Středoškolská odborná činnost 2007/2008

Obor 4 - Biologie

Infekční systém pro studium mechanismů viroidní patogeneze

Autor:
Martin Selinger
Gymnázium J.V. Jirsíka, 4. A
Fráni Šrámka 23, 371 46, Č.Budějovice

Odborný vedoucí:
RNDr. Jaroslav Matoušek, CSc.
Oddělení molekulární genetiky
Ústav molekulární biologie rostlin
Biologické centrum Akademie věd ČR, v. v. i.
Branišovská 31, 370 05, Č. Budějovice

Rád bych poděkoval panu Dr. Jaroslavu Matouškovi za odborné vedení mé práce a za cenné rady a připomínky. Dále bych rád poděkoval paní Ing. Lidmile Orctové, paní Ing. Olze Horákové, Bc. Zoltánu Füssymu a paní Heleně Matouškové za pomoc a rady při řešení laboratorních úkolů a za ochotné zodpovídání mých dotazů.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně, pouze s použitím uvedené literatury.
V Českých Budějovicích, 26. 1. 2008.

Obsah:

1. Úvod 3

1. 1. Viroidy – základní popis, klasifikace 3

1. 2. Struktura viroidů, strukturní a funkční domény 4

1. 3. Replikační mechanismy viroidů 5

1. 4. Patogeneze viroidů, PTGS 6

1. 5. Cíle práce 7

2. Metody a materiál 7

2. 1. Rostlinný materiál 7

2. 2. Příprava biolistického inokula, biolistická inokulace 7

2. 3. Izolace rostlinné RNA 8

2. 4. Extrakce fragmentu DNA z agarósového gelu 8

2. 5. Ligační reakce 9

2. 6. Restrikční analýza 9

2. 7. Transformace bakterií *Escherichia coli* 9

2. 8. Transformace bakterií *Agrobacterium tumefaciens* 10

2. 9. Izolace plazmidů 10

2. 10. Izolace rostlinné RNA pomocí AMESS pufru 11

2. 11. Molekulární hybridizace bakterií 11

2. 11. 1. Opracování membrán před hybridizací 11
2. 11. 2. Vlastní hybridizace 12
2. 11. 3. Opracování membrán po hybridizaci 12

3. Výsledky 13

3. 1. Příprava viroidní cDNA, indukce dimerů a ověření infekčnosti 13

3. 2. Vlastní konstrukce infekčních vektorů a ověření jejich infekčnosti 16

4. Diskuze 20

5. Závěr 22

6. Citovaná literatura 23

1. Úvod

1. 1. Viroidy – základní popis, klasifikace

Na začátku 70. let byl objeven velmi zvláštní virus, který se svou strukturou, velikostí a vlastnostmi zcela vymykal z dosavadních poznatků o virech. Později se ukázalo, že jde o zcela nový druh nebuněčných soustav - viroidů. Termín „viroid“ byl poprvé použit v článku jejich objevitele, pana Theodora O. Dienera (Maryland University, USA). Tento článek můžeme najít pod názvem: Potato spindle tuber “virus” : IV. A replicating, low molecular weight RNA (1971). *Virology* 45, 411-428.

Viroidy jsou malé infekční molekuly RNA o relativně nízké molekulární hmotnosti – cca 1.3×10^5 Da, které způsobují u mnoha hostitelských rostlin závažné patogenní účinky (Diener, T.O., 1991). Viroidy napadají některé vyšší rostliny, pro nás důležité zejména kulturní plodiny, např. brambory, rajčata, baklažán, citrusy, avokádo, broskve, . . . Tyto jednořetězcové, cirkulární RNA molekuly jsou poměrně krátké (246-401 nukleotidů) a kovalentně uzavřené; v jejich sekundární struktuře se však vyskytují mnohé jednořetězcové smyčky (Flores et al., 2004). Cirkulární RNA molekula viroidů je zcela „holá“, tzn. neobaluje ji žádný proteinový plášť či kapsida jako u virů, a neprojevuje se u ní žádná translační aktivita (hovoříme tedy o nekódujících RNA – nonsense RNA). Viroidy jsou schopny autonomně se replikovat v rostlinné hostitelské buňce. Dále se v rostlinách „pohybují“ přes plazmodezmy (pohyb buňka-buňka) a přes floém (pohyb po celé rostlině). Vzhledem k absenci translační aktivity jsou v tomto směru odkázány na hostitelské proteiny (narozdíl od mnohých RNA virů, které si v hostitelské buňce vytváří vlastní pohybový proteinový aparát) (Tabler, M. a Tsagris M., 2004).

Původ viroidů není zcela objasněn. Uvedu zde 2 hlavní hypotézy: 1) Díky své „jednoduchosti“ (holá RNA molekula, přítomnost jednoduchých ribozymů, absence translační aktivity,…) jsou viroidy pozůstatkem RNA světa, tedy tzv. „RNA fosílie“.
2) Viroidy jsou vysoce přizpůsobení a evolučně poměrně mladí transkripční parazité schopní se rychle přizpůsobit změnám v rostlinném metabolismu.

Viroidy jsou taxonomicky rozděleny do dvou čeledí. Do čeledi ***Pospiviroidae*** patří více jak 24 druhů viroidů rozdělených do 5 rodů. Jejich typická sekundární tyčkovitá struktura je rozdělena do několika funkčních domén (viz Struktura viroidů). Tyto druhy viroidů se replikují v jádře hostitelské buňky v asymetrickém replikačním cyklu (viz Replikační mechanismy viroidů). Mezi nejznámější zástupce této čeledi patří například Potato spindle tuber viroid

(PSTVd), Citrus exocortis viroid (CEVd), Hop latent viroid (HLVd) a Hop stunt viroid (HSVd). Čeleď ***Avsunviroidae*** zahrnuje podstatně méně druhů rozdělených do 2 rodů. Sekundární struktura je více větvená a na rozdíl od čeledi *Pospiviroidae* neobsahují centrální konzervované domény (CCR). Replikace probíhá v chloroplastech za přítomnosti jaderné RNA – polymerázy v symetrickém replikačním cyklu (viz Replikační mechanismy viroidů). Tuto čeleď charakterizují například Avocado sunblotch viroid (ASBVd), Chrysanthemum chlorotic mottle viroid (CChMVd), Peach latent mosaic viroid (PLMVd) a Eggplant latent viroid (ELVd).

1. 2. Struktura viroidů, strukturní a funkční domény

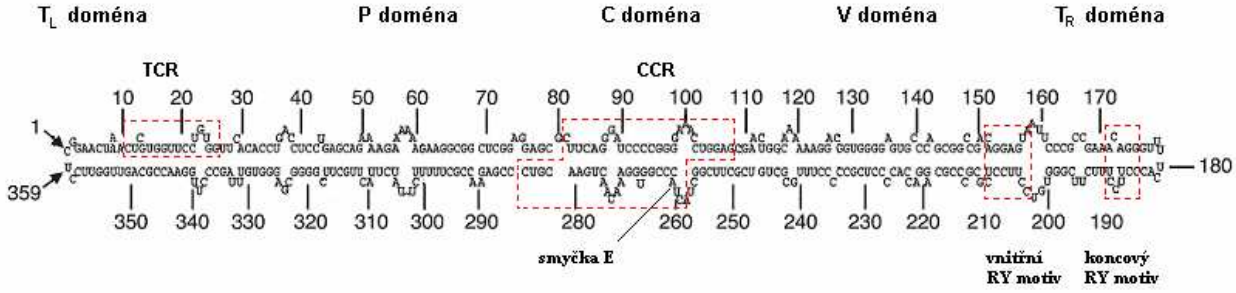
Primární struktura viroidů je velmi důležitá, neboť díky jejich krátkosti (246-401 nt.) záleží na umístění téměř každého nukleotidu. Z dosavadních výzkumů bylo dokázáno, že prakticky každý nukleotid je funkční a pod určitou selekcí (Tabler, M. a Tsagris M., 2004). Existuje ale samozřejmě určitá sekvenční variabilita (zvláště v P doméně, viz níže), která viroidům zaručuje dostatečnou flexibilitu v přizpůsobivosti vzhledem k rostlinným hostitelům a jejich metabolickým pochodům. Například tepelný stres, kterému byly vystaveny rostliny *Nicotiana benthamiana* infikované viroidem PSTVd, způsobil určité mutace právě v levé části sekundární struktury, kde se nachází P doména (Matoušek et al., 2004a).

Sekundární struktura je jedním z nejdůležitějších faktorů biologické aktivity viroidů – komplementárně uzavřená RNA molekula s mnohými smyčkami vytváří několik specifických poutacích signálů pro hostitelské faktory, které se přímo či nepřímo podílejí na životním cyklu viroidů (Tabler, M. a Tsagris M., 2004).

Pro zástupce čeledi *Pospiviroidae* je typická tyčkovitá sekundární struktura, ve které se střídají kovalentně uzavřené části s jednořetězcovými smyčkami. Je rozdělena na 5 strukturních a funkčních domén: T_L doména (terminal left domain – koncová levá), P doména (pathogenic domain – patogenní), C doména (central domain – centrální), V doména (variable domain – variabilní) a T_R doména (terminal right – koncová pravá). C doména obsahuje centrální konzervovaný region – CCR (central conserved region), který je zapojený do procesu vzniku cirkulárních monomerů z oligomerních RNA intermediátů při replikačním cyklu (Baumstark, T., Schröder, A.R.W., Wiesner, D., 1997, cit. dle Flores et al., 2004). V T_L doméně se může nacházet koncový konzervovaný region (TCR – terminal conserved region) a koncová konzervovaná smyčka (TCH – terminal conserved hairpin). Podle odlišnosti sekvence CCR a přítomnosti či nepřítomnosti TCR a TCH se zástupci čeledi *Pospiviroidae* rozdělují do 5 rodů (Flores et al., 2004). U většiny zástupců skupiny *Pospiviroidae* se v T_R doméně nachází tzv.

