



*Identyfikacja rejonów aktywnych rekombinacyjnie,  
występujących w genomowych cząsteczkach RNA  
wirusa mozaiki stokłosa*

*Anna Urbanowicz*

*Praca doktorska wykonana w Pracowni Biologii Molekularnej Roślin  
w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu  
w latach 2000-2005 pod kierunkiem prof. dr hab. Józefa J. Bujarskiego*

BIBLIOTEKA  
INSTYTUTU CHEMII BIOORGANICZNEJ  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK  
ul. Noskowskiego 12/14  
61-704 POZNAŃ

D-125

*Promotorowi*

*prof. dr hab. Józefowi J. Bujarskiemu  
serdecznie dziękuję za wskazanie  
interesującego tematu badań  
oraz przekazywane uwagi i opiekę*

*Doc. dr hab. Markowi Figlerowiczowi  
serdecznie dziękuję za przekazaną wiedzę,  
za możliwość wykonania tej pracy,  
wsparcie i wyrozumiałość*

*Pracownikom Instytutu Chemii Bioorganicznej  
PAN w Poznaniu, a szczególnie  
Zespołowi Wirusologii Molekularnej  
gorąco dziękuję za okazaną życzliwość i pomoc*

BIBLIOTEKA  
INSTYTUTU CHEMII BIOORGANICZNEJ  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK  
ul. Noakowskiego 12/14  
61-704 POZNAŃ

**SPIS TREŚCI**

<b>1. WSTĘP</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1. Wprowadzenie</b> .....	<b>5</b>
<b>1.2. Genetyczna rekombinacja RNA</b> .....	<b>6</b>
1.2.1. Dane filogenetyczne o rekombinacji wirusów typu RNA .....	7
1.2.2. Dane eksperymentalne, typy i mechanizm rekombinacji RNA .....	7
<b>1.3. Bromowirusowy system doświadczalny umożliwiający badanie rekombinacji RNA</b> .....	<b>12</b>
1.3.1. Wirus mozaiki stokłosa .....	13
1.3.2. BMV jako model do badań rekombinacji RNA .....	20
<b>1.4. Podsumowanie</b> .....	<b>31</b>
<b>2. CEL PRACY</b> .....	<b>33</b>
<b>3. MATERIAŁY I METODY</b> .....	<b>34</b>
<b>3.1. Materiały</b> .....	<b>34</b>
3.1.1. Enzymy .....	34
3.1.2. Izotopy.....	34
3.1.3. Startery .....	34
3.1.4. Plazmidy .....	36
3.1.5. Bakterie i rośliny .....	39
3.1.6. Gotowe zestawy do badań biochemicznych .....	40
3.1.7. Pozostałe odczynniki .....	40
3.1.8. Roztwory .....	40
3.1.9. Bufory .....	41
3.1.10. Pożywki.....	43
3.1.11. Żele .....	44
3.1.12. Wzorce długości DNA.....	45

1. The first part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee. The names are listed in alphabetical order, and the addresses are given in full. The list is as follows:

Mr. J. H. Smith, 123 Main Street, New York, N. Y.

Mr. W. B. Jones, 456 Broadway, New York, N. Y.

Mr. C. D. Brown, 789 Fifth Avenue, New York, N. Y.

Mr. E. F. Green, 1010 Park Avenue, New York, N. Y.

Mr. G. H. White, 1212 Madison Avenue, New York, N. Y.

Mr. I. J. Black, 1414 Lexington Avenue, New York, N. Y.

Mr. K. L. Gray, 1616 York Avenue, New York, N. Y.

Mr. M. N. Blue, 1818 Madison Avenue, New York, N. Y.

Mr. O. P. Red, 2020 Park Avenue, New York, N. Y.

Mr. Q. R. Purple, 2222 Lexington Avenue, New York, N. Y.

Mr. S. T. Yellow, 2424 York Avenue, New York, N. Y.

Mr. U. V. Green, 2626 Madison Avenue, New York, N. Y.

Mr. W. X. Blue, 2828 Park Avenue, New York, N. Y.

Mr. Y. Z. Red, 3030 Lexington Avenue, New York, N. Y.

2. The second part of the document is a list of the names and addresses of the members of the committee who were present at the meeting. The names are listed in alphabetical order, and the addresses are given in full. The list is as follows:

Mr. J. H. Smith, 123 Main Street, New York, N. Y.

Mr. W. B. Jones, 456 Broadway, New York, N. Y.

Mr. C. D. Brown, 789 Fifth Avenue, New York, N. Y.

Mr. E. F. Green, 1010 Park Avenue, New York, N. Y.

Mr. G. H. White, 1212 Madison Avenue, New York, N. Y.

Mr. I. J. Black, 1414 Lexington Avenue, New York, N. Y.

Mr. K. L. Gray, 1616 York Avenue, New York, N. Y.

Mr. M. N. Blue, 1818 Madison Avenue, New York, N. Y.

Mr. O. P. Red, 2020 Park Avenue, New York, N. Y.

Mr. Q. R. Purple, 2222 Lexington Avenue, New York, N. Y.

Mr. S. T. Yellow, 2424 York Avenue, New York, N. Y.

