

**Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra ochrany rostlin**

a

**Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.
Laboratoř virologie**



Mutační analýza obalového proteinu X viru bramboru (PVX)

Diplomová práce

Autor práce: Markéta Werschallová

Vedoucí práce: prof. Ing. Pavel Ryšánek, CSc.

Školitel konzultant: Dr.rer.nat.Ing. Helena Plchová

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Mutační analýza obalového proteinu X viru bramboru (PVX)" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne

.....

Markéta Werschallová

Na tomto místě bych chtěla velmi poděkovat Dr.rer.nat.Ing. Heleně Plchové za věnovaný čas, odborné vedení, ochotu pomoci a poradit, ale především za vstřícný a lidský přístup. Dále bych chtěla poděkovat Renatě Hadámkové za její pomoc v laboratoři, ochotu vždy poradit a laskavý přístup. Také děkuji Mgr. Tomáši Moravcovi, Ph.D za možnost vykonat moji diplomovou práci v Laboratoři virologie ÚEB AV ČR, v. v. i. Dále bych ráda poděkovala všem z Laboratoře virologie za přátelský přístup během mého působení v jejich laboratoři. V neposlední řadě děkuji Prof. Ing. Pavlu Ryšánkovi, CSc za ochotu pomoci při finální komplementaci mé diplomové práce.

Poděkování patří také mé rodině, za všestrannou podporu během celého studia.

Souhrn

Předkládaná diplomová práce se zabývá mutační analýzou konzervovaných aminokyselin obalového proteinu (CP, coat protein) X viru bramboru (PVX, *Potato virus X*), kterou má být zjištěna důležitost vybraných aminokyselin pro šíření viru v rostlině. Jako pokusné rostliny byly vybrány tabáky *Nicotiana benthamiana*. Modifikace v obalovém proteinu byly provedeny na základě porovnání aminokyselinové sekvence obalového proteinu PVX s CP viru mozaiky papáji (PapMV CP, *Papaya mosaic virus coat protein*), zatím jediného zástupce potexvirů, kam patří i PVX, s popsanou krystalovou strukturou obalového proteinu, u kterého byla experimentálně potvrzena důležitost určitých aminokyselin pro interakci podjednotek obalového proteinu CP – CP PapMV a CP-RNA a tím i pro tvorbu virových částic. Z databáze National Center for Biotechnology Information (NCBI) byly získány dostupné aminokyselinové sekvence izolátů a kmenů PVX CP, které byly porovnány mezi sebou, ale i se sekvencí PVX využívanou v Laboratoři virologie ÚEB, AV ČR v. v. i. Jako konzervované pozice byly určeny kodóny kódující fenylalanin a lysin v pozici 33 a 118 obalového proteinu, které byly mutovány pomocí metod molekulární biologie.

Celkem bylo vytvořeno 5 konstruktů mutantů obalového proteinu, 2 deleční mutanti N- konce PVX CP, kteří byli vytvořeni ve vektoru odvozeném od PVX (pGR106), ve kterém je integrována cDNA sekvence PVX, zbylí 3 bodoví mutanti byli vytvořeni pouze jako produkt SOE PCR. Do delečních mutantů, u nichž byla odstraněna větší část N- koncové sekvence CP, přesněji sekvence mezi 2.-32. a 2.-33. kodónem, byl zaklonován vytvořený reportérový gen GFP pro sledování nástupu signálu infekce a šíření mutantů v rostlinných pletivech. Ve výsledku se oba mutanti šířili pouze z místa agroinfiltrace do okolních buněk inokulovaného listu. Rozdíl byl zaznamenán jak v rychlosti nástupu signálu GFP, tak i v míře rozšíření mutantů do okolních buněk. Deleční mutant s ponechaným kodónem pro F33 vykazoval jednak rychlejší nástup signálu, ale byl schopen se šířit mnohem rychleji a výrazněji do okolních buněk, ale pouze v rámci inokulovaného listu, zatímco u delečního mutantu s odstraněným kodónem pro F33 byl zaznamenán pomalejší nástup signálu a menší schopnost infikovat okolní buňky. Dále byli vytvořeni bodoví mutanti, deleční a substituční, konkrétně deleční mutant kodónu F33 ($\Delta F33$), substituční mutant, u kterého byl kodón fenylalaninu v pozici 33 nahrazen kodónem alaninu (F33A) a substituční mutant, u kterého byl kodón lysinu v pozici 118 nahrazen kodónem alaninu (K118A). Bohužel se nepodařilo bodové mutanty úspěšně vložit do vektoru pGR106, tudíž nebylo možné je zhodnotit v rostlinách *N. benthamiana*.

Z uvedených výsledků lze usuzovat na důležitost aminokyseliny F33 při mezibuněčném pohybu v rámci sousedních buněk. Pro posouzení důležitosti F33 a K118 v systémové infekci by bylo nutné zhodnotit i bodové mutanty Δ F33, F33A a K118A.

Klíčová slova: X virus bramboru, obalový protein, interakce CP, mutanti

Summary

The thesis deals with the mutational analysis of conserved amino acids of *Potato virus X* coat protein (PVX CP). The importance of selected amino acids for the spread of the virus in the plant should be determined. *Nicotiana benthamiana* was selected as an experimental plant. Mutations of the PVX CP were based on the comparison of PVX CP amino acid sequence with the sequence of *Papaya mosaic virus* coat protein (PapMV CP), the only representative of potexvirus, which includes PVX, with the described crystal structure of the CP. The importance of certain amino acids for interaction of coat protein subunits PapMV CP - CP and PapMV CP-RNA and thus for virus particles formation was experimentally determined. The available amino acid sequences of isolates and strains of PVX CP were obtained from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database, compared with each other and also with the sequence of PVX CP used in the Laboratory of Virology, Institute of Experimental Botany of the CAS. Codons encoding conserved phenylalanine and lysine at positions 33 and 118 in the PVX CP amino acid sequence were mutated using methods of molecular biology.

Five constructs of PVX CP mutants were prepared, Two deletion mutants of the PVX CP N-terminus which were created in the vector derived from PVX (pGR106) in which the cDNA sequence of PVX is integrated, the remaining 3 point mutants were prepared only as a product of SOE PCR. The reporter gene GFP for monitoring of infection and spread of mutants in plant tissue was cloned into pGR106 carrying the deletion mutants of the N-terminus of PVX CP (deletion of 2.-32. or 2.-33. amino acid). Both mutants are able to move only in a short distance from infected cells to adjacent cells within the inoculated *N. benthamiana* leaf. These two deletion mutants showed difference in the speed and in the extent of the GFP signal spread. Deletion mutant still possessing the codon for F33 showed faster onset of the GFP signal and was able to spread more rapidly to surrounding cells in comparison with deletion mutant, where the codon for F33 was removed. Other mutants carrying the point mutations were also prepared: the deletion mutant of the codon for F33 (Δ F33), the substitution mutant, in which the codon for phenylalanine at position 33 was replaced by the codon for alanine (F33A) and substitution mutant, where the codon for lysine at position 118 was replaced by the codon for alanine (K118A). Unfortunately, all three point mutants could not be cloned into the vector pGR106, therefore, the evaluation of their spread in *N. benthamiana* plants was not possible.

Based on obtained results it is possible to conclude that the amino acid F33 is important for the intercellular movement within the neighboring cells. To assess the importance of the amino acids F33 and K118 in the systemic infection, it would be necessary to evaluate also the point mutants Δ F33, F33A, and K118.

Keywords: *Potato virus X*, coat protein, interaction of CP, mutants

Obsah

1 ÚVOD.....	11
2 VĚDECKÁ HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE	12
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED	13
3.1 Rostlinné viry.....	13
3.1.1 Komponenty rostlinných virů	14
3.2 Virové choroby lilku bramboru (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	14
3.3 X virus bramboru (<i>Potato virus X</i> – PVX)	17
3.3.1 Molekulární charakterizace PVX.....	17
3.4 Expresní vektory založené na rostlinných virech.....	19
3.5 Mezibuněčný transport.....	20
3.5.1 Mezibuněčný transport PVX	21
3.6 RNA silencing – utlumování genové exprese	22
3.7 Struktura PVX	23
3.7.1 PVX CP.....	24
3.7.1.1 Topografie PVX.....	26
3.7.1.2 Úloha N- konce PVX CP ve virionu PVX	28
3.7.1.3 Inzerce do povrchově situovaných oblastí PVX CP	31
4 MATERIÁL A METODY	33
4.1 Materiál.....	33
4.1.1 Rostlinný materiál.....	33
4.1.2 Bakteriální kmeny	33
4.1.3 Konstrukty	33
4.1.4 Vektor	34
4.1.5 Vybavení.....	34
4.1.5.1 Laboratorní přístroje.....	34
4.1.5.2 Chemikálie	35
4.1.5.3 Roztoky, pufrý, reakční směsi, soupravy a restrikční enzymy	37
4.1.5.4 Protilátky	38
4.1.5.5 Primery	39
4.2 Metody.....	40
4.2.1 Analýza dostupných sekvencí PVX CP	40
4.2.2 Metody práce s DNA	41
4.2.2.1 Příprava delečních konstruktů PVX CP	41
4.2.2.2 Příprava substitučních konstruktů PVX CP	47
4.2.2.3 Příprava konstruktů zeleného fluorescenčního proteinu – GFP	51
4.2.2.4 Přečištění PCR směsi	54
4.2.2.5 Přečištění DNA z agarózového gelu	54
4.2.2.6 Restrikční štěpení	55

4.2.2.7	Ligace.....	55
4.2.2.8	Transformace.....	56
4.2.2.9	Izolace plazmidů z <i>E. coli</i> DH5 α	57
4.2.2.10	Pěstování rostlin a inokulace virem (agroinfiltrace)	57
4.2.3	Elektroforetické metody	58
4.2.3.1	Horizontální elektroforéza.....	58
4.2.4	Enzymová imunoanalýza.....	58
4.2.4.1	PT – ELISA (Plate – trapped ELISA).....	58
5	VÝSLEDKY	60
5.1	Porovnání sekvencí PVX CP s PapMV CP.....	60
5.2	Porovnání sekvencí PVX CP různých izolátů a kmenů PVX	61
5.3	Mutantní formy PVX CP.....	62
5.3.1	Příprava konstruktů Δ 2-32 PVX CP pomocí PCR a SOE PCR.....	62
5.3.2	Příprava konstruktů Δ 2-33 PVX CP pomocí PCR a SOE PCR.....	63
5.3.3	Příprava konstruktů Δ F33 PVX CP pomocí PCR a SOE PCR.....	64
5.3.4	Příprava konstruktů F33A PVX CP pomocí PCR a SOE PCR	65
5.3.5	Příprava konstruktů K118A PVX CP pomocí PCR a SOE PCR.....	66
5.4	Příprava reportérového genu GFP pomocí PCR a SOE PCR.....	68
5.5	Restrikční štěpení a ligace	69
5.5.1	Restrikční štěpení delečních konstruktů Δ 2-32 PVX CP, Δ 2-33 PVX CP a ligace do vektoru pGR106.....	69
5.5.2	Restrikční štěpení mutantů Δ F33 PVX CP, F33A PVX CP a K118A PVX CP.....	69
5.5.3	Restrikční štěpení konstruktů GFP a ligace do vektoru pGR106	70
5.6	Ověření správnosti sekvencí (sekvenace).....	71
5.7	Sledování šíření PVX pomocí GFP.....	73
5.8	Detekce PVX v rostlinném materiálu	78
6	DISKUSE	80
6.1	Analýza sekvencí	80
6.2	Mutantní formy PVX CP.....	81
6.2.1	Bodoví (deleční a substituční) mutanti PVX CP	81
6.2.2	Deleční mutanti N-konce PVX CP	83
7	ZÁVĚR	85
8	SEZNAM LITERATURY.....	86
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	96
	SEZNAM PŘÍLOH	99
	Obrázky.....	99
	Tabulky	100

1 ÚVOD

Virus X bramboru (PVX, *Potato virus X*) představuje patogena, který je původcem onemocnění především rostlin z čeledi lilkovitých – *Solanaceae*, neboť PVX má úzký přirozený hostitelský okruh. Mezi nejvýznamnější zástupce, které PVX z čeledi *Solanaceae* napadá a na nichž působí citelné zemědělské ztráty, patří především lilek brambor (*Solanum tuberosum* L.), lilek rajče (*Solanum lycopersicum* L.), tabák virginský (*Nicotiana tabacum* L.) a paprika setá (*Capsicum annuum* L.). Rozhodujícím faktorem pro ekonomicky výhodné pěstování, především brambor, je bezesporu použití certifikované sadby s vysokou biologickou hodnotou.

PVX představuje v dnešní době z rostlinolékařského hlediska méně významného patogena, a to především z důvodu uplatňování systému bezvirového šlechtění a systematickou laboratorní kontrolou. Využíváním daných metod došlo ke značnému snížení výskytu virů se slabou manifestací příznaků napadení.

Na viry a především na PVX lze pohlížet z více hledisek. Jednak z hlediska rostlinolékařského, ale i biotechnologického, vhodného pro produkci biologicky významných látek. Hlavní výhodou získávání látek prostřednictvím rostlin a jejich virů spočívá především v nízkých výrobních nákladech (kultivace rostlin) a rychlosti produkce bez tvorby transgenní rostliny. Laboratoř virologie ÚEB AV ČR, v. v. i., se zabývá využitím PVX za účelem exprese heterologních proteinů/peptidů (epitopů) vázaných na povrchu virových částic v rostlinách. Většinou se pro fúzování s epitopy používá N- konec obalového proteinu PVX (PVX CP). Laboratoř virologie fúzovala epitopy i s C- koncem PVX CP a našla i novou vnitřní pozici v povrchové smyčce PVX CP vhodnou pro vložení epitopu. Nicméně podrobná struktura PVX není dosud známa, proto pro nalezení dalších míst vhodných pro vložení epitopů je třeba znát úseky či jednotlivé aminokyseliny PVX CP nezbytné pro tvorbu virových částic.

Z výše uvedených důvodů byla předmětem předkládané diplomové práce analýza dostupných sekvencí PVX CP, jejich porovnání se sekvencí viru mozaiky papáji (PapMV, *Papaya mosaic virus*; jiného potexviru s již popsanou krystalovou strukturou PapMV CP), na základě určení odpovídajících konzervovaných úseků/aminokyselin provedení mutačních modifikací v PVX CP a určení, jak mutace PVX CP ovlivňují šíření viru v rostlině.

2 VĚDECKÁ HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE

Předběžné porovnání sekvencí naznačuje, že určité úseky/aminokyseliny důležité pro interakci podjednotek obalového proteinu CP-CP viru mozaiky papáji (PapMV, *Papaya mosaic virus*; zatím jediného potexviru s popsanou krystalovou strukturou PapMV CP), jsou víceméně konzervované mezi potexviry. Tyto úseky/aminokyseliny mohou být proto důležité i pro interakci PVX CP a tím i pro šíření viru v rostlině.

Hlavním cílem předkládané diplomové práce bylo vytvoření konstruktů mutantů obalového proteinu (CP) X viru bramboru (PVX) ve vektoru odvozeném od PVX a určení, jak mutace PVX CP ovlivňují šíření viru v rostlině.

Díličními experimentálními cíli byly:

- Porovnat sekvenci PVX CP se sekvencí PapMV CP
- Určit pozice aminokyselin PVX CP, které mohou být důležité pro interakce PVX CP
- Porovnat dostupné aminokyselinové sekvence PVX CP
- Určit, které aminokyseliny PVX CP jsou konzervované
- Připravit konstrukty mutantů PVX CP
- Do konstruktů mutantů vložit GFP pro detekci šíření viru v rostlině
- Vložit tyto konstrukty do *Agrobacterium tumefaciens*
- Agroinfiltrovat rostliny *Nicotiana benthamiana*
- Určit, zda mutace v PVX CP ovlivňují šíření viru v rostlině

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Rostlinné viry

Virus je definován jako nebuněčný, obligátní intracelulární parazit. Životní cyklus viru je zcela závislý na hostitelské buňce, neboť viry nemají vlastní proteosyntetický ani metabolický aparát a svoji vlastní replikaci jsou schopny organizovat pouze uvnitř vhodných hostitelských buněk (Matthews and Hull, 2002).

Rostlinné viry (fytoviry) jsou viry, jejichž hostitelským okruhem jsou rostliny, respektive rostlinné buňky. Z fytopatologického hlediska se jedná o rostlinné patogeny, způsobující významné virové choroby řady hospodářských plodin, které se ve výsledku projevují značnými ekonomickými ztrátami na výnosu, ale i na poklesu kvality rostlinných produktů. Scholthof et al. (2011) vydali studii, kde seřadili dle vědecké/ekonomické významnosti rostlinné viry. Na prvním místě byl uveden virus mozaiky tabáku (TMV, *Tobacco mosaic virus*), nejprozkoumanější rostlinný virus vůbec, způsobující každoročně nezanedbatelné ztráty na výnosu řady hospodářsky významných plodin, jeho hostitelský okruh je poměrně široký, dokáže infikovat až 200 druhů rostlin. Mezi další ekonomicky významné virové patogeny patří virus svinutky bramboru (PLRV, *Potato leafroll virus*), způsobující až 90 % redukcí výnosu hlíz bramboru, dále Y virus bramboru (PVY, *Potato virus Y*), mající za následek až 80 % ztráty na výnosu bramborových hlíz, hlavně ve směsné infekci s dalšími viry. Virus šarky švestky (PPV, *Plum pox virus*) je nejškodlivějším a nejrozšířenějším virem peckovin v Evropě. I když většina rostlinných virů je schopna působit značné hospodářské a ekonomické ztráty u široké škály pěstovaných plodin, z vědeckého hlediska nacházejí rostlinné viry, zejména PVX nebo TMV, uplatnění i v biotechnologiích. Dané viry disponují schopností reprodukovat se v hostitelských rostlinách do vysokých titerů (Yusibov et al., 2010), což je jednou z předností dané technologie.

V biotechnologiích jsou v současné době viry využívány při výrobě biologicky významných látek využívaných ve farmacii. Jsou již zvládnuty technologie produkce nejen peptidů, ale i celé řady proteinů ve vektorech na bázi rostlinných virů (Hefferon, 2012). Hlavní výhoda získávání látek prostřednictvím rostlin a jejich virů spočívá především v nízkých výrobních nákladech (kultivace rostlin) a rychlosti produkce bez tvorby transgenní rostliny.

3.1.1 Komponenty rostlinných virů

Virová částice (virion) je složena ze dvou hlavních částí – genomu, tvořeného nukleovou kyselinou a ochranného pláště, tvořeného obalovým (kapsidovým) proteinem. Kromě obalového proteinu, mohou mít některé virové částice i vnější lipoproteinovou membránu (Gergerich and Dolja, 2006).

U virů nacházíme daleko větší rozmanitost v uložení genetické informace, neboť všechny známé buněčné organismy mají genetickou informaci uloženou téměř výhradně v dsDNA (double-stranded DNA, dvojitá DNA). Nositelkou genetické informace většiny (přibližně 75 %) rostlinných virů je (+)ssRNA (positive single-stranded RNA, jednovláknová RNA s pozitivní polaritou). Jedná se o viry neobalené, kdy je genom obalen pouze jedním obalovým proteinem a další vnější obal z lipoproteinů chybí. Mezi nejvýznamnější zástupce s genomem ve formě molekul (+)ssRNA patří početně nejbohatší rod rostlinných virů *Potyvirus*, jehož zástupci způsobují každoročně nezanedbatelné ztráty na světové produkci hospodářských plodin, dále rod *Potexvirus*, kam náleží PVX, rod *Luteovirus*, kam patří např. virus žluté zakrslosti ječmene (BYDV, *Barley yellow dwarf virus*), způsobující virové zakrslosti obilnin, respektive ječmene, a v neposlední řadě i rod *Tobamovirus* s typovým a modelovým zástupcem TMV (Knipe and Howley, 2007). Dalším typem nositele genetické informace jsou molekuly (-)ssRNA (negative single-stranded RNA, jednovláknová RNA s negativní polaritou) (13 % rostlinných virů). Součástí rostlinných virů s genetickou informací tvořenou (-)ssRNA je i fosfolipidová dvojvrstva tvořící vnější obal viru (tzv. obal), jedná se tedy o virus obalený – například virus bronzovitosti rajčete (TSWV, *Tomato spotted wilt virus*). Mimo (+)ssRNA a (-)ssRNA mohou mít rostlinné viry genetickou informaci uloženou i v molekulách dsRNA (double-stranded RNA, dvojitá RNA) – například virus zakrslosti rýže (RDV, *Rice dwarf virus*) (Lu et al., 1998), dsDNA – například virus žilkové mozaiky květáku (CaMV, *Cauliflower mosaic virus*) a ssDNA (single-stranded DNA, jednovláknová DNA) – například virus pruhovitosti kukuřice (MSV, *Maize streak virus*) (Briddon and Stanley; 2006).

3.2 Virové choroby lilku bramboru (*Solanum tuberosum* L.)

Lilek brambor patří mezi celosvětově významnou plodinu. Zaujímá čtvrté místo v zemědělské produkci, hned po rýži, pšenici a kukuřici. Hlavní předností je význačná schopnost tvorby sušiny a škrobu na jednotku plochy, ale i adaptace na širokou škálu podmínek vnějšího prostředí (klimatu) (Khurana, 2004).

Produkce brambor je zatížena řadou chorob a klíčových škůdců, stejně tak fyziologickými poruchami a poškozeními. Jedná se o plodinu množenou především vegetativním způsobem, u níž jsou hlavním problémem právě virové choroby, které se při daném způsobu rozmnožování obvykle přenášejí ve vysokém procentu z mateřské hlízy na potomstvo (Chaube and Pundhir, 2005; Valentová, 1997). Dle Khurana (2004) se ztráty způsobené virózami společně s dalšími patogeny brambor nemusí projevit v roce napadení. Postupem času však dochází ke zvyšování množství viru, či jejich kombinace v hlízách, průběh saturace je zapříčiněn neustálým využíváním infekčních hlíz jako sadbového materiálu. Jak uvádí Loebenstein and Gaba (2012) množství viru v hlízách může z 1 % (základ) vzrůst až na 10 %, již po jednom množení sadby. Degenerace sadby způsobená zejména virózami se projevuje krněním (zakrslostí), kadeřením, celkovou nebo listovou chlorózou.

Dosud je známo zhruba 40 virů schopných infikovat brambor (Khurana, 2004).

V podmínkách České republiky byly největší problémy s virovými chorobami brambor v padesátých a v šedesátých letech 20. století. To souviselo s tehdejší úrovní množení, včetně uznávacího řízení, s výrazným nedostatkem vhodných odrůd rezistentních vůči virovým patogenům i s tehdejší nízkou úrovní ochranných opatření proti šíření těchto chorob. K výsadbě se často používala sadba o nízké biologické hodnotě, s vysokým výskytem virových i jiných chorob, způsobující velmi vysoké hospodářské ztráty (Rasocha, 2002b).

V posledních desetiletích byla na tomto úseku provedena řada klíčových opatření. Mezi nejdůležitější patří především zkvalitnění samotné diagnostiky virových chorob, nejprve využitím sérologických metod, v současné době pomocí ELISA testu (Loebenstein and Gaba, 2012; Rasocha, 2002a). Došlo ke změnám a zpřísnění systému uznávacího řízení, zavedly se povinné posklizňové zkoušky, ochrana množitelských porostů proti vektorům virových chorob, společně s uplatněním povinného zkrácení vegetace u sadbových porostů (desikace), ale i zvětšení izolačních vzdáleností, vytvoření uzavřených pěstebních oblastí a zkrácení cyklu množení (Rasocha, 2002b). Mezi standardní postupy k získání viru-prosté sadby patří v současnosti meristémové kultury. Přínosem bylo i šlechtění odrůd brambor vykazující vyšší odolnost k virovým patogenům (Loebenstein and Gaba, 2012).

Choroby na bramborách vyvolané virem lze rozdělit na lehké a těžké na základě jejich škodlivosti, čímž rozumíme jak jejich vliv na výnosovou depresi hlíz, tak zčásti i sílu vizuálních příznaků onemocnění na rostlinách (Dědič, 2014). Mezi těžké jsou zahrnuty choroby vyvolané PLRV, PVY a virem A bramboru (PVA, *Potato virus A*). Při výskytu těžkých virových chorob v porostu může být výnos snížen v závislosti na použité odrůdě,

půdních a klimatických podmínkách o 30 - 80 %. Virózy mohou zhoršit barvu výrobků z brambor, snížit škrobnatost o 1 až 2 % a poškodit slupku i dužninu hlíz (Rasocha et al., 2008). K lehkým jsou řazeny infekce způsobené virem M bramboru (PVM, *Potato virus M*) PVX a v poslední době též zčásti virem S bramboru (PVS, *Potato virus S*) (Dědič, 2014). Ztráty na výnosech hlíz způsobené lehkými virózami se pohybují v rozmezí 0 - 20 %. Významné výnosové ztráty mají za následek směsné infekce s dalšími viry.

Zahraniční literatura rozděluje viry bramboru také do dvou skupin (Tab. 1), ale v závislosti na jejich asociaci s hostitelskou rostlinou. Do první skupiny se řadí viry, které mají velmi úzký okruh potenciálních hostitelů převážně z čeledi *Solanaceae*. Druhou skupinu tvoří viry, které mají obvykle široký okruh hostitelských rostlin, pouze několik kmenů bylo detekováno na bramborách. Tyto viry způsobují závažné choroby i jiných plodin, nejen bramboru (Salazar, 1996).

Tabulka 1: Rozdělení virů z hlediska jejich asociace s bramborem

VIRY ÚZCE VÁZANÉ NA BRAMBOR		VIRY NA BRAMBORU NEZÁVISLÉ
PLRV	PVM	virus kadeřavosti vrcholu řepy (BCTV, <i>Beet curly top virus</i>)
PVY	PVX	virus mozaiky okurky (CMV, <i>Cucumber mosaic virus</i>)
PVA	PVS	virus nekrotické kadeřavosti tabáku (TRV, <i>Tobacco rattle virus</i>)

Převzato z: Salazar (1996), upraveno

Škodlivost každého viru je determinována na základě jeho prevalence a ekonomických ztrát na produkci. PLRV a PVY jsou zdaleka nejvýznamnějšími viry bramboru, následovanými PVX, PVM, PVA a dalšími, jejichž distribuce je více lokalizovaná (Salazar, 1996).

Epidemiologická situace je v posledních letech příznivá převážně u virů se slabými projevy příznaků (PVA, PVM a PVX), kdy se podařilo zredukovat jejich výskyt na minimum, hlavně díky uplatňování systému bezvirového šlechtění, včetně postupů rychlého rozmnožování ozdravených explantátových kultur a systematickou laboratorní kontrolou. Stále se však významně vyskytuje PVY, který zejména v důsledku celosvětového výskytu nových rekombinantních kmenů se slabší vizuální reakcí rostlin a silného infekčního tlaku v řadě posledních ročníků jednoznačně dominuje (Dědič, 2014).

3.3 X virus bramboru (*Potato virus X* – PVX)

X virus bramboru (PVX) je typovým zástupcem rodu *Potexvirus*, čeledi *Alphaflexiviridae*. Rod *Potexvirus* je po rodu *Tobamovirus* druhým nejlépe prostudovaným rodem rostlinných virů s helikální strukturou. PVX, podobně jako TMV, slouží v rostlinné virologii jako modelový virus. PVX v posledních letech výrazně přispěl k pochopení principů hostitelské rezistence a mechanismů genového umlčování (gene silencing) (Ryu and Hong, 2008). Virové částice zástupců tohoto rodu jsou poměrně stabilní, např. PVX si v syrové rostlinné šťávě uchovává svojí infekčnost při 20 °C po několik týdnů. Inaktivovat ho lze zahřátím infikované rostlinné šťávy na 68 - 74 °C po dobu 10 minut (Khan and Dijkstra, 2006).

Symptomy vyvolané infekcí PVX jsou variabilní a závisí zejména na odrůdě, typu izolátu viru, environmentálních podmínkách a synergismu při směsných infekcích (zvláště s PVY). Většina izolátů způsobuje mírnou až těžkou mozaiku na listech, nebo je průběh infekce latentní, zvláště při vysokých teplotách (Loebenstein and Gaba, 2012). Latentní průběh infekce způsobuje ztráty na výnosu pod 10 %, problémem je množení viru do vysokých titrů, dané rostliny jsou posléze zdrojem infekčního agens. Silné kmeny mohou u některých odrůd bramboru vyvolat i nekrózu hlíz (Dědič, 2014).

Virus není přenášen vektory ani semeny, ale pouze mechanicky, v přírodě je šířen kontaktem napadené rostliny se zdravou, dále prostřednictvím zemědělské mechanizace, člověka, zvířat a hmyzem s kousacím ústním ústrojím.

Přirozený okruh hostitelských rostlin PVX zahrnuje převážně čeleď *Solanaceae*. Mezi hospodářsky významné rostliny, které PVX napadá, patří hlavně brambor, rajče a tabák (Kagiwada et al., 2005).

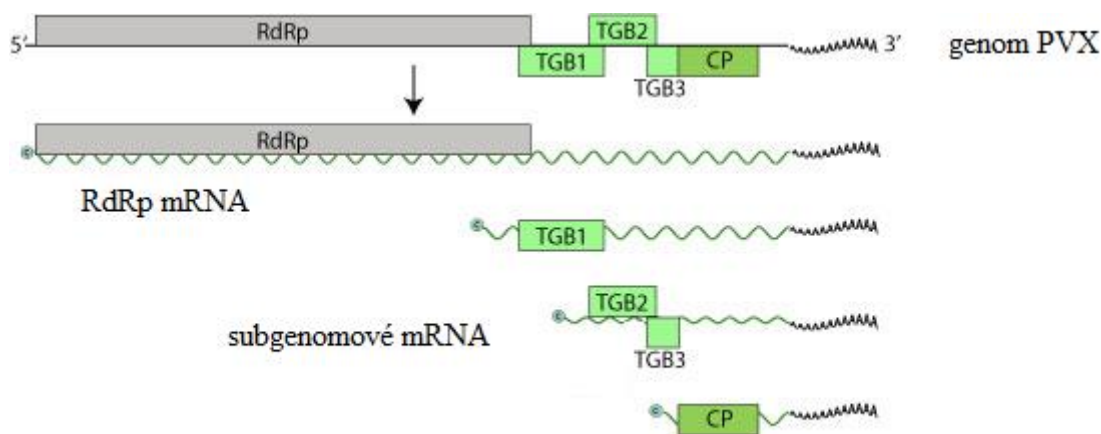
3.3.1 Molekulární charakterizace PVX

Jedná se o flexibilní vláknitý virus o přibližné délce 515 nm a průměru 13 nm. Genom PVX představuje přibližně 6 % celkové hmotnosti virionu, je tvořen (+)ssRNA o velikosti 6,4 kb. 5' konec RNA obsahuje methylguanovinovou čepičku a na 3' konci polyadenylovou sekvenci (Huang et al., 2004). Nepřekládaná oblast na 5' konci virové RNA (5' NTR, **n**on**t**ranslated **r**egion) je dlouhá 84 nukleotidů a plní funkci regulace syntézy genomové (g) a subgenomové (sg) RNA (Kim and Hemenway, 1996). 3' NTR virové RNA je dlouhá 76 nukleotidů. Tato oblast interaguje s RNA – dependentní RNA polymerázou (RdRp,

RNA –dependent RNA polymerase) a polyadenylovou sekvencí (poly(A)) a tím je důležitá pro replikaci virové RNA (Chen et al., 2005). Genom PVX (Obr. 1) kóduje pět otevřených čtecích rámců (ORFs, **open reading frames**): protein pro virovou RdRp, tři transportní proteiny (TGBp1, 2 a 3, **triple gene block 1, 2 a 3**) a CP.

ORF1 kóduje virovou RdRp (165 kDa), která zajišťuje replikaci virového genomu a syntézu subgenomových RNA. Pouze virová polymeráza je translatována přímo z genomové RNA. Zbylé proteiny jsou translatovány pomocí sgRNAs (Batten et al., 2003). U potexvirů byly objeveny celkem 3 sgRNA. Zatímco protein TGBp1 je exprimován jako jediný translační produkt z sgRNA1 o velikosti asi 2,1 kb (Morozov et al., 1991), proteiny TGBp2 a TGBp3 jsou exprimovány z sgRNA2 o velikosti 1,4 kb, která vystupuje jako bicistronická mRNA. CP je translatován z sgRNA3 o velikosti asi 0,9 kb. Tři překrývající se otevřené čtecí rámce (TGBp1, 2 a 3) kódují translokační proteiny viru umožňující jak mezibuněčný pohyb virových částic, tak i šíření virové infekce v hostitelské rostlině (Karpova et al., 2006). Pohyb z buňky do buňky je závislý na potlačení tzv. „RNA silencing“ (Bayne et al., 2005). Protein TGBp1 PVX je nezastupitelný z hlediska systemického šíření infekce hostitelskou rostlinou, neboť funguje jako supresor tzv. „RNA silencing“ (Baulcombe, 2002; Voinnet et al., 2000). TGBp proteiny jsou v rámci rodu *Potexvirus* vysoce konzervované (Morozov and Solovyev, 2003). Proteiny TGBp1, 2 a 3 mají tyto molekulové hmotnosti: 25 kDa, 12 kDa a 8 kDa (Huisman et al., 1988). Proteiny TGBp vzájemně interagují, což umožňuje transport virové RNA plasmodesmaty (Samuels et al., 2007). Některé studie poukazují na fakt, že PVX TGBp1 plní zároveň i funkci destabilizace virionů a podporuje translaci virové RNA (Atabekov et al., 2000; Rodionova et al., 2003).

