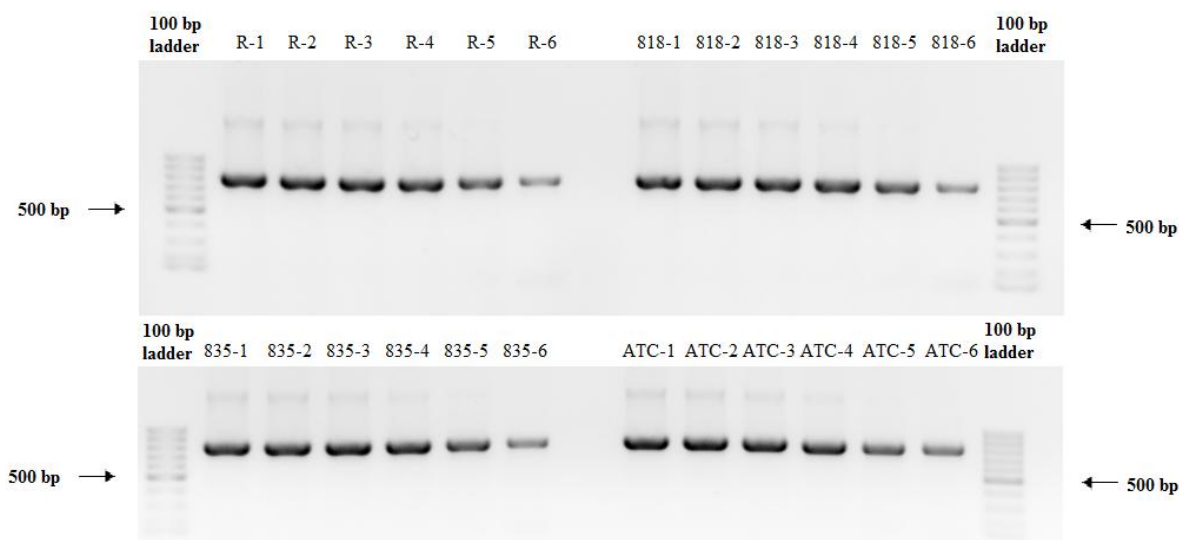
Obr. 12: Gradientová PCR *VPg* genu (L1 a 117)



100 bp ladder = 100 bp DNA Ladder GeneRuler, Fermentas. L1₁₋₈ = vzorky izolátu L1, 117₁₋₈ = vzorky izolátu 117. 1 = T_a 65 °C, 2 = T_a 63,4 °C, 3 = T_a 60,9 °C, 4 = T_a 57,1°C, 5 = T_a 52,6 °C, 6 = T_a 48,8 °C, 7 = T_a 46,4 °C, 8 = T_a 45 °C. Předpokládaná velikost produktu = 646 bp. Barvivo NK - GoodView

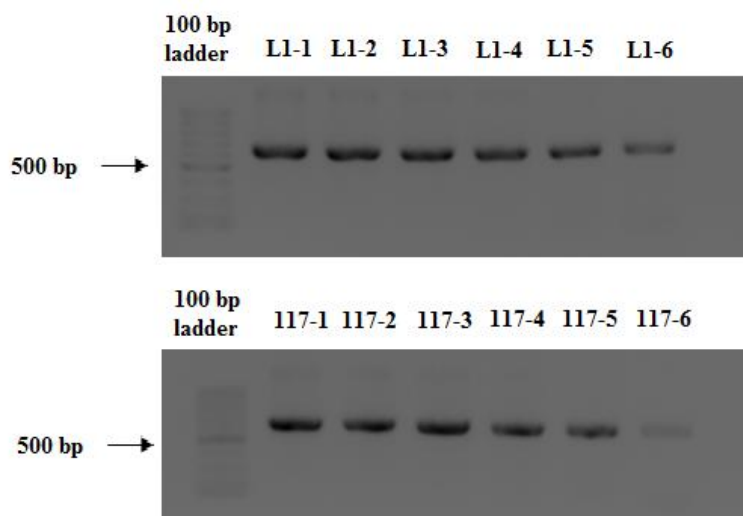
Následovala optimalizace množství templátu. Na základě výsledku elektroforetické separace (Obr. 13 a 14) byla vybrána koncentrace 10 pg/μl.

Obr. 13: Optimalizace množství templátu *eIF4E* gen (Raman) pomocí PCR



100 bp ladder = 100 bp DNA Ladder GeneRuler, Fermentas. Předpokládaná velikost produktu = 787 bp. R₁₋₆ = Raman, 818₁₋₆ = PI269818, 835₁₋₆ = PI 193835 a ATC₁₋₆ = ATC6928. 1 = 10 ng/μl, 2 = 1 ng/μl, 3 = 100 pg/μl, 4 = 10 pg/μl, 5 = 1 pg/μl, 6 = 0,1 pg/μl. Barvivo NK - GoodView.

Obr. 14: Optimalizace množství templátu *VPg* gen (L1 a 117) pomocí PCR

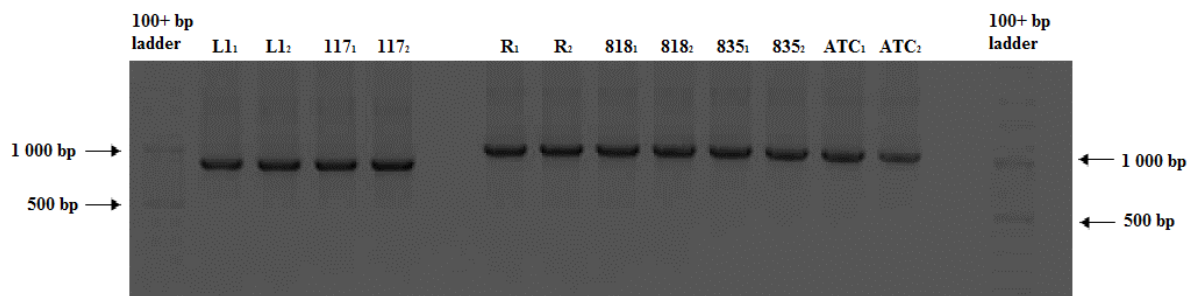


100 bp ladder = 100 bp DNA Ladder GeneRuler, Fermentas. Předpokládaná velikost produktu = 646 bp. L1₁₋₆ = izolát L1, 117₁₋₆ = izolát 117. 1 = 10 ng/μl, 2 = 1 ng/μl, 3 = 100 pg/μl, 4 = 10 pg/μl, 5 = 1 pg/μl, 6 = 0,1 pg/μl. Barvivo NK - GoodView.

5.6 BP a LR klonázová reakce

Pomocí BP rekombinace byly attB PCR produkty úspěšně zaklonovány do vektoru pDONR221, kterým byly následně transformovány bakterie. Výsledek elektroforetické separace po kontrolní PCR je na Obr. 15. Předpokládané velikosti attB PCR produktů se potvrdily (pro *eIF4E* gen - 787 bp, pro *VPg* gen - 646 bp). Ale následné výstupy ze sekvenátoru pro *VPg* gen izolátu L1 a *eIF4E* gen genotypu PI193835 byly nehodnotitelné, proto byly tyto vzorky z další práce vyřazeny.