RY motiv, odpovědný za specifické vázání proteinu Virp1 (Viroid RNA-binding protein 1), který pravděpodobně transportuje molekuly viroidů do buněčného jádra. Tyto motivy existují dva – vnitřní a koncový, ale silněji se projevuje motiv koncový (Maniataki et al. (2003), cit. dle Tabler, M. a Tsagris M. (2004)).

V čeledi *Avsunviroidae* je tyčkovitá struktura typická pro ASBVd a ELVd. Ovšem další zástupci (CChMVd a PLMVd) mají značně rozvětvenou sekundární strukturu. Dalším zajímavým faktorem této čeledi je přítomnost ribozymů (autokatalytických jednotek zajišťujících štěpení i následnou ligaci intermediátů při replikačním cyklu bez přítomnosti hostitelských enzymů).



Obr. 1: Sekundární struktura viroidu PSTVd (druh AS1), znázornění strukturních domén: T_L doména (zahrnující TCR), P doména, C doména (zahrnující CCR), V doména a T_R doména (zahrnující oba RY motivy poutající Virp1). Smyčka E, nacházející se v CCR, je funkční doména podílející se na procesu ligace monomerních PSTVd (+) RNA transkriptů.

1. 3. Replikační mechanismy viroidů

Replikace viroidů probíhá mechanismem valivé kružnice, a to za přítomnosti hostitelských DNA-dependentních RNA-polymeráz (Tabler, M. a Tsagris M., 2004). Tyto RNA-polymerázy za normálních okolností katalyzují syntézu mRNA podle templátového (-) DNA řetězce, tedy syntézu DNA-RNA. Mechanismus, který donutí tyto polymerázy katalyzovat polymeraci podle RNA templátu, není však dosud objasněn. V průběhu replikace obou čeledí jsou přítomny pouze RNA intermediáty. Zástupci čeledi *Pospiviroidae* se replikují v jádře za pomoci RNA-polymerázy II, zatímco zástupci čeledi *Avsunviroidae* se replikují v chloroplastech pomocí jaderné RNA-polymerázy často označované jako NEP (nuclear-encoded polymerase). U druhu PSTVd můžeme nalézt tři iniciační místa pro replikaci *in vivo* - A111, G168 a A325 (Tabler, M. a Tsagris M., 2004).

Velmi důležitá je přítomnost ribozymů u zástupců čeledi *Avsunviroidae.* Ribozym je malý RNA motiv, který se při pokojové teplotě, neutrálním pH a v přítomnosti dvojmocného kovu (nejčastěji Mg^{2+}) sám štěpí a vytváří 2‘,3‘-fosfodiesterový a 5‘-hydroxylový konec (Flores et al., 2004).

a) asymetrický replikační cyklus (u čeledi *Pospiviroidae*):

infekční monomerní (+) cirkulární RNA → replikace (RNA polymeráza II) na „hlava-ocas“ (-) multimery, které slouží jako templáty pro druhou RNA-RNA replikaci → výsledné „hlava-ocas“ multimery (+) jsou štěpeny na jednotlivé monomery (hostitelské RNázy)→ ligace (RNA ligáza) na konečné cirkulární RNA

b) symetrický replikační cyklus (u čeledi *Avsunviroidae*):

infekční monomerní (+) cirkulární RNA → replikace (NEP) na „hlava-ocas“ (-) multimery → štěpení pomocí ribozymů na jednotlivé monomery (-) → replikace na „hlava ocas“ (+) multimery → štěpení pomocí ribozymů na jednotlivé monomery (+) → ligace na konečné cirkulární RNA

1. 4. Patogeneze viroidů, PTGS

Patogeneze způsobovaná viroidy je velmi specifický proces, u kterého záleží na druhu viroidu a genotypu hostitelské rostliny (Matoušek et al., 2007). Při určitých kombinacích hostitelských rostlin a specifického viroidu můžeme dosáhnout symptomů silných, mírných anebo symptomy nemusí být vůbec detekovány. U sensitivního hostitele *L. esculentum* můžeme u několika kmenů druhu PSTVd (včetně kmenu AS1) symptomy klasifikovat jako mírné až velmi silné (např. zakrslost, deformace a vrásnění listů, epinastie). Kmen AS1 vede u *L. esculentum* současně k zakrslosti, deformacím a vrásnění listů a k celkovému kolapsu vývoje rostliny (zvláště u xylému v cévních svazcích je defekt jasně pozorovatelný). Dále tento kmen způsobuje silnou zakrslost i u *N. benthamiana*, považované za tolerantního hostitele ostatních kmenů druhu PSTVd (Matoušek et al., 2007).

Mechanismy viroidní patogeneze nejsou dosud zcela objasněny. Jednou z mnoha možností je představa viroidů jako spouštěčů (zároveň i cílů) tzv. post-transkripčního gene silencingu (PTGS), neboť v infikovaných rostlinách byly potvrzena přítomnost siRNA molekul (Matoušek et al., 2007; Itaya et al., 2001). PTGS je mechanismus pro regulaci genové exprese u eukaryot, který spočívá v sekvenčně-specifické degradaci jednořetězcové RNA pocházející z vnějšího či z vnitřního prostoru buňky. Je to molekulární obrana proti RNA virům. Spouštěčem tohoto mechanismu je přítomnost dvouřetězcové molekuly RNA, která je štěpena tzv. Dicerem (nukleáza podobná RNáze typu III) na krátké (21-25 nt.) jednořetězcové fragmenty s přečnívajícími 3‘- konci, tzv. siRNA (small interfering RNA) (Tabler, M. a Tsagris M., 2004). Tyto fragmenty jsou poté začleněny do multiproteinového komplexu zvaného RISC

(RNA induced silencing complex). Tento komplex (s funkcí RNázy) poté pomocí integrovaných siRNA „vyhledává“ komplementární jednořetězcové molekuly RNA, které jsou následně štěpeny na malé fragmenty (proces degradace). Proces PTGS probíhá v cytoplazmě, u PSTVd a jiných druhů čeledi *Pospiviroidae* byl však lokalizován i v jádře. Např. v genomu *A. thaliana* byly identifikovány 4 druhy Dicerů, z toho 2 druhy (DCL1 a DCL4) obsahují jaderný lokalizační signál (Tabler, M. a Tsagris M., 2004).

Na patogenezi viroidu AS1 se však může podílet i zvýšený obsah apoptotických nukleáz, například v rajčeti objevená bifunkční nukleáza I – TBN1 (tomato bifunctional nuclease) (Matoušek et al., 2007).

1. 5. Cíle práce

Cílem mé práce je konstrukce infekčních klonů silně patogenního viroidu AS1, a to v podobě dimerů, či jiných oligomerů (z důvodu větší infekčnosti než u monomerů [Matoušek et al., 2004b]). Tyto dimery (integrované v expresním rostlinném vektoru pLV07) o známé orientaci budou poté v laboratoři molekulární genetiky dále použity pro výzkum možného vztahu výskytu siRNA molekul v hostitelských rostlinách a viroidní patogeneze.

2. Metody a materiál

Při své práci jsem dodržoval zásady bezpečnosti práce, organizační řád BC AV ČR ÚMBR, interní směrnice oddělení molekulární genetiky BC AV ČR ÚMBR pro práci s karanténními viroidními patogeny a pravidla pro práci s geneticky modifikovanými organismy.

2. 1. Rostlinný materiál

Během mé práce byly použity rostliny rajčete (*Lycopersicon esculentum* cv. Rutgers), senzitivní hostitelé PSTVd (AS1 respektive). Dále byly použity rostliny tabáku (*Nicotiana benthamiana),* tolerantní PSTVd hostitelé, ovšem senzitivní hostitelé AS1. Rostliny byly pěstovány ve skleníku při teplotě 25°C ± 3°C za přirozených světelných podmínek (tj. 16 hodin denně pod světlem).

2. 2. Příprava biolistického inokula, biolistická inokulace

12,5 µg zlatých částic - mikroprojektilů (o průměru 1.0 µm) bylo re-suspendováno v 50 µl 0.025 M spermidinu a krátce sonikováno. Poté bylo ke zlaté suspenzi přidáno 25 µl DNA vzorku (koncentrace 1µg/µl), vortexováno a za stálého třepání bylo po kapkách přidáno 50 µl 1.0 M $CaCl_2$ (precipitace DNA). Směs byla krátce centrifugována a třikrát promyta 0,5 ml

99,8% ethanolem. Následovala re-suspenze v ethanolu/PVP (polyvinylpyrrolidon). Tato suspenze byla okamžitě použita na nanesení do speciální trubičky. Následovala krátká rotace trubičky (rovnoměrné rozmístění zlaté suspenze) a poté byla trubička vysušena plynným dusíkem a nastřihána na jednotlivé „náboje“.