Poslední otevřený čtecí rámec se nachází na 3' konci virové RNA a kóduje PVX CP (Obr. 2) o velikosti přibližně 25 kDa. Molekulová hmotnost může kolísat v rozmezí 27–29 kb, což je způsobeno tím, že v infikovaných rostlinách je N- konec obalového proteinu glykosylován (Batten et al., 2003). PVX CP je nezbytný pro sestavení virionu (přibližně 1300 identických molekul PVX CP na virion) a pro mezibuněčný pohyb (Santa Cruz et al., 1998). Virion PVX má helikální symetrii, kde na jednu otáčku helixu připadá 8,9 jednotek obalového proteinu (Batten et al., 2003). Ačkoli nejsou detailně známé strukturální informace, jež popisují princip skládání molekul PVX CP, i vzájemnou interakci podjednotek CP, bylo zjištěno, že N- konec obalového proteinu je prezentován na povrchu virové částice (Baratova et al., 1992). Předpokládá se, že fosforylace může interakci podjednotek destabilizovat, a tak způsobit rozpad virové částice. Povrch virionu je hluboce rýhovaný, váží se na něj molekuly vody, které tak pomáhají udržovat jeho strukturu (Batten et al., 2003).



Obrázek 1: Organizace genomu a jednotlivé kroky exprese PVX

Převzato z: <http://viralzone.expasy.org>, upraveno



Obrázek 2: Virion PVX

Převzato z: <http://viralzone.expasy.org>, upraveno

3.4 Expresní vektory založené na rostlinných virech

Rostlinné viry lze použít jako univerzální expresní vektory, využívané pro produkci rekombinantních proteinů v rostlinách (Yusibov et al., 2006). Existují dva způsoby produkce cizorodých proteinů v rostlinách, permanentní či transientní (dočasnou) expresi, která je založená na rostlinných virech. Rozdíl oproti permanentní expresi spočívá v tom, že nedochází k začlenění genetické informace do genomu rostliny a vektory mohou být purifikací z rostliny zpětně izolovány (Čeřovská, 2010). Pro rostlinnou virovou expresi se nejčastěji používají genomy odvozené od (+)ssRNA virů, přičemž je vhodné vektory odvozovat od stabilních virů vybraného hostitele, které jsou snadno mechanicky přenosné. Rostlina by k nim měla být vnímavá či tolerantní, aby se dosáhlo vysoké koncentrace virů a tím co největšího výtěžku (Čeřovská, 2010). Mezi nepoužívanější viry, respektive vektory z nich odvozené, jež jsou vhodné pro inserci a expresi heterologních proteinů patří: TMV (Karasev et al., 2005), virus mozaiky viny (CPMV, *Cowpea mosaic virus*) (Sainsbury et al., 2010) a PVX (Avesani et al., 2003).

Expresní vektor pGR106, který je odvozený od PVX (Baulcombe et al., 1995) kombinuje výhody transfekce zprostředkované *Agrobacterium tumefaciens* a virové infekce (Wagner et al., 2004). Ve srovnání s mnoha dalšími systémy rostlinných virových vektorů je genom PVX schopný pojmout velké inserce sekvencí heterologních proteinů, jako je například gen pro zelený fluorescenční protein (GFP, **G**reen **f**luorescent **p**rotein) z medúzy *Aequorea victoria* (Chapman et al., 1992), bez inhibice schopnosti skládání virových částic. GFP je využíván především jako reportér genové exprese.

3.5 Mezibuněčný transport

Virus se do ostatních částí rostlinných pletiv šíří z místa iniciální infekce dvěma způsoby. Jedná se o intracelulární pohyb z míst, kde došlo k replikaci virové RNA, následně pohyb k plasmodesmatům (PD, specifické rostlinné intercelulární nanopóry), jež umožňují pohyb z buňky do buňky (cell-to-cell movement) a pohyb na dlouhé vzdálenosti (long distance movement) probíhající mezi rostlinnými orgány prostřednictvím cévních svazků respektive floému (Matthews, 1991; Tilsner et al., 2013).

Rostlinné viry využívají k pohybu mezi jednotlivými buňkami plasmodesmata, kanálky, jež umožňují symplastický transport v rámci sousedících buněk. V současnosti jsou známy dvě strategie pohybu z buňky do buňky (cell-to-cell movement): 1) virový genom se pohybuje ve formě intaktního virionu, a 2) virové nukleové kyseliny jsou transportovány skrz plasmodesmata ve formě ribonukleoproteinového komplexu (RNP, **r**ibonucleo**p**rotein) (Lough et al., 2000).

Ačkoliv samotný pohyb virových částic je náročný proces, vyžadující koordinovanou souhru řady virových, ale i hostitelských proteinů, tak mnoho virů se dokáže transportovat za pomoci klasických, virem kódovaných proteinů tzv. pohybových proteinů (MPs, **m**ovement **p**roteins), které se nespecifickým způsobem váží na virovou nukleovou kyselinu (RNA) za vytvoření RNP, rozšiřují vybraná plasmodesmata a následně umožňují průnik do okolních buněk (Lucas, 2006). Po infekci dochází k interakci MPs s plasmodesmaty, kdy se MPs na ně váží a zvyšují tak prostupnost (SEL, **s**ize **e**xclusion **l**imit) pro virion, tím dochází k transportu virionu mezi buňkami, popřípadě může být transportována pouze virová nukleová kyselina (jak již bylo uvedeno výše), ve formě RNP, neboť k pohybu není vyžadována kompletní existence virové částice, v tomto případě je virový genom asociován s MPs nebo CP (Lough et al., 1998).

3.5.1 Mezibuněčný transport PVX

Potexviry využívají k mezibuněčnému transportu tři pohybové proteiny TGBp1, TGBp2 a TGBp3 společně s CP. Virový genom PVX se pohybuje v závislosti na asociaci s endoplazmatickým retikulem (ER, endoplasmic reticulum) (Heinlein, 2015). TGBp2 a TGBp3 jsou ER transmembránové proteiny. Oba proteiny obsahují hydrofobní domény asociované s membránami a buněčnými stěnami (Krishnamurthy et al., 2003), tím napomáhají přemístění RNP do blízkosti plasmodesmat a zároveň také regulují funkci proteinu TGBp1 (Morozov et al., 1991; Yang et al., 2000).

U potexvirů, ale i např. i u hordeivirů protein TGBp1 plní řadu funkcí: umožňuje interakci s plasmodesmaty, mezibuněčný transport, ale i schopnost vázat virovou RNA a dopravovat ji skrz plasmodesmata do přilehlých buněk (Lough et al., 2000) a vykazuje také RNA helikázovou aktivitu (Verchot-Lubicz et al., 2007). Prostupnost plasmodesmat (SEL) lokalizovaných v mezofylových a epidermálních buňkách činí méně než 1 kDa (Crawford and Zambryski, 1999; Robards and Lucas, 1990). Protein TGBp1 umožnil v sérii mikroinjekčních experimentů, jež prováděli Howard et al. (2004), výrazně zvýšit prostupnost plasmodesmat až na 10 kDa. Potvrdili tak hypotézu, že TGBp1 hraje nezastupitelnou roli při rozšiřování plasmodesmat a tím přímo ovlivňuje (resp. umožňuje) transport RNP nebo intaktního virionu do přilehlých buněk, avšak Angell et al. (1996) nevylučují možnost zapojení dalších virových proteinů. PVX CP je z hlediska mezibuněčného transportu bezpodmínečně vyžadován (Chapman et al., 1992), ačkoliv nepatří mezi MPs a nemá schopnost zprostředkovat vlastní transport, ani transport virové RNA skrz plasmodesmata (Oparka et al., 1996; Santa Cruz et al., 1998). Mnoho virů, například tobamo- (Saito et al., 1990), diantho- (Xiong et al., 1993), tobra- (Hamilton and Baulcombe, 1989) a hordeiviry (Petty and Jackson, 1989) jsou schopny mezibuněčného pohybu i bez přítomnosti funkčního obalového proteinu (Lough et al., 2000), a v důsledku toho musí virus disponovat schopností mezibuněčného přesunu ve formě RNP, zprostředkované proteiny TGBp (Lough et al., 2000). V porovnání s potexviry, vyžadujícími CP k pohybu z buňky do buňky (Chapman et al., 1992; Baulcombe et al., 1995) PVX CP představuje jediný virový protein, který je hojně lokalizován u vstupu do plasmodesmat infikovaných buněk. CP potexvirů se však nepodílí na rozšiřování plasmodesmat (Krishnamurthy et al., 2002), ačkoliv byla zjištěna asociace s plasmodesmaty u infikovaných listů *Nicotiana benthamiana* virem PVX (Oparka et al., 1996). Lough et al. (1998; 2001) navrhli model, vysvětlující vznik asociace CP s plasmodesmaty u viru mozaiky jetele bílého (WCIMV; *White Clover mosaic virus*), dalšího zástupce rodu potexvirů. Uvádí se, že daný

virus je vzdáleně sérologicky příbuzný s PVX. Model předpokládá schopnost TGBp1 zvýšit propustnost plasmodesmat, kdy je následně umožněn transport RNP (komplexu CP, TGBp1 a virové RNA) skrz plasmodesmata, ačkoli všechny tři TGBp proteiny společně s CP jsou následně vyžadovány k mezibuněčnému pohybu. U potexvirů dle Lough et al. (1998) v rámci rostlinných pletiv právě tento model transportu. Model, navržený Santa Cruz et al. (1998) uvažuje pohyb PVX virionu plasmodesmaty, což bylo potvrzeno pokusy s využitím CP antiséra, které se váže na CP integrovaný ve virové částici.

TGBp1 se může přednostně vázat na jeden konec virové částice PVX a tím způsobit přeměnu PVX genomu z translačně-inaktivní do translačně-aktivní formy (Baratova et al., 1992). Předpokládá se, že právě přeměna na translačně-aktivní formu může souviset s komplexem RNA/TGBp1/CP, formou RNP, požadovanou k transportu skrz plasmodesmata. Pokud není TGBp1 z nějakého důvodu přítomen. Musí existovat jiný mechanismus schopný v raných fázích infekčního cyklu změnu konformace uskutečnit. Zjistilo se, že remodelace může být spojena s fosforylací CP buněčnými kinázami (Atabekov et al., 2001).

3.6 RNA silencing – utlumování genové exprese

Vedle pasivní obrany, jako je například přítomnost kutikuly či buněčné stěny, které brání vniku patogenů do buňky, může v rostlině docházet i k aktivní obraně proti virům. Ta je zprostředkována především umlčováním genů (RNA silencing).

Mechanismus RNA interference (RNAi, RNA interference) označuje vysoce konzervativní obranný systém detekovaný u eukaryotických organismů. Jedná se o typ sekvenčně specifické genové regulace způsobující degradaci RNA (Baulcombe, 2004). Základním principem je štěpení dsRNA, která vzniká u virové infekce jako produkt RNA-dependentní RNA polymerázy kódované virem (Himber et al., 2003). Ta je rozeznána enzymem Dicer, který ji denaturuje a rozštěpí na krátké nepřekrývající se úseky siRNA (small interfering RNA). Enzym Dicer štěpí RNA na úseky dlouhé zhruba 20 nukleotidů. siRNA se připojí na proteinový komplex RISC (RNA-induced silencing complex), ten odvine siRNA na jednořetězcovou, která se komplementárně váže s další virovou RNA, kterou rozštěpí nukleáza Slicer (součást RISC). Výsledkem je likvidace RNA buněčnými mechanismy (Vance and Vaucheret, 2001).

RNAi lze využít jako metodu pro analýzu funkce genů u eukaryot, kdy selektivním vyřazením určitého genu lze pozorovat utlumení příslušného fenotypového projevu. Široké uplatnění RNAi nachází i v procesu transgenóze, kdy vnesením určitého transgenů do rostlin

lze navodit odolnost vůči virům (Bayne et al., 2005). Některé viry kódují supresory (nestrukturní proteiny), štěpící proteiny obranného systému buňky, výsledkem čehož je urychlení exprese virových genů. Jana et al. (2004) uvádí, že takovým proteinem je například HC-Pro (**H**elper **c**omponent **p**rotease, pomocný komponent proteázy) potyvírů nebo multifunkční protein TGBp1 potexvirů. Mechanismus účinku je však rozdílný, HC-Pro zabráňuje akumulaci siRNAs, zatímco TGBp1 působí cíleně na potlačení šíření signálu RNAi.

Degradace homologní RNA (gene silencing, umlčování genů) se může dít na úrovni transkripce - TGS (**T**ranscriptional **g**ene **s**ilencing), kdy v jádře dochází k methyloaci DNA a k modifikaci chromatinu, respektive k zabránění vzniku transkriptu z příslušného genu, nebo na úrovni post-transkripční - PTGS (**P**ost-transcriptional **g**ene **s**ilencing), kdy transkript sice vzniká, ale je zabráněno jeho překlada do proteinu, tím zpomaluje expresi virů v buňce. Samotný proces umlčování genů probíhá v cytoplazmě buňky (Jana et al., 2004). Umlčování genů (signál RNAi) se šíří rostlinou, což zvyšuje efektivitu boje proti virové infekci (Vance and Vaucheret, 2001).

3.7 Struktura PVX

Rod *Potexvirus* je charakteristický utvářením flexibilních vláknitých virionů. Analýza strukturálního uspořádání flexibilních vláknitých virů patří mezi obtížné (Kendall et al., 2008). Je to způsobeno především flexibilitou virových částic, která brání studiu trojrozměrných struktur, a tudíž je obtížné porozumět interakci RNA s obalovým proteinem utvářející výslednou strukturu/ tvar virové částice. Doposud je známo, že infekční částice PVX jsou neobalené, mají flexibilní vláknitý tvar a obsahují cca 1300 kopií obalového proteinu spirálovitě uspořádaného okolo (+)ssRNA (Kendall et al., 2008). Zatímco struktura mnoha kulovitých virů byla zjištěna prostřednictvím rentgenové krystalografie (RTG difrakce), tak struktura flexibilních vláknitých virů nebyla doposud touto metodou detailně popsána na molekulární úrovni (Parker et al., 2002).

Vzhledem k tomu, že flexibilní vlákna obvykle nekrytalizují, a transmisní elektronovou mikroskopií lze jen obtížně dosáhnout molekulárního rozlišení, stejně tak je problémové i využití RTG difrakce (Chandrasekaran and Stubbs, 2001). RTG difrakční analýza využitá ke studiu strukturálního uspořádání řady zástupců potexvirů se ve výsledku projevila jako nevhodná k detailnějšímu popisu virové částice, neboť se omezovala pouze na určení helikální (spirálovité) struktury, nebo dokonce jen na zjištění průměru a stoupání závitů

(Parker et al., 2002). Využitím výše uvedených metod byla objasněna základní architektura virionu PVX. PVX má helikální strukturu, kde na jednu otáčku šroubovicově uspořádaného obalového proteinu připadá 8,9 monomerů. Monomer je tvořen 236 aminokyselinami, výška závitů 3,3 – 3,6 nm kolísá v závislosti na množství vody (Baratova et al., 2004).

Nutnost detailnějšího popisu flexibilních virových částic (zvláště pak PVX) si vyžádalo využití virů jako modelových systémů k využití PVX v biotechnologiích (Parker et al., 2002).

Nově byla pomocí cryo-EM (**cryo-electron mikroskopy**, kryo-elektronová mikroskopie) objasněna struktura u viru mozaiky bambusu (BaMV, *Bamboo mosaic virus*) (DiMaio et al., 2015) a u viru mozaiky pepina (PepMV, *Pepino mosaic virus*) (Agirrezabala et al., 2015), dalších zástupců rodu potexvirus. Studie odhalila, že N- a C- konce CP stabilizují virovou částici a tím umožňují flexibilní utváření virionů. Yang et al. (2012) prokázali, že prostřednictvím delečních mutací, či substitučních mutací u PapMV v oblasti N- konce došlo k narušení interakce jednotlivých podjednotek PapMV CP, což se projevilo neschopností tvorby výsledného virionu. Daná zjištění naznačují, že hydrofobní interakce mezi peptidy na N- konci a sousední hydrofobní drážkou jsou základním mechanismem polymerace vláknitých rostlinných virů. Agirrezabala et al. (2015) dodávají, C- konec CP u PepMV, dalšího zástupce potexvirů, formuje podél axiální osy místa vhodná pro interakci podjednotek CP, kde každá podjednotka je ve vzájemném kontaktu. Z toho vyplývá, že C- konec je zodpovědný za interakce podél axiální osy, jež podporují spirálovité uspořádání částice.

3.7.1 PVX CP

Rozsáhlé studie obalového proteinu PVX prokázaly, že PVX CP se neomezuje pouze na roli sestavení virové částice, ale podílí se do určité míry i na infekčním cyklu. Byla prokázána účast PVX CP při akumulaci virové RNA a systemickém transportu v rámci rostlinných pletiv (Chapman et al. 1992). Je také zodpovědný za navození R_x rezistence u rostlin bramboru a hraje důležitou roli při regulaci translace virové RNA (Kozlovsky et al. 2003). Na základě výše uvedeného výčtu jednotlivých funkcí PVX CP je zcela patrný jeho nezastupitelný význam ve všech fázích interakce virus – rostlina (Baratova et al., 2004).

Navzdory tomu, že CP je nejvíce produkovaným virovým proteinem během infekčního cyklu, ví se jen velmi málo o jeho primární struktuře, způsobu formování

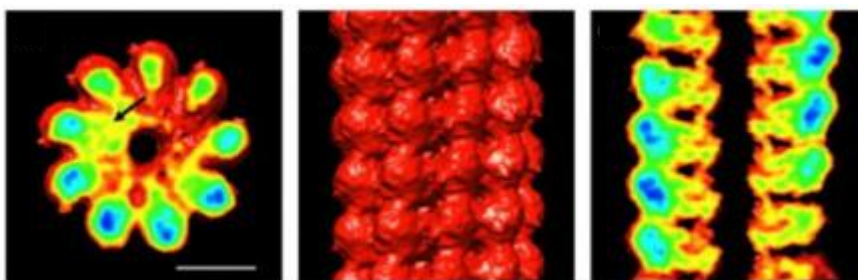
podjednotek CP v intaktní virovou částici, nebo o procesu kompletace a rozkladu virové částice (Batten et al., 2003).

Velikost CP činí zhruba ~ 25 kDa, což odpovídá primární sekvenci PVX CP, určité anomálie lze pozorovat při separaci vzorku intaktního PVX CP využitím SDS-PAGE (sodium dodecylsulfát polyakrylamidová gelová elektroforéza), kdy PVX CP vykazuje výrazně pomalejší elektroforetickou pohyblivost, což koresponduje s různými kmeny PVX o molekulových hmotnostech 27 – 29 kDa (Koenig, 1972). Tozzini et al. (1994) objevili v purifikátu PVX glykosylované formy PVX CP a domnívají se, že glykosylace by mohla být příčinou rozdílné molekulové hmotnosti. Baratova et al. (2004) zjistili, přítomnost dvou monosacharidů galaktózy nebo fukózy na první aminokyselině serinu. Prokázali také, že téměř všechny PVX CP podjednotky wtPVX (wild type PVX, divoký typ PVX) obsahují O- glykosylově vázané monosacharidové zbytky na peptidech v oblasti N- konce (Tozzini et al., 1994). Přítomnost N- konce PVX CP na povrchu virové partikule vytváří tzv. supersekundární strukturu, definované jako tři propletené β -hřebeny, předpokládá se, že odstranění N- terminálního segmentu PVX CP by způsobilo značné fyzikálně-chemické změny v povrchové struktuře PVX virionu (Baratova et al., 2004). Bylo potvrzeno, že glykosylace může způsobit značné změny struktury a funkce proteinů (Ohtsubo and Marth, 2006). Baratova et al. (2004) zjistili, že intaktní wtPVX viriony vykazují vysokou absorpční vodní kapacitu a schopnost pojmout a navázat velké množství molekul vody na povrch virové částice. Je prokázáno, že mutantní formy PVX CP (s delecí N- konce) nejsou schopné glykosylace, tak i jejich schopnost vázat molekuly vody je výrazně nižší. Delece N-terminálního segmentu vede ke značným fyzikálně-chemickým změnám povrchové struktury virionu. Předpokládá se, že glykosylovaný N- konec PVX CP intaktních virionů prezentovaný na jejich povrchu indukuje tvorbu sloupcovitého pláště z molekul vázané vody, plnící pravděpodobně funkci stabilizačního prvku při udržování povrchové struktury virionu. Vodní sloupec kolem virionu PVX vytváří síť vodíkových můstků mezi či uvnitř podjednotek CP, jež silně ovlivňují strukturu a vlastnosti externích oblastí obalového proteinu viru.

Výsledky měření spekter cirkulárního dichroismu PVX CP uvažují složení proteinu ze 40 % α – helixy, 5 % β – skládanými listy a z 55 % je tvořen náhodnými klubky, přičemž převažuje α – helikální struktura (Dobrov et al., 2007).

3.7.1.1 Topografie PVX

Cryo-EM a RTG difrakce (využívaná k měření průměru vláken), přispěla k objasnění základní struktury virové částice (Obr. 3), avšak v nízkém rozlišení. Využití metod s vysokým rozlišením (rentgenová krystalografie) není možné z důvodu neschopnosti nativních PVX virionů, ani podjednotek CP produkovat krystaly. Zatím jediným zástupcem potexvirů s popsanou krystalovou strukturou CP je PapMV (Zhang et al., 1993). Získaná data prozatím neumožňují sestavení detailnějších modelů podjednotek obalového proteinu virionu (Atabekov et al., 2007).



Obrázek 3: Iterativní rekonstrukce spirálovitého utváření virionu PVX
Převzato z: Maramorosch and Murphy (2014)

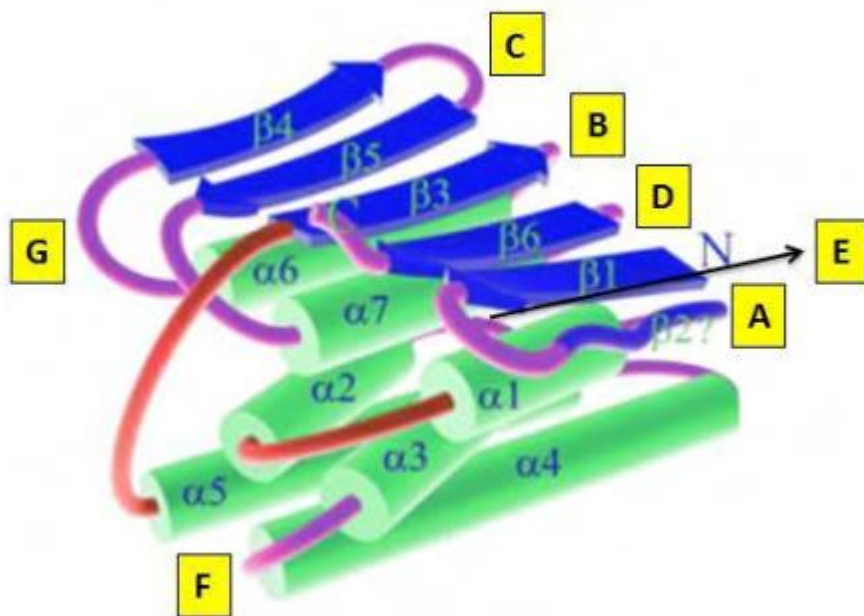
Metoda bombardování tritiem [^3H] se používá v případech, kdy nelze objekt studovat metodami rentgenové krystalografie. Metoda bombardování tritiem se používá ke studiu topografie proteinů, prostorového uspořádání biomakromolekul a supramolekulárních systémů. Princip metody je založen na bombardování makromolekul atomy tritia o vysoké reaktivitě vznikajících termální disociací molekul tritia na povrchu rozžhaveného wolframového vlákna. Po bombardování biologického materiálu je následně analyzováno pomocí standardních chemických analýz proteinů (HPLC, **high-performance liquid chromatography**, vysokoúčinná kapalinová chromatografie) intramolekulární rozložení atomů tritia, sloužící jako detekční markery. Předpokládá se, že množství tritia začleněného do různých částí makromolekuly či jejich komplexů, by mohlo být nepřímo úměrné vzdálenosti značených částí od povrchu makromolekuly (komplexů) (Baratova et al., 1992).

Baratova et al. (1992) použili metodu bombardování tritiem [^3H] ke zmapování povrchu PVX CP. K ověření použili PVX – specifické monoklonální protilátky (MAbs, **monoclonal antibodies**). Metoda ukázala, že N- konec obalového proteinu (tvořený cca 20 aminokyselinovými zbytky) je prezentován na povrchu virové částice, neboť byl přístupný značení atomy tritia. Vystupuje také jako význačná antigenní determinanta, kam se váží

specifické protilátky. Zatímco C- konec nebyl značení atomy tritia vůbec přístupný a nebyl rozpoznán ani monoklonálními protilátkami připravenými proti PVX, naznačuje, že C- konec je skrytý uvnitř virové částice. Dané závěry vedly k vytvoření modelu terciární „sendvičové“ struktury PVX CP virionu Atabekov et al. (2007) (Obr. 4). Na základě toho modelu je každá podjednotka PVX CP tvořena 7 α -helixy ($\alpha 1 - \alpha 7$) a 6 β -skládanými listy ($\beta 1 - \beta 6$) (Lukashina et al., 2012). Podjednotky PVX CP se skládají ze dvou domén, zajišťující vysokou plasticitu obalového proteinu. V blízkosti virové osy (nalevo) se nachází svazek čtyř α -helixů $\alpha 2$ a $\alpha 3$ (horní dvojice) a $\alpha 4$ a $\alpha 5$ (spodní dvojice) (první doména). Tato oblast je spojena s $\beta\alpha\beta\alpha$ překladem (druhá doména) prostřednictvím pružné spojky, která se nachází mezi $\alpha 5$ a $\beta 3$. Tento překlad se také označuje jako RRM (RNA-recognition motif, RNA-rozpoznávací motiv), je tvořen $\beta 3$, $\alpha 6$, $\beta 4$, $\beta 5$ a $\alpha 7$. Předpokládá se, že $\beta\alpha$ jednotka ($\beta 1$, $\beta 6$ a $\alpha 1$) je zakotvena z jedné strany v RRM. Helix $\alpha 1$ z $\beta\alpha$ jednotky je propojen s $\alpha 2$ a tím i svazkem čtyř α -helixů (první doménou) pomocí druhé spojky. $\beta 2$ je pravděpodobně tvořen 15. – 22. aminokyselinou PVX CP.

Tento model terciární struktury byl v Laboratoři virologie ÚEB AV ČR, v. v. i. využit jako předloha pro navržení nových pozic v PVX CP pro vkládání antigenů za účelem jejich prezentace na povrchu virových částic PVX (Vaculík et al., 2015) (viz kapitola: Inzerce do povrchově situovaných oblastí PVX CP).

U PapMV, zatím jediného zástupce potexvirů s popsanou krystalovou strukturou, dochází k interakci sousedních podjednotek CP prostřednictvím N- konců. Na základě prováděných pokusů bylo zjištěno, že mutace v N- konci PapMV CP zcela narušily interakci mezi podjednotkami CP (Lecours et al., 2006). Interakce mezi peptidy N- konce každé podjednotky CP s hydrofobní drážkou sousedící podjednotky je kritická pro vytvoření virionu potexvirů (Yang et al., 2012).



Obrázek 4: Prostorový strukturální model podjednotky PVX CP ve virionu PVX

α = sekundární struktura α – helix; β = sekundární struktura β – skládaný list
spojky jsou vyznačeny fialovou barvou, A – G odpovídá povrchovým smyčkám

Převzato z: Vaculík et al. (2015)

Prostorové uspořádání PVX CP se zcela odlišuje od navržených modelů obalových proteinů jiných zástupců vláknitých rostlinných virů. Například u potyvirů a tobamovirů je N- a C- konec lokalizován na povrchu virionů. Daný fakt potvrdili Shukla et al. (1988), kteří zkoumali účinky trypsinové aktivity (proteolýzy) na virové partikule u odlišných zástupců potyvirů a došli ke stejnému závěru, že N- a C- konec je prezentován na povrchu virové částice.

Přítomnost N- konce CP na povrchu virové partikule byla potvrzena i jinými způsoby. Santa Cruz et al. (1996) použili PVX vektory, kde byl GFP ve fúzi s N- koncem CP. Rostliny inokulované danými konstrukty vykazovaly fluorescenční aktivitu, detekovanou při systemickém šíření viru rostlinnými pletivy, pokud byl CP přítomen.

3.7.1.2 Úloha N- konce PVX CP ve virionu PVX

Termín „kotranslační rozpad“ byl popsán u TMV, dalších zástupců rostlinných virů (+)ssRNA (Shaw, 1999), ale i živočišných virů (Hiscox and Ball, 1997). Jedná se o proces rozvolnění virionu, respektive umožnění translace virové RNA, ke které dochází primárně v inokulovaných buňkách. 5' konec virové RNA těchto zástupců virů může být schopen

asociace s ribozomy, což znamená, že proces samotné translace se podílí na rozvolňování virionu, přičemž simultánně probíhá (Atabekov et al., 2007).

Na rozdíl od těchto virů enkapsidovaná PVX RNA není schopna asociace s ribozomy, respektive ihned po infekci není schopna translace. Neboť v *in vitro* (bezbuněčném) systému nedochází k tvorbě specifických virových proteinů, což naznačuje, že nedošlo k rozvolnění virové partikule. Ačkoliv není PVX RNA translatovatelná v nativní podobě virionu PVX, může být převedena v translatovatelnou formu dvěma způsoby (Atabekov et al., 2001). Jednak prostřednictvím fosforylace PVX CP specifickými Ser/Thr (**serin/threonin**) protein kinázami, či vazbou molekul TGBp1 s PVX CP. Předpokládá se, že oba mechanismy probíhají v rámci jednoho infekčního cyklu, ale v různých fázích (Atabekov et al., 2007).

Bylo prokázáno, že molekuly TGBp1 se selektivně váží pouze na jeden konec částice PVX, pravděpodobně v oblasti 5' konce genomové RNA. Interakce TGBp1 s podjednotkami CP způsobuje změny konformace (destabilizace) PVX CP (dochází k remodelaci částic PVX), čímž je aktivován proces rozvolnění virionu a umožnění translace PVX RNA (Atabekov et al., 2000; Karpova et al., 2006). Destabilizace vedoucí k rozvolnění helixu CP je reversibilní, což naznačuje, že komplex TGBp1-PVX je metastabilní, a je nutná asociace dalších faktorů pro rychlé rozvolnění virionu PVX (Atabekov et al., 2007). Předpokládá se, že protein TGBp1 kódovaný virovou RNA je schopný umožnit translaci PVX virionů, určených k mezibuněčné translokaci skrz plasmodesmata. Interakce TGBp1 s podjednotkami CP je funkční pouze za předpokladu, že proběhne v pozdějších fázích infekčního cyklu, respektive až po expresi genu virového proteinu TGBp1 (Atabekov et al., 2001).

Destabilizace virové partikule může být také způsobena fosforylací CP rostlinnými Ser/Thr protein kinázami (Rodionova et al., 2003), s tím rozdílem, že aktivace translace zprostředkovaná vazbou molekul TGBp1 s PVX CP způsobuje okamžitou disociaci celé virové partikule na jednotlivé podjednotky CP a tím uvolnění virové RNA (Atabekov et al., 2007). Atabekov et al. (2007) prokázali, že fosforylace vede ke změnám konformace PVX CP, aniž by došlo k inhibici infekční schopnosti viru. N- konec PVX CP, prezentovaný na povrchu virové částice, obsahuje Ser/Thr zbytky, potenciální fosforylační místa. Mutantní formy PVX CP, postrádající N- konec, ztrácí schopnost aktivovat translaci virové RNA fosforylací a navíc Karpova et al. (2006) předpokládali, že dojde u těchto mutantů ke snížení infekčnosti. Ve výsledku vykazovaly mutantní formy prokazatelně stejnou specifickou infekčnost jako wtPVX viriony. Mutantní formy PVX CP (bez N- konce), jsou do translatabilní formy převedeny prostřednictvím vazby proteinu TGBp1 s podjednotkami PVX CP což naznačuje, že molekuly TGBp1 nevyužívají při interakci na povrchu exponovanou

N- koncovou oblast PVX CP, ale mohou interagovat se skrytými oblastmi CP (Atabekov et al., 2000). Studie prováděné Zayakina et al. (2008) využívaly delečních mutantů, kdy bylo odstraněno pouze 10 reziduálních peptidů C- terminálního segmentu PVX CP, výsledkem byla ztráta schopnosti molekul TGBp1 se vázat na určité domény podjednotek CP lokalizovaných na 5' konci helixu. Získané údaje naznačují, že podjednotky CP jsou vinuty v takové orientaci, že jejich C- terminální sekvence jsou obráceny směrem k vnějšímu povrchu 5' konce virionu. Detailní mechanismus zpřístupnění PVX RNA není znám. Tomashevskaya et al. (1993) předpokládají, že jakmile je PVX CP fosforylován, stane se virová partikule, přesněji 5' konec nepřekládané sekvence PVX RNA označovaný jako $\alpha\beta$ -leader přístupný ribozomům. Bylo prokázáno, že $\alpha\beta$ -leader (lokalizovaný 83 nukleotidů za methylguanosinovou čepičkou) výrazně zvyšuje úroveň translace RdRp (replikázy) a dalších reportérových genů. Je však stále nejasné, jak fosforylace PVX CP mění interakci (vazbu) podjednotek s virovou RNA, nicméně lze předpokládat, že tato změna vede ke snížení afinity podjednotek CP k 5' konci virové RNA, přesněji $\alpha\beta$ -leaderu, což funguje jako spouštěč rozvolnění kapsidy a obnažení virové RNA (Atabekov et al., 2001).