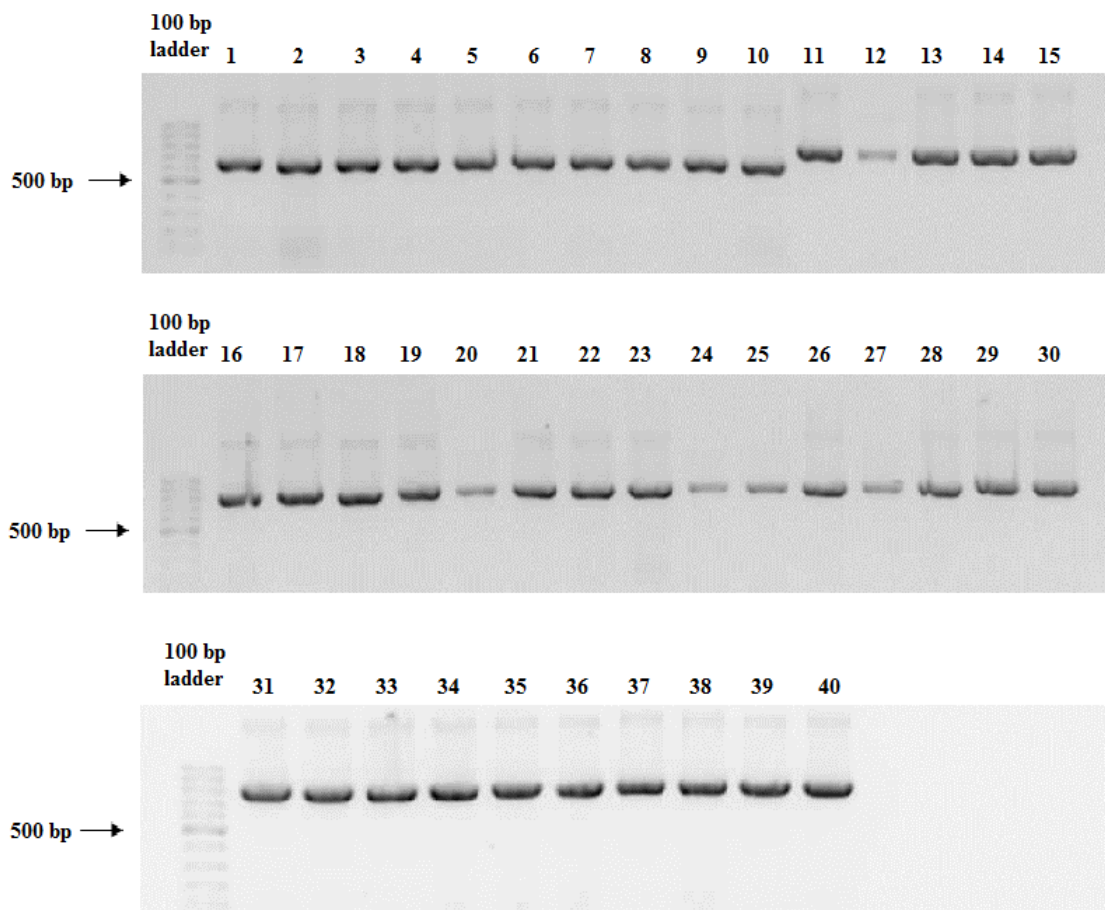
Obr. 15: Amplifikace klonovaných genů *VPg* a *eIF4E* po BP rekombinaci



100+ bp ladder = 100+ bp DNA Ladder GeneRuler, Fermentas. Izoláty L1₁₋₂ = vzorky izolátu L1, 117₁₋₂ = vzorky izolátu 117, R₁₋₂ = vzorky genotypu Raman, 818₁₋₂ = vzorky genotypu PI269818, 835₁₋₂ = vzorky genotypu PI 193835 a ATC₁₋₂ = vzorky genotypu ATC6928. Barvivo NK - GoodView, nanášecí pufr - 6x Loading Dye.

Následnou LR rekombinací došlo k úspěšnému přenosu cílových sekvencí z pDONR221 do destinačních vektorů. Výsledek elektroforetické separace po kontrolní PCR je na Obr. 16. Předpokládané velikosti attB PCR produktů se potvrdily u všech 10 testovaných vzorků izolátu 117 a ATC6928, u 8 vzorků genotypu Raman a u 7 vzorků genotypu PI269818.

Obr. 16: Amplifikace klonovaných genů *VPg* a *eIF4E* po LR rekombinaci



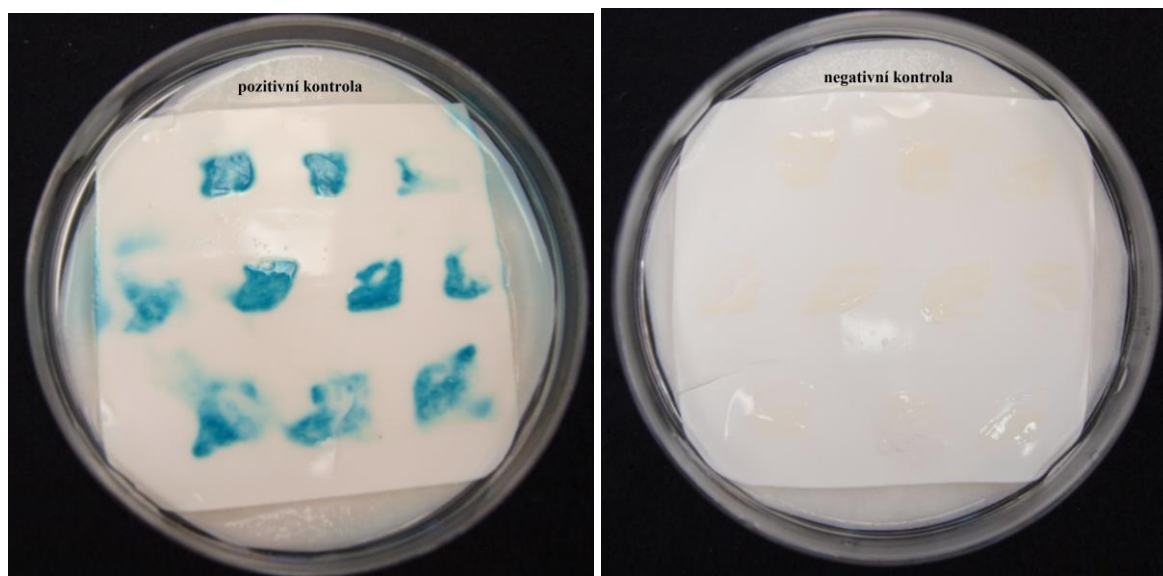
100 bp ladder = 100+ bp DNA Ladder GeneRuler, Fermentas. Vzorky (izolát/genotyp): 1 - 10 = vzorky izolátu 117, 11 - 20 = vzorky genotypu Raman, 21 - 30 = vzorky genotypu PI269818, 31 - 40 = vzorky genotypu ATC6928. Barvivo NK - GoodView.

5.7 Transformace kvasinek a charakterizace transformantů

Kvasinky MaV203 se podařilo transformovat destinačními vektory, které nesly cílové geny. U přeočkováných kvasinkových kolonií byly sledovány proteinové interakce v podobě zbarvení kolonií. U pozitivní kontroly všechny kolonie zmodraly, byla tedy potvrzena funkčnost systému. Kolonie negativní kontroly zůstaly bílé - interakce mezi proteiny

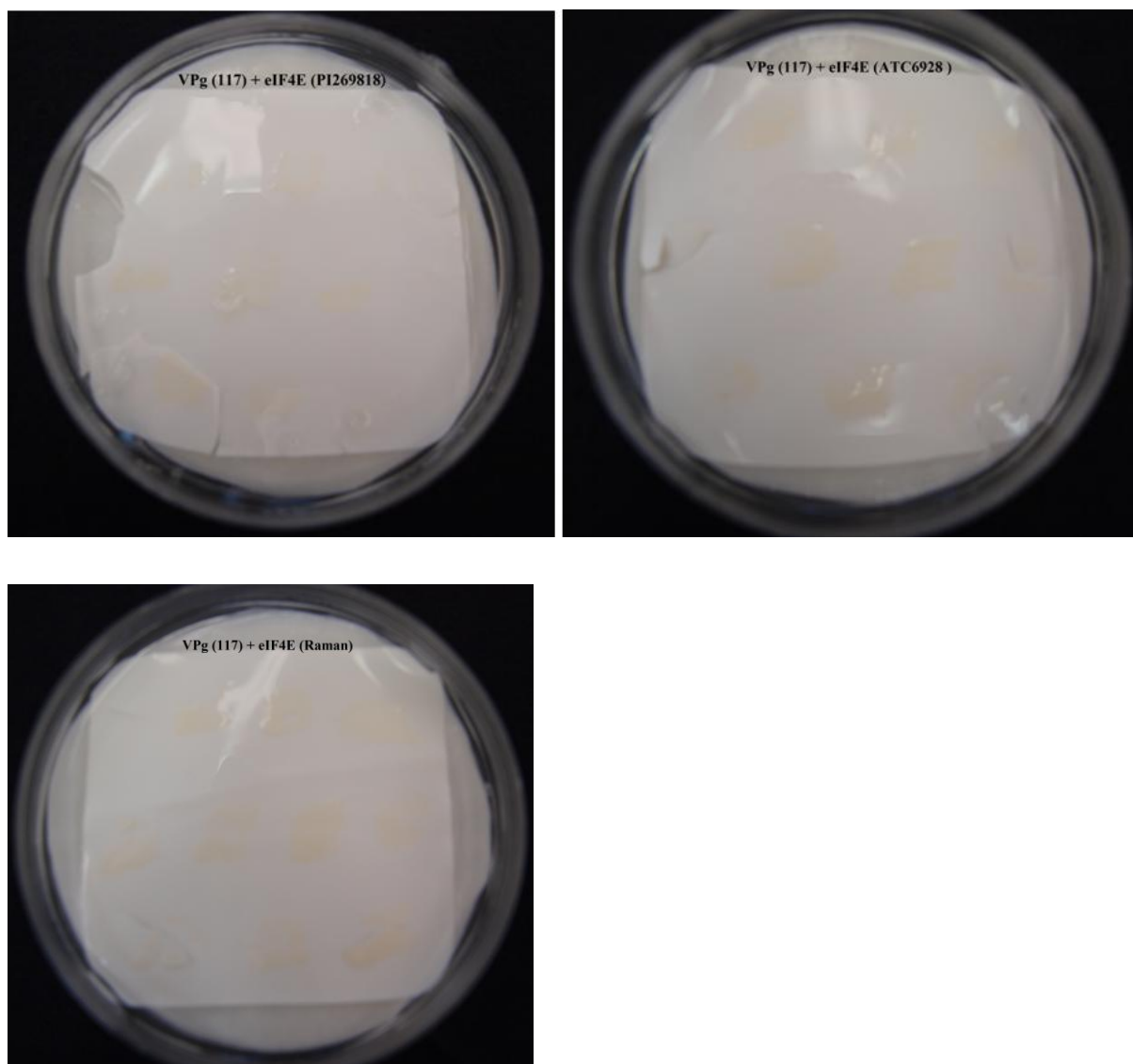
neproběhla. V případě kombinace vzorků VPg (117) + eIF4E (PI269818 a ATC6928) byly kolonie kvasinek bílé - k interakci mezi proteiny nedošlo. Potvrdilo se tak, že hrachové genotypy PI269818 a ATC6928 jsou rezistentní vůči PSbMV - 117 (patotyp P-1). Kombinace testovaných vzorků VPg (117) + eIF4E (Raman) měla vést k zmodrání kolonií, jelikož hrachy genotypu Raman jsou k PSbMV patotypu P-1 vnímavé. Interakce se ale nepotvrdila. Na Obr. 17 jsou kvasinkové kolonie nesoucí kontrolní vektory (pozitivní, negativní). Na Obr. 18 jsou kvasinkové kolonie transformované klonovacími vektory.