Biolistická inokulace byla provedena pomocí Helios Gene Gun systému (BioRad, USA). Inokulovány byly vždy oba děložní lístky ze vzdálenosti asi 2 cm. Lístky byly během inokulace podepřeny tvrdou kartonovou podložkou. Po inokulaci byly rostliny ihned přikryty polyethylenovými sáčky (minimalizace vysušení porušené listové části) a ponechány 24 h ve stínu. První den po inokulaci byly sáčky proděravěny a třetí den sundány.

2. 3. Izolace rostlinné RNA

Rostlinná RNA byla izolována pomocí CONCERTU (rostlinné RNA purifikační reagens, Invitrogen, Carlsbad, USA) a přes kolonku firmy Qiagen. Navážili jsme si 100 mg listů z infikovaných rostlin. Připravili jsme si 2 zkumavky – do 1. jsme si sterilně napipetovali 500 µl CONCERTU a dali do ledu; do 2. jsme napipetovali 100 µl 5 M NaCl. Zmraženým N_2 (-72°C) jsme v porcelánových miskách rozetřeli navážené listy (homogenizace). Homogenát jsme poté přendali do eppendorfky s CONCERTEM, vortexovali a nechali inkubovat 5 min v poloze naležato. Následovaly 3 minuty centrifugace při 15 000 ot. · min^{-1}. Všechen supernatant jsme opatrně odpipetovali do zkumavky s 5 M NaCl. Přidali jsme 200 µl chloroformu (denaturace proteinů) a zvortexovali. Nechali jsme vzorek 10 min centrifugovat při 15 000 ot. · min^{-1}. Poté jsme odebrali 400 µl horní vodné fáze a přendali do předem připravené zkumavky se 400 µl izopropanolu. Nechali jsme 10 min stát při RT a pak jsme vzorek centrifugovali při 4°C při 16000 ot. · min^{-1} po 15 minut. Suchý sediment jsme rozpustili ve 100 µl nahřáté vody (54°C) a poté jsme přidali 350 µl RLT pufru, vortexovali a dali do ledu. Dále jsme přidali 250 µl ethanolu, lehce promíchali, a nanesli do kolonek. Krátce jsme stočili, vylili přefiltrovanou část a do kolonky přidali 350 µl RW1 pufru. Opět jsme krátce stočili a vylili přefiltrovanou část. Dále jsme kolonky dvakrát promyli 500 µl pufru RPE a poté vysušili centrifugací 30 s při 15 000 ot. · min^{-1} (stažení většiny objemu) a 3 min při stejných otáčkách (úplné vysušení). Do vysušené kolonky jsme přidali 50 µl H_2O, krátce centrifugovali při 5000 ot. · min^{-1} a poté přibližně 1 min při 15 000 ot. · min^{-1}.

2. 4. Extrakce fragmentu DNA z agarósového gelu

K extrakci byla použita sada Qiagen kit. Z agarósového gelu pufrovaného acetátovým pufrem (TAE) jsme vyřízli odpovídající fragment pod UV lampou a zvážili jsme jej. Ke gelu

jsme přidali 3x w/v pufru QG a umístili jsme jej do předem připraveného termobloku nastaveného na 50°C. Gel jsme nechali za občasného protřepání rozpustit a poté jsme přidali 1 w/v izopropanolu. Vzorek jsme rozmíchali a postupně aplikovali na kolonku Qiagen. Celý objem vzorku jsme nechali 2x protéct pomocí centrifugace zhruba při 5000 G. Následně jsme kolonku promyli 500 µl pufru QG (opět zhruba při 5000 G a poté 10 s při 13 000 G). Dále byla kolonka 2x promyta 650 µl pufru PE (při 5000 G). Promytou kolonku jsme přemístili do nové zkumavky a 5 min centrifugovali při 14 000 G. Mezitím jsme si ohřáli pufr EB (elační pufr) zhruba na 50°C. Po centrifugaci (5000 G) jsme pomocí pipety opatrně odebrali zbytky ethanolu a do středu kolonky jsme aplikovali 50 µl předehřátého pufru EB. Centrifugací nejdříve při 5000 G a poté při 13 500 G jsme provedli eluci vzorku.

2. 5. Ligační reakce

Objem ligační směsi činil 10 µl: 7 µl insertu (izolovaný fragment monomer/dimer AS1), 1 µl recipientu (tj. plazmid – pCR skript SK (+), pUC19, pLV68 a pLV07), 1 µl ligačního pufru, 1 µl T4 DNA ligázy. Reakce probíhala obvykle přes noc při 20°C.

2. 6. Restrikční analýza

Při restrikčním ověření přítomnosti dimerů ve vektoru pUC19 bylo použito endonukleázy *Bam*HI. Objem reakční směsi činil 15 µl: 10,5 µl H_2O, 2 µl plazmidu (pUC19), 1,5 µl pufru K, 1 µl *Bam*HI. Reakce probíhala 2 hodiny při 37°C.

Při první restrikční analýze bylo použito endonukleázy *Sty*I a vektoru pUC19 s integrovanými dimery AS1. Objem reakční směsi byl 15 µl: 6,35 µl H_2O, 2 µl plazmidu (pUC19), 1,5 µl pufru (NEB buffer 3), 0,15 µl BSA a 5 µl *Sty*I (vzhledem k nižší aktivitě námi použitého *Sty*I při předchozích pokusech byl objem zvýšen z obvyklého 1 µl na 5 µl). Reakce probíhala přes noc při 34,1°C.

Druhá restrikční analýza byla provedena pomocí endonukleáz *Sty*I a *Sal*I. Objem reakční směsi byl 30,5 µl: 14 µl H_2O, 5 µl plazmidu (pUC19), 3 µl pufru H, 0,5 µl BSA, 4 µl *Sty*I a 4 µl *Sal*I. Reakce probíhala 4 hodiny při 37°C.

2. 7. Transformace bakterií *Escherichia coli*

Do ledu umístěný zmražený bakteriální preparát jsme nechali rozpustit do stavu těsně před celkovým zkapalněním. Poté jsme do preparátu aplikovali plazmidy (či ligační směs) a nechali jsme 30 min inkubovat v ledu. Po 30 min v ledu následoval 90-ti sekundový „heat-shock“ (42°C) a poté ochlazení v ledu po dobu cca 1 min. Přidali jsme předehřáté médium pro

kultivaci (na 200 µl vzorku 800 µl LB média). Následuje kultivace bakterií při 37°C po dobu 1,5 h za stálého třepání a poté vysetí bakterií na selektivní LB médium. Bakterie jsme nechali růst přes noc při 37°C a druhý den ráno jsme přečárkovali pozitivní kolonie.

2. 8. Transformace bakterií *Agrobacterium tumefaciens*

Bakterie jsme inokulovali do 10 ml kapalného LK média a nechali jsme přes noc růst při 28°C za stálého třepání. Narostlou kulturu jsme upravili na OD 0,02 (optical density – optická hustota) při 660 nm přidáním čerstvého LK média. Bakterie jsme poté nechali inkubovat za stálého třepání po dobu 4 h (při 28°C). Následuje centrifugace při 5000 ot. · min^{-1} po dobu 5 min. Supernatant jsme slili a pelet promyli 10 mM Tris-HCl, pH 7,4-7,6 (objem je stejný jako původní objem média). Opět jsme bakterie nechali 5 min centrifugovat při 5000 ot. · min^{-1}. Supernatant jsme opět slili a buňky zahustili resuspendováním ve 100 µl YEP média. Resuspendované buňky jsme přemístili do zkumavky a přidali 5 µl plazmidové DNA (tj. 1-5 µg). Směs jsme 5 min inkubovali v tekutém dusíku a poté 25 min ve vodě při 37°C. Suspenzi jsme poté zředili přidáním 0,5 ml čerstvého LK média a inkubovali 2 h při 28°C za stálého třepání. Po 2 hodinách byla suspenze nanesena na selektivní LK médium. Bakterie jsme nechali růst přes noc při 28°C na selektivním LK médiu a druhý den ráno jsme přečárkovali pozitivní kolonie.

2. 9. Izolace plazmidů

Plazmidy byly z bakterií izolovány pomocí sady pufrů a kolonek od firmy Qiagen. Přes noc narostlé bakterie (inkubované při 37°C za stálého třepání) jsme stočili 10 min při 4000 ot. · min^{-1}. Po stočení jsme sediment rozpustili v 1 ml P1 pufru (pufr s RNázou A, resuspendační pufr). Poté jsme přidali 1,1 ml pufru P2 (lyzační pufr) a chvilku pomalu obraceli (vznik lyzátu). Lyzát jsme nechali inkubovat nejdříve 5 min při RT a poté 5 min v ledu. Následně jsme přidali 1,2 ml P3 pufru (neutralizační pufr), chvilku jsme obraceli a dali do ledu. Po 5-20 minutách v ledu jsme vzorek centrifugovali po 20 min při 16 000 ot. · min^{-1} a 4°C. Supernatant jsme slili do nových kyvet a aktivovali jsme kolonku 1 ml pufru QBT. Poté jsme nechali přes aktivovanou kolonku 2x prokapat vzorek (slitý supernatant). Kolonka byla dále promyta 4 ml pufru QC (odstranění nečistot). Mezitím jsme si připravili zkumavku s 500 µl izopropanolu, do které jsme nechali promytou kolonkou prokapat 800 µl pufru QF (eluční pufr). Vzorek jsme vortexovali a nechali 1 h stát při RT. Po odstátí jsme vzorek 30 min centrifugovali při 15 000 ot. · min^{-1} a 4°C. Sediment jsme rozpustili ve 100 µl 0.3 M octanu sodného. Poté jsme přidali 300 µl vymraženého 96% ethanolu (precipitace DNA) a nechali inkubovat 30 min při – 80°C.