Na základě prováděných pokusů lze říci, že N- terminální segment PVX CP hraje důležitou roli v regulaci virové translace (Atabekov et al., 2001; Karpova et al., 2006). Důležitým rysem regulační funkce N- konce PVX CP je, že díky expozici na povrchu v RNPs či PVX virionu nemůže být přímo zapojen do interakcí podjednotek CP mezi sebou, nebo s virovou RNA (Karpova et al., 2006). Modifikovaná N- koncová část podjednotek CP (buď glykosylací či fosforylací) je schopna ovlivnit funkci PVX CP, který může posléze vystupovat jako regulátor RNA translace jak v RNPs, tak v nativních částicích PVX. Například, wtCP funguje jako aktivní translační supresor; po odstranění jeho N- koncového segmentu však nedochází u wtCP ke ztrátě supresorové aktivity. K úplné ztrátě regulační funkce CP, dochází v případě fosforylace N- konce, nebo nahrazením fosforylačních míst (Ser/Thr) v N- terminálním segmentu zbytky neutrálních aminokyselin neschopných fosforylace Ala/Gly (alanin/glycin) (Lukashina et al., 2012). Vzhledem k tomu, že N- terminální segment CP není zapojen do vazeb RNA s proteiny, či do interakcí mezi podjednotkami CP, je jeho aktivita pravděpodobně podmíněna schopností ovlivňovat konformaci oblastí CP, které jsou zapojeny do interakcí podjednotek CP - CP anebo interakcí CP - RNA během skládání virové partikule.

Na základě získaných výsledků Karpova et al. (2006) uvažují, že N- terminální segment CP hraje roli při formování helikální struktury virionu během procesu skládání partikule. Lukashina et al. (2012) předpokládají, že N- koncová oblast PVX CP vystupuje

jako „opora“ během procesu skládání virionu, neboť v případě absence tohoto segmentu se tvoří defektní virové partikule. To potvrzují i pokusy prováděné Chapman et al. (1992), kdy deleční mutanti PVX CP postrádající 19 aminokyselinových zbytků N – konce vytvářeli viriony s abnormální morfologií.

Výčtem všech prováděných experimentů s porovnáním jednotlivých výsledků lze jednoznačně říci, že N- terminální segment PVX CP se významně podílí na průběhu virové infekce (Atabekov et al., 2001, Rodionova et al., 2003). PVX viriony se vyskytují ve třech rozdílných funkčních a strukturálních stavech: 1. nativní viriony (neschopné translace *in vitro*); 2. virové partikule tzv. remodelované vazbou TGBp1 (částice je rychle a kompletně rozvolněna); a za 3. virové částice translatabilní díky fosforylaci N- terminálního segmentu PVX CP (pomalejší proces rozvolnění partikule).

3.7.1.3 Inzerce do povrchově situovaných oblastí PVX CP

PVX je v současné době často využíván pro prezentaci peptidů/proteinů na povrchu virionů s využitím v rostlinných biotechnologiích (např. v inovativních vakcinačních strategiích), jedná se o transienční (dočasnou) expresi požadovaných peptidů/proteinů (Vaculík et al., 2015). Transienční expresní systém může produkovat velké množství požadovaných bílkovin v relativně krátké době. I přes skutečnost, že trojrozměrná struktura PVX CP ve virionu je pouze predikovaná, experimentálně bylo potvrzeno, že je možné fúzovat požadované peptidy/proteiny s N- nebo C- koncem PVX CP, aniž by došlo k narušení skládání virových partikulí (Čeřovská et al., 2013; Plchová et al., 2011; Uhde-Holzem et al., 2006). Modifikace prováděná na C- konci PVX CP mohou ale narušit schopnost systémové infekce (Plchová et al., 2011). Fúze s terminálními segmenty však není univerzální, je nutné hledat nová místa vhodná pro inzerci, která mohou tolerovat přítomnost peptidů/proteinů. Nejnověji navržený model terciární struktury PVX CP ve virionu dle Lukashina et al. (2009) může sloužit jako předloha pro vkládání rekombinantních peptidů/proteinů, jedná se především o možné fúze s povrchovými smyčkami.

Vaculík et al. (2015) hledali nové pozice pro prezentaci peptidů/proteinů, jednalo se o sedm různých smyček (Obr. 3), které by mohly být exponovány na vnější straně PVX CP. Na tomto základě byly vybrány pozice (smyčky) A-G propojující α -helixy s β -hřebeny. Jako antigen pro prezentaci byl použit epitop onkoproteinu E7 odvozený od lidského papilomaviru (HPV 16) ve spojení s detekčním tagem. Výsledky z transienční exprese modifikovaných PVX CP v *N. benthamiana* prokázaly, že nejvhodnější pozice pro prezentaci antigenů je pozice A, která je lokalizována mezi 23. a 24. aminokyselinou v PVX CP. Ostatní smyčky se

prokázaly jako nevhodné, pravděpodobně z důvodu narušení trojrozměrné struktury obalového proteinu.

Experimenty prováděné Plchovou et al. (2011) využívaly pro prezentaci mutantního onkoprotein E7GGG HPV 16 N- a C- terminální segmenty PVX CP. Nebylo možné prokázat tvorbu modifikovaných virových částic vzhledem ke značné nestabilitě konstruktů při purifikaci. Čeřovská et al. (2013) fúzovali s N- a C- koncem PVX CP mutantní E6 onkoprotein (E6GT) HPV 16. Bylo zjištěno, že takto modifikovaný virus není schopen se systemicky šířit v transgenních rostlinách *N. benthamiana* K7 (nesoucí HC-Pro z PVA a MP z TMV), ačkoli všechny konstrukty byly schopny formovat modifikované virové částice. Onkoprotein E6GT HPV se v takto modifikovaných rostlinách exprimoval ve výrazně vyšším množství pouze ve fúzi s C- terminálním segmentem.

Čeřovská et al. (2012) prováděli transientní expresi HPV 16 L2 epitopu, prostřednictvím fúze daného chimérického konstruktu s N- koncem PVX CP v rostlinách *N. benthamiana* 3H (nesoucí MP z TMV). Prokázali, že chimérický konstrukt nezpůsobil ve fúzi s N- koncem narušení stability a infekčnosti virové partikule. Stejně tak nebyl narušen proces skládání virionu, pohyb z buňky do buňky, ale i na dlouhé vzdálenosti v rámci rostlinných pletiv. Expresí epitopu HPV 16 L2₁₀₈₋₁₂₀ ve fúzi s C- koncem PVX CP, znemožnila proces skládání virionu, z toho vyplývá, že tato modifikace C- konce (v podobě fúze většího inzertu) brání sestavení virové partikule.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Materiál

4.1.1 Rostlinný materiál

- rostliny *Nicotiana benthamiana* - ÚEB AV ČR, v. v. i.

Výchozím rostlinným materiálem byly šesti – týdenní sazenice rostliny *Nicotiana benthamiana* (WT, wild type). Rostliny byly kultivovány při 20 – 25 °C za osvětlení (16 h) a při 15 – 20 °C ve tmě (8 h).

4.1.2 Bakteriální kmeny

Chemokompetentní buňky *Escherichia coli* DH5α (ÚEB AV ČR, v. v. i.)

Agrobacterium tumefaciens GV3101 (pJIC SA-Rep) (ÚEB AV ČR, v. v. i.)

4.1.3 Konstrukty

Δ2-32 PVX CP+GFP/pGR106 tvořený otevřeným čtecím rámcem pro zkrácený PVX CP (bez kodónů pro 2.-32. aminokyselinu) ve vektoru pGR106 s vloženým genem pro zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein) GFP

Δ2-33 PVX CP+GFP/pGR106 tvořený otevřeným čtecím rámcem pro zkrácený PVX CP (bez kodónů pro 2.-33. aminokyselinu) ve vektoru pGR106 s vloženým genem pro zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein) GFP

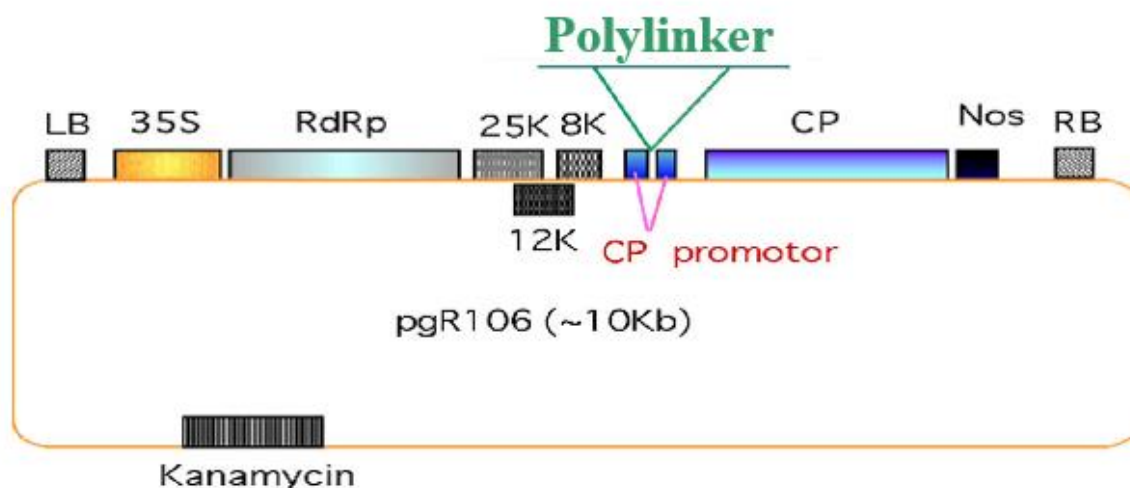
F33A PVX CP+GFP/pGR106 tvořený otevřeným čtecím rámcem pro PVX CP (kodón pro 33. aminokyselinu fenylalanin nahrazen kodónem pro alanin) ve vektoru pGR106 s vloženým genem pro zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein) GFP

ΔF33 PVX CP+GFP/pGR106 tvořený otevřeným čtecím rámcem pro PVX CP (bez kodónu pro 33. aminokyselinu fenylalanin) ve vektoru pGR106 s vloženým genem pro zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein) GFP

K118A PVX CP+GFP/pGR106 tvořený otevřeným čtecím rámcem pro PVX CP (kodón pro 118. aminokyselinu lysin nahrazen kodónem pro alanin) ve vektoru pGR106 s vloženým genem pro zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein) GFP

4.1.4 Vektor

Binární vektor pGR106 odvozený od PVX o velikosti přibližně 10 kb, nese gen pro rezistenci ke kanamycinu. (Obr. 5) - poskytl Dr. D. C. Baulcombe, The Sainsbury Laboratory, Norwich, Velká Británie



Obrázek 5: Schématické znázornění rostlinného virového vektoru pGR106.

LB a RB - (left border a right border; levá a pravá hranice) místa nezbytná pro začlenění jimi ohraničené sekvence buňkami *A. tumefaciens* do DNA rostlinné buňky, Kanamycin – gen rezistence ke kanamycinu, 35S – promotor z Viru mozaiky květáku, RdRp – RNA-dependentní RNA polymeráza PVX, 25K (TGBp1), 12K (TGBp2) a 8K (TGBp3) – blok tří genů kódující pohybové proteiny viru PVX, CP – obalový protein PVX, před kterým je zdvojený promotor, Polylinker - klonovací místo, Nos – terminátor pro Nopalín synthasu

Převzato z: <http://www.plantsci.cam.ac.uk/research/davidbaulcombe/methods/vigs>, upraveno

4.1.5 Vybavení

4.1.5.1 Laboratorní přístroje

Autokláv PS 20A	Chirana, ČR
Biologický termostát Heraeus B6	Heraeus, Německo
Bio TDB 120 – Dry block termostát	BIOSAN, Litva
Centrifuga Biofuge Pico	Heraeus, Německo
Dokumentační systém GelDoc™ EQ	Bio-Rad, USA
Elektroforetická vana	Bio-Rad, USA
Chladicí skříň	Sanyo, Japonsko

Chladnička ERD 2743	Electrolux, Švédsko
Chlazená stolní odstředivka	Sigma, Německo
Inkubátor s třepačkou AM/89	Dynatech, ČR
Kultivační box MLR-350	Sanyo, Japonsko
Laminární box HERAsafe KS 12	Heraeus, Německo
Magnetická míchačka MM2A	LAVAT, ČR
Magnetické míchadlo bez ohřevu IKA-Big Squid	IKA, Německo
Microcentrifuga 220VAC	Roth, Německo
Microcentrifuga	Sigma, Německo
Minitřepačka LabDancer	IKA, Německo
Mrazicí box (-70 °C) Hera freeze basic	Heraeus, Německo
Mrazicí box (-80 °C) Hera freeze	Heraeus, Německo
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, USA
Orbitální inkubátor	Gallenkamp, UK
pH-metr HI8817	Hanna Instruments, USA
Spectrafuge™ Mini centrifuga	Labnet, Korea
Spektrofotometr Helios Gamma	Thermo Fisher Scientific, USA
Stolní třepaný inkubátor NB-205	N-BIOTEK, Korea
T100™ Thermo cycler	Bio-Rad, USA
Thermalblock TB1	Biometra, Německo
UV lampa TXC-20-M	Viber LourMat, Francie
Váhy Kern EW220-3NM	Kern, Německo
Výrobník ledu BREMA	BREMA Ice makers, Itálie
Zdroj napětí pro elektroforézu Power Pac 300	Bio-Rad, USA

4.1.5.2 Chemikálie

6x DNA Loading Dye	Fermentas, Litva
5x Green GoTaq® Reaction Buffer	Promega, USA
5x Phusion® HF – Reaction Buffer	New England BioLabs, UK
5x Phusion® GC – Reaction Buffer	Thermo Fisher Scientific, USA
Azid sodný	Lach:ner, ČR

Deoxynucleotide (dNTP) Solution Mix	New England BioLabs, UK
Diethanolamin	Fluka, Švýcarsko
Difco® Bacto® Agar	Difco, USA
Dihydrogenfosforečnan draselný	Lach:ner, ČR
EDTA	Lachema, ČR
Glycerol (50 %)	Lach:ner, ČR
Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát	Lach:ner, ČR
Hydrogenuhličitan sodný	Lach:ner, ČR
Chlorid draselný	Lach:ner, ČR
Chlorid sodný	Lach:ner, ČR
Chlorid vápenatý	Lach:ner, ČR
Isopropanol	Lach:ner, ČR
Kanamycin	Serva, Německo
Kyselina boritá	Lachema, ČR
Kyselina chlorovodíková	Lachema, ČR
Kvasničný extrakt	Amreson, USA
Marker GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	Fermentas, USA
Marker GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas, USA
Ovalbumin	Invitrogen, USA
Pepton	Amresco, USA
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	New England BioLabs, UK
p-nitrofenylfosfát	Sigma, USA
Polyvinylpyrrolidon	Sigma-Aldrich, USA
Redestilovaná voda	ÚEB, AV ČR
SeaKem® LE agarose	Cambrex, USA
SYBR® Safe DNA Gel Stain	Invitrogen, USA
T4 DNA Ligase	New England BioLabs, UK
T4 DNA Ligase Reaction Buffer	New England BioLabs, UK
Tetracyklin	Sigma-Aldrich, USA
Tris ultrapure	Duchefa, Holandsko
Triton X-100	Serva, Německo
Tween 20	Fluka, Švýcarsko
Uhličitan sodný	Lachema, ČR

4.1.5.3 Roztoky, pufrы, reakční směsi, soupravy a restriční enzymy

ELISA:

Potahovací pufr = PP: 14,7 mM Na₂CO₃, 34,8 mM NaHCO₃, 3,1 mM NaN₃, pH 9,6

Promývací roztok = PBS + T: 137 mM NaCl, 7,8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, 2,7 mM KCl, 3,1 mM NaN₃, 0,05 % (v/v) Tween 20, pH 7,4

Konjugační pufr = KP: PBS + T, 2 % (w/v) polyvinylpyrrolidon (PVP), 0,2 % (w/v) ovalbumin (OVO), pH 7,4

Substrátový pufr = SP: 9,7 % (v/v) diethanolamin; pH 9,8

Elektroforéza – elektroforetický pufr:

TBE pufr: 89 mM Tris-HCl, 89 mM H₃BO₃, 2,5 mM EDTA, pH 8,0

PCR reakční směs pro přípravu konstruktů PVX CP:

5x Phusion [®] HF – Reaction Buffer (10x)	New England BioLabs, UK
5x Phusion [®] GC – Reaction Buffer (10x)	Thermo Fisher Scientific, USA
Deoxynucleotide (dNTPs) Solution Mix (10 mM)	New England BioLabs, UK
Phusion [®] High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/μl)	New England BioLabs, UK
Primery (50 μM)	Metabion, Německo
pGR106	Dr. Baulcombe, UK

PCR reakční směs pro přípravu GFP (Green Fluorescent Protein):

5x Phusion [®] GC – Reaction Buffer (10x)	New England BioLabs, UK
Deoxynucleotide (dNTPs) Solution Mix (10mM)	New England BioLabs, UK
pGR2I-dCP GFP	Dr. Moravec, AV ČR
Phusion [®] High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/μl)	New England BioLabs, UK
Primery (50 μM)	Metabion, Německo

Přečistění PCR směsi:

High Pure PCR Product Purification Kit Roche, Německo

Přečistění a izolace DNA z agarósového gelu:

QIAquick Gel Extraction Kit Qiagen, Německo

Kultivace bakteriálních buněk:

LB médium: 1 % (w/v) pepton, 0,5 % (w/v) kvasničný extrakt, 171 mM NaCl

LB agar: 1 % (w/v) pepton, 0,5 % (w/v) kvasničný extrakt, 171 mM NaCl, 1,6 % (w/v) bacto-agar

Izolace plazmidů z bakterií *E. coli*:

QIAprep Spin Miniprep Kit Qiagen, Německo

Restrikční štěpení:

10x CutSmart Buffer New England BioLabs, UK

10x NEBuffer 4 New England BioLabs, UK

BSA (10 mg/ml) New England BioLabs, UK

ClaI (10 000 U/ml) New England BioLabs, UK

SalHF (20 000 U/ml) New England BioLabs, UK

XhoI (20 000 U/ml) New England BioLabs, UK

XmaI (10 000 U/ml) New England BioLabs, UK

4.1.5.4 Protilátky

Primární protilátka:

Králičí polyklonální protilátka třídy IgG připravená proti PVX CP Bioreba, Německo

Sekundární protilátka:

Protilátka proti králičímu IgG konjugovaná s alkalickou fosfatázou Sigma, Německo

4.1.5.5 Primery

Tabulka 2: Primery pro deleční konstrukty PVX CP

Označení	Sekvence
HPdi-1	5' - AAAAAAAAAAAGCTAGCATCGATTGGCG – 3'
HPdi-2	5' - TCCGGGATAGTGAACATCTTTCGAGTATCAATGG – 3'
HPdi-3	5' - AAAGATGTTCACTATCCCGGATGGGG – 3'
HPdi-4	5' - CGACCTCGAGTGACAGCTG – 3'
HPdi-5	5' - CCATCCGGGATAGTCATCTTTCGAGTATCAATGG – 3'
HPdi-6	5' - AAAGATGACTATCCCGGATGGGGATTT – 3'
HPdi-10	5' - CCGGGATAGTCAGGCCTGAAGCTGTGGCA – 3'
HPdi-11	5' - TCAGGCCTGACTATCCCGGATGGGGATTTC – 3'

Tabulka 3: Primery pro substituční konstrukty PVX CP

Označení	Sekvence
HPdi-4	5' - CGACCTCGAGTGACAGCTG – 3'
HPdi-8	5' - CCATCCGGGATAGTAGCCAGGCCTGAAGCTG – 3'
HPdi-9	5' - CAGCTTCAGGCCTGGCTACTATCCCGGATGG – 3'
HPdi-20	5' - CATTGTCGACCCCGGGCGCCGATGAACGGTTAAGTTT – 3'
HPdi-21	5' - GTGTGCACACCTCGGCAATTGCTGCTGCCAG – 3'
HPdi-22	5' - GCAGCAATTGCCGAGGTGTGCACACTTAGGCA – 3'
HPdi-4-delsi	5' - CGACCTCGAGTGACAGCTGCATC – 3'

Tabulka 4: Primery pro GFP

Označení	Sekvence
HPdi-12	5' - CATTATCGATATGAGTAAAGGAGAAGAACTT – 3'
HPdi-13	5' - CCTCCTTGAAATCTATTCCTTTTAAC – 3'
HPdi-14	5' - GTTAAAAGGAATAGATTTCAAGGAGG – 3'
HPdi-15	5' - CATTGTCGACCCCGGGTCAATTATTTACGGCCGCG – 3'

4.2 Metody

4.2.1 Analýza dostupných sekvencí PVX CP

Aminokyselinová sekvence PVX CP (Obr. 6) byla porovnána se sekvencí obalového proteinu dalšího zástupce potexvirů – PapMV, respektive PapMV CP, kde bylo zjištěno, že určité úseky/aminokyseliny hrají důležitou roli při interakci CP-CP či CP-RNA viru mosaiky papáji. Porovnání bylo provedeno pomocí metody založené na softwarovém programu CLUSTAL W, který je volně přístupný online na EBI (European Bioinformatics Institute). Bylo zjištěno, že pozice F33 v PVX CP odpovídá pozici F13 v PapMV CP. Na základě daného zjištění byla pozice F33 a K118 PVX CP, ale i část sekvence PVX CP sérií molekulárních analýz mutována, aby se zjistilo, zda vybrané úseky/aminokyseliny mohou být důležité i pro interakci PVX CP-CP či PVX CP-RNA.

Z volně dostupné internetové databáze NCBI, PubMed (National Center for Biotechnology Information) byly získány sekvence izolátů a kmenů PVX CP a na základě porovnání sekvencí PVX CP těchto izolátů pomocí počítačové analýzy CLUSTAL W určeny konzervované úseky/aminokyseliny.

MSAPASTTQPIGSTTSTTTKTAGATPATASGL**F**FTIPDGDFFFSTARAIVASNAVATNEDLSKI
EAIWKDMKVPTDTMAQAAWDLVRHCADVGSSAQTEMIDTGPYSNGISRARLAAAI**K**EV
CTLRQFCMKYAPVVWNWMLTNSPPANWQAQGFKPEHKFAAFDFFNGVTNPAAIMPK
EGLIRPPSEAEMNAAQTAAFVKITKARAQSNDFAASLDAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP

Obrázek 6: Aminokyselinová sekvence wtPVX CP (o velikosti 714 bp, 237 aminokyselin).

1. aminokyselina **M** - methionin, **úsek aminokyselin N' konce PVX CP**, **F** – fenylalanin v pozici 33, **K** – lysin v pozici 118

4.2.2 Metody práce s DNA

4.2.2.1 Příprava delečních konstruktů PVX CP

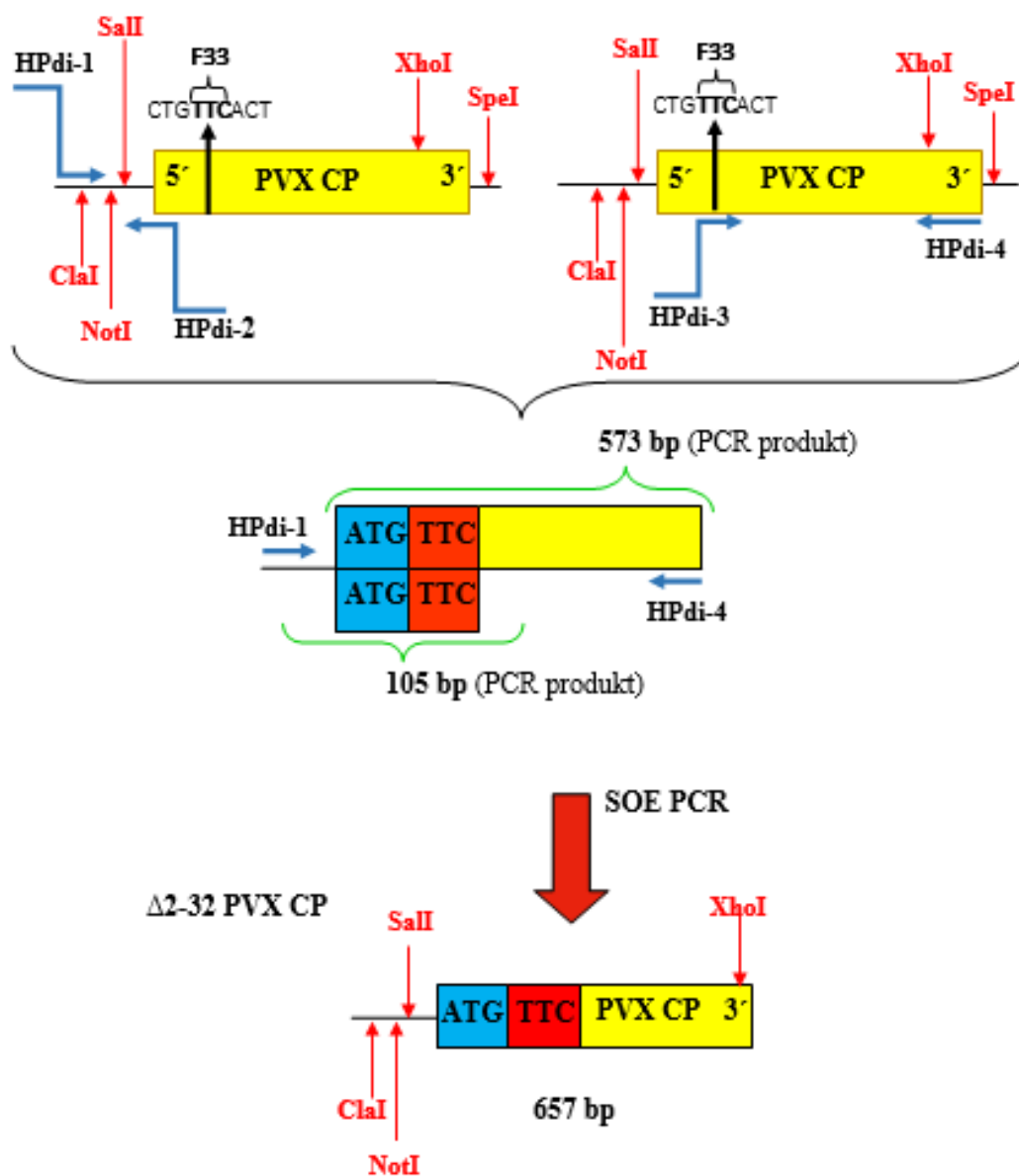
Mutantní formy PVX genomu s delečními modifikacemi v CP byly vytvořeny v expresním vektoru pGR106, který je odvozen od PVX. Získané fragmenty DNA obsahovaly delece na 5' konci otevřeného čtecího rámce kódujícího PVX CP, a to mezi kodóny kódující aminokyseliny 2. až 32. a 2. až 33. včetně. Byl vytvořen také bodový deleční mutant kodonu kódujícího 33. aminokyselinu. DNA sekvence delečních konstruktů PVX CP byla získána prostřednictvím metody Splicing by overlap extension (SOE) polymerázové řetězové reakce (PCR, Polymerase chain reaction), která spojuje fragmenty DNA na základě jejich překrývajících se komplementárních konců (cca 30 – 60 bp) (Higuchi et al., 1988). Nejprve byly amplifikovány vybrané úseky PVX CP za použití příslušných oligonukleotidových primerů metodou PCR (Polymerase chain reaction).

Konstrukt $\Delta 2-32$ PVX CP o celkové velikosti 657 bp (base pairs; bází párů), byl vytvořen z fragmentů o délce 105 bp (primery HPdi – 1 a 2; PCR podmínky: inkubace při 98 °C 30 s (denaturace DNA); následovalo 35 cyklů: denaturace při 98 °C 15 s, nasedání primerů při 56 °C 15 s, syntéza DNA při 72 °C 5 s (aktivita Phusion® High-Fidelity DNA Polymerázy); konečná extenze při 72 °C 10 min (rezerva pro Phusion® High-Fidelity DNA Polymerázu) a 573 bp (primery HPdi – 3 a 4; PCR podmínky: inkubace při 98 °C 30 s; následovalo 35 cyklů: denaturace při 98 °C 15 s, nasedání primerů při 58 °C 15 s, syntéza DNA při 72 °C 25 °C; konečná extenze při 72 °C 10 min) (Obr. 7) pomocí SOE-PCR. Obdobným způsobem byl vytvořen také konstrukt $\Delta 2-33$ PVX CP o celkové velikosti 654 bp, velikost jednotlivých fragmentů činila 105 bp (primery HPdi – 1 a 5; PCR podmínky: byly shodné jako v případě amplifikace kratšího fragmentu (105 bp) konstruktů $\Delta 2-32$ PVX CP) a 570 bp (primery HPdi – 6 a 4; PCR podmínky: byly shodné jako v případě amplifikace delšího fragmentu (573 bp) konstruktů $\Delta 2-32$ PVX CP) (Obr. 8). Konstrukt $\Delta F33$ PVX CP/pGR106 obsahující požadovanou modifikaci v PVX CP byl připraven metodou SOE PCR. Nejprve byl amplifikován kratší fragment o velikosti 166 bp (primery HPdi – 20 a 10; PCR podmínky: inkubace při 98 °C 30 s; následovalo 35 cyklů: denaturace při 98 °C 10 s, nasedání primerů při 57 °C 30 s, syntéza DNA při 72 °C 25 s; konečná extenze při 72 °C 10 min). Následně byl amplifikován delší úsek o velikosti 572 bp (primery HPdi – 11 a 4; PCR podmínky: inkubace při 98 °C 30 s; následovalo 35 cyklů: denaturace při 98 °C 10 s, nasedání primerů při 56 °C 15 s, syntéza DNA při 72 °C 25 s; konečná extenze při 72 °C 10 min) (Obr. 9). Jednotlivé mutované fragmenty PVX CP o odpovídající velikosti byly přečištěny

pomocí High Pure PCR Product Purification Kit dle přiloženého návodu. Takto přečištěné fragmenty byly použity jako templáty do SOE PCR. Množství amplifikovaných úseků pro spojení (lepení) výsledných delečních konstruktů bylo zjištěno porovnáním markeru a amplifikovaných úseků po provedení DNA elektroforézy. Ze zjištěného množství DNA bylo vypočítáno ekvimolární množství templátových DNA (odpovídající 10 ng delší templátové DNA) do SOE PCR pro deleční konstrukty. Syntéza výsledných konstruktů $\Delta 2-32$ PVX CP a $\Delta 2-33$ PVX CP (Obr. 7 a 8) byla provedena pomocí primerů HPdi – 1 a 4. PCR podmínky: inkubace při 98 °C 30 s; následovalo 10 cyklů (překryv fragmentů, bez primerů): denaturace při 98 °C 15 s, překryv fragmentů při 63 °C (pro $\Delta 2-32$ PVX CP) a 62 °C (pro $\Delta 2-33$ PVX CP) 30 s, syntéza DNA při 72 °C 30 s; následovalo 25 cyklů (přidání primerů do PCR reakce): denaturace 98 °C 15 s, nasedání primerů 60 °C 30 s, syntéza DNA při 72 °C 30 s; konečná extenze 72 °C 10 min. Syntéza výsledného bodového delečního konstruktu $\Delta F33$ PVX CP/pGR106 (Obr. 9) byla provedena pomocí krajních primerů HPdi – 20 a 4. PCR podmínky: inkubace při 98 °C 30 s; následovalo 10 cyklů (překryv fragmentů, bez primerů): denaturace při 98 °C 15 s, překryv fragmentů při 63 °C 30 s, syntéza DNA při 72 °C 30 s; následovalo 25 cyklů (přidání primerů do PCR reakce): denaturace 98 °C 15 s, nasedání primerů 60 °C 30 s, syntéza DNA při 72 °C 40 s; konečná extenze 72 °C 10 min). Všechny fragmenty byly amplifikovány pomocí Phusion® High-Fidelity DNA Polymerázy. Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v kapitole: 4.1.5.5 Primery, str. 37.