Obr. 17: Kvasinkové kolonie (MaV203) transformované kontrolními vektory



Pozitivní kontrola = MaV203 kvasinky transformované pEXP32/Krev1 a pEXP22/RalGDS-wt. Negativní kontrola = MaV203 kvasinky transformované pEXP32/Krev1 a pEXP22/RalGDS-m2.

Obr. 18: Kvasinkové kolonie (MaV203) transformované klonovacími vektory



VPg (117) + eIF4E (PI269818) = kvasinky MaV203 transformované pDEST22 nesoucím *VPg* gen PSbMV (117) a pDEST32 nesoucím *eIF4E* gen hrachu setého (PI269818). VPg (117) + eIF4E (ATC6928) = kvasinky MaV203 transformované pDEST22 nesoucím *VPg* gen PSbMV (117) a pDEST32 nesoucím *eIF4E* gen hrachu setého (ATC6928). VPg (117) + eIF4E (Raman) = kvasinky MaV203 transformované pDEST22 nesoucím *VPg* gen PSbMV (117) a pDEST32 nesoucím *eIF4E* gen hrachu setého (Raman).

5.8 Stanovení koncentrace viru ve vnímavých rostlinách hrachu

Cílem experimentu bylo potvrdit nebo vyvrátit rozdílnou dynamiku replikace viru ve vnímavých homozygotech a heterozygotech hrachu setého. Relativní koncentrace viru byla stanovena pomocí Q-RT-PCR. Byla vypočtena průměrná $2^{-\Delta\Delta Ct}$ pro každý termín odběru. Získaná data byla vyjádřena v procentech, která odpovídala změně koncentrace PSbMV

v průměrných vzorcích vzhledem ke kontrole, tj. relativní koncentrace viru v pletivech cv. Raman (vnímavý homozygot) 29. den po inokulaci představovala standard 100 %.

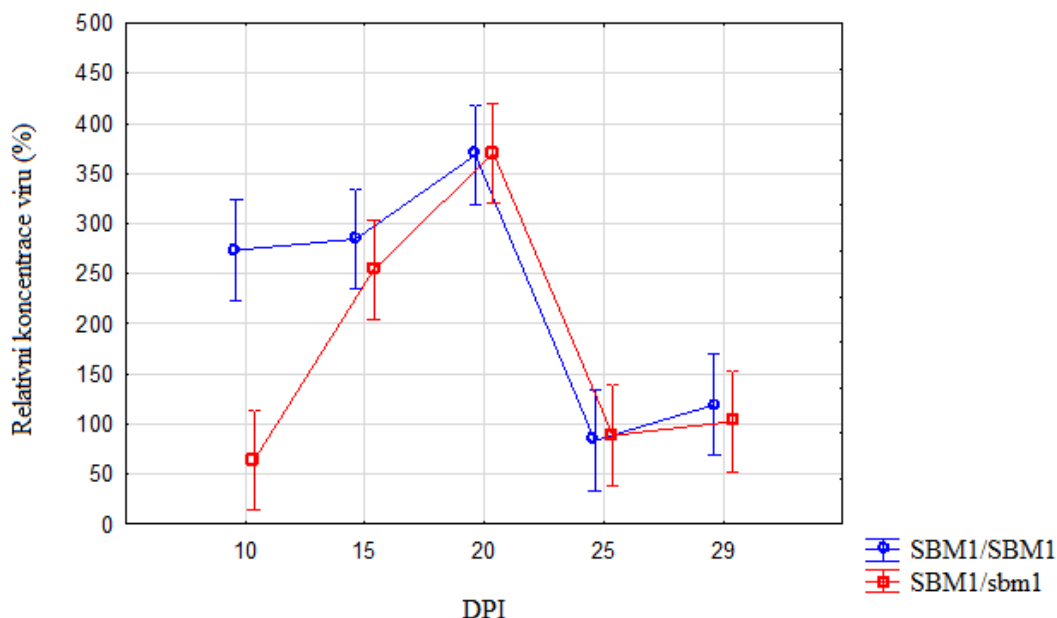
Dynamika a rozdíly v relativní koncentrace PSbMV ve vnímavých homozygotních a heterozygotních rostlinách hrachu jsou uvedeny v Tab. 30 a znázorněny grafem na Obr 19. Výsledky Tukey HSD testu jsou uvedeny v Tab. 32, statisticky průkazný rozdíl mezi srovnávanými vzorky je zvýrazněn modře.

Tab. 30: Relativní koncentrace viru ve vnímavých homozygotech a heterozygotech 10 - 20 dní po inokulaci

	<i>SBM1/SBM1</i>		<i>SBM1/sbm1</i>	
	Průměr	SMODCH. P.	Průměr	SMODCH. P.
10 DPI	273,7	225,1	64,2	24,2
15 DPI	284,7	222,4	254,1	61,7
20 DPI	368,6	248,1	370,4	132,9
25 DPI	83,7	49,4	88,9	33,9
29 DPI	119,5	102,8	102,7	42,0

DPI = počet dní po inokulaci, SBM1/SBM1 = vnímavý homozygot, SBM1/sbm1 = vnímavý heterozygot. Průměr = aritmetický průměr. SMODCH. P. = směrodatná odchylka.

Obr. 19: Dynamika relativní koncentrace PSbMV ve vnímavých homozygotních a heterozygotních rostlinách hrachu.



DPI = počet dní po inokulaci, SBM1/SBM1 = vnímavý homozygot, SBM1/sbm1 = vnímavý heterozygot. Vertikální sloupce označují +/- směrodatnou odchylku.

Vnímaví heterozygoti vykazovali 10 dní po inokulaci výrazně nižší relativní koncentraci PSbMV než vnímaví homozygoti. 15. den po inokulaci došlo k vyrovnání relativních koncentrací viru u heterozygotních a homozygotních rostlin. Od 20. dne po inokulaci byla u všech inokulovaných rostlin pozorována předčasná senescence.

U sledovaných vnímavých heterozygotů došlo mezi 10. a 20. dnem po inokulaci k statisticky průkaznému zvýšení koncentrace viru, mezi 25. a 29. dnem byl prokázán pokles koncentrace vzhledem ke stavu 20 dní po inokulaci. U homozygotních rostlin nárůst statisticky potvrzen nebyl, ale koncentrace viru průkazně poklesla stejně jako u homozygotů. Na hladině průkaznosti $p = 0,05$ nebyl prokázán rozdíl mezi koncentrací viru u homozygota a heterozygota v době 10 dní po inokulaci. Nicméně je možné pozorovat trend sblížení koncentrací viru u homozygotů a heterozygotů.

Příznaky infekce byly sledovány vždy v den odběru u obou genotypů hrachu, záznam těchto dat je v Tab. 31.