Vzorek byl následně 30 min centrifugován při 15 000 ot. · min^{-1} a 4°C. Vzniklý sediment jsme vysušili (centrifugací ve vakuu) a rozpustili ve 30 µl H_2O.

2. 10. Izolace rostlinné RNA pomocí AMESS pufru

Navážili jsme si 300 mg rostlinného materiálu. Do třecí misky jsme dali trochu písku, 450 µl pufru AMESS a navážené listy. Listy jsme rozetřeli a přidali jsme 600 µl směsi chloroform : izoamylalkohol (v poměru 24:1). Pokračovali jsme v homogenizaci a vzorek jsme poté přelili do označených zkumavek. Následovala centrifugace po 5 min při 13 500 G. Supernatant byl přepipetován do nové zkumavky a poté jsme přidali stejný objem směsi formaldehydu (37%) a 20x SSC (3 M NaCl, 0,3 M citrát sodný, pH 7,0) v poměru 2:3. Zvortexovali a denaturovali po 15 min při 65°C v termobloku. Poté se vzorek s extraktem ihned ochladil v ledu a poté nanesl na membránu.

2. 11. Molekulární hybridizace bakterií

Při experimentech zahrnujících molekulární hybridizaci jsem provedl všechny metodické kroky včetně softwarového hodnocení autoradiogramů s výjimkou vlastní práce s radioaktivním izotopem (^{32}P). Práce s radioaktivním materiálem byla provedena vedoucím práce panem Dr. J. Matouškem.

2. 11. 1. Opracování membrán před hybridizací

Na předem připravené nylonové membrány jsme sterilně nanesli bakterie. Membrány s nanesenými bakteriemi jsme přiložili na tuhé LB médium v Petriho misce a nechali kultivovat do druhého dne při 37°C (růst bakterií na membráně).

Do 3 Petriho misek jsme si nastříhali filtrační papíry (4 a více vrstev). Poté jsme do 1. misky nalili 0,5 M NaOH, do 2. misky 1,0 M Tris-HCl (pH 7,4) a do 3. misky roztok 1,6 M NaCl s 0,5 M Tris-HCl (pH 7,4). Množství roztoků v miskách musí být takové, aby filtrační papíry neplavaly (stačí pouze jejich nasáknutí). Membrány s nanesenými bakteriemi jsme sejmuli pinzetou z média a umístili pomalým pokládáním do 1. misky (koloniemi nahoru). Nechali jsme 10 min inkubovat. Poté jsme membrány opatrně vyjmuli a vysušili dotykem na suchý filtrační papír a přemístili jsme je do 2. misky, zde jsme inkubovali 5 min. Membrány jsme po opětovném otření přemístili do 3. misky a nechali inkubovat 10 min. Po inkubaci ve 3. misce jsme membrány přemístili mezi 2 suché filtrační papíry a mírným tlakem jsme přejeli po papírech rukou (adheze většiny bakteriálního materiálu na fil. papír). Mezitím jsme si připravili

dalších 5 misek. Do první jsme nalili 1x SSC, do dalších tří chloroform a do poslední 0,15 M NaCl. Vysušené membrány jsme nechali nasát v 1. misce s 1x SSC (koloniemi nahoru) a poté otočili (koloniemi dolů) a nechali inkubovat 15 min. Membrány jsme následně přemístili do misky s chloroformem a inkubujeme 1-2 min při pomalém kroužení. Totéž opakujeme i v dalších dvou miskách s chloroformem. Membrány následně opláchneme v redestilované vodě, vysušíme a dáme do misky s 0,15 M NaCl na dobu 20-30 min. Poté jsme membrány vyjmuli, opakovali sušení mezi dvěma filtračními papíry a ozářili UV (kovalentní navázání DNA na membránu). Ozářené membrány jsme nechali vyschnout při RT v přehnutém filtračním papíru a poté nechali zapéct v pícce na 80°C po dobu 20 min. Membrány jsme zatavili v mikrotenovém sáčku a poté skladovali až do použití při 4°C.

2. 11. 2. Vlastní hybridizace

Membránu s nanesenými vzorky jsme nejdříve omyli pre-prehybridizačním roztokem s vysokým obsahem NaCl (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 M NaCl, 1mM EDTA, 0,1% SDS(w/v)) – odstranění nečistot. Tato inkubace probíhá 30-45 minut při teplotě 42°C (při hybridizaci DNA-DNA). Poté následuje inkubace v prehybridizačním roztoku (50% formamid (v/v), 1,5xDenhardtovo činidlo, 0,1% SDS (w/v), 5xSSPE, 20 mg/100 ml tRNA) při stejné teplotě – vysycení volných vazebných míst na membráně. Po 1-2 hodinách prehybridizace jsme přidali zdenaturovanou sondu (buď přímo do prehybridizačního roztoku nebo v čerstvém prehybridizačním roztoku). Sondu tvořila připravená radioaktivní značená (pomocí α-^{32}P dCTP) cDNA viroidu. Hybridizaci jsme prováděli při 42°C minimálně po 8 hodin, nejčastěji však přes noc.

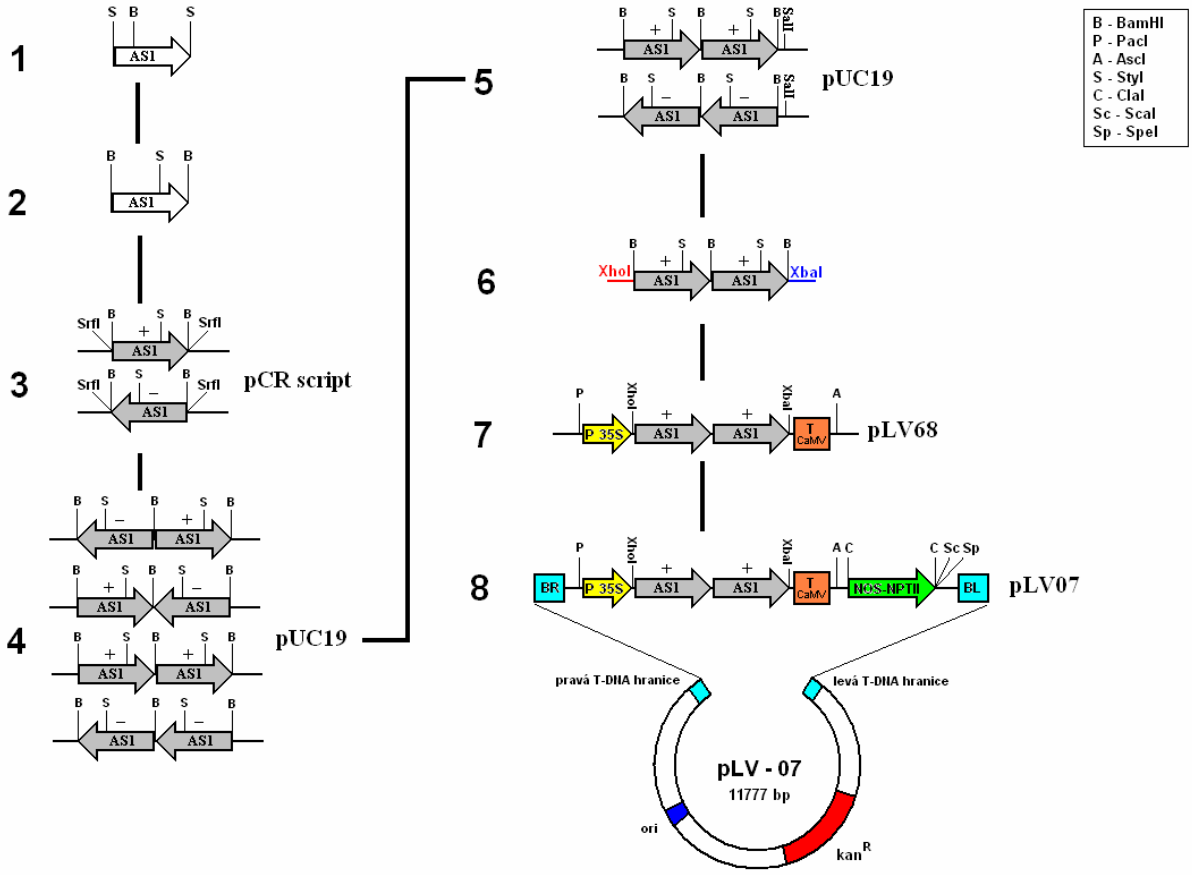
2. 11. 3. Opracování membrán po hybridizaci

Hybridizovanou membránu jsme poté omývali postupně v roztocích s rostoucí vymývací schopností: 2xSSC, 0,1% SDS (při teplotě 25 ˚C); 1xSSC, 0,1% SDS (při teplotě 50°C); 0,1xSSC, 0,1% SDS (při teplotě 50°C).