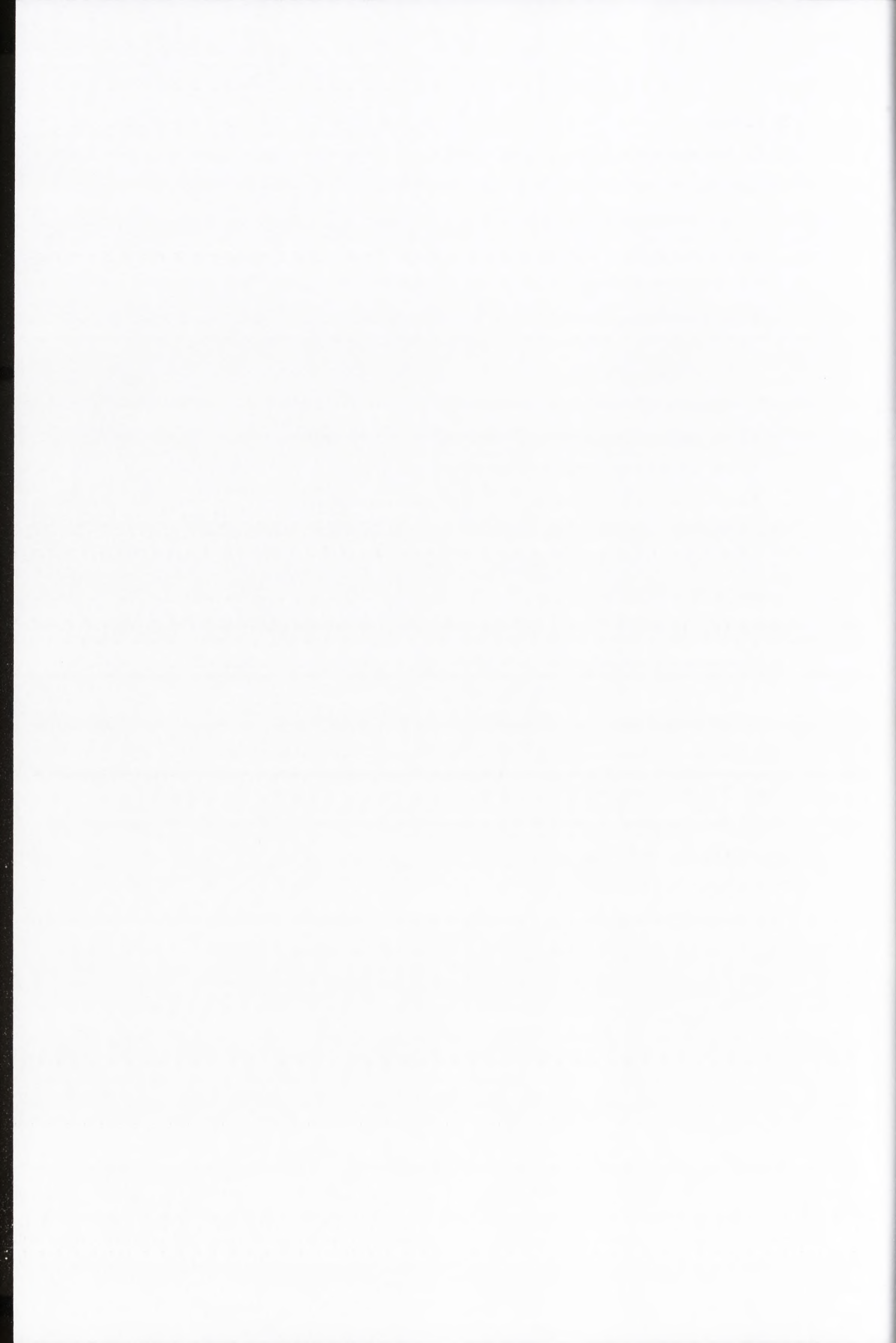
Mr. U. V. Green, 2626 Madison Avenue, New York, N. Y.

Mr. W. X. Blue, 2828 Park Avenue, New York, N. Y.

Mr. Y. Z. Red, 3030 Lexington Avenue, New York, N. Y.

<b>3.2. Metody</b> .....	<b>46</b>
3.2.1. Metody stosowane podczas badań częstości homologicznych przeskoków rekombinacyjnych zachodzących pomiędzy genomowymi cząsteczkami RNA BMV .....	46
3.2.1.1. Otrzymanie dwóch serii plazmidów (pM-RNA2 i pO-RNA1) .....	46
3.2.1.2. Badanie infekcyjności i stabilności mutantów wirusowych M-RNA2-BMV i O-RNA1-BMV. ....	48
3.2.1.3. Badanie homologicznych przeskoków rekombinacyjnych zachodzących między tymi samymi cząsteczkami wirusowych mutantów M-BMV i O-BMV .....	52
3.2.2. Identyfikacja nowego subgenomowego RNA5 .....	53
3.2.2.1. Identyfikacja nowego subgenomowego RNA5 metodą <i>northern blot</i> .....	53
3.2.2.2. Sekwencjonowanie subgenomowego RNA5 BMV .....	55
3.2.2.3. Analiza stabilności RNA3 BMV w ekstrakcie komórkowym .....	56
3.2.3. Metody stosowane podczas badań <i>in vitro</i> homologicznej rekombinacji RNA z wykorzystaniem HIV-1 RT wobec matryc zawierających rekombinacyjnie aktywne rejony R HIV-1 i BMV .....	58
3.2.4. Metody stosowane podczas badań <i>in vivo</i> homologicznej rekombinacji RNA z wykorzystaniem wektora rekombinacyjnego BMV zawierającego rejon R HIV-1 ..	60
3.2.4.1. Otrzymywanie plazmidu pMat-HIVH-RNA3 .....	60
3.2.4.2. Badanie infekcyjności wirusowego Mat-HIVH-BMV .....	61
3.2.5. PCR .....	61
3.2.6. Trawienia restrykcyjne .....	63
3.2.7. Otrzymywanie plazmidów .....	63
3.2.8. Oczyszczanie kwasów nukleinowych .....	65
3.2.9. Sekwencjonowanie .....	65
3.2.10. Analiza produktów reakcji w żelach agarozowych .....	66
3.2.11. Analiza produktów reakcji w żelach poliakryloamidowych .....	66
3.2.12. Izolowanie i odzyskiwanie kwasów nukleinowych z żeli poliakryloamidowych .....	67





<b>4 WYNIKI</b> -----	<b>68</b>
<b>4. Badanie częstości homologicznych przeskoków rekombinacyjnych zachodzących pomiędzy genomowymi cząsteczkami RNA BMV</b> -----	<b>68</b>
4.1.1. Otrzymanie serii mutantów M-RNA2-BMV zawierających markery w genomowych cząsteczkach RNA2-----	69
4.1.2. Badanie homologicznej rekombinacji RNA zachodzącej pomiędzy genomowymi cząsteczkami RNA2 BMV-----	77
4.1.2.1. Koinfekcje M2-RNA2-BMV / M34-RNA2-BMV -----	77
4.1.2.2. Koinfekcje M34-RNA2-BMV / M6-RNA2-BMV -----	82
4.1.2.3. Kontrola aktywności rekombinacyjnej odwrotnej transkryptazy <i>MMLV</i> oraz polimerazy DNA <i>Taq</i> -----	84
4.1.3. Otrzymanie serii mutantów O-RNA1-BMV zawierających markery w genomowych cząsteczkach RNA1 -----	86
4.1.4. Badanie homologicznej rekombinacji RNA zachodzącej pomiędzy genomowymi cząsteczkami RNA1 BMV-----	91
4.1.4.1. Koinfekcje O3-RNA1-BMV / O6-RNA1-BMV -----	91
4.1.4.2. Koinfekcje O6-RNA1-BMV / O8-RNA1-BMV -----	93
4.1.5. Obserwowana i rzeczywista częstość rekombinacji -----	95
4.1.6. Badanie częstości homologicznych przeskoków rekombinacyjnych zachodzących pomiędzy genomowymi cząsteczkami RNA BMV - podsumowanie-----	99
<b>4. Identyfikacja nowego, subgenomowego RNA BMV (RNA5)</b> -----	<b>102</b>
4.2.1. Identyfikacja subgenomowego RNA5 metodą northern blot-----	103
4.2.2. Sekwencjonowanie subgenomowego RNA5 BMV-----	105
4.2.3. Analiza stabilności RNA3 BMV w ekstrakcie komórkowym-----	107
4.2.4. Identyfikacja subgenomowego RNA5 - podsumowanie -----	108
<b>4. Badania homologicznej rekombinacji RNA z wykorzystaniem HIV-1 RT wobec matryc zawierających rekombinacyjnie aktywne rejony R HIV-1 i BMV</b> -----	<b>110</b>
4.3.1. Badania homologicznych przeskoków rekombinacyjnych odwrotnej transkryptazy HIV-1 zachodzących w rejonie R BMV -----	111
4.3.2. Badania homologicznych przeskoków rekombinacyjnych odwrotnej transkryptazy HIV-1 zachodzących w rejonie R HIV-1 -----	115
4.3.3. Badania homologicznej rekombinacji RNA z wykorzystaniem HIV-1 RT wobec matryc zawierających rejony R HIV-1 i BMV -podsumowanie -----	118

1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions and activities. It emphasizes the need for transparency and accountability in financial reporting.