Tab. 31: Sledované příznaky infekce PSbMV u heterozygotních i homozygotních hrachů

Počet dní po inokulaci	Genotyp sledované rostliny hrachu setého	
	<i>SBM1/sbm1</i>	<i>SBM1/SBM1</i>
10	-	+
15	+	++
20	+++	+++
25	+++	+++
29	+++	+++

- = bez příznaků. + = slabé příznaky (mírná mozaika). ++ = mozaika, deformace listů. +++ = silná mozaika, deformace listů.

Tab. 32: Výstup z Tukey HSD testu

DPI	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		
	10	SBMI/SBMI	10	SBMI/sbml	15	SBMI/SBMI	15	SBMI/sbml	20	SBMI/SBMI	20	SBMI/sbml	25	SBMI/SBMI	25	SBMI/sbml	29	SBMI/SBMI	29	SBMI/sbml	
	Genotyp																				
1	10	SBMI/SBMI																			
2	10	SBMI/sbml	0,105207	0,105207	0,071397	0,071397	0,196545	0,196545	0,001917	0,001917	0,968303	0,968303	0,139642	0,139642	0,196010	0,196010	0,227761	0,227761	0,476677	0,476677	0,328020
3	15	SBMI/SBMI	1,000000	1,000000	0,071397	0,071397	0,999991	0,999991	0,972299	0,972299	0,968303	0,968303	0,139642	0,139642	1,000000	1,000000	0,999999	0,999999	0,998711	0,998711	0,999935
4	15	SBMI/sbml	1,000000	0,196545	0,999991	0,999991			0,834393	0,834393	0,999991	0,999991	0,139642	0,139642	0,196010	0,196010	0,164501	0,164501	0,376770	0,376770	0,246389
5	20	SBMI/SBMI	0,940267	0,940267	0,972299	0,972299	0,834393	0,834393	1,000000	1,000000	0,968303	0,968303	0,139642	0,139642	0,333100	0,333100	0,376780	0,376780	0,665173	0,665173	0,503564
6	20	SBMI/sbml	0,933402	0,933402	0,968303	0,968303	0,821722	0,821722	1,000000	1,000000	0,968303	0,968303	0,139642	0,139642	0,004756	0,004756	0,006038	0,006038	0,023234	0,023234	0,011260
7	25	SBMI/SBMI	0,196010	0,196010	0,139642	0,139642	0,333100	0,333100	0,004756	0,004756	0,004383	0,004383	1,000000	1,000000	0,005568	0,005568	1,000000	1,000000	0,999965	0,999965	1,000000
8	25	SBMI/sbml	0,227761	0,227761	0,999999	0,999999	0,376780	0,376780	0,006038	0,006038	0,005568	0,005568	1,000000	1,000000	0,005568	0,005568	0,999991	0,999991	0,999991	0,999991	1,000000
9	29	SBMI/SBMI	0,476677	0,476677	0,998711	0,998711	0,665173	0,665173	0,023234	0,023234	0,999965	0,999965	0,999965	0,999965	0,999965	0,999965	0,999991	0,999991	1,000000	1,000000	1,000000
10	29	SBMI/sbml	0,328020	0,328020	0,999935	0,999935	0,246389	0,246389	0,011260	0,011260	0,010414	0,010414	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000

6 DISKUZE

Rostlinný gen kódující eIF4E protein je všeobecně považován za gen rezistence vůči celé řadě potyvirov. Mezi eIF4E proteinem hostitelské rostliny a VPg proteinem navázaným na 5' konci potyvirové RNA dochází k interakci, která je nezbytná pro replikaci viru. Tento vztah je intenzivně studován u různých druhů rostlin (hrách, huseníček, salát, paprika, rajče, tabák) a potyvirov (PSbMV, TEV, TuMV, LMV, TMV, PVA, PVY) (Wittmann a kol., 1997; Léonard a kol., 2000; Schaad a kol., 2000; Kang a kol., 2005; Yeam a kol., 2007).

Pro studium interakce jsme použili VPg gen PSbMV (izolát 117) a *eIF4E* gen hrachu setého amplifikované specifickými primery obsahujícími ve své sekvenci attB rekombinační místa. Oba geny byly přeneseny klonázovými reakcemi do destinačních vektorů, kterými byly najednou transformovány kvasinky *S. cerevisiae* kmen MaV203. Selektce transformovaných kvasinek probíhala na SC médiu (- Leu, - Trp). Narostlé kolonie byly testovány X-gal testem na membránách na potvrzení spuštění exprese reportérového genu *lacZ* (ProQuest Two-Hybrid Systém - verze A, 2005). Funkčnost Y2H byla potvrzena testováním kontrol. Jako pozitivní kontrola sloužily kvasinky transformované vektory pEXP32/Krev a pEXP22/RalGDS-wt. Negativní kontrolou byly kvasinky transformované vektory pEXP32/Krev a pEXP22/RalGDS-m2. V případě kombinace testovaných proteinů VPg (117) s eIF4E rezistentních genotypů hrachu (PI269818 a ATC6928) podle předpokladů nedošlo na X-gal testu ke vzniku pozitivního výsledku - interakce mezi proteiny neproběhla. Genotypy hrachu setého PI269818 a ATC6928 jsou totiž k PSbMV P-1, kam patří i izolát 117, rezistentní. Problém nastal v případě interakce mezi VPg (117) a eIF4E proteinem hrachu genotypu Raman, který je vůči PSbMV P-1 vnímavý. Interakci se v tomto případě nepodařilo potvrdit.

Chyba v detekci interakce mezi eIF4E - Raman a VPg - 117 mohla být zapříčiněna více faktory. Například mutacemi vzniklými po LR reakci, po níž již nebyly segmenty sekvenovány. Sekvenování nebylo provedeno na základě rady pracovníků Ústavu experimentální botaniky v Olomouci, kteří taktéž sekvenování cílové sekvence provádí pouze po BP reakci. Pravděpodobnost vzniku náhodných mutací je ale v tomto kroku velmi nízká. Dalším mnohem pravděpodobnějším důvodem nepotvrzení interakce může být nízká nebo žádná exprese sledovaných proteinů v kvasinkách. Bude proto dobré zařadit do experimentu test, kde bude sledována exprese obou cílových proteinů.

Výsledky Y2H bývají často doplněny nebo potvrzovány pomocí biochemických metod. Asi nejčastěji používanými metodami je ELISA a Western blot. V případě ELISA testu musí

být cílové proteiny vyprodukovány bakteriemi *E. coli* ve formě rekombinantního proteinu, jeden z nich musí nést na svém N' - konci peptid (př. T7 tag), tato značka může být rozpoznána anti-T7 tag monoklonální protilátkou (Léonard a kol., 2000). Rekombinantní proteiny bývají purifikovány chromatograficky. Následně je ELISA destička pokryta např. VPgPro rekombinantním proteinem a poté inkubována rekombinantním eIF4E proteinem. Vytvoření komplexu mezi oběma proteiny se detekuje pomocí protilátek anti-T7 tag (Wittmann a kol., 1997; Léonard a kol., 2000; Léonard a kol., 2004). Nejčastěji užívané protilátky jsou kozí, myší nebo králičí (Wittmann a kol., 1997; Léonard a kol., 2000; Léonard a kol., 2004). Protilátky navázané na interagujících komplexech jsou rozpoznány dalšími protilátkami, které jsou konjugované s alkalickou fosfatázou nebo peroxidázou a umožňují konečnou detekci (Léonard a kol., 2000; Léonard a kol., 2004; Roudet-Tavert a kol., 2007). Jako další značka rozpoznávaná králičími protilátkami může být použita i histidinová kotva, která se používá spíše při testování ve Western blotu. Nejčastěji užívané membrány jsou nitrocelulóзовé nebo polyvinyliden difluoridové (Goodfellow a kol., 2005; Yeam a kol., 2007; Charron a kol., 2008).

Navíc v různých studiích byly k identifikaci interakcí pomocí Y2H použity odlišné kmeny kvasinek, jiné vektory i různé způsoby vnesení cílových sekvencí do vektorů (Wittmann a kol., 1997; Léonard a kol., 2000; Schaad a kol., 2000; Gao a kol., 2004; Kang a kol., 2005; Charron a kol., 2008), než které byly užity v této práci.

Nejčastěji používanými kvasinkami *S. cerevisiae* transformovanými v dvouhybridním systému je kmen EGY48 (MATa, his3, trp1, ura3, LexA - operator - LEU2). Nejvíce využívanými plazmidy, kterými jsou kvasinky transformovány, jsou pEG202 a pJG4-5. Vektor pEG202 bývá použit k propojení 'bait' proteinu s DNA vazebnou doménou LexA. Cílový gen do něj bývá vložen pomocí dvou nukleáz. Produkty amplifikované primery s attB místy a pEG202 jsou štípány BamHI a XhoI nukleázou a následně je provedena ligace. Vektor pJG4-5 je užíván k expresi cDNA knihovny, ve své sekvenci nese GAL1 inducibilní promotor, NLS (nuclear localization signal) SV40, aktivační doménu B42 a sekvenci pro hemaglutininový epitop.