3. Výsledky

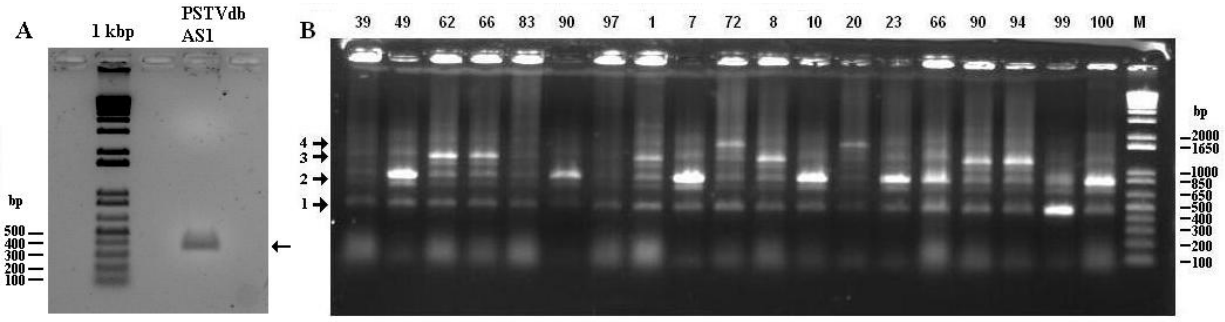
3. 1. Příprava viroidní cDNA, indukce dimerů a ověření infekčnosti

Během předešlých prací v laboratoři molekulární genetiky se nepodařilo zkonstruovat AS1 dimery z AS1 místa (C1) (Dr. Matoušek, osobní sdělení). Proto prvním cílem bylo získat *Bam*HI klony z ověřených sekvencí monomerních sty1 klonů (získaných při předešlých experimentech panem Dr. Matouškem).



Obr. 2: Schéma postupu konstrukce infekčních vektorů s integrovanými dimery AS1: Pro získání monomerů AS1 byly *N. benthamiana* biolisticky infikovány ověřenou sekvencí sty1 klonu (**1**). Monomerní cDNA AS1 byla následně získána pomocí RT-PCR z *N. benthamiana* RNA za použití primerů PSTVdb I a II (**2**). Amplifikovaný fragment s tupými konci byl poté ligován do *Srf*I místa vektoru pCR skript SK (+) (**3**). Za použití endonukleázy *Bam*HI jsme vyštěpili monomerní fragment z izolovaných plazmidů a religovali do *Bam*HI místa vektoru pUC19 (**4**). Restrikční analýza pro stanovení orientace jednotlivých monomerů AS1 byla provedena pomocí endonukleázy *Sty*I, byly selektovány klony s požadovanou orientací (tj. hlava-ocas, tedy ++ či --) (**5**). Pro rozlišení "+" dimerů a "-" dimerů byly inserty podrobeny druhé restrikční analýze (za pomoci endonukleáz *Sty*I a *Sal*I); pro další studie byly vybrány "+" dimery. Po úspěšném ověření patogeneze následoval krok připojení silného promotoru 35S. Pomocí PCR (za použití polymerázy *Pwo* a námi navržených primerů BpuclinkXba a BpuclinkXho) jsme amplifikovali dimerní fragment a zároveň jsme k němu přidali *Xba*I a *Xho*I místa (**6**); délka výsledného fragmentu činila 767 bp. Fragment, opracovaný restriktázami *Xba*I a *Xho*I, byl poté ligován do *Xba*I a *Xho*I míst v MCS v T-DNA intermediárního vektoru pLV-68 (odvozeného od vektoru pRT100) se silným promotorem 35S (**7**). Závěrečný step spočíval v přemístění dimerního insertu s promotorem do expresního rostlinného vektoru pLV-07 (pro dosažení maximální patogeneze). Dimerní insert s promotorem byl vyštěpen pomocí restriktáz *Pac*I a *Asc*I a následně religován do *Pac*I a *Asc*I míst ve vektoru pLV-07 (**8**).

Po izolaci celkové rostlinné RNA z infikovaných rostlin (inokulovaných monomerními sty1 klony; **obr. 2, krok 1**), jsme pomocí RT-PCR (primery PSTVdb I a II, reverzní kit Titan) amplifikovali monomery viroidu AS1 (**obr. 2, krok 2**). Fragment viroidní cDNA (o délce 359 bp) byl poté extrahován z preparativního agarózového gelu (Qiagen kit). Extrahovaný monomer s tupými konci byl následně ligován do *Srf*I míst vektoru pCR script SK (+) (**obr. 2, krok 3**). Tímto vektorem s integrovanými monomerními AS1 jsme poté transformovali kompetentní bakterie *E. coli*. Následovalo vysetí bakterií na selektivní LB médium, jejich růst a následný screening pozitivních klonů pomocí hybridizace. Pro ověření autentity vzniklého AS1 klonu s *Bam*HI místy jsme dali 2 klony s nejsilnějším signálem (2235, 2236) sekvenovat. U klonu 2236 byla 100% shoda.

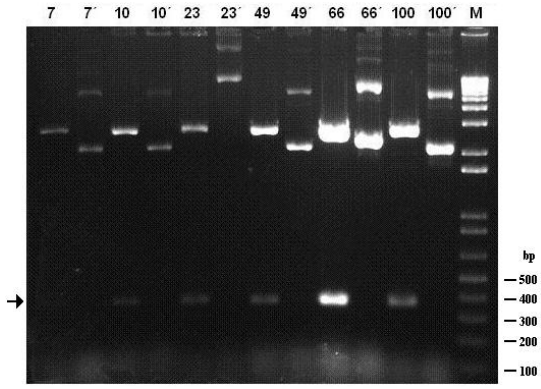


Obr 3: A- druh AS1, 40 d.p.i., *N. benthamiana*, cDNA primery PSTVdb I a II **B**- ověření přítomnosti vzniku oligomerů (monomery (1), dimery (2), trimery (3) a tetramery (4)) pomocí PCR, rev a uni primery vektoru pUC19; 1% TBE agarózový gel, marker – 1kpb

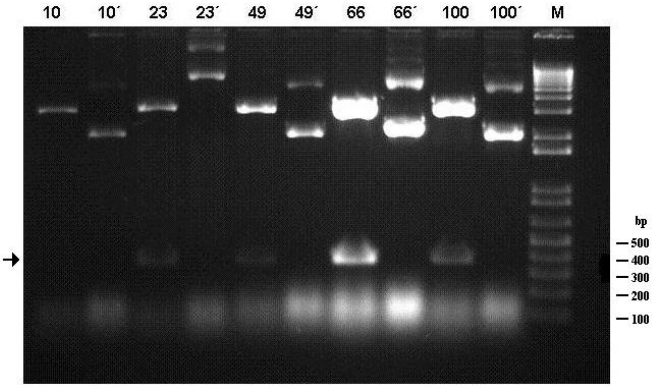
Po izolaci plazmidů klonu 2236 jsme vyštěpili monomerní insert pomocí endonukleázy *Bam*HI. Reakční směs byla poté fragmentována pomocí elektroforézy a vyštěpený monomer AS1 (fragment o délce 359 bp s kohezivními *Bam*HI konci) byl extrahován z preparativního agarózového gelu a religován do *Bam*HI místa vektoru pUC19 (defosforylované *Bam*HI konce) za pomoci T4 DNA ligázy. Právě při této religaci byl očekáván vznik různě orientovaných oligomerů AS1 integrovaných do vektoru pUC19 (**obr. 2, krok 4**). Po hybridizaci transformovaných *E. coli* tímto vektorem jsme vybrali klony s nejsilnějším signálem a pomocí PCR (rev a uni primer vektoru) analyzovali možnost přítomnosti vzniklých oligomerů (**obr. 3-B**). Pro další práci jsme vybrali klony obsahující potencionální dimery (tj. kolonie č. 7, 10, 23, 49, 66, 100).

Vybrané klony byly pomocí restrikční reakce s *Bam*HI podrobeny opětovnému analyzování přítomnosti dimerů (**obr. 4**). Restrikční analýza pro stanovení orientace integrovaných monomerních viroidních jednotek v dimerech byla provedena pomocí endonukleázy *Sty*I (**obr. 5**), byly selektovány klony s požadovanou orientací (tj. „hlava-ocas“, tedy ++ či --) (**obr. 2, krok 5**). Požadovaná orientace byla stanovena u klonů č. 23, 49, 66 a

100. Tyto klony byly zavedeny do bakteriální sbírky pod čísly 2346, 2347, 2348 a 2349; pro jednoduchost jsme nadále používali označení 46, 47, 48 a 49.