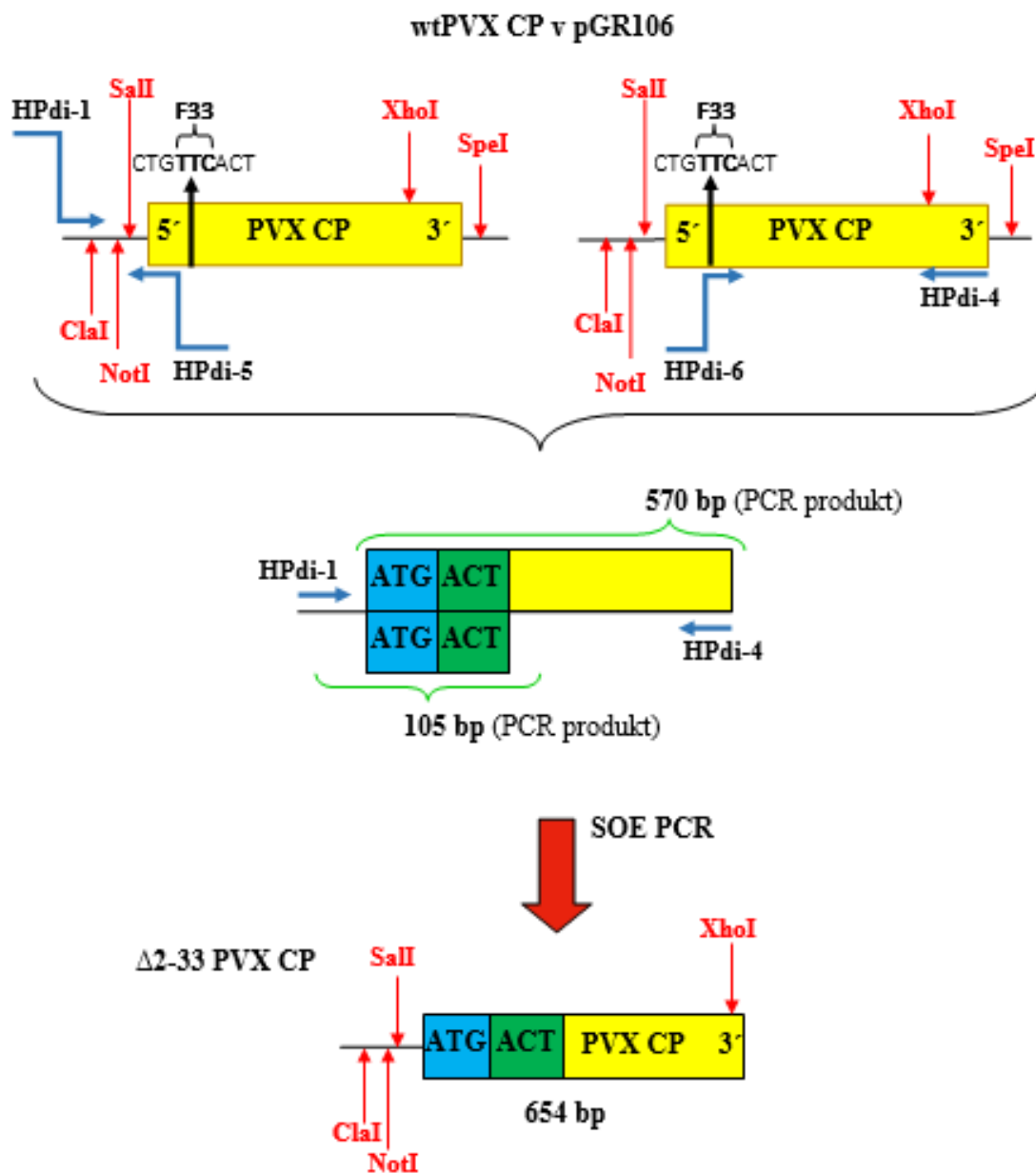
Získané konstrukty byly následně přečištěny pomocí High Pure PCR Product Purification Kit dle pokynů výrobce. Konstrukty o požadované velikosti byly vloženy do binárního vektoru pGR106 (Obr. 5, str. 32) pomocí ClaI a XhoI restričních míst za vzniku požadovaných konstruktů $\Delta 2-32$ PVX CP/pGR106 a $\Delta 2-33$ PVX CP/pGR106. Správnost sekvencí byla ověřena nukleotidovou sekvenací (GATC Biotech).

wtPVX CP v pGR106



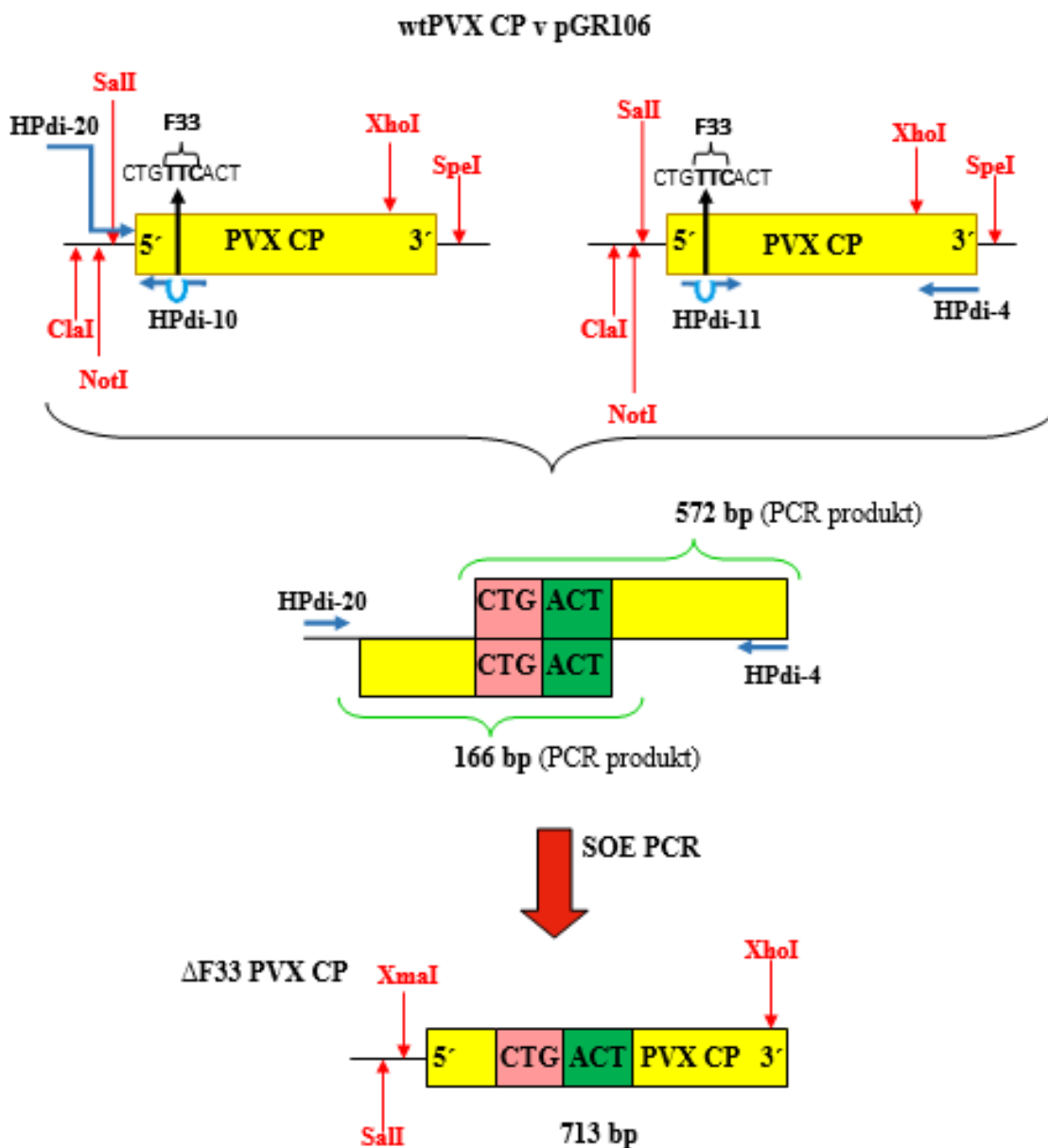
Obrázek 7: Schematické znázornění přípravy delečního konstruktů $\Delta 2-32$ PVX CP.

Zakřivené a rovné šipky (modré) znázorňují primery (kapitola 4.1.5.5 Primery, str. 37);
 PVX CP 5' + CP 3' - DNA sekvence PVX CP;
 ClaI, NotI, SalI, XhoI, SpeI – restrikční místa;
 ATG – iniciační kodón methioninu, TTC – kodón fenylalaninu (F33).



Obrázek 8: Schématické znázornění přípravy delečního konstruktů Δ 2-33 PVX CP.

Zakřivené a rovné šipky (modré) znázorňují primery (kapitola 4.1.5.5 Primery, str. 37);
 PVX CP 5' + CP 3' - DNA sekvence PVX CP;
 ClaI, NotI, SalI, XhoI, SpeI – restrikční místa;
 ATG – iniciační kodón methioninu, ACT – kodón threoninu (T34).



Obrázek 9: Schématické znázornění přípravy bodového delečního konstruktu Δ F33 PVX CP.

Zakřivené a rovné šipky (modré) znázorňují primery (kapitola 4.1.5.5 Primery, str. 37), rovná šipka s bublinou uprostřed znamená, že primer nenasedá v daném místě na sekvenci PVX CP;

PVX CP 5' + CP 3' - DNA sekvence PVX CP;

ClaI, NotI, Sall, XhoI, SpeI, XmaI – restrikční místa;

CTG – kodón leucinu (L32), ACT – kodón threoninu (T34).

Reakční směsi byly připraveny dle protokolu přiloženého k Phusion® High-Fidelity DNA Polymeráze (Thermo Scientific). Všechny PCR reakce byly provedeny v přístroji T100™ Thermo cycler (Bio-Rad, USA). Složení směsí pro PCR amplifikaci jednotlivých fragmentů PVX CP obou mutačních konstruktů Δ 2-32 PVX CP/pGR106 a Δ 2-33 PVX CP/pGR106 bylo následující:

- 10 μ l 5x koncentrovaného pufru HF
- 1 μ l dNTPs (10 mM)
- 1 μ l dopředného primeru (50 mM)
- 1 μ l zpětného primeru (50 mM)
- 0,5 μ l Phusion polymerasy (2 U/ μ l)
- 2 μ l templátu – pGR106 (169 ng/ μ l)
- redestilovaná voda do celkového objemu 50 μ l

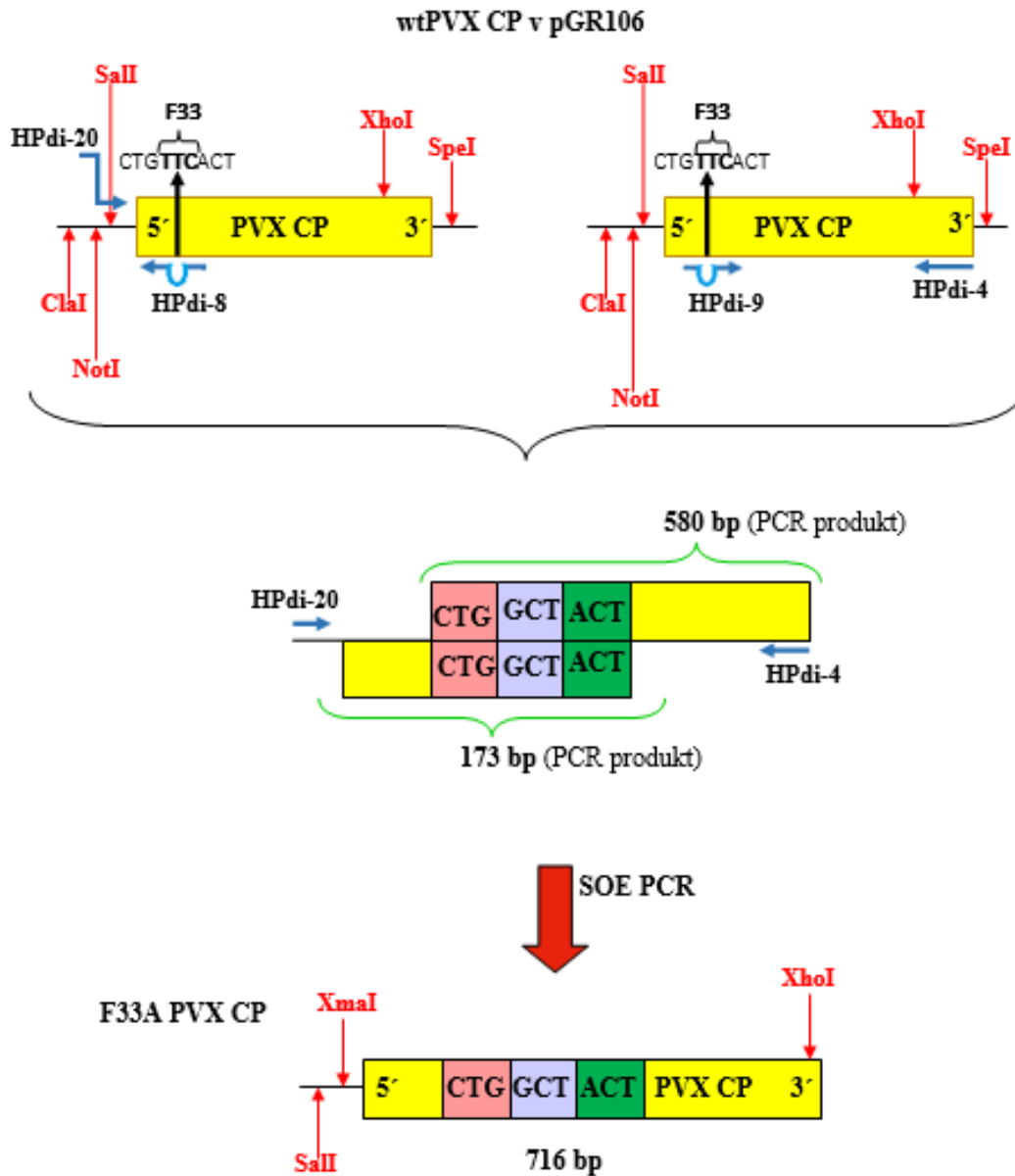
Složení směsí pro SOE PCR obou delečních mutantů při použití Phusion® High-Fidelity DNA Polymerázy bylo následující:

- 10 μ l 5x koncentrovaného pufru GC
- 1 μ l dNTPs (10 mM)
- 1 μ l dopředného primeru (50 mM)
- 1 μ l zpětného primeru (50 mM)
- 0,5 μ l Phusion polymerasy (2 U/ μ l)
- 3,4 μ l 105 bp - fragmentu + 1 μ l 573 bp - fragmentu pro Δ 2-32 PVX CP
nebo
- 2 μ l 105 bp – fragmentu + 1 μ l 570 bp - fragmentu pro Δ 2-33 PVX CP
nebo
- 1,9 μ l 166 bp – fragmentu + 3,3 μ l 572 bp - fragmentu pro Δ F33 PVX CP/pGR106
- redestilovaná voda do celkového objemu 50 μ l

4.2.2.2 Příprava substitučních konstruktů PVX CP

Konstrukty F33A PVX CP/pGR106 a K118A PVX CP/pGR106, obsahující požadované modifikace v PVX CP byly připraveny metodou SOE PCR. Nejprve byl amplifikován kratší fragment o velikosti 173 bp pro F33A PVX CP/pGR106 (primery HPdi – 20 a 8; PCR podmínky: inkubace při 98 °C 30 s; následovalo 35 cyklů: denaturace při 98 °C 10 s, nasedání primerů při 57 °C 30 s, syntéza DNA při 72 °C 25 s; konečná extenze při 72 °C 10 min) (Obr. 10), a delší fragment o velikosti 415 bp pro K118A PVX CP/pGR106 pomocí primerů HPdi – 20 a 21; PCR podmínky: byly shodné jako v případě amplifikace kratšího úseku (173 bp) konstruktu F33A PVX CP/pGR106 (Obr. 11). Následně byl amplifikován delší úsek o velikosti 580 bp pro F33A PVX CP/pGR106 (primery HPdi – 9 a 4; PCR podmínky: inkubace při 98 °C 30 s; následovalo 35 cyklů: denaturace při 98 °C 10 s, nasedání primerů při 56 °C 15 s, syntéza DNA při 72 °C 25 s; konečná extenze při 72 °C 10 min), a kratší úsek o velikosti 320 bp pro K118A PVX CP/pGR106 (primery HPdi – 22 a 4-delší; PCR podmínky: byly shodné jako v případě amplifikace delšího úseku (580 bp) konstruktu F33A PVX CP/pGR106). Získané fragmenty byly přečištěny pomocí High Pure PCR Product Purification Kit dle pokynů výrobce. Množství amplifikovaných úseků pro spojení (lepení) výsledných substitučních konstruktů bylo zjištěno porovnáním markeru a amplifikovaných úseků po provedení DNA elektroforézy. Ze zjištěného množství DNA bylo vypočítáno ekvimolární množství templátových DNA (odpovídající 10 ng delší templátové DNA) do SOE PCR pro substituční konstrukty. Přečištěné fragmenty byly spojeny metodou SOE PCR, F33A PVX CP/pGR106 (primery HPdi – 20 a 4; PCR podmínky: inkubace při 98 °C 30 s; následovalo 10 cyklů (překryv fragmentů, bez primerů): denaturace při 98 °C, 15 s překryv fragmentů při 63 °C 30 s, syntéza DNA při 72 °C 30 s; následovalo 25 cyklů (přidání primerů do PCR reakce): denaturace 98 °C 15 s, nasedání primerů 60 °C 30 s, syntéza DNA při 72 °C 40 s; konečná extenze 72 °C 10 min) (Obr. 10) a K118A PVX CP/pGR106 (primery HPdi – 20 a 4-delší; PCR podmínky: inkubace při 98 °C 30 s; následovalo 10 cyklů (překryv fragmentů, bez primerů): denaturace při 98 °C 15 s, překryv fragmentů při 63 °C 30 s, syntéza DNA při 72 °C 30 s; následovalo 25 cyklů (přidání primerů do PCR reakce): denaturace 98 °C 15 s, nasedání primerů 60 °C 30 s, syntéza DNA při 72 °C 40 s; konečná extenze 72 °C 10 min) (Obr. 11). Všechny fragmenty byly amplifikovány pomocí Phusion® High-Fidelity DNA Polymerázy. Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v kapitole: 4.1.5.5 Primery, str. 37.

Výsledné konstrukty o správné velikosti byly přečištěny pomocí setu High Pure PCR Product Purification Kit. Správnost sekvencí jednotlivých fragmentů byla ověřena nukleotidovou sekvenací (GATC Biotech).



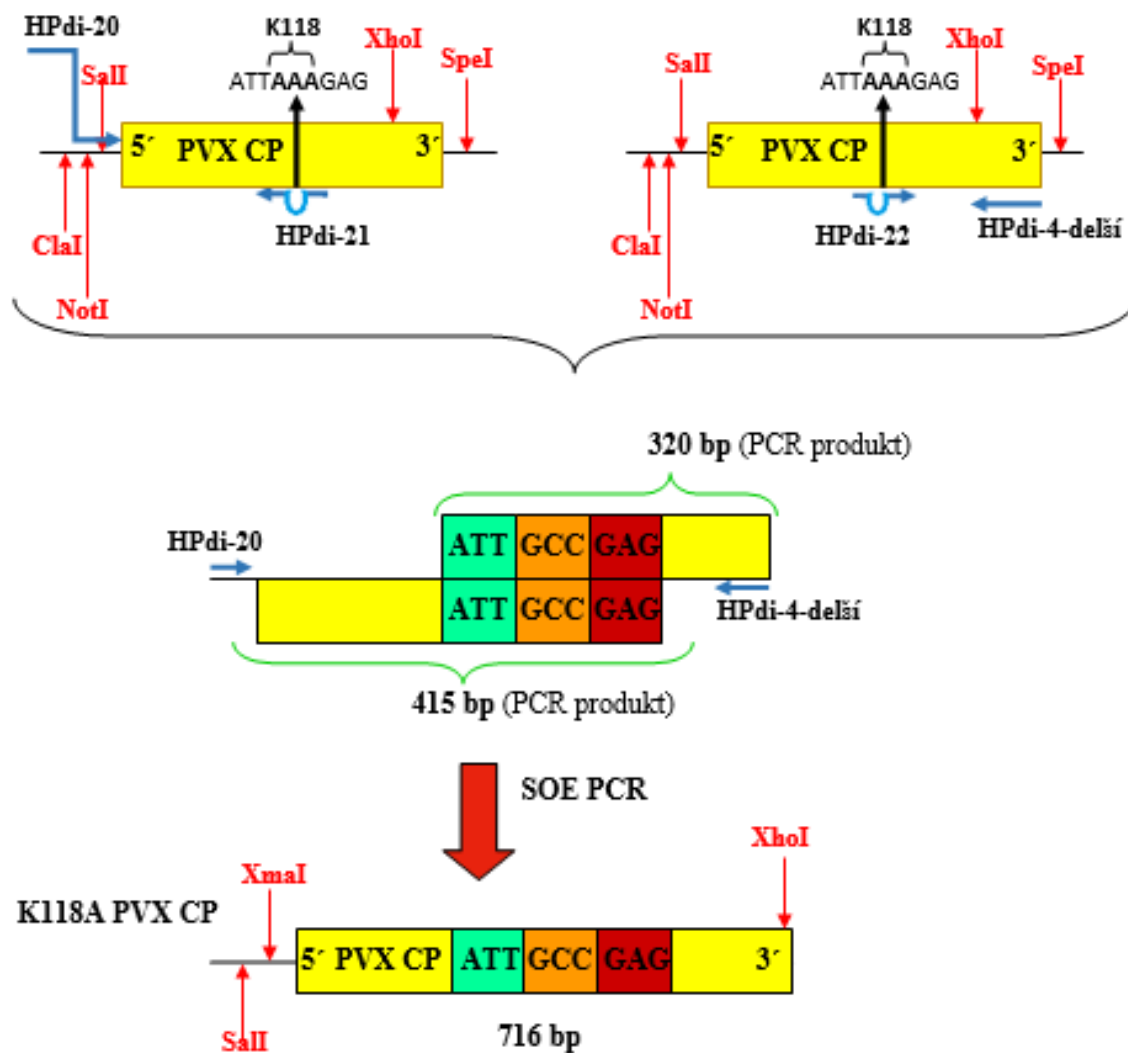
Obrázek 10: Schematické znázornění přípravy bodového substitučního konstruktu F33A PVX CP.

Zakřivené a rovné šipky (modré) znázorňují primery (kapitola 4.1.5.5 Primery, str. 37), rovná šipka s bublinou uprostřed znamená, že primer nenasadá v daném místě na sekvenci PVX CP;

PVX CP 5' + CP 3' - DNA sekvence PVX CP;

ClaI, NotI, Sall, XhoI, SpeI, XmaI – restrikční místa;

wtPVX CP v pGR106



Obrázek 11: Schématické znázornění přípravy bodového substitučního konstruktů K118A PVX CP.

CTG – kodón leucinu (L32), GCT – kodón alaninu (A33), ACT – kodón threoninu (T34).
 Zakřivené a rovné šipky (modré) znázorňují primery (kapitola 4.1.5.5 Primery, str. 37), rovná šipka s bublinou uprostřed znamená, že primer nenasedá v daném místě na sekvenci PVX CP;
 PVX CP 5' + CP 3' - DNA sekvence PVX CP;
 ClaI, NotI, Sall, XhoI, SpeI, XmaI – restrikční místa;
 ATT – kodón isoleucinu (I117), GCC – kodón alaninu (A118), GAG – kodón kys. glutamové (E119).

Všechny PFFCR reakce byly provedeny v přístroji T100TM Thermo cycler (Bio-Rad, USA). Složení reakčních směsí pro přípravu substitučních konstruktů při použití Phusion® High-Fidelity DNA Polymerázy bylo následující:

- 10 µl 5x koncentrovaného pufru GC
- 1 µl dNTPs (10 mM)
- 1 µl dopředného primeru (50 mM)
- 1 µl zpětného primeru (50 mM)
- 0,5 µl Phusion polymerasy (2 U/µl)
- 2 µl templátu – pGR106 (169 ng/µl)
- redestilovaná voda do celkového objemu 50 µl

Složení směsí pro SOE PCR substitučních mutantů při použití Phusion® High-Fidelity DNA Polymerázy bylo následující:

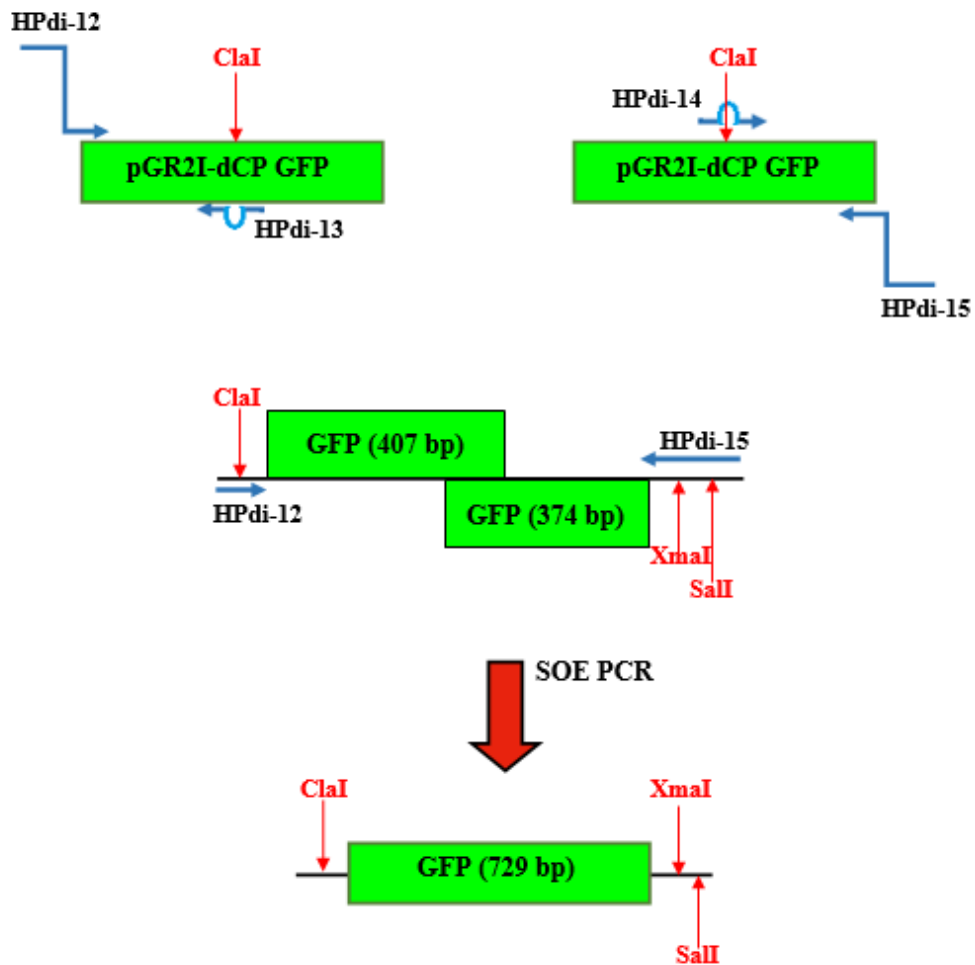
- 10 µl 5x koncentrovaného pufru GC
- 1 µl dNTPs (10 mM)
- 1 µl dopředného primeru (50 mM)
- 1 µl zpětného primeru (50 mM)
- 0,5 µl Phusion polymerasy (2 U/µl)
- 1,9 µl 173 bp - fragmentu + 3,3 µl 580 bp - fragmentu pro F33A PVX CP
nebo
- 1,5 µl 320 bp - fragmentu + 2 µl 415 bp - fragmentu pro K118A PVX CP
- redestilovaná voda do celkového objemu 50 µl

4.2.2.3 Příprava konstruktů zeleného fluorescenčního proteinu – GFP

Konstrukt GFP (729 bp), který byl primárně vytvořen jako reportérový gen pro vizualizaci šíření jednotlivých mutantů v rostlině, byl připraven pomocí SOE PCR, ze dvou navzájem překrývajících se částí, které byly amplifikovány pomocí PCR. Konstrukt GFP byl amplifikován ze dvou fragmentů z důvodu nutnosti odstranění vnitřního restrikčního místa ClaI, aby nedošlo k vnitřnímu štěpení konstruktů GFP (Obr. 12). Nejprve byl amplifikován první fragment (407 bp) (primery HPdi – 12 a 13; PCR podmínky: inkubace při 98 °C 30 s; následovalo 35 cyklů: denaturace při 98 °C 10 s, nasedání primerů při 57 °C 30 s, syntéza DNA při 72 °C 25 s; konečná extenze při 72 °C 10 min), následně byla amplifikována druhá část (374 bp) (primery HPdi – 14 a 15; PCR podmínky: inkubace při 98 °C 30 s; následovalo 35 cyklů: denaturace při 98 °C 10 s, nasedání primerů při 56 °C 25 s, syntéza DNA při 72 °C 25 s; konečná extenze při 72 °C 10 min) (Obr. 12). Obě části byly následně přečištěny pomocí High Pure PCR Product Purification Kit dle příloženého návodu. Množství amplifikovaných úseků pro spojení (lepení) výsledného konstruktů GFP bylo zjištěno porovnáním markeru a amplifikovaných úseků po provedení DNA elektroforézy. Ze zjištěného množství DNA bylo vypočítáno ekvimolární množství templátových DNA (odpovídající 10ng delší templátové DNA) do SOE PCR.

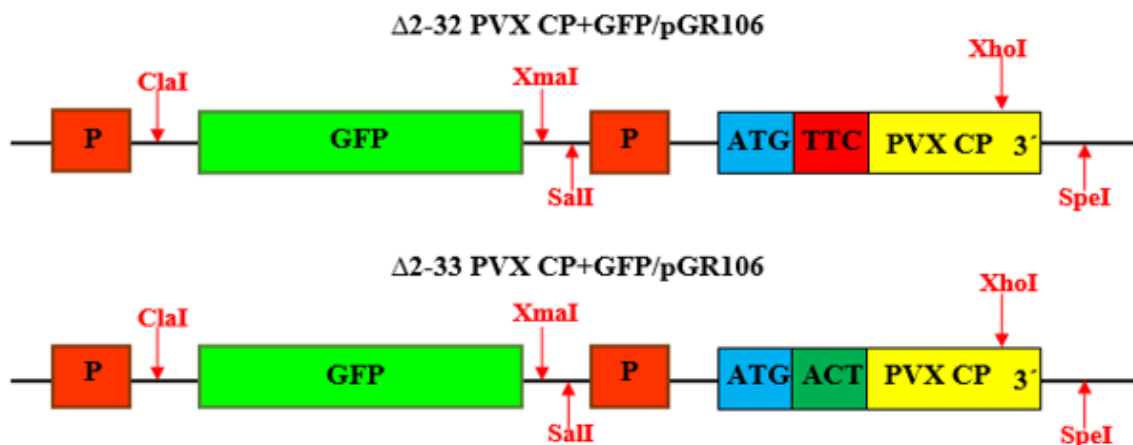
Následně byly jednotlivé fragmenty spojeny pomocí SOE PCR (primery HPdi – 12 a 15; PCR podmínky: inkubace při 98 °C 30 s; následovalo 10 cyklů (překryv fragmentů, bez primerů): denaturace při 98 °C 15 s, překryv fragmentů při 62 °C 30 s, syntéza DNA při 72 °C 40 s; následovalo 25 cyklů (přidání primerů do PCR reakce): denaturace 98 °C 15 s, nasedání primerů 60 °C 30 s, syntéza DNA při 72 °C 30 s; konečná extenze 72 °C 10 min) (Obr. 12). Takto získaný výsledný konstrukt o požadované velikosti, byl přečištěn pomocí High Pure PCR Product Purification Kit, přečištěný konstrukt byl použit v dalších dílčích reakcích. Konstrukt GFP byl posléze naklonován pomocí endonukleáz ClaI a SalI-HF do delečních mutantů, za vzniku konstruktů $\Delta 2-32$ PVX CP+GFP/pGR106 a $\Delta 2-33$ PVX CP+GFP/pGR106 (Obr. 13). Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v kapitole: 4.1.5.5 Primery, str. 37.

Správnost nukleotidové sekvence výsledného GFP konstruktů i jeho umístění v konstruktech byla ověřena nukleotidovou sekvenací (GATC Biotech).



Obrázek 12: Schématické znázornění přípravy GFP.

Zakřivené a rovné šipky (modré) znázorňují primery (kapitola 4.1.5.5 Primery, str. 37), rovná šipka s bublinou uprostřed znamená, že primer nenesedá v daném místě na sekvenci pGR2I-dCP GFP;
 pGR2I-dCP GFP - sekvence GFP ve vektoru pGR2I-dCP;
 ClaI, SalI, XmaI – restrikční místa.



Obrázek 13: Výsledné konstrukty v pGR106.

P – promotor; GFP – sekvence zeleného fluorescenčního proteinu;
 PVX CP 3' - sekvence PVX CP;
 ClaI, XmaI, SalI, XhoI, SpeI – restrikční místa;
 ATG – iniciační kodón methioninu, TTC – kodón fenylalaninu (F33), ACT – kodón threoninu (T34).

PCR i SOE PCR reakce byly provedeny v přístroji T100TM Thermo cycler (Bio-Rad, USA). Složení reakční směsi pro přípravu GFP při použití Phusion® High-Fidelity DNA Polymerázy bylo následující:

- 10 µl 5x koncentrovaného pufru GC
- 1 µl dNTPs (10 mM)
- 1 µl dopředného primeru (50 mM)
- 1 µl zpětného primeru (50 mM)
- 0,5 µl Phusion polymerasy (2 U/µl)
- 2 µl pGR2I-dCP GFP (laskavě poskytnul Dr. Moravec)
- redestilovaná voda do celkového objemu 50 µl

Složení směsi pro SOE PCR při použití Phusion® High-Fidelity DNA Polymerázy bylo následující:

- 10 µl 5x koncentrovaného pufru GC
- 1 µl dNTPs mix (10 mM)
- 1 µl dopředného primeru (50 µM)
- 1 µl zpětného primeru (50 µM)

- 0,5 µl Phusion polymerasy (2 U/µl)
- 5 µl 407 bp - fragmentu GFP + 3,7 µl 374 bp - fragmentu GFP
- redestilovaná voda do celkového objemu 50 µl

4.2.2.4 Přečištění PCR směsi

Neinkorporované nukleotidy, volné primery, přítomnost solí a DNA polymerázy mohou negativně ovlivňovat následnou práci s amplifikovanou DNA. K odstranění těchto znečišťujících komponentů byla využita souprava High Pure PCR Product Purification Kit.

K 40 µl PCR směsi bylo přidáno 450 µl Binding buffer (vazebný pufr) a pipetou byla směs převedena na kolonku a centrifugována 30 s při 13 000 ot/min. Obsah sběrné nádoby byl odlit, na kolonku bylo pipetováno 500 µl Washing buffer (promývací pufr) a kolonka byla centrifugována 30 s při 13 000 ot/min. Obsah sběrné nádoby byl opět odlit, na kolonku bylo pipetováno 200 µl Washing buffer (promývací pufr) a kolonka byla centrifugována 30 s při 13 000 ot/min. Kolonka byla posléze umístěna do čisté mikrozkušavky. Do kolonky bylo pipetováno 50 µl Elution buffer (eluční pufr), kolonka byla ponechána 1 min stát, a následně byla centrifugována 30 s při 13 000 ot/min.