2. The second part of the document outlines the various methods and techniques used to collect and analyze data. It includes a detailed description of the experimental procedures and the statistical analysis performed.

3. The third part of the document presents the results of the study. It includes a series of tables and graphs that illustrate the findings and trends observed during the experiment.

4. The fourth part of the document discusses the implications of the results and the potential applications of the findings. It highlights the significance of the study and the need for further research in this area.

5. The fifth part of the document provides a conclusion and a summary of the key points discussed throughout the document. It reiterates the main findings and the overall objectives of the study.

6. The sixth part of the document includes a list of references and a bibliography. It provides a comprehensive list of the sources used in the study and the works cited in the text.

7. The seventh part of the document contains a list of appendices and supplementary materials. It includes additional data, charts, and documents that are relevant to the study but are not included in the main text.

8. The eighth part of the document provides a list of contact information and a list of authors. It includes the names and affiliations of the researchers who conducted the study and the contact details for those who wish to be contacted.

9. The ninth part of the document includes a list of acknowledgments and a list of funding sources. It expresses gratitude to the individuals and organizations that supported the study and provided financial assistance.

10. The tenth part of the document contains a list of footnotes and a list of references. It includes additional information and citations that are relevant to the study and are not included in the main text.

<b>4.4. Badania homologicznej rekombinacji RNA z wykorzystaniem systemu rekombinacyjnego BMV zawierającego rejon R HIV-1</b> .....	<b>119</b>
4.4.1. Otrzymanie infekcyjnej cząsteczki Mat-HIVH-BMV zawierającej dwie kopie rejonu R HIV-1 .....	121
4.4.2. Badanie homologicznych przeskoków rekombinacyjnych zachodzących pomiędzy cząsteczkami Mat-HIVH-BMV podczas infekcji w roślinach .....	122
4.4.3. Badania homologicznej rekombinacji RNA z wykorzystaniem systemu rekombinacyjnego BMV zawierającego rejon R HIV-1 – podsumowanie .....	124
<b>4.5. Podsumowanie wyników</b> .....	<b>126</b>
<b>5. DYSKUSJA</b> .....	<b>128</b>
<b>5.1. Badanie częstości homologicznych przeskoków rekombinacyjnych, zachodzących pomiędzy genomowymi cząsteczkami RNA BMV</b> .....	<b>128</b>
<b>5.2 Identyfikacja subgenomowego RNA5</b> .....	<b>133</b>
<b>5.3. Badania homologicznej rekombinacji RNA z wykorzystaniem HIV-1 RT wobec matryc zawierających rekombinacyjnie aktywne rejony R HIV-1 i BMV</b> .....	<b>136</b>
<b>5.4. Badania homologicznej rekombinacji RNA z wykorzystaniem systemu rekombinacyjnego BMV zawierającego rejon R HIV-1</b> .....	<b>141</b>
<b>6. WNIOSKI KOŃCOWE</b> .....	<b>144</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>146</b>
<b>8. STRESZCZENIE PRACY</b> .....	<b>153</b>
<b>9. SUMMARY</b> .....	<b>155</b>



## 1. Wstęp

### 1.1. Wprowadzenie

Wirusy posiadające genom zbudowany z RNA są patogenami o dużym potencjale ewolucyjnym, umożliwiającym przetrwanie w niestabilnych warunkach środowiska oraz zasiedlanie nowych nisz ekologicznych, o czym świadczyć może pojawienie się w ciągu ostatniego stulecia wielu groźnych dla człowieka przedstawicieli tej grupy, takich jak HIV, SARS-CoV, wirus Zachodniego Nilu, czy nowe szczepy wirusa grypy. Przodkami wszystkich wymienionych patogenów są wirusy atakujące zwierzęta. Małe rozmiary genomów (do 30 kb) oraz wysokie tempo replikacji, mutacji i rearanżacji materiału genetycznego sprawiają, iż wirusy typu RNA, łatwo dostosowując się do otoczenia, zdolne są do wytwarzania nowych wariantów genetycznych. Ich niestabilność genetyczna jest tak duża, że pojęcia stosowane w odniesieniu do organizmów o genomie DNA, takie jak „populacja” czy „gatunek”, nie oddają ich zmiennej natury. Niektórzy badacze proponują, aby w wypadku retrowirusów oraz wirusów RNA używać terminu „kwazi-gatunek” (Domingo, 1992; Domingo i wsp., 1997; Holland i wsp., 1992). Pojęcie to zostało stworzone przez autorów hipotezy świata RNA do opisu replikacji we wczesnym etapie ewolucji (Eigen i wsp., 1977, 1988) i oznacza mieszaninę samoreplikujących się cząsteczek RNA podobnych do cząsteczki macierzystej. Wirusowy kwazi-gatunek to zbiór różnych wariantów wirusowych obecnych w zainfekowanym organizmie, w którym sekwencja genomowych RNA oscyluje wokół najlepiej dostosowanej do aktualnych warunków środowiskowych.

Początkowo za główne źródło zmienności genomów RNA uważano niedokładność ich kopiowania przez wirusowe kompleksy replikacyjne, ze względu na brak aktywności naprawczej tych enzymów (Drake i wsp., 1999). Badania struktury oraz ewolucji genów współczesnych nam wirusów RNA wykazały jednak, że zawierają one rozległe rearanżacje materiału genetycznego w postaci delekcji lub insercji sekwencji RNA, a nawet całych kodujących domen. Zmiany te nie mogły powstać w następstwie błędów replikacji. Podobnie jak u organizmów wyższych, odpowiada za nie rekombinacja genetyczna, z tą różnicą, że wymiana informacji zachodzi na poziomie RNA (Worobey i wsp., 1999).