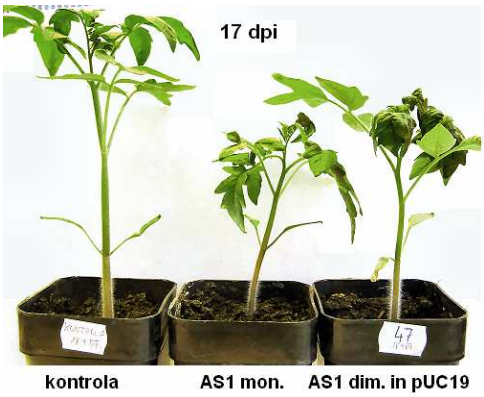


Obr. 4: analýza přítomnosti dimerů pomocí *Bam*HI u klonů č. 7, 10, 23, 49, 66, 100; 1% TBE – agarózový gel; marker – 1kbp; jasně vyštěpená frakce (monomer AS1-359 bp – označený šipkou) viditelná u klonů č. 10, 23, 49, 66, 100

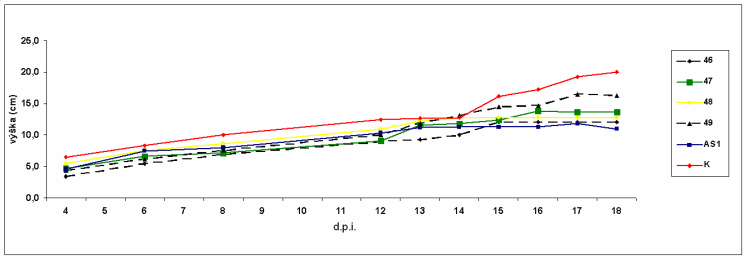


Obr. 5: restrikční analýza pomocí *Sty*I pro stanovení orientace dimerů u klonů č. 10, 23, 49, 66, 100; 1% TBE-agarózový gel, marker-1 kbp; jasně vyštěpená frakce (u správné orientace „hlava-ocas“ monomer o délce 359 bp - označený šipkou) viditelná u klonů č. 23, 49, 66, 100

Pro ověření infekčnosti získaných konstruktů (tedy AS1 dim. in pUC19) byly izolované plazmidy z klonů 46, 47, 48 a 49 použity při přípravě biolistického inokula a následně inokulovány do rajčat (*L. esculentum*, cv. Rutgers) a tabáků (*Nicotiana benthamiana)*. Při fenologických pozorováních jsme se zaměřili na výšku pozorovaných rostlin a jejich celkový habitus (tj. projev symptomů typických pro AS1 - tj. deformace a vrásnění listů). Nejvýraznější projev symptomů jsme pozorovali u rajčat inokulovaných klony č. 47 a 48 (**obr. 6, obr. 7**), zpomalení či naprosté zastavení růstu bylo pozorováno mezi 13.- 15. d.p.i., vrásnění a deformování listů se začalo projevovat po 11 d.p.i. Jasné symptomy se nakonec projevily u 3 z celkových 5 infikovaných rostlin u varianty č. 47, u 48 to byly 4 rostliny z celkových 5.

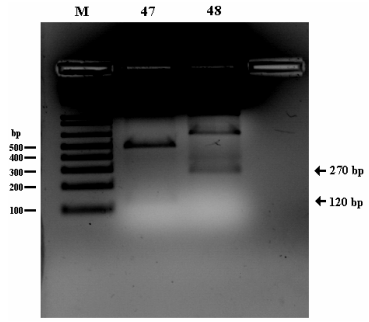


Obr. 6: Projev patogenních symptomů konstruktů AS1 dim. in pUC19 a monomerního sty1 klonu jako pozitivní kontroly; 17 dpi; *L. esculentum*, cv. Rutgers



Obr. 7: Zaznamenání růstu *L. esculentum*; Při tomto pokusu bylo použito celkem 26 rostlin. 5 rostlin pro každou ze 4 variant (46,47,48,49), 3 rostliny byly inokulovány monomerním AS1 a sloužily jako pozitivní kontroly, 3 rostliny nebyly inokulovány a sloužily jako negativní kontroly. Z grafu je na první pohled patrný negativní vliv AS1 na růst hostitelské rostliny.

V průběhu pozorování infikovaných rostlin jsme provedli finální restrikční analýzu (za pomocí endonukleáz *Sty*I a *Sal*I), díky které jsme určili orientaci dimerních jednotek ve vektoru pUC19. Dimery v klonu 47 mají (++) orientaci, dimery v klonu 48 mají (--) orientaci (viz. **obr. 9**).



Obr. 9: Restrikční analýza pro zjištění orientace dimerů ve vektoru pUC19 pomocí endonukleáz *Sty*I a *Sal*I; Restrikční místo *Sty*I (252) se nachází ve viroidní sekvenci, zatímco restrikční místo *Sal*I je lokalizováno na vektoru (12 nukleotidů od insertovaného AS1). Délkou vyštěpených fragmentů jsme mohli analyzovat orientaci: 120 bp – orientace ++, 270 bp – orientace --

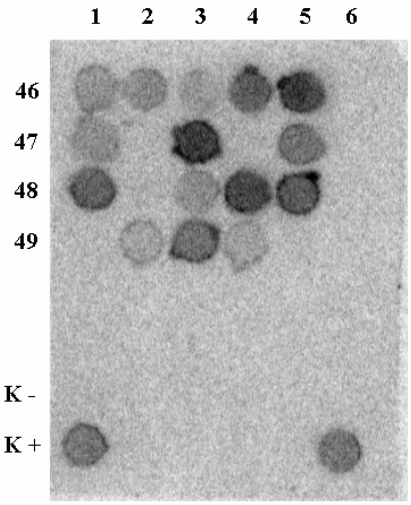
3. 2. Vlastní konstrukce infekčních vektorů a ověření jejich infekčnosti

Po úspěšném ověření infekčnosti dimerického konstruktu a autentity AS1 (sekvenace získaných *Bam*HI klonů) jsme přistoupili ke konstrukci vlastních infekčních vektorů. Cílem bylo získání expresního rostlinného vektoru pLV07 s integrovaným dimerem AS1 s promotorem 35S a ověření jeho infekčnosti.

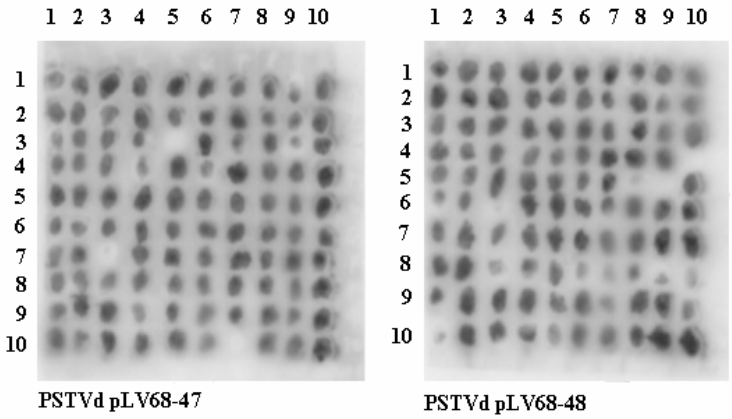
Pro zpětné ověření přítomnosti infekčních dimerů AS1 ve vybraných klonech 47 a 48 byla provedena izolace rostlinné RNA pomocí pufru AMESS a následná DOT-BLOT hybridizace z infikovaných rajčat (**obr. 9**). Po kladném výsledku hybridizační analýzy jsme pomocí PCR (polymeráza Pwo) amplifikovali dimery z klonu 47 . Byly použity primery pro (++) dimery (klon 47), sestavené panem Dr. Matouškem (ÚMBR, oddělení molekulární genetiky), do kterých byla integrována restrikční místa pro endonukleázy *Xho*I a *Xba*I (příprava insertu na ligaci do nového vektoru; **obr. 2, krok 6**): BPUCLINK-Xba: 5'-AAT TCT AGA CAG TGA ATT CGA GCT CGG TAC C-3' a BPUCLINK-Xho: 5'-GAC CTC GAG GGC CCC TGC AGG TCG ACA CTA GAG GAT C-3'. Výsledná délka amplifikovaného fragmentu tedy činila 767 bp. Tento fragment byl poté extrahován z preparativního agarózového gelu a následně opracován endonukleázami *Xba*I a *Xho*I (vytvoření kohezivních konců). Pro zajištění čistoty byly vzorky po restrikčním opracování fenolovány (odstranění proteinů) a fragment následně extrahován z preparativního agarózového gelu.

Takto upravené a očištěné inserty byly ligovány (T4 DNA ligáza) do defosforylovaných *Xba*I a *Xho*I míst v MCS v T-DNA intermediárního vektoru pLV68 (odvozeného od vektoru pRT100) se silným promotorem 35S (**obr. 2**, **krok 7**). Tyto vektory byly poté transformovány do kompetentních bakterií *E. coli*. Pro stanovení úspěšnosti

transformace bakterií jsme provedli hybridizaci narostlých kolonií. Bylo vybráno 8 klonů s nejsilnějším signálem z obou variant (**obr. 10**). Vybrané klony byly přečárkovány na Petriho misky se selektivním LB médiem. Výběr byl námi následně zúžen na 3 klony z každé varianty (47: 37, 40, 50 a 48: 92, 99, 100); tato šestice byla zavedena do bakteriální sbírky (pod čísly 2351-2356). Nakonec byly vybrány 2 klony (jeden z každé varianty) – 2351 a 2355, dále jen 51 a 55.