Výše popsané kvasinky a plazmidy použil například S. Wittmann, který v roce 1997 potvrdil poprvé interakci mezi VPg proteinem TuMV a rostlinným eIF4E proteinem právě pomocí kvasinkového dvouhybridního systému. Využil Y2H k identifikaci interakcí mezi VPg viru mozaiky řepy a proteiny z cDNA knihovny modelové rostliny *A. thaliana*. Kvasinky EGY48 byly nejprve transformovány pEG202 vektorem s inzertovaným genem

pro VPgPro společně s plazmidem pSH18-34 nesoucím *lacZ* reportérový gen. Následovalo potvrzení stabilní exprese proteinu pomocí imunoblotu, bylo využito anti-TuMV VPgPro králičí sérum. Dalším krokem byly testování aktivace a represe, aby bylo potvrzeno, že vzniklý fúzní protein sám o sobě neaktivuje reportérový gen a že je lokalizován v jádře. Takto připravené a otestované kvasinky byly transformovány znovu a to cDNA knihovnou *A. thaliana*, která byla vložena do pGJ4-5. Kvasinky byly selektovány na médiu bez histidinu, tryptofanu a uracilu. Narostlé kolonie byly smíchány a selektovány znovu na médiu bez histidinu, tryptofanu, uracilu a leucinu. Vyselektované kolonie byly otestovány na β -galactosidázovou aktivitu. Z pozitivních kolonií byly izolovány plazmidy pJG4-5. Těmito plazmidy byly opět transformovány kvasinky, došlo tak k redukci počtu testovaných klonů na čtyři. Pomocí programu BLAST byly porovnány sekvence těchto klonů. Jeden z klonů (pSW56) vykazoval homologii s eIF4E proteinem pocházejícím z mnoha různých organismů. Příma asociace mezi proteiny byla nakonec ještě potvrzena ELISA testem (Wittmann a kol., 1997). Stejný biologický materiál byl použit i pro identifikaci interakcí mezi VPg (TuMV) a eIF(iso)4E pšenice seté *Triticum aestivum*, kdy byla mapována interakční doména VPg proteinu (Léonard a kol., 2000). Některým autorům se potvrdit interakci mezi VPg TuMV a eIF4E proteinem *A. thaliana* pomocí kvasinkového dvouhybridního systému nepodařilo (Gao a kol., 2004). Totožným způsobem, jako použil Wittmann, byla identifikována interakce mezi NIa^{HAT} proteinem TEV a eIF4E rajčete *Lycopersicon esculentum* cv. VF36 (Schaad a kol., 2000). Identifikována byla i interakce mezi eIF4E proteinem papriky *Capsicum* spp., který je kódován *pvr1* alelou, a VPg proteinem různých izolátů TEV (Kang a kol., 2005; Yeam a kol., 2007). Po identifikaci v Y2H byl proveden test k potvrzení interakce na glutation-agarózových kuličkách (Kang a kol., 2005).

Dalším možným způsobem, jak pracovat s Y2H je podle The Matchmaker GAL4 two-hybrid system 3 (Clontech), postup je popsán v Clontech Yeast Protocol Handbook. V tomto případě jsou použity plazmidy pGADT7 a pGBKT7, kterými jsou transformovány kvasinky kmene AH109 (*MAT α* , *trp 1-901*, *leu2-3*, *112*, *ura3-52*, *his3- 200*, $\Delta gal4$, $\Delta gal80$, *LYS2: GAL1UAS - GAL1TATA-HIS3*, *GAL2UAS - GAL2TATA-ADE2*, *URA3: MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ*) nebo Y187 (*MAT α* , *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*, *leu2-3*, *112*, *gal4 Δ* , *met-*, *gal80 Δ* , *URA3::GAL1UAS-GAL1TATA-lacZ*). U *S. cerevisiae* AH109 se využívá 3 reportérových genů (*ADE2*, *HIS3* a *lacZ*), které mohou snížit možnost vzniku falešných pozitivit. Kmen Y187 nese pouze *lacZ* reportérový gen. Vektor pGADT7 slouží ke spojení AD s knihovnou testovaných klonů, kóduje gen pro epitop HA (hemaglutinin), nese gen

rezistence k ampicilinu (pro práci v bakteriích) a kóduje gen *LEU2* pro selekci v kvasinkách. Vektor GBKT7 spojuje DBD s 'bait' proteinem, kóduje gen pro epitop c-Myc, nese gen rezistence ke kanamycinu (pro práci v bakteriích) a kóduje gen *TRP1* pro selekci v kvasinkách. Tento systém byl použit při identifikaci interakce mezi eIF4E papriky a VPg proteinem PVY a TEV (Charron a kol., 2008).

Proteinové interakce je možné taktéž detekovat v bakteriálním dvouhybridním systému (BACTH System Kit - Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid System).

Hlavní výhodou použití dvouhybridního kvasinkového systému je především možnost testovat velké množství proteinů pomocí relativně jednoduchého experimentu. Navíc experiment probíhá *in vivo*, kde nedochází k ovlivnění umělými podmínkami jako u *in vitro* metod. Můžeme testovat a charakterizovat širokou škálu proteinových interakcí pomocí jediného běžně užívaného protokolu. Samozřejmě má tento systém i svá omezení. Problémem může být vznik falešných pozitivitních nebo negativních výsledků. Během let byl Y2H modifikován tak, aby byla silně redukována možnost vzniku falešných výsledků na minimum. Například byla snížena úroveň exprese cílových proteinů použitím kvasinkových centromerických vektorů, jejichž počet v buňce je nízký ('low copy number'). Navíc je využíváno většího počtu reportérových genů. A tím, že se užívá rozmnožování kvasinek ('mating strategy'), je umožněn skrining mnoha různých proteinů za reprodukovatelných podmínek (Vidal a kol., 1999).

V další části práce byly detekovány změny v relativní koncentraci PSbMV (117) v průběhu času. Rozdíly byly sledovány mezi vnímavými homozygotními a heterozygotními rostlinami hrachu setého, které byly infikovány PSbMV (izolát 117). Maximální koncentrace PSbMV u vnímavých homozygotů bylo dosaženo 20. den po inokulaci. Rozdíly v replikaci viru u vnímavých homozygotů a heterozygotů doposud nebyla studována.

Bylo publikováno velmi malé množství prací, které jednoznačně sledovaly změny koncentrace viru v závislosti na čase. Pomocí kvantitativní RT-PCR (PrimeScript RT-PCR kit II) byl ale například sledován počet virem (TEV) infikovaných buněk hostitele (*N. tabacum*) v jednotlivých listech. Nejvyšší frekvence infikovaných buněk bylo dosaženo 10 dní po inokulaci (Tomas a kol., 2014). Data z Q-RT-PCR (pomocí SYBR Green PCR Master Mix) byla využita i k monitorování a kvantifikaci YDV ve vnímavých (8138) a rezistentních (P29) liniích pšenice. Rozdíly mezi nimi byly jasné ve všech sledovaných dnech po inokulaci. Nejvyšší koncentrace sledovaného viru byla detekována mezi 7. a 14. dnem po inokulaci (Balaji a kol., 2003). Také byla sledována akumulace (+) a (-) vláken RNA TuMV

v protoplastech infikovaných rostlin *N. benthamiana*. Byla identifikována spojitost mezi počtem dní po inokulaci a počtem molekul vláken RNA na 100 ng celkové RNA. Počet molekul RNA narůstá během 20 hodin po infekci protoplastu do téměř nejvyšší hodnoty. Maxima pak nabývá kolem 40. hodiny po infekci (Martínez a kol., 2011).

Pro statistickou analýzu byl použit program STATISTICA 12 založený na Tukey testu, který je řazen mezi konzervativní testy. Pokud by byl k analýze rozptylu použit liberálnější, tedy méně přísný, test (Fischerův, Duncanův), bylo by možné prokázat statistické rozdíly. Při užití Duncanova testu s $p = 0,1$ je možné statisticky potvrdit rozdíl mezi koncentrací viru u homozygota a heterozygota 10 dní po inokulaci, stejně tak by byl potvrzen nárůst koncentrace viru mezi 10. a 20. dnem po inokulaci u homozygotů. Pokles koncentrace potvrzený u obou genotypů byl vyvolán stářím rostliny a rozvojem infekce.