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

## 1.2. Genetyczna rekombinacja RNA

W latach sześćdziesiątych ubiegłego stulecia uważano rekombinację genetyczną za proces zarezerwowany wyłącznie dla cząsteczek DNA. Pogląd ten został obalony przez Hirsta, który zaobserwował przepływ informacji genetycznej pomiędzy różnymi mutantami wirusa Newcastle i polio (Hirst, 1962). W ciągu kolejnych lat próbowano określić rolę biologiczną rekombinacji RNA, badając ten proces u innych pikornawirusów (Pringle, 1965), wirusów (+)RNA (Lai, 1992; Simon i Bujarski, 1994) i reowirusów (Coffin, 1979; Zhang i Temin, 1993). Badania te zaowocowały wysunięciem tezy mówiącej, iż wymiana materiału genetycznego na poziomie RNA zachodzi jedynie u wirusów (+)RNA. Teza ta została podważona po opisanie niehomologicznej rekombinacji RNA u wirusa grypy, który należy do wirusów (-)RNA (Khatchikian i wsp., 1989) oraz u faga  $\Phi 6$ , którego genom stanowi dwuniciowy RNA (dsRNA- *double stranded RNA*) (Mindich i wsp., 1992; Onodera i wsp., 1993). Pomimo iż udowodniono istnienie potencjału rekombinacyjnego u wirusów (-)RNA oraz dsRNA, w środowisku naukowym nadal przeważał pogląd, iż homologiczna rekombinacja RNA jest procesem charakterystycznym tylko i wyłącznie dla wirusów (+)RNA. Po udokumentowaniu homologicznej rekombinacji RNA zachodzącej u rotawirusa o segmentowanym genomie zbudowanym z dsRNA (Suzuki i wsp., 1998) zaczęto jednak dostrzegać nieprawdziwość tego sposobu myślenia. Ostatecznego dowodu świadczącego o powszechności rekombinacji RNA wśród wszystkich wirusów posiadających genom RNA dostarczyły badania hantiwirusa Tula, należącego do wirusów(-)RNA (Plyusin i wsp., 2002), podczas których zidentyfikowano naturalnie powstałego rekombinanta homologicznego. Na podstawie tej obserwacji zaprojektowano system eksperymentalny umożliwiający rekonstrukcję takich homologicznych rekombinantów.

Obecnie rekombinacja RNA jest intensywnie badana w wielu ośrodkach naukowych, a uzyskiwane dane świadczą, iż ulegają jej nie tylko wirusowe lecz także i inne cząsteczki RNA. Przykładowo, proces ten kształtuje budowę ludzkich chimerycznych retrotranspozonów L1, do których drogą rekombinacji RNA, zachodzącej podczas odwrotnej transkrypcji, dodawane są sekwencje RNA komórkowego (Buzdin i wsp., 2002, 2003, Bibiłto i Eickbush, 2002). Postuluje się również, że zjawisko rekombinacji RNA dało początek współczesnemu systemowi składania genów (*splicing system*) i że może ono brać udział w potranskrypcyjnej



THE HISTORY OF THE ...

The first part of the ...

The second part of the ...

The third part of the ...

The fourth part of the ...

The fifth part of the ...

The sixth part of the ...

The seventh part of the ...

The eighth part of the ...

The ninth part of the ...

The tenth part of the ...

The eleventh part of the ...

The twelfth part of the ...

The thirteenth part of the ...

The fourteenth part of the ...

The fifteenth part of the ...

The sixteenth part of the ...

The seventeenth part of the ...

The eighteenth part of the ...

The nineteenth part of the ...

The twentieth part of the ...

The twenty-first part of the ...

The twenty-second part of the ...

The twenty-third part of the ...

The twenty-fourth part of the ...

The twenty-fifth part of the ...

The twenty-sixth part of the ...

The twenty-seventh part of the ...

The twenty-eighth part of the ...

The twenty-ninth part of the ...

The thirtieth part of the ...

regulacji ekspresji genów poprzez modulowanie kształtu i umiejscowienia intronów (Hiller i wsp., 2000).

### 1.2.1. Dane filogenetyczne o rekombinacji wirusów typu RNA

Analiza filogenetyczna jest istotnym źródłem informacji o rekombinacji RNA. Podobieństwo organizacji genomów jak i poszczególnych genów pomiędzy różnymi jednostkami taksonomicznymi dowodzi, że nawet niespokrewnione wirusy typu RNA są zdolne do wymiany materiału genetycznego (Worobey i wsp., 1999). Przykładowo, u torowirusa BEV (*Berne virus*) zaobserwowano obecność genu esterazy hemaglutyniny, pochodzącej częściowo od koronawirusów a częściowo od wirusa grypy typu C (Snijder i wsp., 1991). Luteowirusy podgrupy I i II posiadają bardzo podobny gen białka płaszczka, jednak podgrupa I posiada gen polimerazy wykazujący duże podobieństwo do genu polimerazy karmowirusa, natomiast gen polimerazy podgrupy II wskazuje na pokrewieństwo z sobemowirusami (Mayo i wsp., 1996). Wirusy w trakcie ewolucji wcielały do swego genomu nie tylko sekwencje wirusowe, lecz także sekwencje mRNA gospodarza. Jako przykład może posłużyć sekwencja 28S rRNA występująca wewnątrz genu hemaglutyniny wirusa grypy (Khatchikian i wsp., 1989), sekwencja tRNA w genomowym RNA wirusa *Sindbis* (Monroe i wsp., 1983), sekwencja kodująca komórkowe białko DnaJ w genie białka C pestiwirusa BVDV (*bovine viral diarrhea virus*) (Nagai i wsp., 2003) czy sekwencja homologiczna do chloroplastowych egzonów tytoniu w genomach luteowirusów (Mayo i wsp., 1991) i klosterowirusów (Dolja i wsp., 1994). Defektywne interferujące RNA towarzyszące niektórym wirusom zwierzęcym i roślinnym są również produktami rekombinacji RNA (Lazarini i wsp., 1981; Inoue-Nagata i wsp., 1998). Wszystkie te przykłady ilustrują ogromną rolę rekombinacji jako jednej z sił napędowych ewolucji wirusów RNA.