4.2.2.5 Přečištění DNA z agarózového gelu

Pod UV lampou byla vybrána požadovaná velikost DNA dle markeru, vyříznutý proužek gelu byl vložen do předem zvážené mikrozkušavky. Pro získání DNA z gelu byl použit QIAquick Gel Extraction Kit. Dle hmotnosti gelu (rozdíl mezi mikrozkušavkou prázdnou a tou s vloženým gelem) byl pipetován trojnásobek QG buffer (vazebný pufr). Obsah mikrozkušavky byl promíchán a mikrozkušavka byla umístěna do termálního bloku vytemperovaného na teplotu 56 °C a byla zde ponechána po dobu 10 min. Během této doby byla mikrozkušavka třikrát vortexována. Do mikrozkušavky byl pipetován dle hmotnosti gelu jeden objem isopropanolu a obsah mikrozkušavky byl promíchán. Obsah mikrozkušavky byl převeden na kolonku a ta byla centrifugována 1 min při 13 000 ot/min. Obsah sběrné nádoby byl vylit, na kolonku bylo pipetováno 750 µl PE buffer (promývací pufr) a kolonka byla centrifugována 1 min při 13 000 ot/min. Obsah sběrné nádoby byl vylit, kolonka byla znovu centrifugována 1 min při 13 000 ot/min, aby došlo k odstranění reziduálního PE buffer. Kolonka byla umístěna do čisté mikrozkušavky. Na kolonku bylo pipetováno 50 µl EB buffer (eluční pufr), kolonka byla ponechána 1 min stát a následně byla centrifugována 1 min při 13 000 ot/min.

4.2.2.6 Restrikční štěpení

Do reakce bylo v závislosti na koncentraci DNA pipetováno 2 – 5 U endonukleázy, 5 µl 10x koncentrovaného pufru (dle použitého enzymu), 0,25 – 1 µg DNA (dle výpočtu). Směs byla doplněna do 50 µl redestilovanou vodou. Restrikční štěpení probíhalo v inkubátoru při 37 °C přes noc. Optimální průběh restrikce a požadovaná velikost získaných fragmentů byla ověřena horizontální elektroforézou na 1 % agarózovém gelu. PCR produkty restrikčního štěpení byly přečištěny pomocí High Pure PCR Product Purification Kit dle pokynů výrobce. Pokud byly štěpeny vektory a bylo nutno odstranit z vektoru produkt štěpení delší než 100 bp, byly produkty restrikčního štěpení nanесeny na 1 % agarózový gel a následně byla provedena preparativní zónová elektroforéza, přičemž velikostně požadované frakce byly z gelu vyextrahovány za použití QIAquick Gel Extraction Kit.

4.2.2.7 Ligace

Pro spojování přečištěných štěpených DNA fragmentů získaných PCR reakcí a linearizovaných vektorů vzniklých restrikčním štěpením byla použita T4 DNA ligasa (Promega). Při přípravě ligační směsi bylo postupováno dle pokynů výrobce. Zpravidla byl dodržován molární poměr inzert:vektor 3:1. Další komponenty ligační směsi byly následující:

- 2 µl 10x koncentrovaného ligačního pufru
- 1 µl T4 DNA ligasa (5 U/µl)
- redestilovaná voda do celkového objemu 20 µl

Nejdříve bylo pipetováno vypočtené množství DNA vektoru a posléze optimální množství DNA inzertu (viz vzorec), takto vzniklá směs byla důkladně promísena, následně byla přidána redestilovaná voda a 10x koncentrovaný ligační pufr. Nakonec byla do reakce přidána T4 DNA ligáza. Obsah mikrozkušavky byl důkladně promísen a krátce centrifugován. Mikrozkušavka byla umístěna do pěnového držáku do 500 ml kádinky s vodou o laboratorní teplotě (20 °C), ligační směs byla následně inkubována přes noc při 4 °C.

Vzorec pro výpočet potřebného množství inzertu:

$$\text{Množství inzertu (v ng)} = \frac{\text{množství vektoru (ng)} \times \text{velikost inzertu (kb)}}{\text{velikost vektoru (kb)}} \times \text{molární poměr} \frac{\text{inzert}}{\text{vektor}}$$

Obecně platí, že pokud probíhá ligační reakce za nižších teplot, je vyžadována delší inkubace.

4.2.2.8 Transformace

4.2.2.8.1 Transformace *Escherichia coli* DH5α a *Agrobacterium tumefaciens* GV3101

Chemokompetentní buňky (100 μl) uchovávané v -80 °C byly ponechány pomalu roztát na ledu. K suspenzi buněk *E. coli* byl přidán buď 1 μl vektoru či 10 μl ligační směsi. V případě transformace do suspenze buněk *A. tumefaciens* byl přidán 1 μl plazmidové DNA. Získaná směs byla ponechána 1 h na ledu. Následoval tzv. teplotní šok, kdy byly bakterie inkubovány v termálním bloku při 42 °C po dobu 2 min, následně byly bakterie opět uloženy na led. Po 2 min bylo k suspenzi přidáno 800 μl sterilního LB média (bez přídavku antibiotik), mikrozkušavka byla pečlivě uzavřena a umístěna do inkubátoru s třepačkou (220 ot/min) vytemperovaném na 37 °C v případě *E. coli* a 26 °C v případě *A. tumefaciens*, kde se bakterie po dobu 1 h třepaly. Po uplynutí doby byly bakterie 1 min při 13 000 ot/min centrifugovány při laboratorní teplotě a byl odlit přebytečný supernatant. Získaný pelet byl resuspendován v 200 μl LB média. Suspenze byla následně sterilní očkovací hokejkou rozprostřena rovnoměrně na Petriho misky s tuhým LB agarem a selekčním antibiotikem (kanamycin, 30 μg/ml). Petriho misky s vyšetými bakteriemi byly umístěny do termostatu nastaveného na 37 °C (*E. coli*) po dobu 24 h, v případě bakterií *A. tumefaciens* byly plotny umístěny do termostatu při konstantní teplotě 26 °C po dobu 48 h.

4.2.2.8.2 Příprava kompetentních buněk *A. tumefaciens*

Před transformací bakterií je nejprve třeba uvést buňky do kompetentního stavu. Princip spočívá ve zvýšení propustnosti plazmatické membrány bakterií vychlazeným chloridem vápenatým. Bakteriální kultura kmene GV3101 byla kultivována ve 2 ml sterilního LB média s antibiotikem tetracyklinem v koncentraci 50 μg/ml LB média a přes noc byla ponechána třepat (220 ot/min) při 26 °C. Narostlé bakteriální kultury byly inokulovány do 50 ml sterilního LB média s tetracyklinem v koncentraci 50 μg/ml LB média ve 250 ml Erlenmeyerově baňce, následně byly ponechány třepat (220 ot/min) při teplotě 26 °C do té doby, než dosáhla optická hustota (OD; optical density) při 550 nm hodnoty 0,6 – 1. Kultura byla následně inkubována 5 min na ledu. Posléze bylo odebráno 30 ml zchlazené kultury a převedeno do centrifugační zkumavky a kultury byly centrifugovány 5 min při 7 000 ot/min při teplotě 4 °C. Následně byl odlit supernatant, pelet byl resuspendován v 10 ml ledově vychlazeném 0,15 M NaCl. Bakterie se ponechaly inkubovat 15 min na ledu. Kultura byla opět centrifugována 5 min při 7 000 ot/min při 4 °C, byl odsát supernatant a pelet byl opět resuspendován v 1 ml ledově vychlazeném 20 mM CaCl₂. Vniklá suspenze bakteriálních

buněk byla převedena v objemu 100 µl do předem vychlazených mikrozkušavek, ihned byla zmrazena tekutým dusíkem a uložena do mrazícího boxu při -80 °C.

Antibiotikum tetracyklin je do LB media přidáváno z důvodu zachování pomocného plazmidu pSoup, jedná se o rostlinný vektor, který umožňuje replikaci pGreen vektoru (od něj odvozený vektor pGR106) v buňkách *A. tumefaciens*, pSoup vektor nese rezistenci k tetracyklinu.

4.2.2.9 Izolace plazmidů z *E. coli* DH5α

Do 10 ml tekutého LB média s antibiotikem kanamycinem v koncentraci 30 µg/ml LB média byla přeočkována vždy jedna vybraná bakteriální kolonie. Kultura byla za neustálého třepání ponechána růst v inkubátoru při 37 °C přes noc. Bakteriální suspenze byly poté převedeny do 2 ml mikrozkušavek a centrifugovány po dobu 1 min při 13 000 ot/min. Izolace plazmidové DNA byla provedena pomocí komerčního setu QIAprep Spin Miniprep Kit dle pokynů výrobce. Supernatant byl odstraněn a sediment byl resuspendován v 250 µl P1 buffer. Do mikrozkušavky bylo pipetováno 250 µl P2 buffer (lyzační pufr) a obsah mikrozkušavky byl lehce promíchán. Do mikrozkušavky bylo pipetováno 350 µl N3 buffer (neutralizační pufr), obsah mikrozkušavky byl promíchán a mikrozkušavka byla centrifugována po dobu 10 min při 13 000 ot/min. Supernatant byl převeden na kolonku a ta byla centrifugována 1 min při 13 000 ot/min. Obsah sběrné nádoby byl odlit, na kolonku bylo pipetováno 500 µl PE buffer (promývací pufr) a kolonka byla centrifugována 1 min při 13 000 ot/min. Obsah sběrné nádoby byl odlit, na kolonku bylo pipetováno 0,75 ml PE buffer (promývací pufr) a kolona byla centrifugována 1 min při 13 000 ot/min. Kolonka byla umístěna do čisté mikrozkušavky, na kolonku bylo pipetováno 50 µl EB buffer (eluční pufr), kolonka v mikrozkušavce byla ponechána po dobu 1 min stát a následně byla centrifugována 1 min při 13 000 ot/min.

4.2.2.10 Pěstování rostlin a inokulace virem (agroinfiltrace)

Pokusné rostliny *Nicotiana benthamiana* byly pěstovány v kultivační místnosti při 20 -25 °C s umělým osvětlením (16 h) a při 15 – 20 °C ve tmě (8 h)). Čtyřtýdenní sazenice byly přesazeny do směsi zahradního substrátu s pískem a přiklopeny minipařeništěm po dobu dvou dnů. Transformované kolonie *A. tumefaciens*, nesoucí virový vektor byly přeočkovány do 10 ml tekutého LB média s kanamycinem ve finální koncentraci 30 µg/ml LB média a následně byly ponechány v orbitálním inkubátoru při 28 °C po 48 h. Primární infekce rostlin

Nicotiana benthamiana byla provedena pomocí injekční stříkačky na spodní stranu listů, které byly předtím ovlhčeny, aby došlo k usnadnění infiltrace, neboť bakterie se pod tlakem dostávají do listů přes otevřené průduchy (Hoffmeistrová, 2008). Pokusné rostliny byly staré 6 týdnů. Po očkování byly infiltrované rostliny umístěny do kultivačního boxu za stále teploty 24 °C a relativní vlhkosti 80 %. Rostliny byly sledovány v intervalu 2, 5, 7 a 14 dnů po inokulaci, kdy pomocí UV svítilny bylo sledováno emitované záření GFP, odebraná pletiva byla podrobena mikroskopické analýze a testu ELISA.

4.2.3 Elektroforetické metody

4.2.3.1 Horizontální elektroforéza

Gelová elektroforéza slouží pro separaci různě dlouhých fragmentů DNA. Principem gelové elektroforézy je pohyb záporně nabitých molekul DNA v elektrickém poli směrem k anodě a v agarózovém gelu se dělí dle velikosti. Koncentrace agarózy se volí dle velikosti očekávaných fragmentů od 0,8 – 2 %.

Pro dělení fragmentů byl použit 1 % agarózový gel v pufru TBE (složení viz: 4.1.5 Vybavení, 4.1.5.3 Roztoky), který byl použit i jako pufr elektrodový. 1 g agarózy byl za tepla rozpuštěn ve 100 ml TBE pufru. Do gelu před ztuhnutím bylo přidáno za stálého míchání vizualizační barvivo typu SYBR red (SYBR Save Stain) v koncentraci 0,1 µl/ml gelu. Roztok byl nalit do připravené formy s hřebínkem pro vytvoření jamek. Bylo smícháno 10 µl požadovaného vzorku se 2 µl 6x pufru Loading dye a poté nanášeno na gel. Jako velikostní marker byl použit GeneRuler 1 kb. Elektroforéza probíhala po dobu 30 min, při napětí 100 V. Vizualizace byla následně provedena na dokumentačním zařízení GelDoc™ EQ.

4.2.4 Enzymová imunoanalýza

4.2.4.1 PT – ELISA (Plate – trapped ELISA)

Nepřímá PT-ELISA byla provedena k detekci PVX CP v rostlinném materiálu. Před zahájením práce bylo zajištěno vytemperování všech potřebných činidel na laboratorní teplotu (tj. 20 °C). Z pokusných rostlin *N. benthamiana* byla vždy odebrána polovina listu (inokulovaný nebo systémový list), následně byla rozetřena ve třecí misce v potahovacím pufru (PP) v hmotnostním poměru 1 : 10. Postupně bylo do tří jamek mikrotitrační ELISA destičky pipetováno 100 µl homogenátu, na závěr bylo do zvláštních jamek pipetováno 100 µl

blanku (čistý potahovací pufr), sloužícího při spektrofotometrické analýze k odpočtu pozadí a 100 μ l negativní kontroly (vzorek zdravého listu rozetřeného v PP). Následně byla destička inkubována přes noc v lednici při 4 °C. Druhý den byly jednotlivé jamky čtyřikrát promyty roztokem PBS + T (promývací roztok) (200 μ l/jamka). Po promytí byla přidána králičí polyklonální protilátka třídy IgG připravená proti PVX (1 : 1000; Sigma, St. Louis, MO, USA) ředěná v KP (konjugační pufr) (100 μ l/jamka), inkubace probíhala 2 hod při 37 °C. Po uplynutí inkubační doby byly opět všechny jamky čtyřikrát (200 μ l/jamka) promyty roztokem PBS + T. Jako sekundární protilátka byla použita Sigma protilátka proti králičímu IgG konjugovaná s alkalickou fosfatázou (ředěna 1 : 30 000 v KP, 100 μ l/jamka), následná inkubace probíhala po dobu 2,5 h při 37 °C. Po uplynutí inkubační doby byly znovu všechny jamky čtyřikrát promyty roztokem PBS + T (200 μ l/jamka). Následně bylo do jamek pipetováno 100 μ l bezbarvého p-nitrofenylfosfátu (enzymatický substrát) v koncentraci 1 mg/ml rozpuštěného v SP (substrátový pufr). Destička byla poté inkubována při 37 °C po dobu 60 min. Enzymatický substrát byl štěpen alkalickou fosfatázou na fosfátovou skupinu a žlutý nitrofenol. Aktivita fosfatázy je úměrná uvolněnému množství nitrofenolu. V testovaném vzorku je tím vyšší koncentrace viru, čím více je žluté zbarvení intenzivnější. Zabarvení bylo měřeno jako absorbance při vlnové délce 405 nm.

5 VÝSLEDKY

5.1 Porovnání sekvencí PVX CP s PapMV CP

Na základě publikovaných článků (Laliberté Gagné et al., 2008; Tremblay et al., 2006), zkoumající důležitost určitých úseků/aminokyselin pro interakci CP – CP a CP - RNA PapMV, zatím jediného potexviru s popsanou krystalovou strukturou, bylo zjištěno, že určité úseky jsou víceméně konzervované mezi potexviry.

Pozice F13 PapMV CP se projevila jako nepostradatelná při interakci CP – CP. Záměna F13 za alanin (A), glycin (G), arginin (R), kyselinu glutamovou (E) nebo serin (S) bránila interakci CP-CP a tím i skládání a šíření virové částice rostlinou. Zároveň bylo potvrzeno, že substituční náhrada F13 za leucin (L) a tyrosin (Y) nepůsobí inhibičně. Pozice K97 PapMV CP lokalizovaná v doméně, kde se virová RNA váže na podjednotky CP, hraje důležitou roli právě při vazbě CP - RNA u PapMV. Substituce K97 za alanin (A) měla vliv jak na proces formování nukleokapsidu podobných částic (NLPs, **n**ucleocapsid **l**ike **p**articles), tak i na vazbu podjednotek CP s genomovou RNA.

Analýzou CLUSTAL W byla porovnána aminokyselinová sekvence PapMV CP (215 aminokyselin) s PVX CP (237 aminokyselin). Bylo zjištěno, že pozici F13 u PapMV CP kódující aminokyselinu fenylalanin, odpovídá v sekvenci PVX CP pozice F33. Pozice K97 u PapMV CP je v souladu s pozicí K118 v sekvenci PVX CP, kdy u obou virů vybraný triplet nukleotidů kóduje aminokyselinu lysin. Aminokyselinové sekvence PapMV CP s PVX CP byly porovnány v celé jejich délce (Obr. 14).

```
PapMV      MS-----KSSMSTPNI---AFPAITQEQMSSIKVDPTSNNLLPSQEQLK
PVX        MSAPASTTQPIGSTTSTTTKTAGATPATASGLFTIIPDGDFFFSTARAIVASNAVATNEDLS

PapMV      SVSTLMVAAKVPAASVTTVALELVNFCYDNGSSAYTTVTGPSSI-PEISLAQLASIVKAS
PVX        KIEAIWKDMKVPTDTMAQAANDLVRHCADVGSSAQTEMIDTGPYSNGISRARLAAAIK-E

PapMV      GTSLRKFCRYFAPIIWNLR-TDKMAPANWEASGYKPSAKFAAFDFFDGVENPAAMQPPSG
PVX        VCTLRQFCMKYAPVVWNWMLTNNSPANWQAQGFKPEHKFAAFDFFNGVTNPAAIMPKEG

PapMV      LIRSPTQEERIANATNKQVHLFQAAAQDNNFTSNSAFITKGQISGSTPTI--QFLPPPE
PVX        LIRPPSEAEMNAAQTAAFVKITKARAQSNDFASLDAAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP-
```

Obrázek 14: Porovnání aminokyselinové sekvence PapMV CP s PVX CP.

Pozice F13 u PapMV CP odpovídá u PVX CP pozici F33 (žlutě zvýrazněná),
pozice K97 u PapMV CP je v souladu s pozicí K118 u PVX CP (modře zvýrazněná).

5.2 Porovnání sekvencí PVX CP různých izolátů a kmenů PVX

Z internetové databáze NCBI bylo vybráno přibližně 500 aminokyselinových sekvencí různých izolátů a kmenů PVX CP. Následně byly získané sekvence upraveny tak, aby mohly být analyzovány pomocí metody založené na softwarovém programu CLUSTAL W.

Analýza byla zaměřena především na aminokyseliny F33 a K118, které byly vyhodnoceny jako potenciálně zajímavé pro interakce PVX CP. Analýzou bylo zjištěno, že pozice F33 je u většiny izolátů a kmenů PVX CP prezentována fenylalaninem, v menší míře (3 %) pak leucinem (Obr. 15). Na základě získaných dat bylo zhodnoceno, že pozice F33 vystupuje jako pozice konzervovaná, a tudíž by měla hrát důležitou roli při interakci CP - CP, a tím i šíření viru v rostlinných pletivech. Ze získaných dat bylo dále určeno, že pozice 118 je u všech porovnávaných izolátů a kmenů PVX CP zastoupena právě lysinem (Obr. 16). Získaná data nasvědčují tomu, že stejně tak jako pozice F13, vystupuje i pozice K118 v rámci PVX CP jako konzervovaná. Měla by tedy hrát klíčovou roli při vazbě podjednotek CP na virovou RNA, a tím výrazně ovlivňovat proces tvorby NLPs .

HM036197	I	MSAPASTTQATG	STTS-----	TTT	K	TAGATPATASGL	FTIPD	G	DF	F	S	T	A	R	A	I	V	A	49
AB056719	K	MSAPASTTQATG	STTS-----	TTT	K	TAGATPATASGL	FTIPD	G	DF	F	S	T	A	R	V	I	V	A	49
HM036196	I	MSAPASTTQATG	STTS-----	TTT	K	TAGATPATASGL	FTIPD	G	DF	F	S	T	A	R	A	I	V	A	49
JX273242	I	MSAPASTTQATG	STTS-----	TTT	K	PAGATPATASGL	FTIPD	G	DF	F	S	T	A	R	A	I	V	A	49
KF568904	I	MSAPASTTQATG	STTS-----	TTT	K	TAGATPATASGL	FTIPD	G	DF	F	S	T	A	R	A	I	V	A	49
HG518657	I	MSAPASTTQATG	STTS-----	TTT	K	TAGATPATASGL	FTIPD	G	DF	F	S	T	A	R	A	I	V	A	49
Z34261	K	MSAPASTTQATG	STTS-----	TTT	K	TAGATPATASGL	FTIPD	G	DF	F	S	T	A	R	A	I	V	A	49

Obrázek 15: Porovnání vybraných aminokyselinových sekvencí PVX CP různých izolátů a kmenů PVX CP s důrazem na pozici F33

Červeně zvýrazněná oblast odpovídá pozici 33, kódující fenylalanin v PVX CP, výjimkou jsou kmeny a izoláty (zvýrazněné modře) u nichž nukleotidová sekvence v pozici 33 kóduje leucin; I = izolát, K = kmen.

HM036197	I	SNAVATNEDLSK	TEAIWKDMKVPT	DTMAQA	AWDLV	RHCAD	VGSSAQ	TEMI	D	T	G	P	S	N	G	I	S	109
AB056719	K	SNAVATNEDLSK	TEAIWKDMKVPT	NTMAQA	AWDLV	RHCAD	VGSSAQ	TEMI	D	T	G	P	S	N	G	I	S	109
HM036196	I	SNAVATNEDLSK	TEAIWKDMKVPT	DTMAQA	AWDLV	RHCAD	VGSSAQ	TEMI	D	T	G	P	S	N	G	I	S	109
JX273242	I	SNAVATNEDLSK	TEAIWKDMKVPT	GTMAQA	AWDLV	RHCAD	VGSSAQ	TEMI	D	T	G	P	S	N	G	I	S	109
KF568904	I	SNAVATNEDLSK	TEAIWKDMKVPT	DTMAQA	AWDLV	RHCAD	VGSSAQ	TEMI	D	T	G	P	S	N	G	I	S	109
HG518657	I	SNAVATNEDLSK	TEAIWKDMKVPT	DTMAQA	AWDLV	RHCAD	VGSSAQ	TEMI	D	T	G	P	S	N	G	I	S	109
Z34261	K	SNAVATNEDLSK	TEAIWKDMKVPT	DTMAQA	AWDLV	RHCAD	VGSSAQ	TEMI	D	T	G	P	S	N	G	I	S	109

Obrázek 16: Porovnání vybraných aminokyselinových sekvencí PVX CP různých izolátů a kmenů PVX CP s důrazem na pozici K118

Červeně zvýrazněná oblast odpovídá pozici 118 kódující lysin u všech porovnávaných izolátů a kmenů PVX CP, I = izolát, K = kmen.

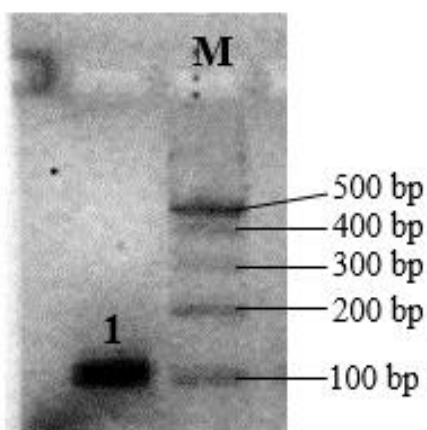
5.3 Mutantní formy PVX CP

Gen PVX CP je složen ze 714 nukleotidů, což odpovídá 237 aminokyselinovým zbytkům, teoretická molekulová hmotnost vycházející z nukleotidové sekvence odpovídá 25 kDa. Pomocí metod PCR a SOE PCR s využitím příslušných primerů (kapitola 4.1.5.5 Primery, str. 37) byly vytvořeny mutantní formy PVX CP (Obr. 7, str. 41; 8, str. 42; 9, str. 43; 10 str. 46; 11 str. 47). Všechny 5 konstruktů bylo úspěšně připraveno pomocí metod PCR a SOE PCR. Konstrukty mutantů PVX CP byly následně klonovány pomocí standardních technik (restrikční štěpení a ligace) do expresního vektoru pGR106, kde byl nahrazen wtPVX CP za mutantní PVX CP. K získaným mutantům PVX CP byl následně klonován GFP za účelem detekce šíření viru v rostlině.

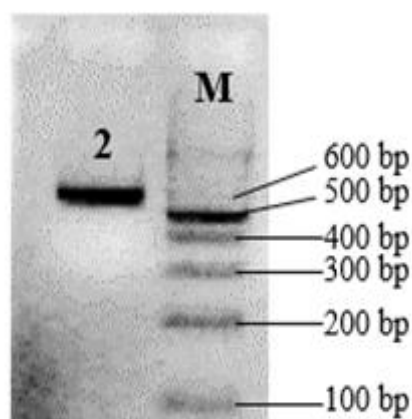
Konstrukty s mutacemi v PVX CP zahrnovaly 3 deleční mutanty: $\Delta 2-32$ PVX CP (delece 2.-32. kodónu), $\Delta 2-33$ PVX CP (delece 2.-33. kodónu) a $\Delta F33$ PVX CP (delece 33. kodónu kódujícího fenylalanin) a 2 substituční mutanty: F33A PVX CP (náhrada kodónu fenylalaninu za kodón alaninu) a K118A PVX CP (náhrada kodónu lysinu za kodón alaninu). Všechny mutace byly vytvořeny v závislosti na výsledcích analýzy CLUSTAL W, kde se jako konzervované pozice v rámci různých izolátů a kmenů PVX jevíly právě pozice F33 a K118.

5.3.1 Příprava konstruktů $\Delta 2-32$ PVX CP pomocí PCR a SOE PCR

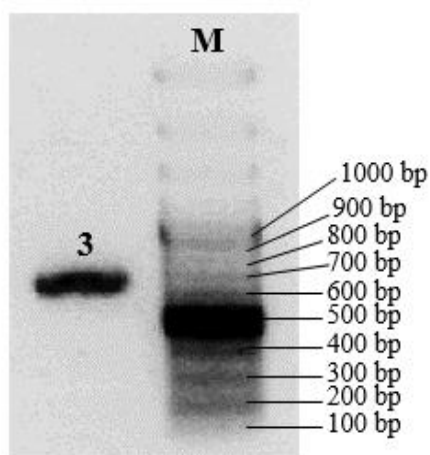
Z plazmidu pGR106, ve kterém je integrována kompletní cDNA sekvence PVX, respektive je zde zaklonován i gen pro PVX CP, byl metodou PCR, prostřednictvím navržených primerů HPdi - 1 a 2, získán první DNA fragment, jehož velikost činila 105 bp (Obr. 17). Pomocí primerů HPdi - 3 a 4 byl získán druhý DNA fragment o velikosti 573 bp (Obr. 18). Pomocí metody SOE PCR byly jednotlivé fragmenty o odpovídající velikosti slepeny pomocí primerů HPdi - 1 a 4 do výsledného konstruktů o celkové velikosti 657 bp (Obr. 19). Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v kapitole: 4.1.5.5 Primery, str. 37.



Obrázek 17: Elektroforeogram 1. fragmentu konstruktů $\Delta 2-32$ PVX CP v 1 % agarózovém gelu. M- marker GeneRuler™, 1- 1. část konstruktů $\Delta 2-32$ PVX CP



Obrázek 18: Elektroforeogram 2. fragmentu konstruktů $\Delta 2-32$ PVX CP v 1 % agarózovém gelu. M- marker GeneRuler™, 2- 2. část konstruktů $\Delta 2-32$ PVX CP

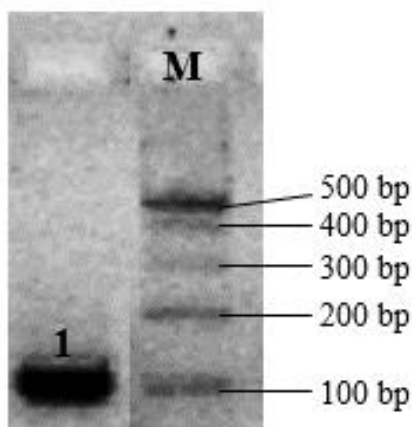


Obrázek 19: Elektroforeogram slepeného konstruktů $\Delta 2-32$ PVX CP v 1 % agarózovém gelu. M- marker GeneRuler™, 3- výsledný konstrukt $\Delta 2-32$ PVX CP

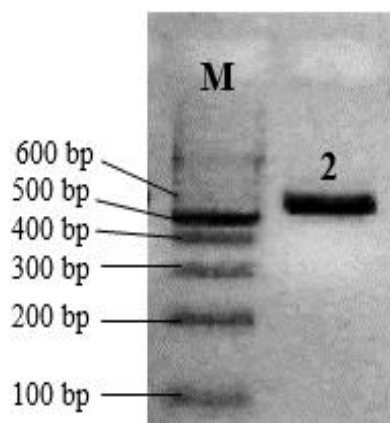
5.3.2 Příprava konstruktů $\Delta 2-33$ PVX CP pomocí PCR a SOE PCR

Z plazmidu pGR106 byly metodou PCR získány jednotlivé fragmenty, které byly pomocí metody SOE PCR slepeny ve výsledný konstrukt $\Delta 2-33$ PVX CP. Prostřednictvím navržených primerů HPdi – 1 a 5 byl amplifikován první fragment o velikosti 105 bp (Obr. 20). Druhý fragment o velikosti 570 bp byl amplifikován pomocí primerů HPdi – 6 a 4 (Obr. 21). Metodou SOE PCR s využitím primerů HPdi – 1 a 4 byly jednotlivé fragmenty slepeny do výsledného konstruktů o celkové velikosti 654 bp (Obr. 22). V tomto případě byla odstraněna i konzervovaná pozice F33, která by měla být zodpovědná za interakci podjednotek CP a CP.

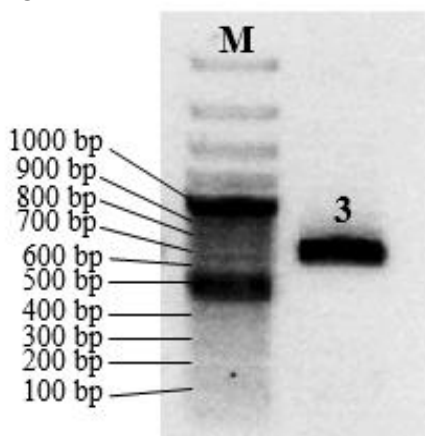
Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v kapitole: 4.1.5.5 Primery, str. 37.



Obrázek 20: Elektroforeogram 1. fragmentu konstruktů $\Delta 2-33$ PVX CP v 1 % agarózovém gelu. M- marker GeneRuler™, 1- 1. část konstruktů $\Delta 2-33$ PVX CP



Obrázek 21: Elektroforeogram 2. fragmentu konstruktů $\Delta 2-33$ PVX CP v 1 % agarózovém gelu. M- marker GeneRuler™, 2- 2. část konstruktů $\Delta 2-33$ PVX CP

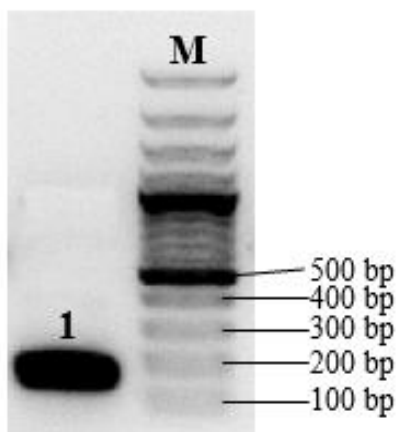


Obrázek 22: Elektroforeogram spleného konstruktů $\Delta 2-33$ PVX CP v 1 % agarózovém gelu. M- marker GeneRuler™, 3- výsledný konstrukt $\Delta 2-33$ PVX CP

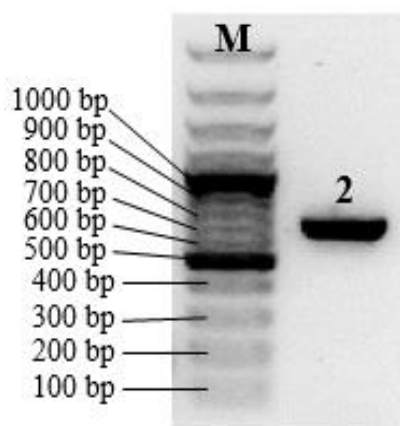
5.3.3 Příprava konstruktů $\Delta F33$ PVX CP pomocí PCR a SOE PCR

Deleční konstrukt $\Delta F33$ PVX CP obsahoval delecí jednoho kodónu aminokyseliny (fenylalaninu) v pozici 33. K vytvoření delečního konstruktů $\Delta F33$ PVX CP byla využita metoda PCR a SOE PCR. Pomocí metody PCR byly z plazmidu pGR106 amplifikovány za použití navržených primerů jednotlivé fragmenty. První fragment o velikosti 166 bp byl vytvořen pomocí primerů HPdi – 20 a 10 (Obr. 23). Druhý fragment o velikosti 572 bp byl vytvořen prostřednictvím primerů HPdi – 11 a 4 (Obr. 24). Jednotlivé fragmenty získané metodou PCR, byly spojeny do výsledného konstruktů metodou SOE PCR, s využitím primerů HPdi – 20 a 4, výsledná velikost konstruktů činila 713 bp (Obr. 25).