7 ZÁVĚR

Interakce cílových proteinů byly testovány v dvouhybridním kvasinkovém systému. Sekvence *VPg* genu PSbMV (117) a *eIF4E* genu hrachu setého (Raman, PI269818, ATC6928) byly amplifikovány specifickými primery s attB rekombinačním místem a následnou BP a LR klonázovou reakcí byly vneseny do destinačních vektorů pDEST. Kvasinky *S. cerevisiae* kmen MaV203 byly transformovány připravenými destinačními vektory, následně byli transformanti charakterizováni testem 'X-gal assay'.

Funkčnost systému byla nejprve ověřena transformací kvasinek kontrolními vektory, následovala transformace cílovými geny. V případě transformace kvasinek kombinací vektorů nesoucích geny *VPg* - PSbMV izolát 117 a *eIF4E* hrachu setého - genotyp PI269818 a nebo ATC6928 nebyla potvrzena interakce mezi exprimovanými cílovými proteiny, což koresponduje s faktem, že oba tyto genotypy hrachu setého jsou k PSbMV (P-1) rezistentní. Interakce proteinů *VPg* - PSbMV izolátu 117 a *eIF4E* hrachu genotyp Raman potvrzena nebyla. S největší pravděpodobností se jedná o falešný negativní výsledek.

Relativní koncentrace PSbMV ve vnímavých homozygotech hrachu setého genotyp Raman (*SBMI/SBMI*) a vnímavých heterozygotech hrachu setého Raman x B99 (*SBMI/sbm1*) byla stanovena metodou Q-RT-PCR. Desátý den po inokulaci rostlin virem byl sledován rozdíl v koncentraci viru, pozdější odběrové dny již rozdíl nenaznačují.

Statisticky průkazný (Tukey test, $p = 0,05$) byl nárůst koncentrace viru u vnímavých heterozygotů mezi 10. a 20. dnem po inokulaci a pokles koncentrace mezi 25. a 29. dnem u heterozygotů i homozygotů. Výsledky jsou součástí dosud nepublikovaného výzkumu.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

AK	aminokyselina
Amp	Ampicilin
ATP	adenosintrifosfát
BFM	bromfenolová modř
bp	páry bází
C - C doména	coiled - coil doména (vinutá cívka)
CC/SC	sekvence AK cystein - cystein/serin - cystein
CI	Cytoplasmic Inclusion Protein
CMV	virus mozaiky okurek (<i>Cucumber mosaic virus</i>)
CP	Coat Protein
DAG	sekvence AK kyselina asparagová - alanin – glycin
DEPC	dietyl pyrokarbonát
DMF	dimetylformamid
DMSO	dimetylsulfoxid
DPI	počet dní po inokulaci
eIF4E	eukaryotický translační iniciační faktor 4E (eukaryotic translation initiation factor 4E)
ELFO	elektroforetická separace
ELISA	enzymimunoanalýza (enzyme-linked immunosorbent assay)
ER	endoplazmatické retikulum
FP	forward primer
GDD	sekvence AK glycin - kyselina asparagová - kyselina aspartová
HA	hemaglutinin
HC-Pro	Helper Component Proteinase
HSP	heat shock protein

IGN	sekvence AK izoleucin – glycin – asparagin
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactopyranozid
KITC	sekvence AK lysin - izoleucin/leucin - threonin/serin - cystein
kb	kilobáze
LMV	virus mozaiky salátu (<i>Lettuce mosaic virus</i>)
LRR	repetice bohatá na leucin (leucine - rich repeat)
M-MuLV	Moloney Murine Leukemia Virus
NBS	nukleotid vazebné místo (nucleotide binding site)
NIa	Nuclear Inclusion Protein A
NIb	Nuclear Inclusion Protein B
NK	nukleová kyselina
NLS	jaderný lokalizační signál
nt	nukleotid
NTP	nukleosidtrifosfát
P-1, P-2, P-3, P-4	patotypy 1 - 4 PSbMV
P1	proteináza P1
P3	proteináza P3
PIPO	nově objevený protein potyvírů
polyA	polyadenylovaná sekvence
PPV	virus šarky švestky (<i>Plum pox virus</i>)
PSbMV	virus semenem přenosné mozaiky hrachu (<i>Pea seed-borne mosaic virus</i>)
PTGS	postranskripční umlčování genů (posttranscriptional gene silencing)
PTK	sekvence AK prolin - threonin - lysin
PVA	A virus brambor (<i>Potato virus A</i>)
PVMV	<i>Potato vein mottling virus</i>

PVX	X virus brambor (<i>Potato virus X</i>)
PVY	Y virus brambor (<i>Potato virus Y</i>)
Q-RT-PCR	kvantitativní RT-PCR
RdRp	RNA dependentní RNA polymeráza
RNA	ribonukleová kyselina
RP	reverse primer
RT	reverzní transkripce/transkriptáza
RYMV	<i>Rice yellow mottle virus</i>
STK	serin/threonin kinázová doména
TCV	<i>Turnip circle virus</i>
TEV	virus tabákové mozaiky (<i>Tobacco etch virus</i>)
TIR1	Toll - interleukin - 1 receptor
T _m	primer melting temperature
TMV	virus mozaiky tabáku (<i>Tobacco mosaic virus</i>), virus mozaiky rajčat (<i>Tomato mosaic virus</i>)
TuMV	virus mozaiky řepy (<i>Turnip mosaic virus</i>)
UAS	'upstream activating sequence'
VPg	Viral Genome - Linked Protein
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranozid
YDV	<i>Yellow dwarf virus</i>
Y2H	dvouhybridní kvasinkový systém
ZYMV	virus žluté mozaiky cukety (<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>)
6K ₁	6 kDa proteinase 1
6K ₂	6 kDa proteinase 2

9 SEZNAM LITERATURY

- Aapola, A.A., Knesek, J.E., Mink, G.I. (1974): The influence of inoculation procedure on the host range of pea seed-borne mosaic virus. *Phytopathology* 64:1003-1006.
- Alconero, R., Provvidenti, R., Gonsalves, D. (1986): Three pea seedborne mosaic virus pathotypes from pea and lentil germ plasm. *Plant Disease* 70:783-786.
- Anderson, K., Johansen, I.E. (1998): A single conserved amino acid in the coat protein of pea seed-borne mosaic potyvirus modulates the ability of the virus to move systemically in *Chenopodium quinoa*. *Virology* 241:304-311.
- Ashby, J.A., Stevenson, C.E.M., Jarvis, G.E., Lawson, D.M., Maule, A.J. (2011): Structure-based mutational analysis of eIF4E in relation to sbm1 resistance to Pea seed-borne mosaic virus in pea. *PlosOne* 6(1):e15873.
- Bartel, P.L., Fields, S. (1997): úprava knihy: The yeast two-hybrid system. Oxford University Press, Inc. NY.
- Balaji, B., Bucholtz, D.B., Anderson, J.M. (2003): Barley yellow dwarf virus and Cereal yellow dwarf virus quantification by real-time polymerase chain reaction in resistant and susceptible plants. *Phytopathology* 93(11):1386-1392.
- Bendahmane, A., Kanyuka, K., Baulcombe, D.C. (1999): The Rx gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell* 11:781-792.
- Blair, W.S., Nguyen, J.H.C., Parsley, T.B., Semler, B.L. (1996): Mutations in the poliovirus 3CD proteinase S1-specificity pocket affect substrate recognition and RNA binding. *Virology* 218:1-13.
- Blanc, S., López-Moya, J.J., Wang, R., García-Lampasona, S., Thornbury, D.W., Pirone, T.P. (1997): A specific interaction between coat protein and helper component correlates with aphid transmission of a potyvirus. *Virology* 231:141-147.
- Blanc, S., Ammar, E.D., García-Lampasona, S., Dolja, V.V., Llave, C., Barker, J., Pirone, T.P. (1998): Mutations in the potyvirus helper component protein: effects on interaction with virions and aphid stylets. *Journal of General Virology* 79:3119-3122.
- Bogdanove A. (2002): Pto update: recent progress on an ancient plant defense response signaling pathway. *Molecular Plant Pathology* 3:283-288.
- Bos, L. (1970): The identification of three new viruses isolated from *Wisteria* and *Pisum* in the Netherlands and the problem of variation within potato virus Y group. Netherlands *Journal of Plant Pathology* 76:8-46.