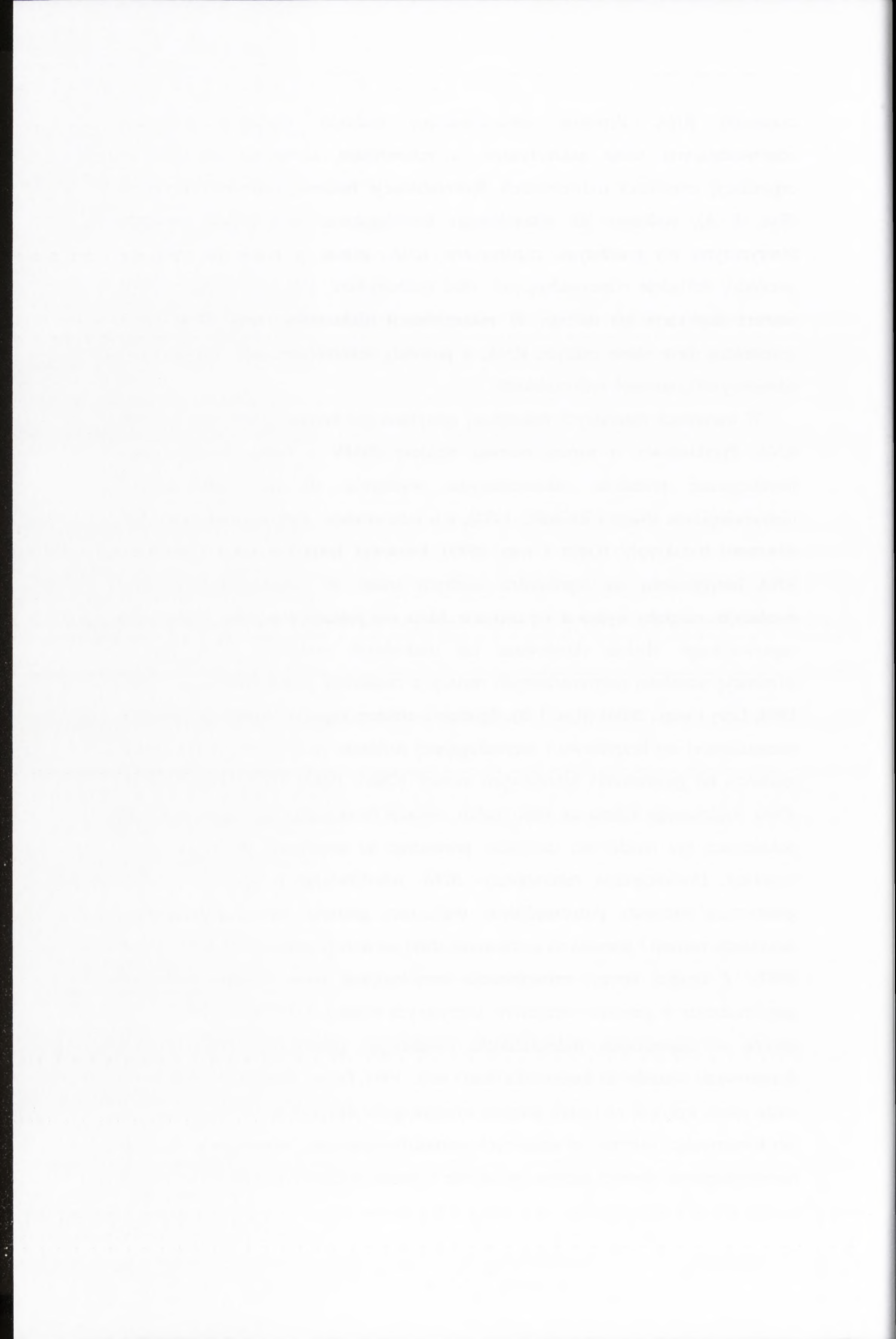
### 1.2.2. Dane eksperymentalne, typy i mechanizm rekombinacji RNA

Drugim źródłem pozyskiwania wiedzy o rekombinacji RNA są badania prowadzone w różnych eksperymentalnych systemach rekombinacyjnych, często z użyciem zmutowanych szczepów wirusowych. Analizując strukturę oraz funkcję substratów i produktów rekombinacji, zaproponowano wyróżnienie trzech jej podstawowych typów (Lai, 1992): rekombinację homologiczną, rekombinację homologiczną nieprecyzyjną i rekombinację niehomologiczną (Rys. 1). W **rekombinacji homologicznej** (Rys. 1 A) uczestniczą identyczne lub bardzo podobne

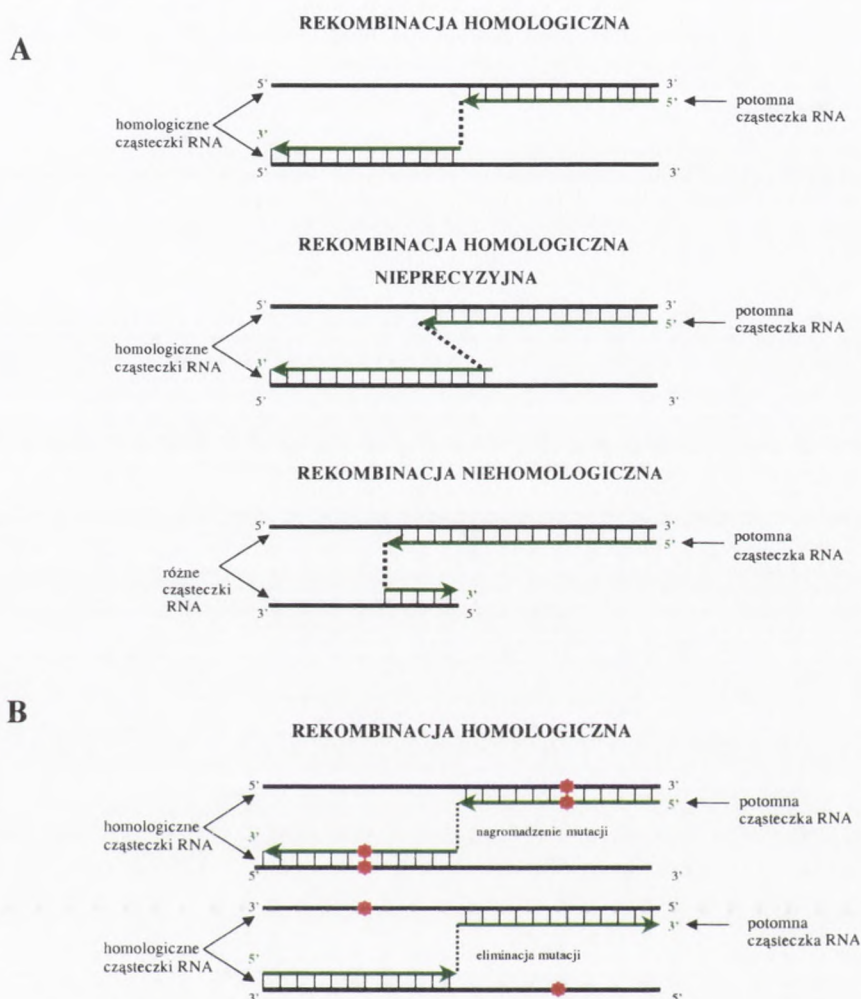


cząsteczki RNA. Przeskok rekombinacyjny zachodzi dokładnie pomiędzy odpowiadającymi sobie nukleotydami, a rekombinant zachowuje sekwencję i organizację cząsteczek rodzicielskich. **Rekombinacja homologiczna nieprecyzyjna** (Rys. 1 A), podobnie jak rekombinacja homologiczna, ma miejsce pomiędzy identycznymi lub podobnymi cząsteczkami RNA, jednak przeskok nie zachodzi pomiędzy dokładnie odpowiadającymi sobie nukleotydami, tak więc potomny RNA zawiera duplikacje lub delecje. W **rekombinacji niehomologicznej** (Rys. 1 A). uczestniczą dwie różne matryce RNA, a powstały rekombinant jest zdecydowanie odmienny od cząsteczek rodzicielskich.