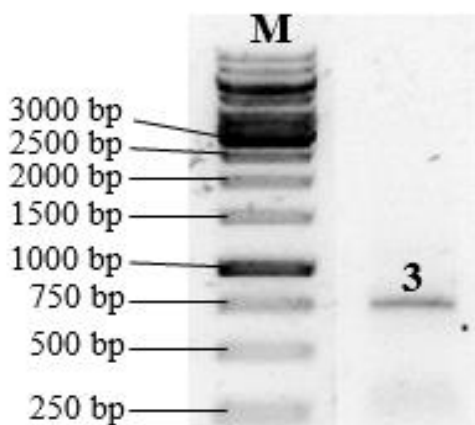
Sekvence primerů použitých pro syntézu dílčích částí jsou uvedeny v kapitole: 4.1.5.5 Primery, str. 37.



Obrázek 23: Elektroforeogram 1. fragmentu konstruktů $\Delta F33$ PVX CP v 1 % agarózovém gelu. **M**- marker GeneRuler™, **1**- 1. část konstruktů $\Delta F33$ PVX CP



Obrázek 24: Elektroforeogram 2. fragmentu konstruktů $\Delta F33$ PVX CP v 1 % agarózovém gelu. **M**- marker GeneRuler™, **2**- 2. část konstruktů $\Delta F33$ PVX CP



Obrázek 25: Elektroforeogram slepeného konstruktů $\Delta F33$ PVX CP v 1 % agarózovém gelu. **M**- marker GeneRuler™, **3**- výsledný konstrukt $\Delta F33$ PVX CP

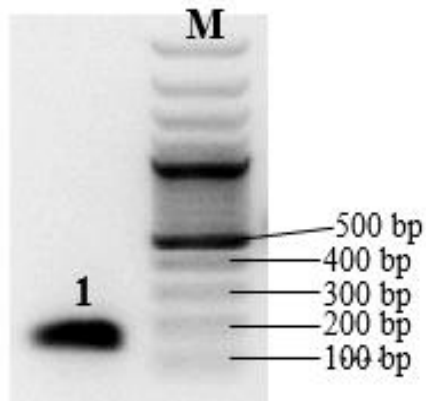
5.3.4 Příprava konstruktů F33A PVX CP pomocí PCR a SOE PCR

Pomocí metody PCR a navržených primerů byl 33. kodón kódující fenylalanin v PVX CP substituován za kodón alaninu. Vybraná substituční aminokyselina byla zvolena na základě pokusů, jež prováděli Laliberté Gagné et al. (2008), kdy u PapMV CP konzervovanou pozici F13 kódující fenylalanin, která u PVX CP odpovídá pozici F33, nahradili za hydrofobní alanin, za vzniku mutantní formy F13A PapMV CP. Tato mutace vykazovala značný vliv na skládání podjednotek PapMV CP do NLPs.

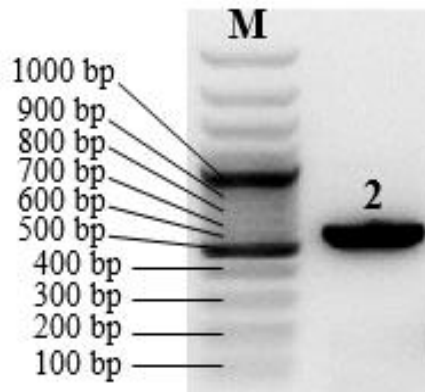
Konstrukt F33A PVX CP byl vytvořen pomocí metod PCR a SOE PCR, kdy z plasmidu pGR106 byly amplifikovány jednotlivé fragmenty o odpovídajících délkách a následně metodou SOE PCR spojeny. Pomocí primerů HPdi – 20 a 8 byl amplifikován úsek o velikosti 173 bp (Obr. 26), prostřednictvím primerů HPdi – 9 a 4 byl amplifikován delší

úsek o velikosti 580 bp (Obr. 27). Metodou SOE PCR s využitím krajních primerů HPdi – 20 a 4 byly spojeny jednotlivé fragmenty do výsledného konstruktu o velikosti 716 bp (Obr. 28).

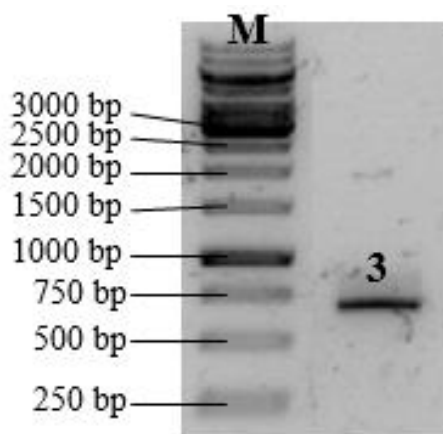
Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v kapitole: 4.1.5.5 Primery, str. 37.



Obrázek 26: Elektroforeogram 1. fragmentu konstruktů F33A PVX CP v 1 % agarózovém gelu. **M**- marker GeneRuler™, **1**- 1. část konstruktů F33A PVX CP



Obrázek 27: Elektroforeogram 2. fragmentu konstruktů F33A PVX CP v 1 % agarózovém gelu. **M**- marker GeneRuler™, **2**- 2. část konstruktů F33A PVX CP



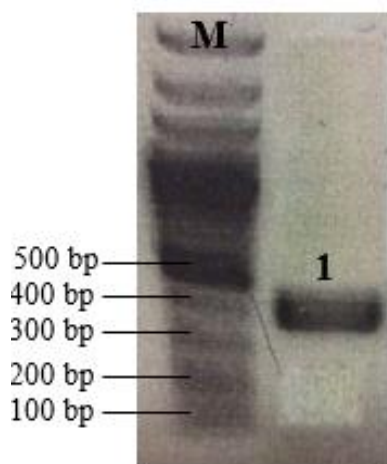
Obrázek 28: Elektroforeogram slepeného konstruktů F33A PVX CP v 1 % agarózovém gelu. **M**- marker GeneRuler™, **3**- výsledný konstrukt F33A PVX CP

5.3.5 Příprava konstruktů K118A PVX CP pomocí PCR a SOE PCR

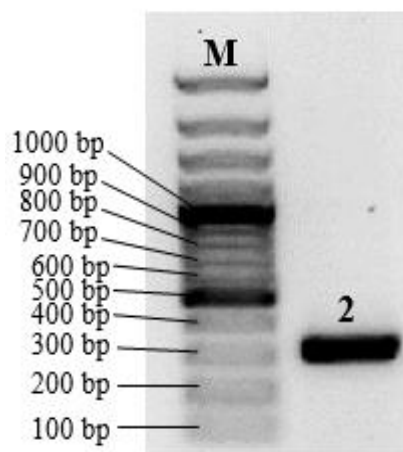
Pomocí metody PCR a navržených primerů byl 118. kodón kódující lysin v PVX CP substituován za kodón alaninu. Vybraná substituční aminokyselina byla vybrána, na základě pokusů, jež prováděli Tremblay et al. (2006), kdy u PapMV CP konzervovanou pozici K97 kódující lysin, která u PVX CP odpovídá pozici K118, nahradili za hydrofobní alanin, za vzniku mutantní formy K97A PapMV CP.

Z plazmidu pGR106 byl metodou PCR, prostřednictvím navržených primerů HPdi – 20 a 21 nejprve amplifikován první fragment o velikosti 415 bp (Obr. 29). Pomocí primerů HPdi – 22 a 4-delší byl získán druhý fragment o velikosti 320 bp (Obr. 30). Metodou SOE PCR byly získané fragmenty spojeny prostřednictvím krajních primerů HPdi – 20 a 4-delší do požadovaného konstrukt, jehož vypočítaná velikost činila 716 bp. (Obr. 31).

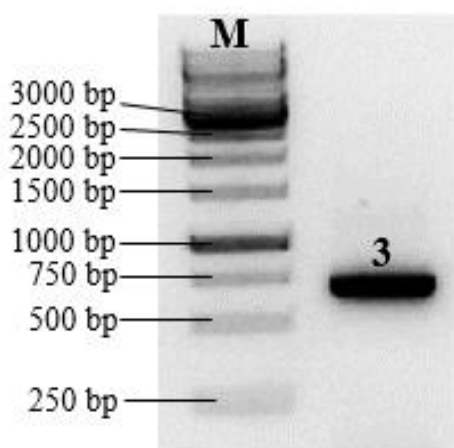
Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v kapitole 4.1.5.5 Primery, str. 37.



Obrázek 29: Elektroforeogram 1. fragmentu konstrukt K118A PVX CP v 1 % agarózovém gelu. M- marker GeneRuler™, 1- 1. část konstrukt K118A PVX CP



Obrázek 30: Elektroforeogram 2. fragmentu konstrukt K118A PVX CP v 1 % agarózovém gelu. M- marker GeneRuler™, 2- 2. část konstrukt K118A PVX CP

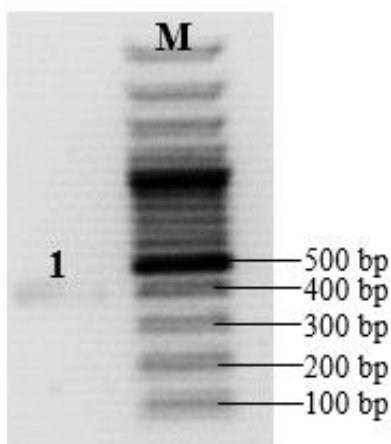


Obrázek 31: Elektroforeogram slepeného konstrukt K118A PVX CP v 1 % agarózovém gelu. M- marker GeneRuler™, 3- výsledný konstrukt K118A PVX CP

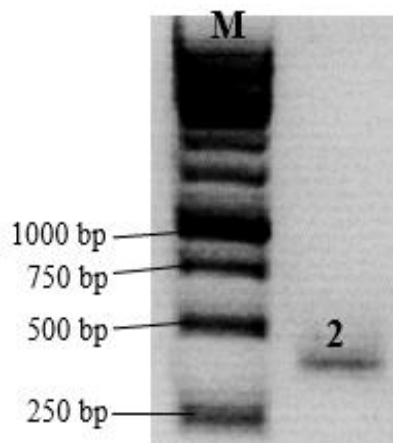
5.4 Příprava reportérového genu GFP pomocí PCR a SOE PCR

Konstrukt GFP byl zhotoven za účelem sledování šíření viru PVX s mutacemi v PVX CP. K vytvoření konstruktů GFP byla použita PCR a SOE PCR. Výsledný konstrukt byl vytvořen ze dvou fragmentů z důvodu odstranění vnitřního restričního místa ClaI. Z expresního vektoru pGR2I-dCP GFP byly metodou PCR, prostřednictvím navržených primerů získány jednotlivé DNA fragmenty GFP. První fragment o velikosti 407 bp byl amplifikován pomocí primerů HPdi – 12 a 13 (Obr. 32). Druhý fragment o velikosti 374 bp byl amplifikován prostřednictvím primerů HPdi – 14 a 15 (Obr. 33). Metodou SOE PCR prostřednictvím primerů HPdi – 12 a 15 byly amplifikované fragmenty spojeny do výsledného konstruktů o vypočítané velikosti 755 bp (Obr. 34).

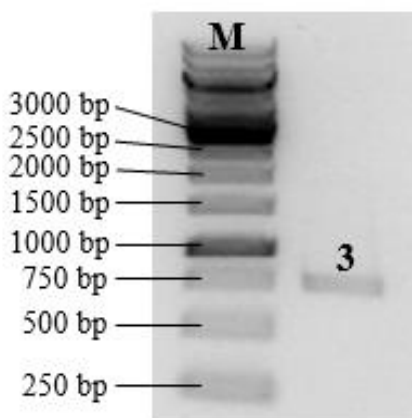
Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v kapitole: 4.1.5 Primery, str. 37.



Obrázek 32: Elektroforeogram 1. fragmentu GFP konstruktů v 1 % agarózovém gelu. M- marker GeneRuler™, 1- 1. část GFP konstruktů



Obrázek 33: Elektroforeogram 2. fragmentu GFP konstruktů v 1 % agarózovém gelu. M- marker GeneRuler™, 2- 2. část GFP konstruktů

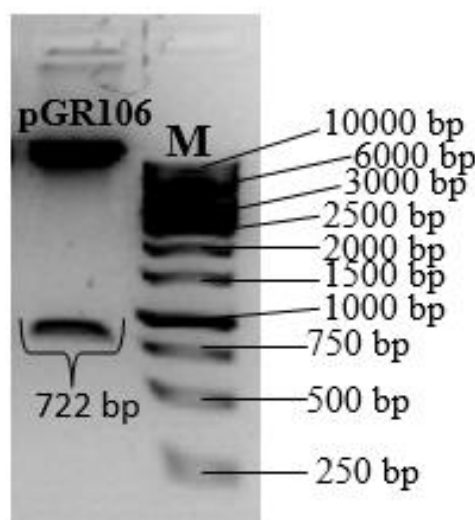


Obrázek 34: Elektroforeogram spleného GFP konstruktů v 1 % agarózovém gelu. M- marker GeneRuler™, 3- výsledný GFP konstrukt

5.5 Restriční štěpení a ligace

5.5.1 Restriční štěpení delečních konstruktů $\Delta 2-32$ PVX CP, $\Delta 2-33$ PVX CP a ligace do vektoru pGR106

Získané 2 deleční DNA konstrukty byly společně s vektorem pGR106 štěpeny restričními endonukleázami ClaI a XhoI. Štěpené konstrukty byly přečištěny pomocí High Pure PCR Product Purification Kit dle pokynů výrobce. Na Obr. 35 je vidět štěpený a linearizovaný vektor pGR106, z něhož byl vyštěpen fragment o velikosti 722 bp. Linearizovaný vektor pGR106 o správné velikosti byl vyříznut z gelu, přečištěn a následně do něj byly ligovány štěpené a přečištěné deleční konstrukty. Po DNA ligaci, byla provedena transformace do *E. coli* kmene DH5 α , z několika vybraných narostlých kolonií byly pomocí QIAprep Spin Miniprep Kit izolovány plazmidy. Izolované plazmidy byly podrobeny kontrolnímu štěpení restričními enzymy ClaI a XhoI, k ověření přítomnosti požadovaných konstruktů v pGR106.

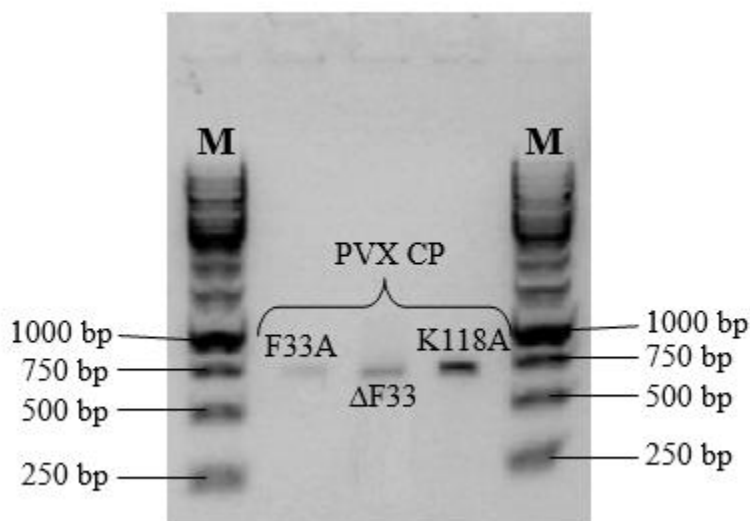


Obrázek 35: Elektroforeogram štěpení pGR106wt v 1 % agarózovém gelu. M- marker GeneRuler™

5.5.2 Restriční štěpení mutantů $\Delta F33$ PVX CP, F33A PVX CP a K118 PVX CP a ligace

Získané 3 DNA konstrukty byly štěpeny restričními endonukleázami XmaI a XhoI. Na Obr. 36 jsou vidět štěpené DNA konstrukty odpovídající vypočítané velikosti (vypočítaná velikost činí 703, 706 a 706 bp). Štěpené produkty byly přečištěny pomocí High Pure PCR Product Purification Kit dle pokynů výrobce. Prostřednictvím restričních míst XmaI a XhoI měli být tyto bodové mutanti vneseni do získaného konstruktů GFP/pGR106 (viz 5.5.3). Ani po opakovaných pokusech se bohužel nepodařilo získat bodové mutanty vnesené do

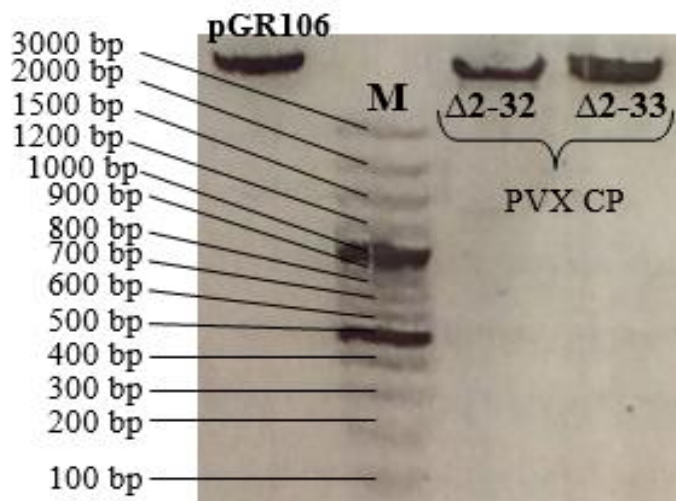
GFP/pGR106 i přesto, že nukleotidovou sekvenací byla potvrzena přítomnost požadovaných restrikčních míst jak v GFP/pGR106, tak i v sekvencích 3 konstruktů bodových mutantů.



Obrázek 36: Elektroforeogram štěpených slepených mutantů PVX CP v 1 % agarózovém gelu. M- marker GeneRuler™

5.5.3 Restrikční štěpení konstruktů GFP a ligace do vektoru pGR106 a delečních mutantů $\Delta 2-32$ PVX CP/pGR106, $\Delta 2-33$ PVX CP/pGR106

Získaný konstrukt GFP společně s vektorem pGR106 a delečními mutanty $\Delta 2-32$ PVX CP/pGR106, $\Delta 2-33$ PVX CP/pGR106 byl štěpen restrikčními endonukleázami ClaI a SalI -HF. Na Obr. 37 je vidět štěpený linearizovaný vektor pGR106, jehož velikost odpovídá vypočítané velikosti 11077 bp. Na Obr. 37 jsou dále zobrazeny linearizované mutantní vektory $\Delta 2-32$ PVX CP/pGR106, $\Delta 2-33$ PVX CP/pGR106 o předpokládané velikosti 10984 a 10981 bp. Linearizované vektory pGR106, $\Delta 2-32$ PVX CP/pGR106 a $\Delta 2-33$ PVX CP/pGR106 a štěpený GFP konstrukt byly přečištěny pomocí High Pure PCR Purification Kit dle pokynů výrobce. Následně byl konstrukt GFP ligován do štěpených expresních vektorů pGR106, $\Delta 2-32$ PVX CP/pGR106 a $\Delta 2-33$ PVX CP/pGR106. Po ligaci byla provedena transformace do *E. coli* kmene DH5 α , z několika vybraných narostlých kolonií byly pomocí QIAprep Spin Miniprep Kit izolovány plazmidy. Izolované plazmidy byly podrobeny kontrolnímu štěpení restrikčními enzymy ClaI a SalI-HF (Obr. 37), k ověření přítomnosti GFP v pGR106, $\Delta 2-32$ PVX CP/pGR106 a $\Delta 2-33$ PVX CP/pGR106. Vnesením konstruktů GFP do pGR106, stejně tak i do mutantních vektorů $\Delta 2-32$ PVX CP/pGR106 a $\Delta 2-33$ PVX CP/pGR106 bylo uměle včleněno restrikční místo XmaI pro účely přípravy bodových mutantů.



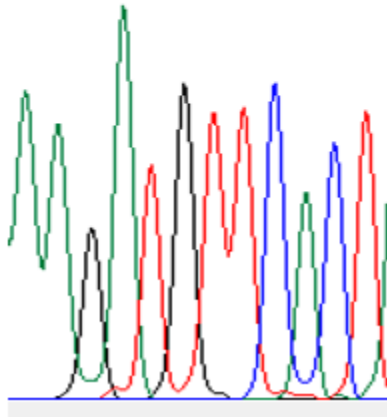
Obrázek 37: Elektroforeogram štěpeného pGR106wt a delečních mutantů PVX CP pro zaklonování GFP v 1 % agarózovém gelu.

M- marker GeneRuler™

5.6 Ověření správnosti sekvencí (sekvenace)

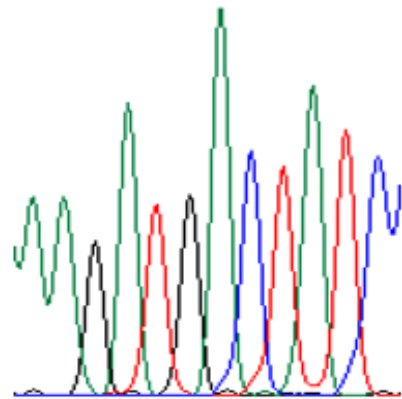
Pro kontrolu správnosti nukleotidové a od nich odvozené aminokyselinové sekvence vytvořených konstruktů PVX CP byla provedena sekvenace příslušných 5 modifikovaných úseků PVX CP. Prostřednictvím sekvenace byla také ověřena správnost konstruktů GFP, ale i správnost klonovacích technik. Sekvenace byla provedena firmou GATC Biotech.

Analýza nukleotidových sekvencí potvrdila správnost všech 6 vytvořených konstruktů (5 mutantů a konstruktů GFP). Deleční mutanti $\Delta 2-32$ PVX CP/pGR106 a $\Delta 2-33$ PVX CP/pGR106 obsahovaly: iniciační (ATG) kodon PVX CP, delecí od 2. po 32. kodón (v případě mutantu $\Delta 2-32$ PVX CP), delecí od 2. po 33. kodón (v případě mutantu $\Delta 2-33$ PVX CP) (Obr. 38 a 39), sekvenci CP PVX a restrikční místo XhoI a terminační (TAA) kodon. V případě bodových mutací, a to delečního mutantu $\Delta F33$ PVX CP, byla potvrzena delece 33. kodónu aminokyseliny fenylalaninu (Obr. 40), u substitučních mutantů F33A PVX CP (Obr. 41) a K118A PVX CP (Obr. 42) byla také prokázána bodová mutace v podobě náhrady 33. a 118. kodónu fenylalaninu a lysinu za kodón alaninu. Sekvenací byla potvrzena i správnost vnesených restrikčních míst do sekvence bodových mutantů ($\Delta F33$ PVX CP, F33A PVX CP a K118A PVX CP), které byly připraveny jako produkty SOE PCR, tudíž by se mělo podařit je úspěšně ligovat do pGR/GFP popřípadě do $\Delta 2-32$ PVX CP/pGR106 a $\Delta 2-33$ PVX CP/pGR106. Následující obrázky (Obr. 38-42) jsou pořízeny z programu Chromas, který se využívá k analýze sekvenačních dat.



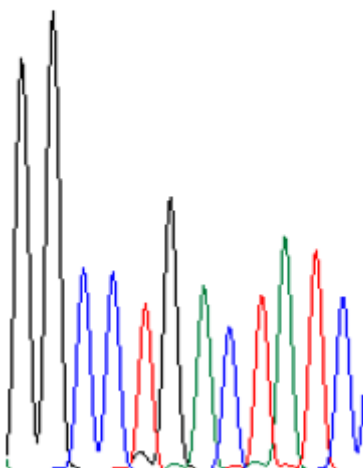
Obrázek 38: Výstup z programu Chromas; mutant $\Delta 2-32$ PVX CP.

V oválu je vyznačena sekvence s chybějícím 2.-32. kodónem, po iniciačním ATG kodónu následuje kodón TTC (F33).



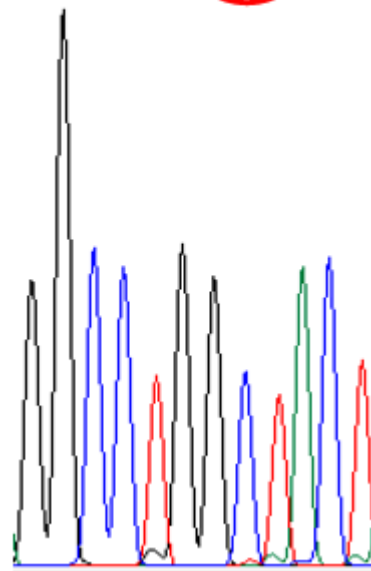
Obrázek 39: Výstup z programu Chromas; mutant $\Delta 2-33$ PVX CP.

V oválu je vyznačena sekvence s chybějícím 2.-33. kodónem, po iniciačním ATG kodónu následuje kodón ACT (T34).



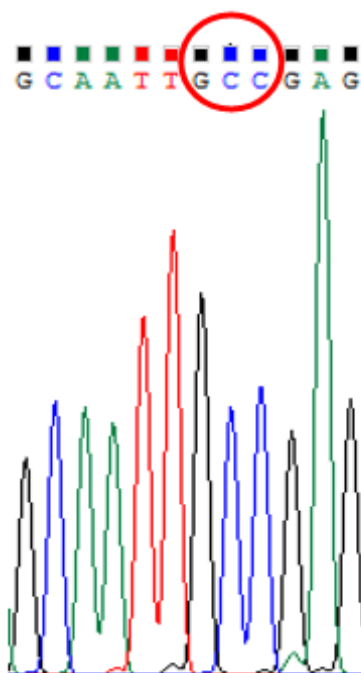
Obrázek 40: Výstup z programu Chromas; mutant $\Delta F33$ PVX CP.

V oválu je vyznačena sekvence s chybějícím 33. kodónem (TTC), který se v nemodifikovaném PVX CP nachází mezi kodónem CTG a ACT.



Obrázek 41: Výstup z programu Chromas; mutant F33A PVX CP.

V oválu je vyznačena sekvence s nahrazeným 33. kodónem TTC (fenylalanin) za kodón GCT (alanin).



Obrázek 42: Výstup z programu Chromas; mutant K118A PVX CP. V oválu je vyznačena sekvence s nahrazeným 118. kodónem AAA (lysin) za kodón GCC (alanin).

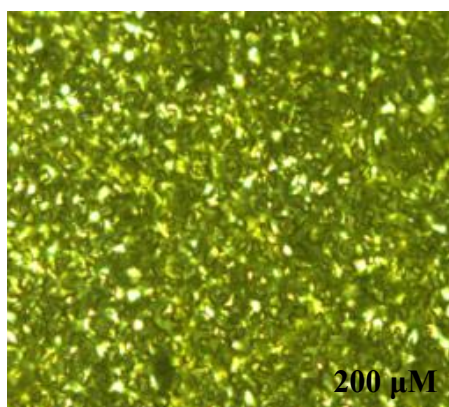
5.7 Sledování šíření PVX pomocí GFP

Celkem 40 rostlin *N. benthamiana* bylo inokulováno *A. tumefaciens* nesoucím deleční mutanty $\Delta 2-32$ PVX CP+GFP/pGR106 (20 rostlin) a $\Delta 2-33$ PVX CP+GFP/pGR106 (20 rostlin). Jako pozitivní kontrola bylo inokulováno 5 rostlin *N. benthamiana* pomocí *A. tumefaciens* nesoucím GFP/pGR106. K detekci šíření viru v rostlině byl použit reportérový gen GFP. Pokud je GFP ozářen světlem z modré až UV oblasti, fluoreskuje jasně zelenou barvou (maximum při 509 nm), lze tedy zaznamenat, v jaké části rostlinného pletiva je virus přítomen.

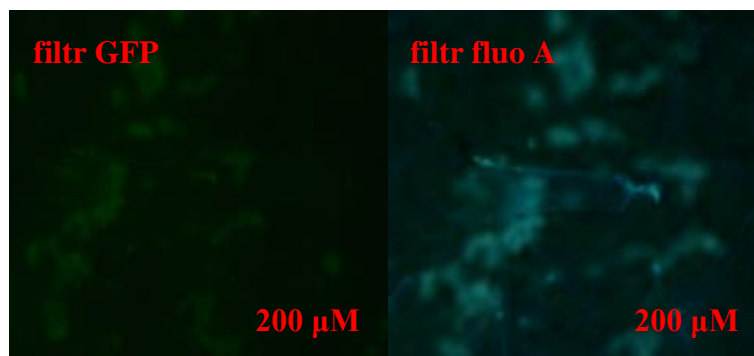
Po 2, 5, 7 a 14 dnech od infekce byla provedena mikroskopická analýza inokulovaných listů. Na Obr. 43 je zobrazena pro porovnání struktura neinfikovaného (zdravého) listu. Následující obrázky (Obr. 44 a 45) byly pořízeny 2 dny po inokulaci. Na Obr. 44 je zachycena mikroskopická struktura listu inokulovaného konstruktem $\Delta 2-32$ PVX CP+GFP/pGR106 a Obr. 45 zobrazuje list inokulovaný konstruktem $\Delta 2-33$ PVX CP+GFP/pGR106. Jedná se o snímky pořízené pomocí filtrů fluo A a GFP. Na snímcích pořízených 2 dny po inokulaci (Obr. 44 a 45) nebyly patrné žádné známky signálu GFP u obou delečních mutantů i u pozitivní kontroly. Po 5 dnech od inokulace byly patrné rozdíly. Rychlejší nástup signálu GFP byl zaznamenán u delečního mutantu $\Delta 2-32$ PVX

CP+GFP/pGR106, který vykazoval stejnou dynamiku signálu GFP jako u pozitivní kontroly. Pod UV osvětlením bylo patrné, že je virus přítomen pouze v infikovaných epidermálních buňkách, a to jak u mutantu $\Delta 2-32$ PVX CP+GFP/pGR106, tak i u pozitivní kontroly GFP/pGR106. Signál GFP u delečního mutantu $\Delta 2-33$ PVX CP+GFP/pGR106 byl sice zaznamenán, ale ve slabší intenzitě. Sedmý den po inokulaci byl zaznamenán výrazný nástup signálu GFP v korelaci s infekcí jak mutanty, tak i nemodifikovaným PVX. Rozdíly, které byly patrné 5. den po inokulaci v rámci delečních mutantů, byly zaznamenány i po 7 dnech. Jednalo se o změny v šíření mutantů v rámci buněk inokulovaných listů. Infekce mutantem $\Delta 2-32$ PVX CP+GFP/pGR106 (Obr. 46) se rozšířila i do přilehlých buněk, stejně jako v případě pozitivní kontroly. Zatímco infekce mutantem $\Delta 2-33$ PVX CP+GFP/pGR106 (Obr. 47) se soustředila pouze v infikovaných epidermálních buňkách, pouze u některých inokulovaných listů byl patrný mírný přechod do sousedních buněk. Po 14 dnech od inokulace nedošlo u infikovaných rostlin oběma delečními mutanty k systemické infekci. V porovnání s infikovanými rostlinami nemodifikovaným PVX (GFP/pGR106) (Obr. 51 a 52), jako pozitivní kontrolou, kde se virus šířil do nově přirůstajících částí rostlinných pletiv. Mutant $\Delta 2-32$ PVX CP+GFP/pGR106 (Obr. 48 49) se v inokulovaných listech za časový interval 14 dnů značně rozšířil do přilehlých buněk. I po 14 dnech byla fluorescence GFP značně intenzivní. Mutant $\Delta 2-33$ PVX CP+GFP/pGR106 (Obr. 50) se také omezil pouze na rozšíření do přilehlých buněk v rámci inokulovaného listu, ale v menší míře než mutant $\Delta 2-32$ PVX CP+GFP/pGR106, intenzita fluorescence GFP byla slabší.

V porovnání s inokulovanými rostlinami pozitivní kontrolou GFP/pGR106, která vykazovala mírné příznaky napadení PVX v podobě žilkové mozaiky převážně na mladších listech, nebyly zaznamenány vizuální příznaky infikovaných rostlin *N. benthamiana* delečními mutanty. Pouze inokulované listy vykazovaly drobné nekrotické skvrnky, které byly způsobené inokulací *A. tumefaciens*.



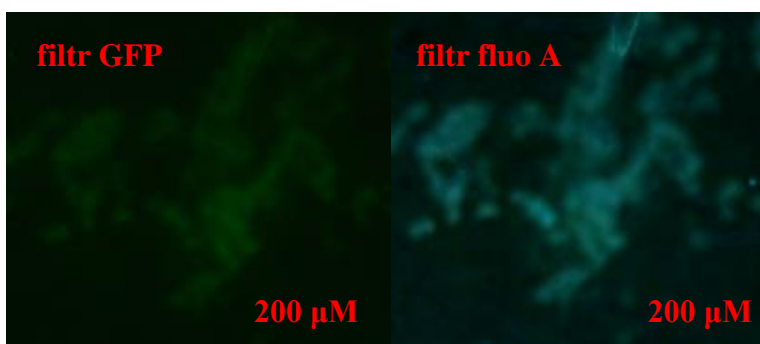
Obrázek 43: Struktura listu neinfikované rostliny. Mikroskopický snímek ve viditelném světle (VIS) (vlastní fotografie)



Obrázek 44: List inokulovaný $\Delta 2-32$ PVX CP+GFP/pGR106, filtr GFP a fluo A po 2 dnech od inokulace.

filtr GFP: Světle zelené skvrny neodpovídají emitovanému záření GFP, ale koloniím *A. tumefaciens*, které jsou pod filtrem GFP také zelené.

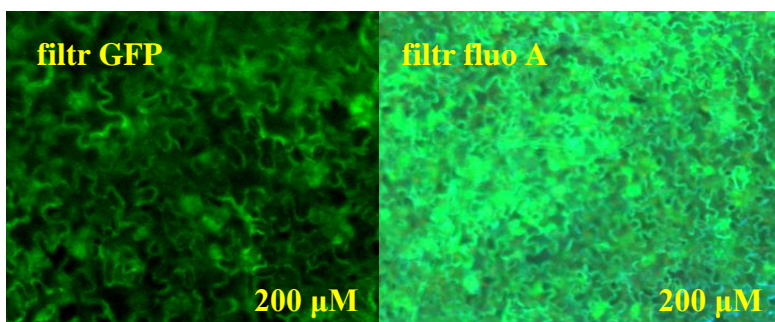
filtr fluo A: Šedé skvrny odpovídají také koloniím *A. tumefaciens* (vlastní fotografie).