- Brommonschenkel, S.H., Frary, A., Tanksley, S.D. (2000): The broad-spectrum tospovirus resistance gene Sw-5 of tomato is a homolog of the root-knot nematode resistance gene Mi. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13:1130-1138.
- Carrington, J.C., Dougherty, W.G. (1988): A viral cleavage site cassette: identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 85:3391-3395.
- 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.
- Carrington, J.C., Kasschau, K.D., Mahajan, S.K., Schaad, M.C. (1996): Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *Plant Cell* 8:1669-1681.
- Charron, C., Nicolai, M., Gallois, J.-L., Robaglia, C., Moury, B., Palloix, A., Caranta, C. (2008): Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg. *Plant Journal* 54:56-58.
- Chisholm, S.T., Mahajan, S.K., Whitham, S.A., Yamamoto, M.L., Carrington, J.C. (2000): Cloning of the *Arabidopsis* RTM1 gene, which controls restriction of long-distance movement of *Tobacco etch virus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97:789-494.
- Chung, B.Y.-W., Miller, W.A., Atkins, J.F., Firth, A.E. (2008): An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proceedings of National Academy of Sciences* 105(15):5897-5902.
- Cronin, S., Verchot, J., Haldeman-Cahill, R., Schaad, M.C., Carrington, J.C. (1995): Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. *Plant Cell* 7:549-559.
- Dangl, J.L., Jones, J.D.G. (2003): Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411:826-833.
- Die, V.J., Román, B., Nadal, S., González-Verdejo, C.I. (2010): Evaluation of candidate reference genes for expression studies in *Pisum sativum* under different experimental conditions. *Planta* 232:145-153.
- Dinesh-Kumar, S.P., Tham, W.H., Barker, B.J. (2000): Structure-function analysis of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97:14789-14794.

- Dixon, M.S., Jones, D.A., Keddie, J.S., Thomas, C.M., Harrison, K., Jones, J.D.G. (1996): The tomato *Cf-2* disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. *Cell* 84:451-459.
- Dodds, P., Lawrence, G., Ellis, J. (2001): Six amino acid changes confined to the leucine-rich repeat beta-strand/beta-turn motif determine the difference between the P and P2 rust resistance specificities in flax. *Plant Cell* 13:163-178.
- Dolja, V.V., Haldeman, R., Robertson, N.L., Dougherty, W.G., Carrington, J.C. (1994): Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of Tobacco etch potyvirus in plants. *EMBO Journal* 13:1482-1491.
- Fernández, A., Laín, S., García, J.A. (1995): RNA helicase activity of the plum pox potyvirus CI protein expressed in *Escherichia coli*. Mapping of an RNA binding domain. *Nucleic Acids Research* 23:1327-1332.
- Fernández, A., García, J.A. (1996): The RNA helicase CI from plum pox potyvirus has two regions involved in binding to RNA. *FEBS Letters* 388:206-210.
- Fernández, A., Guo, H.S., Sáenz, P., Simón-Buela, L., Gómez de Cedrón, M., García, J.A. (1997): The motif V of plum pox potyvirus CI RNA helicase is involved in NTP hydrolysis and is essential for virus RNA replication. *Nucleic Acids Research* 25:4474-7780.
- Gao, Z., Johansen, E., Evers, S., Thomas, C.L., Ellis, T.H.N., Maule, A.J. (2004): The potyvirus resistance gene, *sbm1*, identifies a novel role for translation initiation factor eIF4E in cell to cell trafficking. *Plant Journal* 40:376-385.
- Goodfellow, I., Chaudhry, Y., Gioldasi, I., Gerondopoulos, A., Natoni, A., Labrie, L., Laliberté, J.-F., Roberts, L. (2005): Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF4E. *EMBO reports* 6(10):968-972.
- Guo, D., Merits, A., Saarma, M. (1999): Self-association and mapping of interaction domains of helper component proteinase of potato A potyvirus. *Journal of General Virology* 80:1127-1131.
- Hagedron, D.J., Gritton, E.T. (1973): Inheritance of resistance to the pea seed-borne mosaic virus. *Phytopathology* 63:1130-1131.
- Hajimorad, M.R., Ding, X.S., Flasiński, S., Mahajan, S., Graff, E., Haldeman-Cahill, R., Carrington, J.C., Cassidy, B.G. (1996): NIa and NIb of peanut stripe potyvirus are present in the nucleus of infected cells, but do not form inclusions. *Virology* 224:368-379.

- Hammond-Kosack, K.E., Parker, J.E. (2003): Deciphering plant – pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology* 14:177-193.
- Harrison, B.D., Robinson, D.J. (1988): Molecular variation in vector-borne plant viruses: epidemiological significance. *Philosophical Transactions of Royal Society London Biological Science* 321:447-762.
- Hayes, A.J., Jeong, S.C., Gore, M.A., Yu, Y.G., Buss, G.R., Tolin, S.A., Saghai Maroof, M.A. (2004): Recombination within a nucleotide-binding-site/Leucine-rich-repeat gene cluster produces new variants conditioning resistance to *Soybean mosaic virus* in soybeans. *Genetics* 166:493-503.
- Hong, Y., Levay, K., Murphy, J.F., Klein, P.G., Shaw, J.G., Hunt, A.G. (1995): A potyvirus polymerase interacts with the viral coat protein and VPg in the yeast cells. *Virology* 214:159-166.
- Hong, Y., Hunt, A.G. (1996): RNA polymerase activity catalyzed by a potyvirus-encoded RNA-dependent RNA-polymerase. *Virology* 226:146-151.
- Inouye, T. (1967): A seed-borne mosaic virus of pea. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 33:38-42.
- Johansen, I.E., Rasmussen, O.F., Heide, M., Borkhardt, B. (1991): The complete nucleotide sequence of pea seed-borne mosaic virus RNA. *Journal of General Virology* 72:2625-2632.
- Kang, B.C., Yeam, I., Frantz, J.D., Murphy, J.F., Jahn, M.M. (2005): The *pvr1* locus in *Capsicum* encodes a translation initiation factor eIF4E that interacts with *Tobacco etch virus* VPg. *Plant Journal* 42:392-405.
- Kasschau, K.D., Carrington, J.C. (1998): A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95:461-470.
- Keller, K.E., Johansen, I.E., Martin, R.R., Hampton, R.O. (1998): Potyvirus genome-linked protein (VPg) determines pea seed-borne mosaic virus pathotype-specific virulence in *Pisum sativum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11:124-130.
- Kim, Y.J., Lin, N.C., Martin, G.B. (2002): Two distinct *Pseudomonas* effector proteins interact with the Pto kinase and activate plant immunity. *Cell* 109:589-598.
- Klein, P.G., Klein, R.R., Rodríguez-Cezero, E., Hunt, A.G., Shaw, J.G. (1994): Mutational analysis of the tobacco vein mottling virus genome. *Virology* 204:759-769.

- Lain, S., Reichmann, J.L., García, J.A. (1990): RNA helicase: a novel activity associated with a protein encoded by a positive strand RNA virus. *Nucleic Acids Research* 18:7003-7006.
- 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.
- Léonard, S., Plante, D., Wittmann, S., Daigneault, N., Fortin, M.G., Laliberté, J.-F. (2000): Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor eIF4E correlates with virus infectivity. *Journal of Virology* 74(17):7730-7737.
- Léonard, S., Viel, C., Beauchemin, C., Daigneault, N., Fortin, M.G., Laliberté, J.-F. (2004): Interaction of VPg-Pro of *Turnip mosaic virus* with the translation initiation factor 4E and the poly(A)-binding protein in *planta*. *Journal of General Virology* 85:1055-1063.
- Liu, G.Z., Pi, L.Y., Walker, J.C., Ronald, P.C., Song, W.Y. (2002): Biochemical characterization of the kinase domain of the rice dinase resistance receptor-like kinase Xa21. *The Journal of Biological Chemistry* 277:20264-20269.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25 (4):402-408.
- Martin, M.T., Garcia, J.A., Cervera, M.T., Goldbach, R.W., Van-Lent, J.W.M. (1992): Intracellular localization of three non-structural plum pox potyvirus proteins by immunogold labelling. *Virus Research* 25:201-211.
- Martin, G.B., Brommonschenkel, S.H., Chunwongse, J., Frary, A., Ganai, M.W., Spivey, R., Wu, T., Earle, E.D., Tanksley, S.D. (1993): Map-based cloning of a protein kinase gene conferring dinase resistance in tomato. *Science* 262:1432-1436.
- Martínez, F., Sardanyés, J., Elena, S.F., Darós, J.-A. (2011): Dynamics of a plant RNA virus intracellular accumulation: stamping machine vs. geometric replication. *Genetics* 188:637-646.
- Maule, A.J., Caranta, C., Boulton, M.I. (2007): Sources of natural resistance to plant viruses: status and prospects. *Molecular Plant Pathology* 8(2):223-231.
- Merits, A., Guo, D., Saarma, M. (1998): VPg, coat protein and five non-structural proteins of potato A potyvirus bind RNA in a sequence-unspecific manner. *Journal of General Virology* 79:3123-3127.
- Merits, A., Ramajaki, M.L., Lindholm, P., Runeberg-Roos, P., Kekarainen, T., Puustinen, P., Makelainen, K., Valkonen, J.P.T., Saarma, M. (2002): Proteolytic processing