W warunkach naturalnych najczęściej spotykana jest homologiczna rekombinacja RNA. Przykładowo, u wirusa mozaiki stokłosa (BMV – *brome mosaic virus*) homologiczne przeskoki rekombinacyjne występują 10 razy częściej niż niehomologiczne (Nagy i Bujarski, 1992), a u retrowirusów stanowią integralny etap odwrotnej transkrypcji (Götte i wsp. 1999). Ponieważ homologiczna rekombinacja RNA bezpośrednio nie wprowadza istotnych zmian do genomu, jej znaczenie ewolucyjne mogłoby wydawać się znikome. Może ona jednak pełnić rolę mechanizmu naprawiającego błędnie skopiowane lub uszkodzone cząsteczki RNA poprzez eliminację wcześniej nagromadzonych mutacji z cząsteczek potomnych (Rao i wsp., 1993, Levy i wsp., 2004) (Rys. 1 B). Zgodnie z efektem zapadki Mullera, w populacji rozmnażającej się bezpłciowo i niepodlegającej działaniu presji selekcyjnej, istnieje tendencja do gromadzenia szkodliwych mutacji (Chao, 1990). Ponieważ powrót do allelu wyjściowego zdarza się zbyt rzadko, mutacje te nawarstwiają się w kolejnych pokoleniach bez możliwości usunięcia, prowadząc do stopniowej degeneracji całej populacji. Homologiczna rekombinacja RNA, umożliwiając przepływ informacji genetycznej pomiędzy poszczególnymi wariantami genomu wirusa, przeciwdziała akumulacji mutacji i pozwala na zachowanie stałej sekwencji genomowego RNA (Chao, 1997). Z drugiej strony, rekombinacja homologiczna może też prowadzić do nagromadzenia w genomie wirusowym korzystnych mutacji, które wcześniej już były obecne w cząsteczkach rodzicielskich, zwiększając genetyczną różnorodność i dostosowanie wirusów do środowiska (Rao i wsp., 1993, Levy i wsp., 2004). Proces ten może zatem wpływać na kształt genomu wirusowego w dwojaki sposób, różnicując go lub konserwując, zależnie od aktualnych warunków bytowania wirusa. Rekombinacja niehomologiczna również spełnia istotną rolę z punktu widzenia ewolucji. Pomimo że



zachodzi o wiele rzadziej, wprowadza największe zmiany w genomie wirusowym, generując całkowicie nowe cząsteczki.



### Rysunek 1. Typy rekombinacji RNA

**A** – W rekombinacji homologicznej uczestniczą dwie identyczne cząsteczki RNA, a przeskok rekombinacyjny zachodzi między odpowiadającymi sobie nukleotydami, prowadząc do odtworzenia cząsteczek rodzicielskich. Rekombinacja homologiczna nieprecyzyjna zachodzi między identycznymi cząsteczkami RNA, lecz przeskok nie zachodzi dokładnie pomiędzy odpowiadającymi sobie nukleotydami, powodując wprowadzenie do cząsteczki potomnej insercji lub delecji. Rekombinacja niehomologiczna zachodzi między dwiema różnymi cząsteczkami RNA, a rekombinant różni się od cząsteczek rodzicielskich.

**B** – Homologiczna rekombinacja RNA jako proces wpływający na sekwencję RNA. Może ona prowadzić do naprawienia uszkodzonych cząsteczek genomowych lub do nagromadzenia w nich mutacji, które wcześniej były obecne w cząsteczkach rodzicielskich.

Cząsteczki rodzicielskie oznaczono czarnymi liniami, cząsteczki potomne i kierunek replikacji - zielonymi strzałkami, mutacje – czerwonymi gwiazdkami, miejsce przeskoku rekombinacyjnego – czarną przerywaną linią.



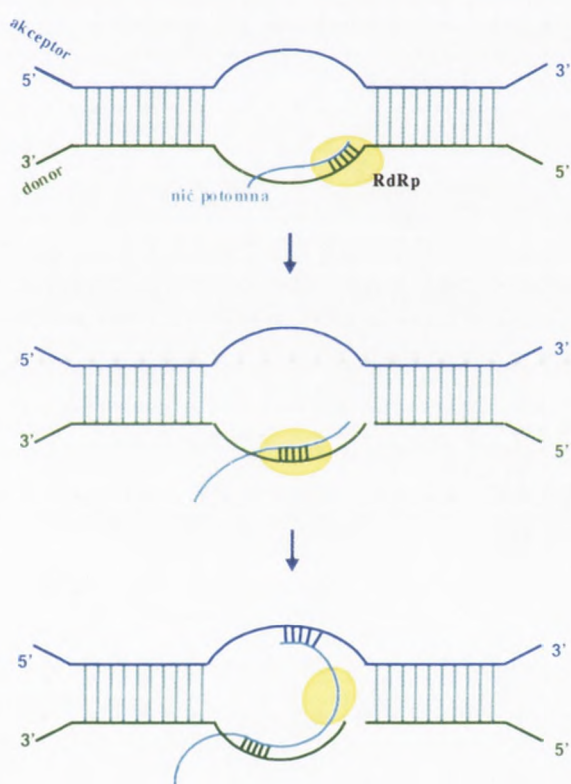
Trudności związane z obserwacją procesu rekombinacji *in vivo* powodują, iż mechanizm tego procesu nie został do tej pory w pełni poznany. Rekombinacja homologiczna, zachodząca pomiędzy identycznymi cząsteczkami RNA, jest niemożliwa do wykrycia, ponieważ w jej wyniku odtworzone zostają cząsteczki rodzicielskie. Jeżeli zaś proces rekombinacji niehomologicznej doprowadzi do rearanżacji genomowego RNA, to w większości przypadków wprowadzone zmiany są na tyle niekorzystne, że powodują eliminację rekombinanta z populacji.