Obrázek 45: List inokulovaný $\Delta 2-33$ PVX CP+GFP/pGR106, filtr GFP a fluo A po 2 dnech od inokulace.

filtr GFP: Světle zelené skvrny neodpovídají emitovanému záření GFP, ale koloniím *A. tumefaciens* (místo agroinfiltrace), které jsou pod filtrem GFP také zelené.

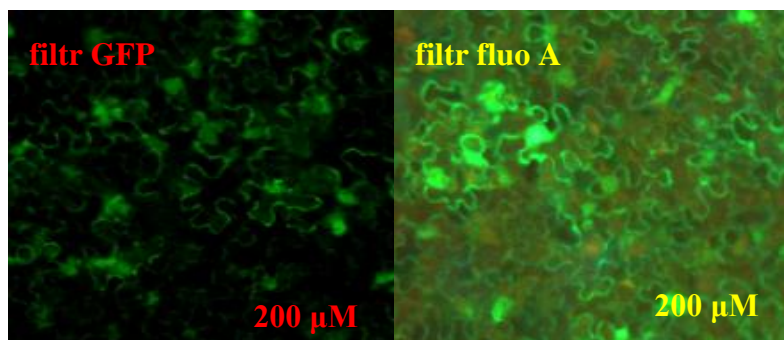
filtr fluo A: Šedé skvrny odpovídají také koloniím *A. tumefaciens* (vlastní fotografie).



Obrázek 46: List inokulovaný $\Delta 2-32$ PVX CP+GFP/pGR106, filtr GFP a fluo A po 7 dnech od inokulace.

filtr GFP: V tomto snímku je již vidět emitované záření GFP, výraznější zelená barva, pravidelně rozložená v buňkách, zvrásněné záhyby jsou buněčné stěny okolních buněk

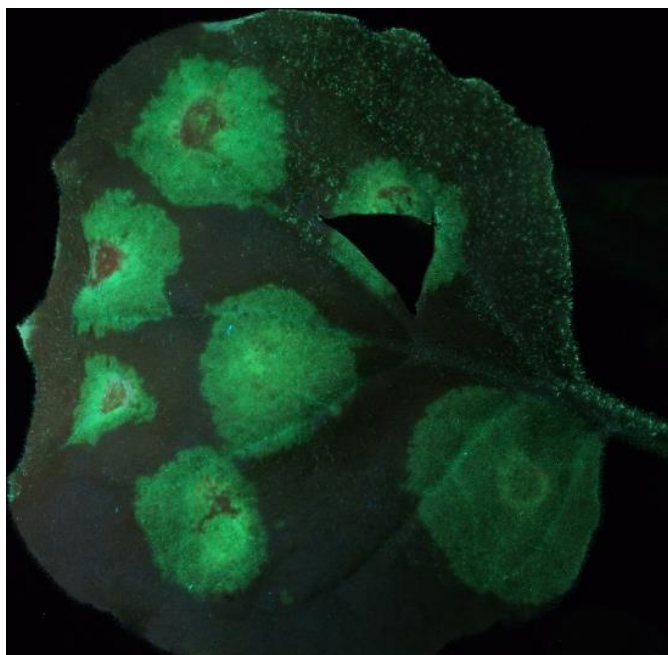
filtr fluo A: Zářivě zelená barva odpovídá buňkám s virem nesoucí GFP (vlastní fotografie).



Obrázek 47: List inokulovaný $\Delta 2-33$ PVX CP+GFP/pGR106, filtr GFP a fluo A po 7 dnech od inokulace.

filtr GFP: V tomto snímku je již vidět emitované záření GFP, ovšem ve výrazně slabší intenzitě, a v méně buňkách.

filtr fluo A: Zářivě zelená barva odpovídá buňkám s virem nesoucí GFP, (vlastní fotografie).



Obrázek 48: Inokulovaný list $\Delta 2-32$ PVX CP+GFP/pGR106.

Foto pořízené pod UV filtrem, zářivě zelená barva v kolech odpovídá šíření mutanta do okolních buněk z místa agroinfiltrace, která jsou viditelná jako červená kolečka uprostřed.

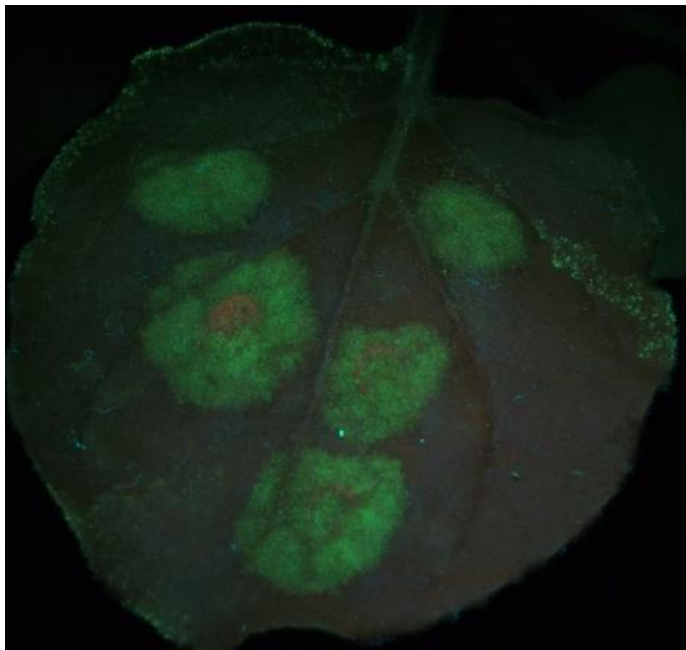
(foto: Dr. Moravec, ÚEB, AV ČR, v. v. i.).



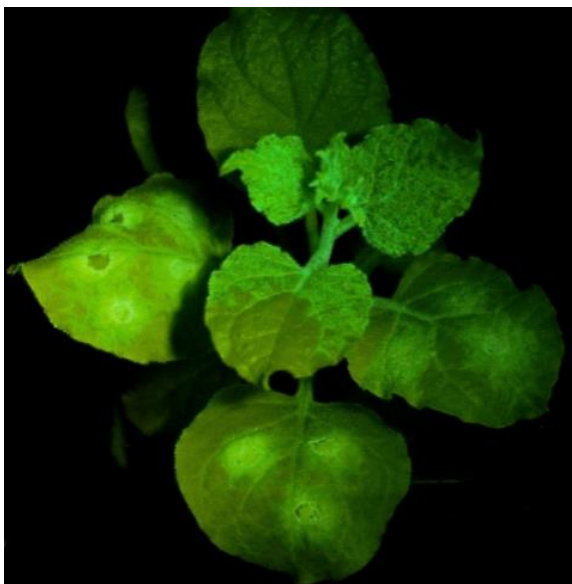
Obrázek 49: Inokulovaný list $\Delta 2-32$ PVX CP+GFP/pGR106.

Foto pořízené ve viditelném světle.

(foto: Dr. Moravec, ÚEB, AV ČR, v. v. i.).



Obrázek 50: Inokulovaný list $\Delta 2-33$ PVX CP+GFP/pGR106. Foto pořízené pod UV filtrem, zářivě zelená barva v kolech odpovídá šíření mutanta do okolních buněk z místa agroinfiltrace, která jsou viditelná jako červená kolečka uprostřed. (foto: Dr. Moravec, ÚEB, AV ČR, v. v. i.).



Obrázek 51: Rostlina inokulovaná GFP/pGR106. Foto v UV oblasti, zachycující systemickou infekci wtPVX + GFP (foto: Dr. Moravec, ÚEB AV ČR, v. v. i.).



Obrázek 52: Rostlina inokulovaná GFP/pGR106. Foto pořízené ve viditelné oblasti spektra. (foto: Dr. Moravec, ÚEB, AV ČR, v. v. i.).

5.8 Detekce PVX v rostlinném materiálu

Přítomnost PVX v infikovaných rostlinách *N. benthamiana* byla detekována metodou PT-ELISA (viz. 4.2.4 Enzymová imunoanalýza). Byly analyzovány inokulované a neinokulované listy. Po 1 h inkubace s roztokem substrátu (p-nitrofenylfosfát) při 37 °C byla měřena absorbance barevného produktu (p-nitrofenol) při 405 nm. Byla prokázána přítomnost PVX CP i jeho mutantů v rostlinném materiálu tam, kde se exprimoval i GFP. Naměřené hodnoty absorbance získané z neinokulovaných listů byly zanedbatelné, neboť infekce delečními mutanty nevykazovala systémovou infekci.

Pro porovnání jsou zde uvedeny hodnoty absorbance naměřené u pozitivní kontroly GFP/pGR106 (Tab. 7), která vykazovala značné hodnoty jak v inokulovaných listech, tak i v systemicky infikovaných. Při porovnání hodnot absorbancí obou delečních mutantů je patrné, že mutant $\Delta 2-32$ PVX CP+GFP/pGR106 (Tab. 5) se v rostlinném pletivu namnožil do výrazně vyšších titrů oproti mutantu $\Delta 2-33$ PVX CP+GFP/pGR106 (Tab. 6). Absorbance (A) infikované rostliny mutantem $\Delta 2-32$ PVX CP+GFP/pGR106 je po 14 dnech od inokulace přibližně 2,8x větší v porovnání s rostlinou infikovanou mutantem $\Delta 2-33$ PVX CP+GFP/pGR106. Stejně tak absorbance infikované rostliny mutantem $\Delta 2-32$ PVX CP+GFP/pGR106 vykazuje v jednotlivých intervalech analýzy vzorků hodnoty, které jsou bližší absorbanci GFP/pGR106. Neinfikovaná rostlina vykazovala při každém měření podobnou absorbanci, proto je zde uváděna průměrná hodnota, vzorky byly z neinfikované rostliny odebírány ve stejném intervalu jako vzorky z infikovaných rostlin, tzn. po 2, 5, 7 a 14 dnech, získané hodnoty byly zprůměrovány.

Tabulka 5: Naměřená absorbance při 405 nm po 1 h inkubace s roztokem substrátu při 37 °C, rostlinný materiál infikovaný delečním mutantem $\Delta 2-32$ PVX CP+GFP/pGR106.

<i>Nicotiana benthamiana</i> – inokulace mutantem $\Delta 2-32$ PVX CP+GFP/pGR106	A (405 nm)
Neinfikovaná rostlina	0,009
Infikovaná rostlina (po 2 dnech) – inokulovaný list	0,149
Infikovaná rostlina (po 5 dnech) – inokulovaný list	0,238
Infikovaná rostlina (po 7 dnech) – inokulovaný list	0,708
Infikovaná rostlina (po 14 dnech) – inokulovaný list	2,628

Tabulka 6: Naměřená absorbance při 405 nm po 1 h inkubace s roztokem substrátu při 37 °C, rostlinný materiál infikovaný delečním mutantem $\Delta 2-33$ PVX CP+GFP/pGR106.

<i>Nicotiana benthamiana</i> – inokulace mutantem $\Delta 2-33$ PVX CP+GFP/pGR106	A (405 nm)
Neinfikovaná rostlina	0,009
Infikovaná rostlina (po 2 dnech) – inokulovaný list	0,103
Infikovaná rostlina (po 5 dnech) – inokulovaný list	0,161
Infikovaná rostlina (po 7 dnech) – inokulovaný list	0,396
Infikovaná rostlina (po 14 dnech) – inokulovaný list	0,935

Tabulka 7: Naměřená absorbance při 405 nm po 1 h inkubace s roztokem substrátu při 37 °C, rostlinný materiál infikovaný pozitivní kontrolou GFP/pGR106.

<i>Nicotiana benthamiana</i> – inokulace pozitivní kontrolou GFP/pGR106	A (405 nm)
Neinfikovaná rostlina	0,009
Infikovaná rostlina (po 2 dnech) – inokulovaný list	0,130
Infikovaná rostlina (po 5 dnech) – inokulovaný list	0,330
Infikovaná rostlina (po 7 dnech) – inokulovaný list	1,169
Infikovaná rostlina (po 14 dnech) – inokulovaný list	2,084
Infikovaná rostlina (po 7 dnech) – systémový list	0,608
Infikovaná rostlina (po 14 dnech) – systémový list	2,274

Z hodnot uvedených v Tab. 7 je na první pohled patrné, že nemodifikovaný virus se množí do vysokých titrů, a to jak v inokulovaných listech, tak i v nově přirůstajících částích rostliny. Je zajímavé, že nenastal žádný úbytek viru v inokulovaném listu i po 14 dnech od infekce, což svědčí o značné stabilitě a perzistenci PVX. V porovnání absorbance GFP/pGR106 naměřenou v inokulovaných listech s absorbancemi inokulovaných listů po 14 dnech od inokulace delečních mutantů, bylo zjištěno, že deleční mutant $\Delta 2-32$ PVX CP+GFP/pGR106 vykazuje hodnoty velmi blízké pozitivní kontrole, zatímco absorbance mutantu $\Delta 2-33$ PVX CP+GFP/pGR106 byla v porovnání s kontrolou o více než polovinu menší, z čehož by se dalo usuzovat na nezbytnost pozice F33 při tvorbě NLPs, které jsou zapojeny do mezibuněčného pohybu v rámci sousedních buněk.

6 DISKUSE

Předkládaná diplomová práce byla provedena v Laboratoři virologie ÚEB AV ČR, v. v. i., která se zabývá využitím PVX za účelem exprese heterologních proteinů/peptidů (epitopů) vázaných na povrchu virových částic v rostlinách. Většinou se pro fúzování s epitopy používá N- konec PVX CP. Laboratoř virologie fúzovala epitopy i s C- koncem PVX CP a našla i novou vnitřní pozici v povrchové smyčce PVX CP vhodnou pro vložení epitopu. Nicméně podrobná struktura PVX není dosud známa, proto pro nalezení dalších míst vhodných pro vložení epitopů je třeba znát úseky či jednotlivé aminokyseliny PVX CP nezbytné pro tvorbu virových částic. Z tohoto důvodu aminokyseliny nutné pro tvorbu částic zkoumáme pomocí porovnání s poznatky u jiných potexvirů a tvorby mutantů.

6.1 Analýza sekvencí

Bylo prokázáno, že určité aminokyseliny PapMV CP důležité pro CP multimerizaci jsou situovány v N- terminálním segmentu, přesněji v oblasti mezi 1. – 27. aminokyselinou (Tremblay et al., 2006; Lecours, 2006), na základě těchto studií bylo zjištěno, že tyto aminokyseliny jsou víceméně konzervované mezi potexviry. Dané tvrzení bylo podpořeno porovnáním sekvencí dalších zástupců rodu *Potexvirus* s aminokyselinovou sekvencí PapMV CP. Konzervované aminokyselinové zbytky, jež jsou v souladu s pozicí 13 u PapMV CP, byly na základě analýzy CLUSTAL W nalezeny jak u analyzovaného viru PVX, tak i u X viru lilie (LVX, *Lily virus X*), X viru kaktusu (CVX, *Cactus virus X*), viru mozaiky jetele bílého (WCIMV, *White clover mosaic virus*) a u viru mozaiky bambusu (BaMV, *Bamboo mosaic virus*) (Laliberté Gagné et al., 2008). Určité aminokyseliny jsou důležité pro interakci CP – CP (Laliberté Gagné et al., 2008) a CP – RNA (Tremblay et al., 2006) u PapMV. Z daného tvrzení jsme vycházeli při sestavení předkládané studie, ve které jsme se zabývali mutacemi konzervovaných pozic u PVX CP, které by mohly být zodpovědné za interakce podjednotek CP, vedoucí k sestavení virových částic, či by mohly hrát roli při šíření viru z buňky do buňky, nebo dokonce při systemickém šíření viru rostlinnými pletivy. V našem případě se jednalo o mutaci pozice 33 (zastoupené fenylalaninem) a pozice 118 (kódující lysin) u PVX CP. Výběr daných pozic vycházel z analýzy porovnání aminokyselinové sekvence PapMV CP s PVX CP. Zjistili jsme, že pozice F33 u PVX CP odpovídá pozici F13 u PapMV CP, zatímco pozice K118 u PVX CP je v souladu s pozicí K97 u PapMV CP. Zvolili jsme sérii různých mutačních úprav, jak delečních (odstranění části sekvence CP, či

jedné aminokyseliny), tak i substitučních (bodové mutace), které měly ve výsledku objasnit důležitost (při interakci CP – CP a CP – RNA) vybraných pozic u PVX CP.

6.2 Mutantní formy PVX CP

6.2.1 Bodoví (deleční a substituční) mutanti PVX CP

Dalším krokem bylo získat a porovnat jednotlivé aminokyselinové sekvence izolátů a kmenů PVX CP. Stejně tak jako v předchozím případě, byla využita metoda CLUSTAL W. Bylo prokázáno, že ve většině případů kodón 33 kóduje aminokyselinu fenylalanin (F). Jen u několika kmenů byla zaznamenána v pozici 33 aminokyselina leucin. Je zajímavé, že tyto rozdíly byly zaznamenány v N- konci CP. Oblast N- konce vykazuje značnou variabilitu ve velikosti a aminokyselinové sekvenci mezi jednotlivými zástupci potexvirů (Abouhaidir and Lai, 1989), ale i v rámci různých kmenů PVX (Santa Cruz and Baulcombe, 1995). Aminokyselina lysin (L), stejně tak substituční náhrada fenylalaninu za hydrofobní aminokyselinu tyrosin (Y) nepůsobí inhibičně na interakci podjednotek CP vedoucí k sestavení VLP (Laliberté Gagné et al., 2008). Na základě studií prováděných Laliberté Gagné et al. (2008), ale i Tremblay et al. (2006), kteří nahradili konzervované aminokyseliny F13 a K97 u PapMV CP za alanin, za vzniku mutantů F13A a K97A, se došlo k závěru, že bodové mutace mají za následek narušení procesu skládání proteinů do VLP, respektive interakci podjednotek CP – CP a narušení procesu vazby CP – RNA a tím procesu skládání virionu, neboť K97 u PapMV CP je lokalizována v doméně, kde se podjednotky CP váží s virovou RNA. Stejně zjištění deklarují i Yang et al. (2012). Stejný efekt vykazuje i substituce F13 u PapMV CP za další méně hydrofobní aminokyselinu glycin (G), nebo aminokyseliny s nábojem arginin (A), dále kyselinu glutamovou (E), nebo náhrada za polární zbytek serin (S). Výsledky těchto experimentů byly stěžejní pro vytvoření mutantních forem PVX CP, byl vybrán méně hydrofobní aminokyselinový zbytek – alanin (A), kterým byly substituovány konzervativní pozice F33 a K118, výsledkem bylo vytvoření mutantních forem PVX CP a to F33A a K118A. Požadované substituční konstrukty PVX CP společně s delečním konstruktem Δ F33 PVX CP se podařilo úspěšně vytvořit metodami PCR a SOE PCR. Bohužel, se již nepodařilo vložit tyto konstrukty do vektoru a namnožit je v bakteriálních buňkách. Uvažujeme, že jedním z důvodů, proč se nepodařilo z transformovaných chemokompetentních buněk *E. coli* DH5 α izolovat plazmidovou DNA, je možná toxicita inzertu, neboť z prováděných pozitivních kontrol bakteriálních buněk transformovaných prázdným plazmidem pGR106 bylo pomocí High Pure PCR Product

Purification Kit izolováno odpovídající množství plazmidové DNA. Využívané chemokompetentní buňky *E. coli* DH5 α jsou vhodné jak pro produkci stabilní plazmidové DNA, z důvodu mutace genu *recA* na *RecA*⁻ a mutace genu *endA*, respektive odstranění těchto genů, přičemž dané mutace vedou ke zvýšení stability produkované plazmidové DNA. Předpokládáme, že pokud by se podařilo získané konstrukty úspěšně transformovat a posléze infikovat rostliny *N. benthamiana*, nedošlo by k systemickému šíření, neboť PVX vyžaduje funkční CP jak k mezibuněčnému pohybu skrz plasmodesmata (Chapman et al., 1992; Baulcombe et al., 1995), tak i pro šíření ve floému (Fedorkin et al., 2001, Santa Cruz et al., 1998). PepMV, zástupce potexvirů, striktně vyžaduje CP k mezibuněčnému pohybu (Sempere et al., 2011). Virus mozaiky vojtěšky (AIMV, *Alfalfa mosaic virus*) vyžaduje funkční CP pro detekovatelnou infekci již v inokulovaných listech (Van der Kuyl et al., 1991). CP je nezbytný pro transport viru na dlouhé vzdálenosti floémem (Saito et al., 1990). Na základě daných zjištění, lze předpokládat, že substituční či deleční bodové mutace pozic F33 a K118 v PVX CP, by měly detrimetální efekt na interakci podjednotek CP, CP - RNA a tím i na samotný proces formování virové partikule. Pozice F33 u PVX CP, jež je v souladu s pozicí F13 u PapMV CP, by měla hrát klíčovou roli při interakci CP – CP a skládání virionu. Podobný typ interakce podjednotek CP, zprostředkovaný kodónem v pozici F13 u PapMV CP (Yang et al., 2012), byl popsán u dalších dvou potexvirů, a to u PepMV, kde za interakci CP-CP zodpovídá pozice F28 PepMV CP (Agirrezabala et al., 2015) a u BaMV pozice W41 BaMV CP (DiMao et al., 2015). Lze tedy konstatovat, že flexibilní spojení mezi jednotlivými podjednotkami CP (interakce CP – CP), prostřednictvím N- a C-konce CP umožňuje helikální utváření virionu, přičemž iniciace interakce závisí na určitých úsecích/aminokyselinách.

Pozice K118 u PVX CP, odpovídající pozici K97 u PapMV CP by měla mít vliv na vazbu CP – RNA, z čehož vyplývá, že virová RNA není důležitá z hlediska multimerizace proteinu do helikální struktury (Tremblay et al., 2006). Substituční záměna K97A u PapMV CP (Tremblay et al., 2006) snížila afinitu CP k RNA. Podobný efekt měla i substituční mutace konzervované pozice A209G u BaMV CP (Lee et al., 2011), pozice A230G u viru mozaiky bérů (FoMV, *Foxtail mosaic virus*) a pozice K93A u PepMV CP (Agirrezabala et al., 2015), která výrazně snížila afinitu podjednotek CP k RNA, a tím došlo k omezení pohybu viru z buňky do buňky, zatímco proces enkapsidace nebyl narušen. Lze usuzovat, že interakce mezi CP – RNA je stěžejní pro transport viru skrz plasmodesmata, neboť narušení interakce CP - RNA vede u potexvirů k omezení translokace viru v rámci rostlinných pletiv.

Mutace jedné aminokyseliny dle Agirrezabala et al. (2015) stačí, aby došlo k narušení vazby CP – RNA, pravděpodobně z důvodu kooperace podjednotek CP formující virion.

6.2.2 Deleční mutanti N-konce PVX CP

Deleční konstrukty $\Delta 2-32$ PVX CP a $\Delta 2-33$ PVX CP, byly úspěšně připraveny metodami PCR a SOE PCR, následně úspěšně klonovány do expresního vektoru, který nesl reportérový gen GFP, za vzniku delečních mutantů $\Delta 2-32$ PVX CP+GFP/pGR106 a $\Delta 2-33$ PVX CP+GFP/pGR106. Transformace takto připravených mutantů do buněk *E. coli* byla také úspěšná, stejně tak i izolace plazmidové DNA. Nakonec bylo 40 rostlin *N. benthamiana* inokulováno *A. tumefaciens* nesoucím deleční mutanty $\Delta 2-32$ PVX CP+GFP/pGR106 a $\Delta 2-33$ PVX CP+GFP/pGR106.

Deleční mutant $\Delta 2-32$ PVX CP+GFP/pGR106 měl zachovanou pozici F33, dalo by se tudíž předpokládat, že po určitém časovém intervalu dojde k systemickému šíření. Bylo zjištěno, že deleční mutant $\Delta 2-32$ PVX CP+GFP/pGR106 se omezuje na translokaci pouze do sousedních buněk v rámci inokulovaného listu. Chapman et al. (1992), kteří prováděli obdobné deleční mutace PVX CP, vytvořili 2 deleční mutanty, ovšem s delecí mezi 7. – 31. kodónem a 14. – 31. kodónem, kdy konzervovaná pozice F33 zůstala zachována. Ve výsledku se oba deleční mutanti systemicky šířili, rozdíl byl sledován pouze v časovém nástupu a síle projevu symptomů. Příčinou rozdílných výsledků, by mohl být fakt, že Chapman et al. (1992) odstranili menší část sekvence PVX CP. Delece aminokyselin N- konce PVX CP nemá zásadní vliv na formování a funkčnosti virových partikulí, ale nemusí dojít k systémové infekci (Lico et al., 2006).

Druhý deleční mutant $\Delta 2-33$ PVX CP+GFP/pGR106 se také šířil pouze do přilehlých buněk v okolí místa agroinfiltrace. Rozdíl mezi námi vytvořenými delečními mutanty PVX CP byl sledován v rychlosti nástupu signálu GFP a právě v šíření viru. Jak již bylo uvedeno, oba deleční mutanti se multiplikovali pouze v infikovaných epidermálních buňkách a šířili se pouze do sousedních buněk inokulovaného listu. Nástup signálu GFP byl mnohem časnější v případě mutantu $\Delta 2-32$ PVX CP+GFP/pGR106, který se dle vizualizace GFP rozšířil do většího počtu přilehlých buněk z místa agroinfiltrace. Příčina efektivnější translokace mutantu $\Delta 2-32$ PVX CP+GFP/pGR106 by mohla být vysvětlena schopností tvorby NLPs, neboť jak je uvedeno výše, konzervovaná pozice F33 ovlivňuje interakci CP – CP a tím i tvorbu NLPs. Analýza mutací PVX CP, přesněji delečních mutací na N- konci CP ukázala, že daná mutace narušuje schopnost skládání virových partikulí v korelaci se selháním viru akumulovat se

v inokulovaném listu (Chapman et al., 1992). Neobvyklá morfologie částic (pokroucené či nahloučené částice ve svazku) byla pozorována u delečních mutantů, kteří postrádali větší část N- konce (Chapman et al., 1992). Na základě získaných výsledků, lze předpokládat, že N- konec CP je zapojen do interakcí mezi podjednotkami CP. Stejně tvrzení deklarují i Chapman et al. (1992) a Laliberté Gagné et al. (2008). Delece 26 aminokyselin N- konce PapMV CP vedla k monomernímu utváření proteinu, který nebyl schopen formace do NLPs či vazby s RNA, přičemž delece 13 aminokyselin, respektive i konzervované pozice F13 PapMV CP byla dostačující k potlačení interakce podjednotek CP, vedoucí ke vzniku monomerní formy proteinu (Lecours et al., 2006).

7 ZÁVĚR

Pomocí CLUSTAL W byla porovnána aminokyselinová sekvence PapMV CP s PVX CP. Podařilo se určit možné kritické aminokyseliny, důležité pro interakci CP – CP a CP -RNA u PVX CP. Zároveň byly porovnány dostupné sekvence izolátů a kmenů PVX CP, kde byla zjišťována různorodost v zastoupení aminokyselin vybraných konzervovaných pozic PVX CP.

Byly vytvořeny mutantní formy PVX CP v místech vybraných kritických aminokyselin, u nichž se předpokládala důležitost pro interakci PVX CP. Byli vytvořeni 2 deleční mutanti v oblasti N- konce PVX CP, přesněji mezi 2. – 32. kodónem (Δ 2-32 PVX CP) a 2. – 33. kodónem (Δ 2-33 PVX CP), dále pak bodoví mutanti (deleční Δ F33 PVX CP a substituční F33A PVX CP a K118A PVX CP) konzervovaných pozic F33 a K118. Deleční mutanti Δ 2-32 PVX CP a Δ 2-33 PVX CP byli vloženi do vektoru pGR106. Do vektoru pGR106 se po opakovaných pokusech nepodařilo vnést konstrukty s bodovými mutanty. Do vektoru s delečními mutanty (Δ 2-32 PVX CP/pGR106 a Δ 2-33 PVX CP/pGR106) byl úspěšně vložen připravený reportérový gen GFP.

Konstrukty delečních mutantů Δ 2-32 PVX CP + GFP/pGR106 a Δ 2-33 PVX CP + GFP/pGR106 byly transformovány do *A. tumefaciens* a následně byly infikovány rostliny *N. benthamiana*, kde bylo sledováno šíření mutantů viru pomocí GFP a metody ELISA. Oba mutanti se nešířili v rostlině systemicky, rychlejší nástup signálu GFP i vyšší hodnoty absorbance v textu ELISA vykazoval mutant Δ 2-32 PVX CP + GFP/pGR106. Tento mutant se i šířil z infikovaných buněk do buněk přilehlých rychleji a ve větší míře. Z uvedených výsledků lze usuzovat na důležitost aminokyseliny F33 zřejmě pro tvorbu nukleokapsidu podobných částic, které jsou zapojeny do mezibuněčného pohybu v rámci sousedních buněk. Pro posouzení důležitosti F33 v systémové infekci a vliv K118 na vazbu PVX CP – RNA by bylo nutné zhodnotit i bodové mutanty Δ F33, F33A a K118A.

8 SEZNAM LITERATURY

- Abouhaidir, M. G., Lai, R. 1989. Nucleotide sequence of the 3'- terminal region of clover yellow mosaic virus RNA. *Journal of General Virology*. 70. 1871-1875.
- Agirrezabala, X., Méndez-López, E., Lasso, G., Sánchez-Pina, M. A., Aranda, M., Valle, M. 2015. The near-atomic cryoEM structure of a flexible filamentous plant virus shows homology of its coat protein with nucleoproteins of animal viruses. *eLIFE*. 4. e11795.
- Angell, S. M., Davies, Ch., Baulcombe, D. C. 1996. Cell-to-Cell Movement of Potato Virus X Is Associated with a Change in the Size-Exclusion Limit of Plasmodesmata in Trichome Cell of *Nicotiana clevelandii*. *Virology*. 216. 197-201.
- Atabekov, J. G., Dobrov, E., Karpova, O., Rodionova, N. 2007. Potato virus X: Structure, disassembly and reconstitution. *Molecular Plant Pathology*. 8 (5). 667-675.
- Atabekov, J. G., Rodionova, N. P., Karpova, O. V., Kozlovsky, S. V., Poljakovt, V. Y. 2000. The Movement Protein-Triggered in Situ Conversion of Potato Virus X Virion RNA from a Nontranslatable into a Translatable Form. *Virology*. 271 (2). 259-263.
- Atabekov, J. G., Rodionova, N. P., Karpova, O. V., Kozlovsky, S. V., Novikov, V. K., Arkhipenko, M. V. 2001. Translational Activation of Encapsidated Potato Virus X RNA by Coat Protein Phosphorylation. *Virology*. 286. 466-474.
- Avesani, L., Falorni, A., Tornielli, G. B., Marusic, C., Porceddu, A., Polverari, A., Faleri, C., Calcinaro, F., Pezzotti, M. 2003. Improved in planta expression of the human islet autoantigen glutamic acid decarboxylase (GAD65). *Transgenic Research*. 12. 203-212.
- Baratova, L. A., Fedorova, N. V., Dobrov, E. N., Lukashina, E. V., Kharlanov, A. N., Nasonov, V. V., Serebryakova, M. V., Kozlovsky, S. V., Zayakina, O. V., Rodionova, N. P. 2004. N- Terminal segment of potato virus X coat protein subunits is glycosylated and mediates formation of a bound water shell on the virion surface. *European Journal of Biochemistry*. 271. 3136-3145.
- Baratova, L. A., Grebenshchikov, N. I., Shishkov, A. V., Kashirin, I. A., Radavsky, J. L., Jarvekulg, L., Saarma, M. 1992. The topography of the surface of potato virus X: Tritium planigraphy and immunological analysis. *Journal of General Virology*. 73. 229-235.
- Batten, J. S., Yoshinari, S., Hemenway, C. 2003. Potato virus X: a model system for virus replication, movement and gene expression. *Molecular Plant Pathology*. 4 (2). 125-131.