Obr. 9: DOT-BLOT hybridizace – analýza přítomnosti infekčních dimerů viroidu AS1 v rostlinách rajčete; pro další práci byly vybrány klony 47 a 48 (nejvýraznější projevy patogeneze u hostitelských rostlin), tento pokus nám potvrdil přítomnost viroidních dimerů v námi vybraných variantách 47 a 48

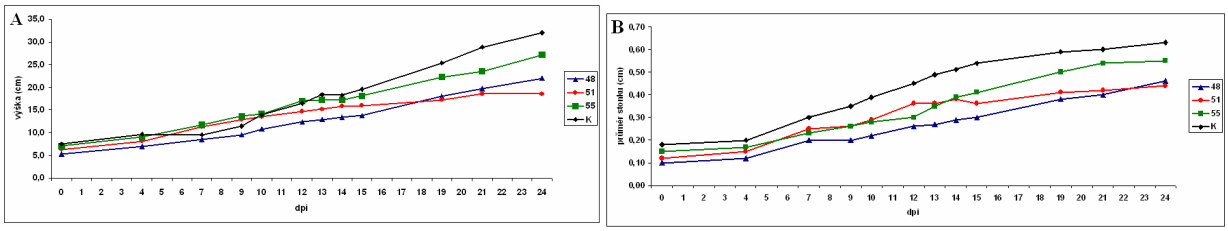


Obr. 10: Analýza úspěšnosti transformace *E. coli* pomocí hybridizace; byly vybrány tyto klony. 47-3, 26, 37, 40, 44, 50, 80, 90; 48- 69, 70, 72, 82, 88, 92, 99, 100

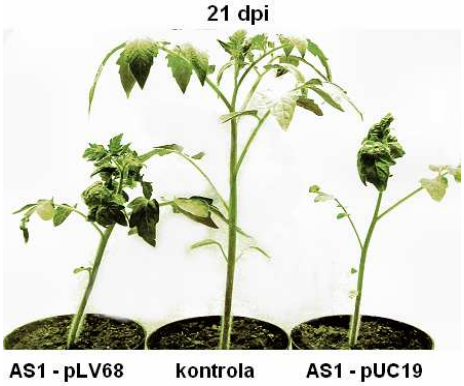
Při dalším pokusu jsme chtěli ověřit infekčnost nových konstruktů a možný vliv promotoru 35S na rychlost a vývoj patogenních účinků u hostitelských rostlin. Provedli jsme tedy izolaci plazmidů (pLV68) z transformovaných bakterií a připravili biolistické inokulum. Pro následující pozorovací experiment jsme použili 20 rostlin rajčete. 5 bylo ponecháno jako negativní kontrola, 5 bylo inokulováno již dříve připraveným inokulem s klonem 48 (vektor pUC19), 5 bylo inokulováno klonem 51 a 5 rostlin klonem 55.

Při následném fenologickém pozorování jsme se opět zaměřili na výšku a celkový habitus infikovaných rostlin. Dalším pozorovaným faktorem byl průměr stonků (měřený pod děložními lístky), neboť nedávné pokusy prokázaly, že přítomnost viroidu AS1 v rostlině má negativní vliv na tloušťku stonků (Matoušek et al., 2007). Naše nové konstrukty se ukázaly být stejně infekčními, promotor 35S však na rychlost vzniku symptomů neměl výraznější vliv (první symptomy se shodně projevily 12 d.p.i. u vzroku 48 a 51), viz obr. **11-A** . Průměr stonků byl přímo úměrný výšce pozorovaných rostlin (**obr.11-B**). K další práci byl vybrán klon 51 (jasné patogenní symptomy typické pro AS1 se projevily u 4 z celkových infikovaných 5

rostlin, **obr. 12**). U klonu 55 to byly 3 rostliny z 5 s tím, že nebyl pozorován tzv. stopefekt (tj. totální zhroucení rostliny, zastavení jejího růstu).



Obr. 11: Kvantitativní vyhodnocení výšky (**A**) a průměrů stonků (**B**) u pozorovaných rostlin. První viditelné symptomy se projevily u rostlin inokulovaných vzrokem č. 48 (pUC19) a 51 (pLV68), a to 12 d.p.i. U rostlin inokulovaných vzorkem 55 se symptomy projevily až 14 d.p.i. Celkově se symptomy projevily: 48 – 4 rostliny z 5, 51 – 4 rostliny z 5 a 55- 3 rostliny z 5. Pro další práci byl vybrán klon 51. Průměr stonků, měřený pod děložními lístky, byl přímo úměrný výšce rostliny.



Obr. 12: Projev symptomů patogeneze infekčních konstruktů AS1 dim. in pLV68 a pUC19; 21 dpi; *L. esculentum*, cv. Rutgers

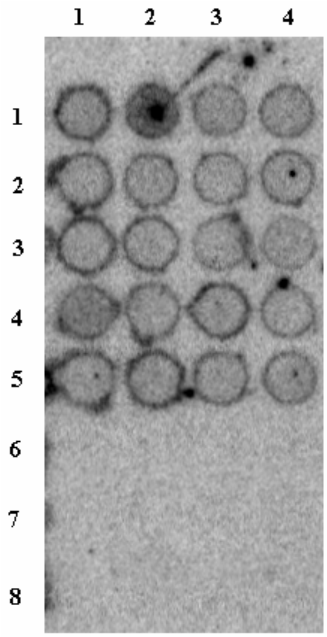
Pro závěrečný krok, který spočíval v přemístění dimeru AS1 s promotorem do rostlinného expresního vektoru pLV07 (dosažení maximální patogeneze), jsme tedy vybrali klon č. 51. Provedli jsme izolaci plazmidů (pLV68) z *E. coli* a následně vyštěpili dimerní insert i s promotorem 35S (pomocí endonukleáz *Asc*I a *Pac*I). Reakční směs byla fragmentována pomocí elektroforézy a insert byl následně extrahován z preparativního agarózového gelu (Qiagen kit). Extrahovaný insert byl poté religován do *Asc*I a *Pac*I míst expresního vektoru pLV07 (**obr. 2, krok 8**). Ověření přítomnosti dimerů AS1 v pLV07 v transformovaných *E. coli* jsme namísto hybridizace provedli pomocí PCR (vybráno prvních 10 klonů; primery BPUCLINK-Xba a BPUCLINK-Xho). Analýza prokázala přítomnost dimerů AS1 integrovaných v pLV07 ve všech 10 vybraných klonech. Pro další práci byly vybrány klony 4, 6 a 8. Tyto klony byly zavedeny do bakteriální sbírky pod čísly 2373, 2374 a 2375.

Následovalo prokázání infekčnosti našich finálních konstruktů [tj. AS1 dimerů ve vektoru pLV07, který jsme označili pLV07 AS1(++)]. Provedli jsme tedy izolaci plazmidů z klonů č. 4 a 6 (2373, 2374 respektive) a následně jsme těmito izolovanými plazmidy transformovali půdní bakterie (*A. tumefaciens*, kmen LBA 4404). Pomocí PCR jsme opět ověřili přítomnost vektorů ve vybraných klonech transformovaných bakterií. Pozitivní výsledky nám vyšly u všech 12 analyzovaných klonů (tj. 2373 - 2‘, 8, 9, 10, 19 a 22; 2374 – 1,

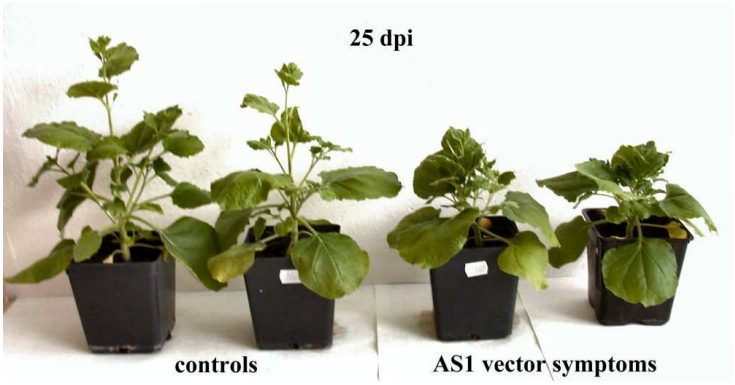
2, 12, 14, 15 a 60). Na následnou infiltraci jsme vybrali 2 klony z každé varianty (2373 – 2‘, 8; 2374 – 12, 14).

Připravili jsme si 25 rostlin tabáku (*N. benthamiana*), z toho 5 jako negativních kontrol. Aktivované *A. tumefaciens* (kmen LBA 4404) jsme infiltrovali pomocí stříkaček (bez jehel) do listů. Během následujících 20 dnů jsme ovšem nezaznamenali žádné výraznější projevy symptomů. Abychom zjistili, zda jsou pokusné rostliny skutečně infikovány, provedli jsme izolaci RNA ze vzorků jejich listů pomocí AMESS pufru a následně DOT-BLOT hybridizaci (**obr. 13**). Hybridizace prokázala přítomnost AS1 ve všech infiltrovaných rostlinách. Bylo zjištěno, že patogenní symptomy, typické pro AS1 (stopefekt, vrásnění listů), se projevily později - 25 d.p.i. (viz **obr. 14) -** u všech infiltrovaných rostlin *N. benthamiana*.

Po analýze sekvencí klonů potomstev z vektoru pLV07 AS1(++) z infikovaných *N. benthamiana* bylo zjištěno, že všechny klony (2424-26) jsou identické a odpovídají původní sekvenci AS1.



Obr. 13: DOT-BLOT hybridizace infiltrovaných *N. benthamiana* jasně prokázala přítomnost AS1 ve všech pozorovaných rostlinách



Obr. 14: Projev symptomů způsobených infekčními vektory pLV07 s integrovanými dimerními jednotkami viroidu AS1; 25 d.p.i, *N. benthamiana*

4. Diskuze

Studium viroidní patogeneze je zásadní jednak ze zemědělského hlediska (parazité některých vyšších rostlin (zejména kulturních plodin) způsobující závažná onemocnění, a tím pádem snižující zemědělské výnosy), ale také z hlediska molekulárně biologického (nové poznatky v oblasti úlohy malých RNA molekul v eukaryotní buňce) (Tabler, M., Tsargis, M., 2004).