Najpowszechniej przyjmowanym i najlepiej potwierdzonym eksperymentalnie modelem opisującym proces rekombinacji jest **model wybiórczego kopiowania** (*copy-choice*) (Lai, 1992). Zakłada on, że rekombinant powstaje podczas replikacji genomowych cząsteczek RNA, gdy zaangażowany w nią kompleks enzymatyczny przeskakuje z jednej matrycy (zwanej RNA donorowym) na drugą (zwaną RNA akceptorowym). Potomna cząsteczka RNA jest zatem syntetyzowana w oparciu o co najmniej dwie matryce. Rekombinację zachodzącą według modelu wybiórczego kopiowania zaobserwowano u większości wirusów typu RNA. Odnotowano jednocześnie, że pewne elementy obecne w sekwencji i strukturze RNA mogą wpływać na przeskoki rekombinacyjne. U wirusa polio skupiają się one w rejonach lokalnej hybrydyzacji (tzw. heterodupleksach) pomiędzy sekwencjami umiejscowionymi w obrębie tej samej lub dwóch różnych cząsteczek (Kirkegaard i wsp., 1986). Tworzenie lokalnych struktur dwuniciowych pomiędzy donorem i akceptorem sprzyja też niehomologicznej rekombinacji u wirusa mozaiki stokłosa (Nagy i Bujarski, 1993). Przeskok rekombinacyjny może być także spowodowany przez zatrzymanie replikazy w rejonach RNA przyjmujących stabilne struktury drugorzędowe, stanowiące przestrzenne blokady dla kompleksu, takich jak np. struktury typu spinki do włosów analogiczne do terminatorów transkrypcji występujące w genomie tombuswirusów (White i wsp., 1994, 1995). Promotoro-podobne struktury RNA mogą z kolei tworzyć dogodne miejsce reinicjacji syntezy RNA i zostały zidentyfikowane w rejonach rekombinacyjnie aktywnych genomowych cząsteczek wirusa mozaiki stokłosa (Bruyere i wsp., 2000), karmowirusów (Cascone i wsp., 1990, 1993, Nagy i Simon 1996, 1998, Cheng i wsp., 2003), tombuswirusów (Cheng i wsp., 2003), kukumowirusów (Suzuki, 2003) czy nodawirusów (Ball, 1997). Podczas badań rekombinacji homologicznej u bromowirusów oraz u pikornawirusów zaobserwowano zwiększoną częstość przeskoków rekombinacyjnych w rejonach bogatych w reszty adeninowe i uracylowe (Nagy i Bujarski, 1996; Pilipenko i wsp., 1995). Przypuszcza się, iż sekwencje tego typu





powodują „poślizg polimerazy”, skutkujący kilkunukleotydowymi insercjami lub delecjami na końcu 3' nowosyntetyzowanej nici potomnej. Dodatkowe nukleotydy włączone w miejscu przeskoku obserwowano także u rekombinantów karmowirusów (Cascone i wsp., 1990, 1993), tobamowirusów (Robinson i wsp., 1987) oraz bromowirusów (Nagy i Bujarski, 1993, 1996). Przerwanie ciągłości matrycy RNA, związane z dużą labilnością RNA i narażeniem na działanie komórkowych nukleaz, również może powodować przeskok replikazy i kontynuację syntezy nici potomnej na innej cząsteczce (Rys. 2). Niestabilne fragmenty donorowego RNA są rejonami aktywnymi rekombinacyjnie u tombuswirusów, u których zaobserwowano, że po sztucznym rozerwaniu genomowego RNA rekombinacja zachodzi w rejonie końców 5' nowopowstałych matryc (White i wsp., 1995). Podobny mechanizm opisano dla retrowirusów (Peliska i wsp., 1992, Levy i wsp., 2004)).



### Rysunek 2. Rekombinacja RNA zachodząca według mechanizmu wybiórczego kopiowania, indukowana pęknięciem donorowego RNA

Przerwanie ciągłości cząsteczki donorowej (zielona linia) sprzyja jej oddzieleniu od wirusowej replikazy (żółty owal), a lokalna komplementarność pomiędzy końcem 3' potomnej cząsteczki RNA (błękitna linia) i akceptorowym RNA (granatowa linia) może ułatwić przeniesienie replikazy, zasocjowanej z nicią potomną, na nową matrycę.

Rekombinacja RNA według mechanizmu wybiórczego kopiowania, zachodząca pomiędzy wirusami RNA i mRNA transgenów roślin opornych na infekcje wirusowe jest obecnie przedmiotem intensywnych badań, w związku z zagrożeniem dla biosfery, wynikającym z możliwości powstania nowych wirusów o zwiększonych

Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page.

właściwościach przystosowawczych. Strategia, wykorzystywana w tych badaniach, polega między innymi na wywoływaniu infekcji roślin transformowanych nieuszkodzonym genem wirusowym przy pomocy delecyjnego mutantu wirusowego, pozbawionego tegoż genu. Podczas przeprowadzonych w ten sposób eksperymentów, w genomowym RNA potomnego pokolenia wirusowego w miejsce rodzicielskiej delecji powracała sekwencja typu dzikiego poprzez rekombinację z mRNA transgenu roślinnego. Dodatkowo, zdolności przystosowawcze niektórych z powstałych rekombinantów różniły się od wirusów typu dzikiego (Lomell i wsp., 1991; Gal i wsp., 1992; Schoelz i wsp., 1993; Borja i wsp., 1999; Greene i wsp., 1994, 1996).

Zrekombinowane cząsteczki RNA mogą także powstawać w sposób niezależny od replikacji, wskutek rozerwania cząsteczki RNA i niespecyficznego ligacji z innym fragmentem genomu. Zjawisko to zachodzi za pośrednictwem reakcji transestryfikacji, przypominając powszechnie znany mechanizm rekombinacji DNA (Dressler i wsp., 1982). Po raz pierwszy mechanizm ten został zaobserwowany podczas rekombinacji *in vitro* pomiędzy fragmentami RNA pochodzącymi z bakteriofaga Q $\beta$  (Chetverin i wsp., 1997). Stwierdzono wtedy, że niereplikujące się wskutek braku pewnych struktur na końcach 5' i 3' cząsteczki RNA faga zdolne są do wytworzenia formy replikatywnej bez udziału enzymu, natomiast proces zostaje zahamowany w wyniku fosforylacji wolnej grupy OH na końcu 3' nici akceptorowej. Niehomologiczną rekombinację RNA niezależną od replikacji zaobserwowano także u wirusa polio (Gmyl i wsp., 2003), pestiwirusów (Gallei i wsp., 2004) i podczas składania genów (Hiller i wsp., 2000).

### **1.3. Bromowirusowy system doświadczalny umożliwiający badanie rekombinacji RNA**

Prowadzone w ostatnich latach badania rekombinacji RNA doprowadziły do stworzenia wielu systemów doświadczalnych, umożliwiających obserwacje efektów działania tego procesu i wpływu, jaki wywiera on na populacje wirusowe. Przedstawione w niniejszej pracy badania przeprowadzono z wykorzystaniem systemu rekombinacyjnego stworzonego w oparciu o bromowirusa – wirusa mozaiki stokłosa (BMV - *brome mosaic virus*). Uzyskiwane przy jego zastosowaniu wyniki mają najbardziej kompleksowy charakter, umożliwiają bowiem badanie mechanizmu wszystkich trzech typów rekombinacji i pozwalają określić strukturalne uwarunkowania badanego procesu (Bujarski i wsp., 1994, Alejska i wsp. 2005a i b).