- Baulcombe, D. 2002. Viral suppression of systemic silencing. *Trends in Microbiology*. 10 (7). 306-308.
- Baulcombe, D. 2004. RNA silencing in plants. *Nature*. 431. 356-363.
- Baulcombe, D. C., Chapman, S., Santa Cruz, S. 1995. Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infection. *Plant Journal*. 7. 1045-1053.
- Bayne, E. H., Rakitina, D. V., Morozov, S. Y., Baulcombe, D. C. 2005. Cell-to-cell movement of potato Potexvirus X is dependent on suppression of RNA silencing. *The Plant Journal*. 44. 471-482.
- Briddon, R.W., Stanley, J. 2006. Subviral agents associated with plant single-stranded DNA viruses. *Virology*. 344. 198–210.
- Crawford, K. M., Zambryski, P. C. 1999. Plasmodesmata signaling: many roles, sophisticated statutes. *Current Opinion in Plant Biology*. 2 (5). 382-387.
- Čeřovská, N. 2010. Biochemická a molekulárně biologická charakterizace rostlinných virů a jejich biotechnologické využití. Habilitační práce. Univerzita Palackého v Olomouci. Přírodovědecká fakulta. Olomouc. 33 s.
- Čeřovská, N., Hoffmeisterová, H., Moravec, T., Plchová, H., Folwarczna, J., Synková, H., Ludviková, V., Šmahel, M. 2012. Transient expression of Human papillomavirus type 16 L2 epitope fused to N- and C- terminus of coat protein of Potato virus X in plants. *Journal of Biosciences*. 37 (1). 125-133.
- Čeřovská, N., Moravec, T., Hoffmeisterová, H., Plchová, H., Synková, H., Poláková, I., Dušková, M., Šmahel, M. 2013. Expression of a recombinant Human papillomavirus 16 E6GT oncoprotein fused to N- and C-termini of Potato virus X coat protein in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 113. 81-90.
- Dědič, P. 2014. Hlavní virové choroby brambor v ČR, Vyd. 1. Výzkumný ústav bramborářský. Havlíčkův Brod. p. 15. ISBN: 9788086940557.
- DiMao, F., Chen, C-C. Yu X., Frenz, B., Hsu, Y-H., Lin, N-S., Egelman, E. H. 2015. The molecular basis for flexibility in the flexible filamentous plant viruses. *Nature Structural and Molecular Biology*. 22. 642-644.
- Dobrov, E. N., Nemykh M. A., Lukashina, E. V., Baratova L. A., Drachev, V. A., Efimov, A. V. 2007. Modified model of the structure of the potato virus X coat protein. *Molecular Biology*. 41 (4). 638-641.
- Fedorkin, O. N., Solovyev, A. G., Yelina, N. E., Zamyatnin, A. A. Jr., Zinovkin, R. A., Mäkinen, K., Schiemann, J., Morozov, S. Yu. 2001. Cell-to-cell movement of potato

- virus X involves distinct functions of the coat protein. *Journal of General Virology*. 82. 449-458.
- Gergerich, R. C., Dolja, V. V. Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe [online]. The Plant Health Instructor. 2006 [cit. 2016-01-02]. Dostupné z <<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/pathogengroups/pages/plantviruses.aspx>>.
- Hamilton, W. D. O., Baulcombe, D. L. 1989. Infectious RNA produced by in vitro transcription of a full-length tobacco rattle virus RNA-1 cDNA. *Journal of General Virology*. 70. 963-968.
- Hefferon, K. L. 2012. Plant virus expression vectors set the stage as production platforms for biopharmaceutical proteins. *Virology*. 433 (1). 1-6.
- Heinlein, M. 2015 Plant virus replication and movement. *Virology*. 479-480. 657-671.
- Higuchi, R., Krummel, B., Saiki, R. K. 1988. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic acids research*. 16. 7351-7367.
- Himber, C., Dunoyer, P., Moissiard, G., Ritzenthaler, C., Voinnet, O. Transitivity-dependent and – independent cell-to-cell movement of RNA silencing [online]. *The EMBO Journal*. 1st September 2003 [cit. 2016-02-25]. Dostupné z <<http://embojnl.embopress.org/content/22/17/4523.full.pdf+html>>.
- Hiscox, J. A., Ball, L. A. 1997. Contranlational disassembly of flock house virus in a cell-free system. *Journal of Virology*. 71 (10). 7974-7977.
- Hoffmeistrová, H., Čeřovská, N., Moravec, T., Plchová, H., Folwarczna, J., Velemínský, J. 2008. Transient expression of fusion gene coding the HPV-16 epitopes fused to the sequence of potyvirus coat protein using different means of inoculation of *Nicotiana benthamiana* and *Brassica rapa*, cv. Rapa plants. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 94. 261-267.
- Howard, A. R., Heppler, M. L., Ju, H. J., Krishnamurthy, K., Payton, M. E., Verchot-Lubicz, J. 2004. Potato virus X TGBp1 induces plasmodesmata rating and moves between cells in several host species whereas CP moves only in *N.benhamiana* leaves. *Virology*. 328. 185-197.
- Huang, Y. L., Han, Y. T., Chang, Y. T., Hsu, Y. H., Meng, M. 2004. Critical residues for GTP methylation and formation of the covalent m7GMP-enzyme intermediate in the camping enzyme domain of bamboo mosaic virus. *Journal Virology*. 78 (3). 1271-1280.

- Huisman, M., J., Linthorst, H., J., Bol, J., F., Cornelissen, B., J., C. 1988. The Complete Nucleotide Sequence of Potato Virus X and Its Homologies at the Amino Acid Level with Various Plus-stranded Rna Viruses. *Journal of General Virology*. 69. 1789-1798.
- Chandrasekaran, R., and G. Stubbs. 2001. Fibre diffraction. In: Rossman, M. G., Arnold, E. (ed.). *International tables for crystallography*, vol. F: crystallography of biological macromolecules. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. p. 444-450. ISBN: 0792368576.
- Chapman, S. N., Hills, G., Watts, J., Baulcombe, D. C. 1992. Mutational analysis of the coat protein gene of potato virus X: Effects on virion morphology and viral pathogenicity. *Virology*. 191. 223-230.
- Chaube, H. S., Pundhir, V. S. 2005. *Crop Diseases and their management*. PHI Learning Private Limited. p. 698. ISBN: 9788120326743.
- Chen, I. H., Chou, W. J., Lee, P. Y., Hsu, Y. H., Tsai, C. H. 2005. The AAUAAA motif of bamboo mosaic virus RNA is involved in minus-strand RNA synthesis and plus-strand RNA polyadenylation. *Journal of Virology*. 79. 14555-14561.
- Jana, S., Chakraborty, Ch., Nandi, S. 2004. Mechanisms and roles of the RNA-based gene silencing. *Electronic Journal of Biotechnology*. 7 (3). 324-333.
- Kagiwada, S., Yamaji, Y., Komatsu, K., Takahashi, S., Mori, T., Hirata, H., Suzuki, M., Ugaki, M., Namba, S. 2005. A single amino acid residue of RNA-dependent RNA polymerase in the Potato virus X genome determines the symptoms in Nicotiana plants. *Virus Research*. 110. 177-182.
- Karasev, A., Foulke, S., Wellens, C., Rich, A., Shon, K. J., Zwierzynski, I., Hone, D., Koprowski, H., Reitz, M. 2005. Plant based HIV-1 vaccine candidate: Tat protein produced in spinach. *Vaccine*. 23 (15). 1875-1880.
- Karpova, O. V., Arkhipenko, M. V., Zayakina, O. V., Nikitin, N. A., Kiselyova, O. I., Kozlovsky, S. V., Rodionova, N. P., Atabekov, J. G. 2006. Regulation of RNA Translation in Potato Virus X RNA-Coat Protein Complexes: The Key Role of the N-Terminal Segment of the Protein. *Molecular Biology*. 40 (4). 628-634.
- Kendall, A., McDonald, M., Bian, W., Bowles, T., Baumgarten, S. C., Shi, J., Stewart, P. L., Bullitt, E., Gore, D., Irving, T. C., Havens, W. M., Ghabrial, S. A., Wall, J. S., Stubbs, G. 2008. Structure of Flexible Filamentous Plant Viruses. *Journal of Virology*. 82 (19). 9546-9554.
- Khan, J. A., Dijkstra, J. 2006. *Handbook of plant virology*. Food Products Press. New York. p. 452. ISBN: 9781560229797.

- Khurana, S. M. P. 2004. Diseases of fruits and vegetables: diagnosis and management. Springer Netherlands. p. 686. ISBN: 9781402018237.
- Kim, K. H., Hemenway, C. 1996. The 5' nontranslated region of Potato virus X RNA affects both genomic and subgenomic RNA synthesis. *Journal of Virology*. 70. 5533-5540.
- Knipe, D. M., Howley, P. M. 2007. *Fields' Virology*, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. p. 3177. ISBN: 9780781760607.
- Koenig, R. 1972. Anomalous behavior of the coat proteins of potato virus X and cactus virus X during electrophoresis in dodecyl sulfate-containing polyacrylamide gels. *Virology*. 50. 263-266.
- Kozlovsky, S. V., Karpova, O. V., Arkhipenko, M. V., Zayakina, O. V., Rodionova, N. P., Atabekov, J. G. 2003. Effect of the N-terminal domain of the coat protein of Potato virus X on the structure of viral particles. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 391. 189-191.
- Krishnamurthy, K., Heppler, M., Mitra, R., Blancaflor, E., Payton, M., Nelson, R. S., Verchot-Lubicz, J. 2003. The Potato virus X TGBp3 protein associates with the ER network for virus cell-to-cell movement. *Virology*. 309 (1). 135-151.
- Krishnamurthy, K., Mitra, R., Payton, M., E., Verchot-Lubicz, J. 2002. Cell-to-Cell Movement of the PVX 12K, 8K, or Coat Proteins May Depend on the Host, Leaf Developmental Stage, and the PVX 25K Protein. *Virology*. 300. 269-281.
- Laliberté Gagné, M. E., Lecours, K., Gagné, S., Leclerc, D. 2008. The F13 residue is critical for interaction among the coat protein subunits of papaya mosaic virus. *FEBS Journal*. 275. 1474-1484.
- Lecours, K., Tremblay M. H., Gagné, M. E., Gagné S. M., Leclerc, D. 2006. Purification and biochemical characterization of a monomeric form of papaya mosaic potexvirus coat protein. *Protein Expr. Purif.* 47. 273-280.
- Lee, Ch-Ch., Ho, Y-N., Hu, R-H., Yen, Y-T., Wang, Z-Ch., Lee, Y-Ch., Hsu, Y-H., Meng, M. 2011. The interaction between Bamboo mosaic virus replication protein and coat protein is critical for virus movement in plant hosts. *Journal Virology*. 85 (22). 12022-12031.
- Lico, Ch., Capuano, F., Renzone, G., Donini, M., Marusic, C., Scaloni, A., Benvenuto, E., Baschieri, S. 2006. Peptide display on Potato virus X: molecular features of the coat protein-fused peptide affecting cell-to-cell and phloem movement of chimeric virus particular. *Journal of General Virology*. 87. 3103-3112.
- Loebenstein, G., Gaba, V. 2012. Viruses of Potato. *Advances in Virus Research*. 84. 209-246.

- Lough, T. J., Emerson, S. J., Lucas, W. J., Forster, R. L. S. 2001. Trans-complementation of long-distance movement of white clover mosaic virus triple gene block (TGB) mutants: phloem associated movement of TGBp1. *Virology*. 288. 18-28.
- Lough, T. J., Netzler, N. E., Emerson, S. J., Stherland, P., Carr, F., Beck, D. L., Lukas, W. J., Foster, L. S. 2000. Cell-to-cell movement of potexviruses: Evidence for a ribonucleoprotein complex involving the coat protein and first triple gene block protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 13. 962-974.
- Lough, T. J., Shash, K., Xoconostle-Cazares, B., Hofstra, K. R., Beck, D. L., Balmori, E., Forster, R. L. S., Lucas, W. J. 1998. Molecular dissection of the mechanism by which potexvirus triple gene block proteins mediate cell-to-cell transport of infectious RNA. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 11. 801-814.
- Lu, G., Zhou, Z. H., Baker, M. L., Jakana, J., Cai, D., Wei, X., Chen, S., Gu, X., Chiu, W. 1998. Structure of double-shelled rice dwarf virus. *Journal of Virology*. 72. 8541-8549.
- Lucas, W. J. 2006. Plant viral movement proteins: agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology*. 344. 169-184.
- Lukashina, E., Badun, G., Fedorova, N., Ksenofontov, A., Nemykh, M., Serebryakova, M., Mukhamedzhanova, A., Karpova, O., Rodionova, N., Baratova, L., Dobrov, E. 2009. Tritium planigraphy study of structural alterations in the coat protein of Potato virus X induced by binding of its triple gene block 1 protein to virions. *FEBS Journal*. 276. 7006-7015.
- Lukashina, E., Ksenofontov, A., Fedrova, N., Badun, G., Mukhamedzhanova, A., Karpova, O., Rodionova, N., Baratova, L., Dobrov, E. 2012. Analysis of the role of the coat protein N-terminal segment in Potato virus X virion stability and functional activity. *Molecular Plant Pathology*. 13 (1). 38-45.
- Maramorosch, K., Murphy, F. A. 2014. *Advances in Virus Research*, 1st ed. Academic Press. Amsterdam. p. 292. ISBN: 9780128001721.
- Matthews, R. E. F. 1991. *Plant virology*, 3rd ed. Academic Press. San Diego. p. 835. ISBN: 9780124805538.
- Matthews, R., Hull, R. 2002. *Matthews' plant virology*, 4th ed. Academic Press. San Diego. p. 1056. ISBN: 0123611601.
- Morozov, S. Y., Miroshnichenko, N. A., Solovyev, A. G., Fedorkin, O. N., Zelenina, D. A., Lukasheva, L. I., Karasev, A. V., Dolja, V. V., Atabekov, J. G. 1991. Expression

- strategy of the potato virus X triple gene block. *Journal of General Virology*. 72. 2039-2042.
- Morozov, S. Y., Solovyev, A. G. 2003. Triple gene block: modular design of a multifunctional machine for plant virus movement. *Journal of General Virology*. 84. 1351-1366.
- Ohtsubo, K., Marth, J. D. 2006. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell*. 126 (5). 855-867.
- Oparka, K. J., Roberts, A. G., Roberts, I. M., Prior, D. A., Cruz, S. S. 1996. Viral coat protein is targeted to, but does not gate, plasmodesmata during cell-to-cell movement of potato virus X. *The Plant Journal*. 10 (5). 805-813.
- Parker, L., Kendall, A., Stubbs, G. 2002. Surface features of potato virus X from fiber diffraction. *Virology*. 300. 291-295.
- Petty, I. T. D., Jackson, A. O. 1989. Mutational analysis of barley stripe mosaic virus RNA β . *Virology*. 179. 712-718.
- Plchova, H., Moravec, T., Hoffmeisterova, H., Folwarczna, J., Cerovska, N. 2011. Expression of human papillomavirus 16 E7ggg oncoprotein on N- and C-terminus of Potato virus X coat protein in bacterial and plant cells. *Protein Expression and Purification*. 77. 146-152.
- Rasocha, V. Virové choroby brambor a jejich význam v našich podmínkách [online]. *Úroda*. 16. dubna 2002a [cit. 2015-11-25]. Dostupné z <<http://uroda.cz/virove-choroby-brambor-a-jejich-vyznam-v-nasich-podminkach/>>.
- Rasocha, V. Zamyšlení nad ochranou brambor a jejím ekonomickým významem [online]. *Úroda*. 19. února 2002b [cit. 2015-11-27]. Dostupné z <<http://uroda.cz/zamysleni-nad-ochranou-brambor-a-jejim-ekonomickym-vyznamem/>>.
- Rasocha, V., Hausvater, E., Doležal, P. Množení sadby v České republice [online]. *Zemědělec*. 22. února 2008 [cit. 2016-01-03]. Dostupné z <<http://zemedelec.cz/mnozeni-sadby-v-ceske-republice/>>.
- Robards, A. W., Lucas, W. J. 1990. Plasmodesmata. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 41. 369-419.
- Rodionova, N. P., Karpova, O. V., Kozlovsky, S. V., Zayakina, O. V., Arkhipenko, M. V., Atabekov, J. G. 2003. Linear remodeling of helical virus by movement protein binding. *Journal of Molecular Biology*. 333 (3). 565-572.
- Ryu, K. H., Hong, J. S. 2008. Potexvirus. *Encyclopedia of Virology*. 4. 310-313.

- Sainsbury, F., Sack, M., Stadlmann, J., Quendler, H., Fischer, R., Lomonosoff, G. P. 2010. Rapid transient production in plants by replicating and non-replicating vectors yields high quality functional anti-HIV antibody. *PLoS One*. 5 (11). e13976.
- Saito, T., Yamanaka, K., Okada, Y. 1990. Long-distance movement and viral assembly of tobacco mosaic virus mutants. *Virology*. 176. 329-336.
- Salazar, L. F. 1996. *Potato Viruses and Their Control*. International Potato Center. Lima, Peru. p. 214. ISBN: 9290601841.
- Samuels, T. D., Ju, H-J., Ye, Ch-M., Motes, Ch. M., Blancaflor, E. B., Verchot-Lubicz, J. 2007. Subcellular targeting and interactions among the Potato virus X TGB proteins. *Virology*. 367. 375-389.
- Santa Cruz, S., Baulcombe, D. 1995. Analysis of potato virus X coat protein genes in relation to resistance conferred by the genes Nx, Nb and Rx1 of potato. *Journal of General Virology*. 76. 2057-2061.
- Santa Cruz, S., Chapman, S., Roberts, A. G., Roberts, I. M., Prior, D. A. M., Oparka, J. K. 1996. Assembly and movement of a plant virus carrying a green fluorescent protein overcoat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93. 6286-6290.
- Santa Cruz, S., Roberts, A. G., Prior, D. A. M., Chapman, S., Oparka, K. J. 1998. Cell-to-cell and phloem-mediated transport of potato virus X: the role of virions. *Plant Cell*. 10. 495-510.
- Sempere, R. N., Gómez, P., Truniger, V., Aranda, M. A. 2011. Development of expression vectors based on pepino mosaic virus. *Plant Methods*. 7. 6.
- Shaw, J. G. 1999. Tobacco mosaic virus and the study of early events in virus infections. *Plant Physiology*. 354 (1383). 603-611.
- Shukla, D. D., Strike, P. M., Tracy, K. H., Gough, K. H., Ward, C. W. 1988. The N and C termini of the coat proteins of potyviruses are surface-located and the N terminus contains the major virus-specific epitopes. *Journal of Virology*. 69. 1497-1508.
- Scholthof, K. B., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., Candresse, T., Ahlquist, P., Hemenway, C., Foster G. D. 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 12 (9). 938-954.
- Tilsner, J., Linnik, O., Louveaux, M., Roberts, I. M., Chapman, S. N., Oparka, K. J. 2013. Replication and trafficking of a plant virus are coupled at the entrances of plasmodesmata. *The Journal of cell Biology*. 201. (7). 981-995.

- Tomashevskaya, O. L., Solovyev, A. G., Karpova, O. V., Fedorkin, O. N., Rodionova, N. P., Morozov, S. Yu., Atabekov, J. G. 1993. Effects of semence elements in the potato virus X RNA 5' non-translated alpha beta-leader on its translation enhancing activity. *Journal of General Virology*. 74. 2717-2724.
- Tozzini, A. C., Ek, B., Palva, E. T., Hoppt, H. E. 1994. Potato Virus X Coat Protein: a glycoprotein. *Virology*. 202. 651-658.
- Tremblay, M. H., Majeau, N., Gagné, M. E., Lecours, K., Morin, H., Duvignaud, J. B., Bolduc, M., Chouinard, N., Paré, C., Gagné, S., Leclerc, D. 2006. Effect of mutations K97A and E128A on RNA binding and self assembly of papaya mosaicpotexvirus coat protein. *FEBS Journal*. 273. 14-25.
- Uhde-Holzem, K., Fischer, R., Commandeur, U. 2006. Genetic stability of recombinant potato virus X virus vectors. *Archives of Virology*. 152. 805-811.
- Vaculík, P., Plehová, H., Moravec, T., Čeřovská, N. 2015. New positions for peptide presentation in Potato virus X capsid protein. *Open Life Sciences*. 10. 133-141.
- Valentová, M. Odolnost odrůd brambor virovým chorobám [online]. *Agris*. 11. březen 1997 [cit. 2015-12-10]. Dostupné z <<http://www.agris.cz/clanek/111386>>.
- Van der Kuyl, A. C., Neeleman, L., Bol, J. F. 1991. Complementation and recombination between alfalfa mosaic virus RNA 3 mutants in tobacco plants. *Virology*. 183. 731-738.
- Vance, V., Vaucheret, H. 2001. RNA silencing in Plants-Defense and Counterdefence. *Plant Pathology*. 292. 2277-2280.
- Verchot-Lubicz, J., Ye, Ch-M., Bamunusinghe, D. 2007. Molecular biology of potexviruses: recent advances. *Journal of General Virology*. 88. 1643-1655.
- Voinnet, O., Lederer, C., Baulcombe, D. C. 2000. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell*. 103. 157-167.
- Wagner, B., Fuchs, H., Adhami, F., Ma, Y., Schneiner, O., Breiteneder, H. 2004. Plant virus expression systems for transient production of recombinant allergens in *Nicotiana benthamiana*. *Methods*. 32 (3). 227-234.
- Xiong, Z., Kim, K. H., Giesman-Cookmeyer, D., Lommel, S. A. 1993. The roles of the red clover necrotic mosaic virus capsid and cell-to-cell movement proteins in systemic infection. *Virology*. 192. 27-32.
- Yang, S., Wang, T., Bohon, J., Laliberté Gagné, M. E., Bolduc, M., Leclerc, D., Li, H. 2012. Crystal Structure of the coat protein of the flexible filamentous papaya mosaic virus. *Journal of Molecular Biology*. 422. 263-273.

- Yang, Y., Ding, B., Baulcombe, D. C., Verchot, J. 2000. Cell-to-cell movement of the 25 K protein of Potato virus X is regulated by free other viral proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 13. 599-605.
- Yusibov, V. M., Mamedov, T. G. 2010. Plants as an Alternative System for Expression of Vaccine Antigens. *Biological Sciences*. 65. 195-200.
- Yusibov, V., Rabindran, S., Commandeur, U., Twyman, R. M., Fisher, R. 2006. The potential of plant virus vectors for valine production. *Drugs in R&D*. 7. 203-217.
- Zayakina, O., Arkhipenko, M., Kozlovsky, S., Nikitin, N., Smirnov, A., Susi, P., Rodionova, N., Karpova, O., Atabekov, J. G. 2008. Mutagenic analysis of potato virus X movement protein (TBGp1) and the coat protein (CP): in vitro TBGp1-CP binding and viral RNA translation activation. *Molecular Plant Pathology*. 9. 37-44.
- Zhang, H., Todderud, E., Stubbs, G. 1993. Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of Papaya Mosaic Virus Coat Protein. *Journal of Molecular Biology*. 234 (3). 885-887.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ZKRATKA	ANGLICKÝ NÁZEV	ČESKÝ NÁZEV
(-)ssRNA	negative-stranded RNA	jednovláknová RNA s negativní polaritou
(+)ssRNA	positive-stranded RNA	jednovláknová RNA s pozitivní polaritou
Δ	deletion	delece
A	absorbance	absorbance
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
AIMV	<i>Alfalfa mosaic virus</i>	virus mozaiky vojtěšky
BAMV	<i>Bamboo mosaic virus</i>	virus mozaiky bambusu
BCTV	<i>Beet curly top virus</i>	virus kadeřavosti vrcholu řepy
BP	base pair	pár bází
BSA	bovine serum albumine	hovězí (bovinní) sérový albumin
BYDV	<i>Barley yellow dwarf virus</i>	virus žluté zakrslosti ječmene
CAMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i>	virus žilkové mozaiky kvěťáku
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>	virus mozaiky okurky
CP	coat protein	obalový (kapsidový) protein
CPMV	<i>Cowpea mosaic virus</i>	virus mozaiky vigny
cryo-EM	cryo-electron microscopy	kryo-elektronová mikroskopie
CVX	<i>Cactus virus X</i>	X virus kaktusu
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate	deoxyribonukleotid trifosfát
dsDNA	double-stranded DNA	dvojvláknová DNA
dsRNA	double-stranded RNA	dvojvláknová RNA
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBI	European Bioinformatics Institute	Evropský institut pro bioinformatiku
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	ethylendiamintetraoctová kyselina
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	enzymová imunorpční analýza
ER	endoplasmic reticulum	endoplazmaticke retikulum
F33		33. kodón kódující fenylalanin
FoMV	<i>Foxtail mosaic virus</i>	virus mozaiky bėru
GFP	green fluorescent protein	zelený fluorescenční protein
gRNA	genomic RNA	genomová RNA
HC-Pro	helper component protease	pomocný komponent proteázy
HPLC	high-performance liquid chromatography	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPV	human papillomavirus	lidský papilomavirus
HPV 16	human papillomavirus type 16	lidský papilomavirus typu 16
IgG	immunoglobulin G	imunoglobulin G
K118		118. kodón kódující lysin
kDa	kilodalton	kilodalton
KP		konjugační pufr

LB médium	Luria-Bertani medium	Luria-Bertani médium
LVX	<i>Lily virus X</i>	X virus lilie
MAbs	monoclonal antibodies	monoklonální protilátky
MP	movement protein	pohybový protein
MSV	<i>Maize streak virus</i>	virus pruovitosti kukuřice
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information	Národní centrum pro biotechnologické informace
NLPs	nucleocapsid like particles	nukleokapsid podobné částice
NTR	nontranslated region	nepřekládaná oblast
OD	optic density	optická hustota
ORF	open reading frame	otevřený čtecí rámeček
OVO	ovoalbumine	ovoalbumin
PapMV	<i>Papaya mosaic virus</i>	virus mozaiky papáji
PBS	phosphate-buffered saline	solný roztok pufovaný fosforečnany
PBS + T		pufr PBS s přísadkou Tween 20
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
PD	plasmodesmata	plasmodesmata
PepMV	<i>Pepino mosaic virus</i>	virus mozaiky pepina
pGR106	pGreen106	binární vektor odvozený od vektoru pGreen0000
PLRV	<i>Potato leafroll virus</i>	virová svinutka bramboru
poly(A)	poly(A) tail	poly(A) konec
PP		potahovací pufr
PPV	<i>Plum pox virus</i>	virus šarky švestky
PT-ELISA	Plate – trapped ELISA	
PTGS	Post-transcriptional gene silencing	umlčování genů na post-transkripční úrovni
PVA	<i>Potato virus A</i>	A viróza bramboru
PVS	<i>Potato virus S</i>	S viróza bramboru
PVX	<i>Potato virus X</i>	X viróza bramboru
PVY	<i>Potato virus Y</i>	Y viróza bramboru
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase	RNA-dependentní RNA polymeráza
RDV	<i>Rice dwarf virus</i>	virus zakrslosti rýže
RISC	RNA-inducing silencing complex	ribonukleoproteinový komplex
RNA	ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
RNAi	RNA-interference	RNA interference
RNP	ribonucleoprotein	ribonukleoproteinový komplex
RRM	RNA-recognition motif	RNA-rozpoznávací motiv
RTG difrakce	RTG diffraction	RTG difrakce
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného
SEL	size exclusion limit	protein umožňující průnik větších molekul skrz plasmodesmata
Ser/Thr kinázy	serine/threonine kinases	serin/threonin kinázy
sgRNA	subgenomic RNA	subgenomová RNA
siRNA	small interfering RNA	malé interferující RNA

Slicer	Slicer	nukleáza (součást RISC)
SOE-PCR	splicing by overlap extension	PCR spojující fragmenty na základě překrývajících se komplementárních konců
SP		substrátový pufr
ssDNA	single-stranded DNA	jednovláčková DNA
TBE pufr	Tris/Borate/EDTA buffer	Tris/borát/EDTA pufr
TGB	triple gene block	virové pohybové proteiny
TGS	transcriptional gene silencing	umlčování genů na transkripční úrovni
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>	virus mozaiky tabáku
TRV	<i>Tobacco rattle virus</i>	virus nekrotické kadeřavosti tabáku
TSWV	<i>Tomato spotted wilt virus</i>	virus bronzovitosti rajčete
U	unit	jednotka
ÚEB AV ČR, v. v. i.	Laboratory of Virology, Institute of Experimental Botany of the CAS	Ústav experimentální botaniky Akademie věd, ČR veřejná výzkumná instituce
UV	ultra violet	ultrafialové záření
VIS	visible	viditelné světlo (380–760 nm)
WCIMV	<i>White Clover mosaic virus</i>	virus mozaiky jetele bílého
wt	wild type	nemutovaný (divoký typ)
wtCP	wild type coat protein	nemutovaný (divoký typ) obalový protein
wtPVX	wild type PVX	nemutovaný (divoký typ) PVX

SEZNAM PŘÍLOH

Obrázky

Obrázek 1: Organizace genomu a jednotlivé kroky exprese PVX	19
Obrázek 2: Virion PVX	19
Obrázek 3: Iterativní rekonstrukce spirálovitého utváření virionu PVX	26
Obrázek 4: Prostorový strukturní model podjednotky PVX CP ve virionu PVX	28
Obrázek 5: Schématické znázornění rostlinného virového vektoru pGR106.	34
Obrázek 6: Aminokyselinová sekvence wtPVX CP (o velikosti 714 bp, 237 aminokyselin)..	40
Obrázek 7: Schématické znázornění přípravy delečního konstruktů $\Delta 2-32$ PVX CP.	43
Obrázek 8: Schématické znázornění přípravy delečního konstruktů $\Delta 2-33$ PVX CP.	44
Obrázek 9: Schématické znázornění přípravy bodového delečního konstruktů	45
Obrázek 10: Schématické znázornění přípravy bodového substitučního konstruktů	48
Obrázek 11: Schématické znázornění přípravy bodového substitučního konstruktů	49
Obrázek 12: Schématické znázornění přípravy GFP.	52
Obrázek 13: Výsledné konstrukty v pGR106.	53
Obrázek 14: Porovnání aminokyselinové sekvence PapMV CP s PVX CP.	60
Obrázek 15: Porovnání vybraných aminokyselinových sekvencí PVX CP různých izolátů a kmenů PVX CP s důrazem na pozici F33	61
Obrázek 16: Porovnání vybraných aminokyselinových sekvencí PVX CP různých izolátů a kmenů PVX CP s důrazem na pozici K118	61
Obrázek 17: Elektroforeogram 1. fragmentu konstruktů $\Delta 2-32$ PVX CP	63
Obrázek 18: Elektroforeogram 2. fragmentu konstruktů $\Delta 2-32$ PVX CP	63
Obrázek 19: Elektroforeogram slepeného konstruktů $\Delta 2-32$ PVX CP.	63
Obrázek 20: Elektroforeogram 1. fragmentu $\Delta 2-33$ PVX CP	64
Obrázek 21: Elektroforeogram 2. fragmentu $\Delta 2-33$ PVX CP	64
Obrázek 22: Elektroforeogram slepeného konstruktů $\Delta 2-33$ PVX CP.	64
Obrázek 23: Elektroforeogram 1. fragmentu konstruktů $\Delta F33$ PVX CP	65
Obrázek 24: Elektroforeogram 2. fragmentu konstruktů $\Delta F33$ PVX CP	65
Obrázek 25: Elektroforeogram slepeného konstruktů $\Delta F33$ PVX CP.	65
Obrázek 26: Elektroforeogram 1. fragmentu konstruktů F33A PVX CP.	66
Obrázek 27: Elektroforeogram 2. fragmentu konstruktů F33A PVX CP.	66
Obrázek 28: Elektroforeogram slepeného konstruktů F33A PVX CP	66
Obrázek 29: Elektroforeogram 1. fragmentu konstruktů K118A PVX CP	67
Obrázek 30: Elektroforeogram 2. fragmentu konstruktů K118A PVX CP	67
Obrázek 31: Elektroforeogram slepeného konstruktů K118A PVX CP.	67
Obrázek 32: Elektroforeogram 1. fragmentu GFP konstruktů	68
Obrázek 33: Elektroforeogram 2. fragmentu GFP konstruktů	68
Obrázek 34: Elektroforeogram slepeného GFP konstruktů	68
Obrázek 35: Elektroforeogram štěpení pGR106wt	69
Obrázek 36: Elektroforeogram štěpených slepených mutantů PVX CP	70
Obrázek 37: Elektroforeogram štěpeného pGR106wt a delečních mutantů PVX CP pro zaklonování GFP	71
Obrázek 38: Výstup z programu Chromas; mutant $\Delta 2-32$ PVX CP.	72
Obrázek 39: Výstup z programu Chromas; mutant $\Delta 2-32$ PVX CP.	72
Obrázek 40: Výstup z programu Chromas; mutant $\Delta F33$ PVX CP.	72

Obrázek 41: Výstup z programu Chromas; mutant F33A PVX CP	72
Obrázek 42: Výstup z programu Chromas; mutant K118A PVX CP.....	73
Obrázek 43: Struktura listu neinfikované rostliny	74
Obrázek 44: List inokulovaný $\Delta 2-32$ PVX CP+GFP/pGR106, filtr GFP a fluo A po 2 dnech od inokulace	75
Obrázek 45: List inokulovaný $\Delta 2-32$ PVX CP+GFP/pGR106, filtr GFP a fluo A po 2 dnech od inokulace	75
Obrázek 46: List inokulovaný $\Delta 2-32$ PVX CP+GFP/pGR106, filtr GFP a fluo A po 7 dnech od inokulace	75
Obrázek 47: List inokulovaný $\Delta 2-32$ PVX CP+GFP/pGR106, filtr GFP a fluo A po 7 dnech od inokulace	76
Obrázek 48: Inokulovaný list $\Delta 2-32$ PVX CP+GFP/pGR106.....	76
Obrázek 49: Inokulovaný list $\Delta 2-32$ PVX CP+GFP/pGR106.....	76
Obrázek 50: Inokulovaný list $\Delta 2-32$ PVX CP+GFP/pGR106.....	77
Obrázek 51: Rostlina inokulovaná GFP/pGR106.....	77
Obrázek 52: Rostlina inokulovaná GFP/pGR106.....	77

Tabulky

Tabulka 1: Rozdělení virů z hlediska jejich asociace s bramborem	16
Tabulka 2: Primery pro deleční konstrukty PVX CP	39
Tabulka 3: Primery pro substituční konstrukty PVX CP.....	39
Tabulka 4: Primery pro GFP	39
Tabulka 5: Naměřená absorbance při 405 nm po 1 h inkubace s roztokem substrátu při 37 °C, rostlinný materiál infikovaný delečním mutantem $\Delta 2-32$ PVX CP+GFP/pGR106.	78
Tabulka 6: Naměřená absorbance při 405 nm po 1 h inkubace s roztokem substrátu při 37 °C, rostlinný materiál infikovaný delečním mutantem $\Delta 2-33$ PVX CP+GFP/pGR106.	79
Tabulka 7: Naměřená absorbance při 405 nm po 1 h inkubace s roztokem substrátu při 37 °C, rostlinný materiál infikovaný pozitivní kontrolou GFP/pGR106.	79