Teoretická souvislost mezi viroidní patogenezí a PTGS je potvrzována objevem viroid-specifických siRNA molekul v infikovaných rostlinách, a to jak u čeledi *Pospiviroidae* (zkoumána zejména u rodu PSTVd – Matoušek et al., 2007, Papaefthimiou et al., 2001), tak i *Avsunviroidae* (např. u CChMVd a PLMVd - Martínez, A.E., Flores, R., 2002). Byly ovšem pozorovány dva rozdílné stavy. Množství specifických siRNA bylo přímo úměrné míře patogenicity urč. příbuzných viroidních druhů (Matoušek et al., 2007; Itaya et al., 2001) anebo množství siRNA bylo u příbuzných viroidních druhů s odlišnou patogenicitou přibližně stejné (Papaefthimiou et al., 2001; Martínez, A.E., Flores, R., 2002). Při naší práci jsme navazovali na výsledky laboratoře pana Dr. Matouška, kde byla pozorována pozitivní korelace mezi extrémní patogenicitou a akumulací siRNA. Pro další analýzy mechanismu patogeneze bylo také potřeba vypracovat inokulační techniku na bázi infiltrace, která zajistí vysokou pravděpodobnost úspěšnosti inokulace rostlin druhu *N. benthamiana* a zároveň možnost koinfiltrace listů dalšími geny.

AS1 kmen (zápisové č. AY518939) je silně patogenní viroid získaný v laboratoři molekulární genetiky (ÚMBR, AV ČR, ČB). V porovnání s jinými používanými kmeny PSTVd jako jsou letální RG1 (používaný v experimentech jako silně patogenní viroid [Itaya et al., 2001, Papaefthimiou et al., 2001]), silně patogenní KF440-2 (Papaefthimiou et al., 2001) či letální KF440-1 je AS1 ještě více patogenní (Matoušek et al., 2007). Silné symptomy (zakrslost, deformace a vrásnění listů a k celkový kolaps vývoje rostliny) se po biolistické inokulaci rajčete (cv. Rutgers) projeví již za 10-11 d.p.i (Matoušek et al., 2007). Význačnost AS1 tkví právě v extrémní patogenicitě, neboť díky tomu může být použit pro studium patogeneze i v rostlinách, kde jiné kmeny patogenezi nevyvolávají. Tento fakt je nejdůležitější u druhu *N. benthamiana*, který byl dříve považován za tolerantního hostitele PSTVd (Hadidi et al, 2003, Viroids, s. 126-127). AS1 vyvolává patogenezi i u tohoto druhu (Matoušek et al., 2007), kde náš zkonstruovaný expresní vektor může být použit ke studiu interakcí se silencery a dalšími faktory metodou transientní exprese (rychlá, flexibilní vysokostupňová exprese). Tato

metoda je aplikovatelná pomocí infiltrace rekombinantních *A. tumefaciens* (agro-infiltrace), která je možná právě u *N. benthamiana* (Vionnet et al., 2002).

Základním požadavkem při konstrukci infekčních vektorů byla integrace dimerického AS1 insertu, neboť dimery se ukázaly být více infekčmí než monomery (Tabler, M. a Sänger, H.L. (1984), cit. dle Matoušek et al., 2004b). Po předešlých neúspěšných pokusech o vytvoření AS1 dimerů (klony s *in vivo* používaným AS1 místem – C1) se nám podařilo zkonstruovat dimery z BamHI klonů (integrované v pUC19). Symptomy inokulovaných rostlin (*L. esculentum* cv. Rutgers) jasně prokazovaly již dříve pozorovanou patogenicitu (Matoušek et al.,2007) našich primárních konstruktů (již 10 d.p.i). Tyto symptomy se dle předpokladu zcela shodovaly se symptomy projevenými u rostlin inokulovaných monomerními AS1.

Následující inokulace (*L. esculentum* cv. Rutgers) ověřila infekčnost konstruktů se zabudovaným promotorem (AS1 dim. in pLV68). Vliv promotoru 35S na rychlejší projev prvotních symptomů našich konstruktů nebyl výrazný, neboť symptomy se shodně projevily jak u konstruktů s promotorem, tak i u konstruktů bez něj. Existuje tu ovšem možnost působení zcela jiného faktoru (možný transkripční faktor), který anuloval vliv promotoru v počáteční fázi infiltrace rostliny. Mezi 15-20 d.p.i byl však vliv promotoru na celkový dopad viroidní patogeneze prokazatelný, neboť u rostlin inokulovaných vektory s 35S se projevil tzv. stopefekt a celkový projev symptomů byl ke konci pozorování markantnější.

Při přímé inokulaci viroidní RNA bylo u zakrslých rostlin, jejichž vývoj ustrnul v raném stádiu, pozorováno významné redukování stonků (Dr. Matoušek, osobní sdělení). Ovšem při našem pozorování byly průměry stonků rostlin rajčete (měřené pod děložními lístky) přímo úměrné výšce rostliny. Dá se tedy usuzovat, že přímá inokulace RNA se zdá být účinější než DNA, neboť od DNA k RNA je nutný ještě další krok transkripce.

Infekčnost a vysoká patogeneze (++) dimerů AS1 s promotorem 35S integrovaných v expresním vektoru pLV07 byla dokázána i na rostlinách *N. benthamiana* za použití agro-infiltrace (kde dochází k transientní expresi a pravděpodobně i k integraci cDNA, tedy k transformacím buněk infiltrovaného pletiva) a následné transientní exprese v infikovaných rostlinách. Vzhledem k potvrzení identity sekvence klonů, získaných z infikovaných *N. benthamiana*, které odpovídají původní sekvenci AS1 (z toho plyne i vysoká stabilita získaných dimerů AS1), lze tedy říci, že pozdější projev symptomů (25 d.p.i. namísto 10-12 d.p.i.) byl zapříčiněn díky odlišnému způsobu infiltrace rostlin (agro-infiltrace namísto biolistické inokulace).

Tento konstrukt, společně se silencingovými supresory, bude dál využit při výzkumu vztahu výskytu viroid-specifických siRNA molekul a viroidní patogeneze.

5. Závěr

1. Byl zkonstruován expresní rostlinný vektor pLV07 AS1(++) s integrovaným dimerem viroidní cDNA kmenu PSTVd AS1 v plus orientaci.

2. V práci byla prokázána 100% infekčnost a vysoká patogennicita pLV07 AS1(++) pro modelovou rostlinu *N. benthamiana.* pLV07 AS1(++) tak umožní uplatnit metodu listové infiltrace pro studium mechanismu patogeneze vyvolané viroidními patogeny.

6. Citovaná literatura

Baumstark, T., Schröder, A.R.W., Riesner, D. (1997) Viroid processing: switch from cleavage to ligation is driven by a change from a tetraloop to a loop E conformation. EMBO J. 16, 599-610

Diener, T.O. (1991) Subviral pathogens of plants: viroids and viroidlike satelite RNAs. The FASEB J., Vol. 5, 2808-2813

Flores, R., Delgado, S., Gas, M.E., Carbonell, A., Molina, D., Gago, S., Pena, M. (2004) Viroids: the minimal non-coding RNAs with autonomous replication. FEBS Letters, 567, 42-48

Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W., Semancik, J.S. (2003) Viroids, CSIRO publishing, ISBN 0643067892 (internetová verze)

Itaya, A., Folimonov, A., Matsuda, Y., Nelson, R.S., Ding, B. (2001) Potato spindle tuber viroid as inducer of RNA silencing in infected tomato. Mol. Plant-Microbe Interact. 14, 1332-1334

Maniataki, E., Tabler, M., Tsagris, M. (2003) Viroid RNA systemic spread may depend on the interaction of a 71-nucleotide bulged hairpin with the host protein VirP1. RNA 9, 346-354

Martínez de Alba, A.E., Flores, R., Hernández, C. (2002) Two chloroplastic viroids induce the accumulation of small RNAs associated with posttranscriptional gene silencing. J. Virol. 76, 13094-13096

Matoušek, J., Orctová, L., Steger, G., Škopek, J., Moors, M., Dědič, P., Riesner, D. (2004a) Analysis of thermal stress-mediated PSTVd variation and biolistic inoculation of progeny of viroid „thermomutants“ to tomato and *Brassica* species. Virology 323 (2004), 9-23

Matoušek, J., Orctová, L., Steger, G., Riesner, D. (2004b) Biolistic inoculation of plants with viroid nucleic acids. J. Virol. 122, 153-164

Matoušek, J., Kozlová, P., Orctová, L., Schmitz, A., Pešina, K., Bannach, O., Diermann, N., Steger, G., Riesner, D. (2007) Accumulation of viroid-specific small RNAs and increase in nucleolytic activities linked to viroid-caused pathoenesis. Biol. Chem., vol. 388, 1-13

Papaefthimiou, I., Hamilton, J.H., Denti, M.A., Baulcombe, D.C., Tsagris, M., Tabler, M. (2001) Replicating potato spindle tuber viroid RNA is accompanied by short RNA fragments that are characteristic of post-transcriptional gene silencing. Nucleic Acids Res. 29, 2395-2400

Tabler, M., Sänger, H.L. (1984) Clonek single- and double-stranded DNA copies of potato spindle tuber viroid (PSTV) RNA and co-inoculated subgenomic DNA fragments are infectious. EMBO J. 3, 3055-3062

Tabler, M., Tsagris, M. (2004) Viroids: petite RNA pathogens with distinguished talents. Trends Plant Sci. 9, 339-348

Vionnet, O., Rivas, S., Mestre, P., Baulcombe, D. (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. Plant J. 2003, 33, 949-956