- of potyviral proteins and polyprotein processing intermediates in insect and plant cells. *Journal of General Virology* 83:1211-1221.
- Meyers, B.C., Dickerman, A.W., Michelmore, R., W., Sivaramakrishnan, S., Sobral, B., W., Young, N.,D. (1999): Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant Journal* 20:317-332.
- Mink, G.I., Kraft, J., Knesek, J., Jafri, A. (1969): A seed-borne virus of pea. *Phytopathology* 59:1342-1343.
- Mink, G.I., Inouye, T., Hampton, R.O., Knesek, J.E. (1974): Relationships among isolates of Pea seed-borne mosaic virus from the United States to Japan. *Phytopathology* 64:569-570.
- Moury, B., Morel, C., Johansen, E., Guilbaud, L., Souche, S., Ayme, V., Caranta, C., Palloix, A., Jacquemond, M. (2004): Mutations in *Potato virus Y* genome-linked protein determine virulence toward recessive resistances in *Capsicum Annuum* and *Lycopersicon hirsutum*. *Molecular Plant Microbe Interaction* 17:322-329.
- Murphy, J.F., Klein, P.G., Hunt, A.G., Shaw, J.G. (1996): Replacement of the tyrosine residue that links a potyviral VPg to the viral RNA in lethal. *Virology* 220:535-538.
- Musil, M., (1966): Uber das Vorkommen des Virus des Blattrollens der Erbse in der Slowakei. *Biologia* 21:133-138.
- Olsen, B. S., Johansen, I.E. (2001): Nucleotide sequence and infectious cDNA clone of the L1 isolate of *Pea seed-borne mosaic potyvirus*. *Archives of Virology* 146:15-25.
- Peng, Y.-H., Kadoury, D., Gal-On, A., Huet, H., Wang, Y., Raccach, B. (1998): Mutations in the HC-Pro gene of zucchini yellow mosaic potyvirus: effects on aphid transmission and binding to purified virions. *Journal of General Virology* 79:897-904.
- Plochocka, D., Welnicki, M., Zielenkiewitz, P., Ostoja-Zagórski, W. (1996): Three-dimensional model of the potyviral genome-linked protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93:12150-12154.
- Provvidenti, R., Alconero, R. (1988a): Inheritance of resistance to a third pathotype of *Pea seed-borne mosaic virus* in *Pisum sativum*. *Journal of Heredity* 79:76-77.
- Provvidenti, R., Alconero, R. (1988b): Inheritance of resistance to a lentil strain of *Pea seed-borne mosaic virus* in *Pisum sativum*. *Journal of Heredity* 79:45-47.
- Restrepo-Hartwig, M.A., Carrington, J.C. (1992): Regulation of nuclear transport of a plant potyvirus protein by autoproteolysis. *Journal of Virology* 66:5662-5666.

- 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.
- Riechmann, J.L., Cervera, M.T., García, 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* 76:51-956.
- Riedel, D., Lasemann, D.-E., Maiss, E. (1998): Ultrastructural localization of nonstructural and coat proteins of 19 potyviruses using antisera to bacterially expressed proteins of plum pox potyvirus. *Archives of Virology* 143:2133-2158.
- Robaglia, C., Caranta, C. (2006): Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends in Plant Science* 11:40-45.
- Roberts, I.M., Wang, D., Findlay, K., Maule, A.J. (1998): Ultrastructural and temporal observations of the potyvirus cylindrical inclusions (CIs) show that the CI protein acts transiently in aiding virus movement. *Virology* 245:173-181.
- Rodríguez-Cezero, E., Ammar, E.D., Pirone, T.P., Shaw, J.G. (1993): Association of the non-structural P3 viral protein with cylindrical inclusions in potyvirus-infected cells. *Journal of General Virology* 74:1945-1949.
- Roudet-Tavert, G., Michon, T., Walter, J., Delaunay, T., Redondot, E., Le Gall, O. (2007): Central domain of a potyvirus VP gis involved in the interaction with the host translation initiation factor eIF4E and the viral protein HcPro. *Journal of General Virology* 88:1029-1033.
- Schaad, M.C., Jensen, P.E., Carrington, J.C. (1997): Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *EMBO Journal* 16:4049-4059.
- Schaad, M.C., Anderberg, R.J., Carrington, J.C. (2000): Strain-specific interaction of the Tobacco etch virus NIa protein with the translation initiation factor eIF4E in the yeast two-hybrid system. *Virology* 273:300-306.
- Sessa, G., D'Ascenzo, M., Martin, G.B. (2000): Thr38 and Ser198 are Pto autophosphorylation sites required for the AvrPto-Pto-mediated hypersensitive response. *EMBO Journal* 19:2257-2269.
- Smýkal, P., Hudzieczek, V., Hanáček, P. (2010). Molekulární detekce genu rezistence hrachu k viru semenem přenosné mozaiky (PSbMV). *Rostlinolékař* 6/2010: 20-24.
- Sonenberg, N., Gingras, A.C. (1998): The mRNA 5'cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Current Opinion in Cell Biology* 10:268-275.

- Song, W.Y., Wang, G.-L., Chen, L.-L., Kim, H.-S., Pi, L.-Y., Hosten, T., Gardner, J., Wang, B., Zhai, W.-X., Zhu, L.-H., Fauquet, C., Roland, P. (1995): A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science* 270:1804-1806.
- Šafářová, 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 (1): 53-57.
- Thottappilly, G.E., Schmutter, H. (1968): Zur Kenntnis eines mechanisch Samen-, Pilz- and Insektenübertragbaren neuen Virus der Erbse. *Z. Pflanzenkr. Pflanzen Pathol. Pflanzensch.* 75:1-8.
- Tordo, V.M.-J., Chachulska, A.M., Fakhfakh, H., Le Romancer, M., Robaglia, C., Astier-Magnificier, S. (1995): Sequence polymorphism in the 5'NTR and in the P1 coding region of potato virus Y genomic RNA. *Journal of General Virology* 76:939-949.
- Tromas, N., Zwart, M.P., Lafforgue, G., Elena, S.F. (2014): Within-host spatiotemporal dynamics of plant virus infection at the cellular level. *PLOS Genetics* 10(2):e1004186.
- Ueda, H., Yamaguchi, Y., Sano, H. (2006): Direct interaction between the Tobacco mosaic virus helicase domain and ATP-bound resistance protein, N factor during the hypersensitive response in Tobacco plants. *Plant Molecular Biology* 61:31-45.
- Urcuqui-Inchima, S., Maia, I.G., Arruda, P., Drugeon, G., Haenni, A.-L., Bernardi, F. (2000): Deletion mapping of the potyviral helper component-proteinase reveals two regions in RNA binding. *Virology* 268:104-111.
- 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.
- Vidal, M. (1997): The reverse two-hybrid system in *The two-hybrid system*. Oxford University Press, NY 109.
- Vidal, M., Legrain, P. (1999): Yeast forward and reverse 'n'-hybrid systems. Oxford University Press. *Nucleic Acids Research* 27(4):919-929.
- Walsh, J.A., Jenner, C.E. (2002): Turnip mosaic virus and the quest for durable resistance. *Molecular Plant Pathology* 3:289-300.
- Wang, R.Y., Powell, G., Hardie, J., Pirone, T.P. (1998): Role of the helper component in vector-specific transmission of potyviruses. *Journal of General Virology* 79:1519-1524.

- Warren, R.F. Merritt, P.M., Holub, E., Innes, R.W. (1999): Identification of three putative signal transduction genes involved in R gene-specified disease resistance in *Arabidopsis*. *Genetics* 152:401-412.
- Wei, T., Zhang, C., Hong, J., Xiong, R., Kasschau, K.D., Zhou, X., Carrington, J.C., Wang, A. (2010): Formation of complexes at plasmodesmata for Potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. *PLoS Pathogens* 6(6):e1000962.
- Wittman, S., Chatel, H., Fortin, M.G., Laliberté, J.F. (1997): Interaction of the viral protein genome linked of turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso)4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. *Virology* 234:84-92.
- Yeam, I., Cavatorta, J.R., Ripoll, D.R., Kang, B.-C., Jahn, M.M. (2007): Functional dissection of naturally occurring amino acid substitutions in eIF4E that confers recessive potyvirus resistance in plants. *Plant Cell* 19:2913-2928.
- Zhang, Y.-Y., Li, H.X., Ouyang, B., Ye, Z.B. (2006): Regulation of eukaryotic initiation factor 4E and its isoforms: implications for antiviral strategy in plants. *Journal of Integrative Plant Biology* 48(10):1129-1139.