Faint, illegible text covering the page, possibly bleed-through from the reverse side. The text is too light to transcribe accurately.

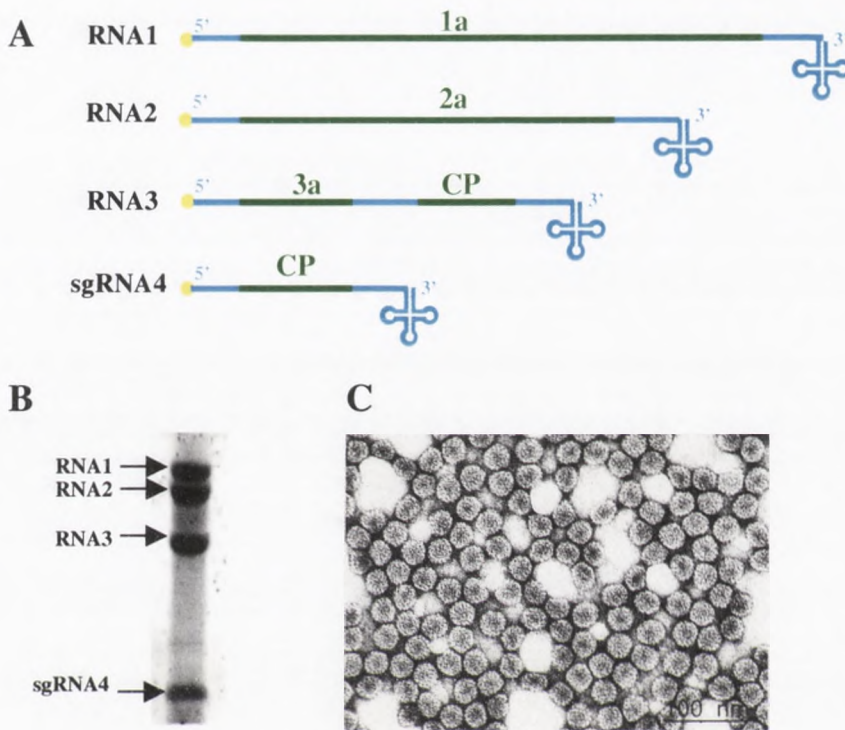
### 1.3.1. Wirus mozaiki stokłosa

Wirusa mozaiki stokłosa wyizolowano pierwotnie z *Bromus intermis* w 1942 roku (Lane, 1974). Jego genom był jednym z pierwszych w pełni zsekwencjonowanych genomów wirusowych (Ahlquist i wsp., 1981, 1984a). Wkrótce też odtworzono go w roślinie poprzez infekcję otrzymanymi na drodze transkrypcji *in vitro* genomowymi cząsteczkami RNA (Ahlquist i wsp., 1984b, 1984c). Dzięki rozwojowi technik biochemicznych, stosunkowo szybko poznano przebieg replikacji BMV, a także określono udział wirusowych oraz niektórych komórkowych białek w poszczególnych jego etapach (Hardy i wsp., 1979, Kao i wsp., 1992; Quad i wsp., 1990, 1993). Ze względu na dobrą znajomość budowy i cyklu życiowego, wirus ten bywa często używany jako model, służący poznaniu procesów zachodzących podczas infekcji w roślinie, takich jak ekspresja białek wirusowych, rekombinacja, rozprzestrzenianie wirusa czy reakcja gospodarza na infekcję (Kao i Sivakumaran, 2000).

BMV należy do wirusów o genomie zbudowanym z jednoniciowego RNA o polarności mRNA (wirusy (+)RNA). Patogeny tego typu stanowią ponad 1/3 wszystkich znanych wirusów. BMV jest przedstawicielem rodziny *Bromoviridae*, atakuje przede wszystkim rośliny z rodziny *Graminae* i *Chenopodiaceae*, rozprzestrzeniając się i infekując głównie za pośrednictwem owadów (Lane, 1974). Oglądany pod mikroskopem elektronowym preparat wirusa składa się z ikozaedralnych cząstek o średnicy około 25 nm (Rys. 3). Wiriony zawierają genomowy RNA, a ich kapsyd zbudowany jest ze 180 cząsteczek białka płaszczka (Krol i wsp., 1999). Genom BMV składa się z trzech segmentów RNA (Rys. 3): RNA1 o wielkości około 3.2 tysiąca zasad, RNA2 o wielkości około 2.9 tysiąca zasad oraz RNA3 o wielkości około 2.1 tysiąca zasad. W trakcie infekcji na ujemnej matrycy RNA3 wytwarzany jest dodatkowy, subgenomowy RNA4 (sgRNA4), odpowiadający części 3' RNA3. SgRNA4 jest często ko-enkapsydowany z RNA3 (Miller i wsp., 1985). Wszystkie wymienione wyżej RNA BMV posiadają metylowaną resztę guanozynową (tzw. kap) na końcu 5'. Sekwencja ostatnich 200 nukleotydów 3'UTR (UTR – *untranslated region*) jest niemal identyczna we wszystkich cząsteczkach i tworzy strukturę tRNA podobną (Ahlquist, 1985). W RNA BMV znajdują się geny kodujące trzy niestrukturalne białka: białko 1a o wielkości 109 kDa (RNA1), białko 2a o wielkości 94kDa (RNA2), białko 3a o wielkości 32 kDa, oraz strukturalne białko płaszczka o masie 20 kDa (RNA3) (Ahlquist, 1985). Badania infekcyjności komponentów genomu BMV wykazały, że żaden z nich osobno nie wywołuje zakażenia w roślinie. Do infekcji niezbędne są wszystkie trzy



RNA, jednak obecność RNA1 i RNA2 kodujących białka 1a i 2a jest wystarczająca do efektywnej replikacji tych cząsteczek w protoplastach roślinnych, ponieważ właśnie białka 1a i 2a stanowią kompleks replikacyjny BMV (Kao i wsp., 1992; Kilberstis i wsp., 1981).



### Rysunek 3. Organizacja genomu BMV

**A** - Genom BMV składa się z trzech cząsteczek RNA (RNA1, 2 i 3) kodujących białka 1a, 2a i 3a oraz białko płaszczka (CP). W trakcie infekcji syntetyzowany jest subgenomowy RNA4, który sekwencją jest identyczną z częścią 3' RNA3.

Regiony kodujące genomu oznaczone zostały kolorem niebieskim a niekodujące kolorem zielonym. Wszystkie cząsteczki posiadają 7-metyloguanozynę na końcu 5' (kolor żółty) i prawie identyczny koniec 3', którego fragment terminalny tworzy strukturę tRNA podobną.

**B** - Obraz genomowego RNA BMV rozdzielonego elektroforetycznie w 1% natywnym żelu agarozowym.

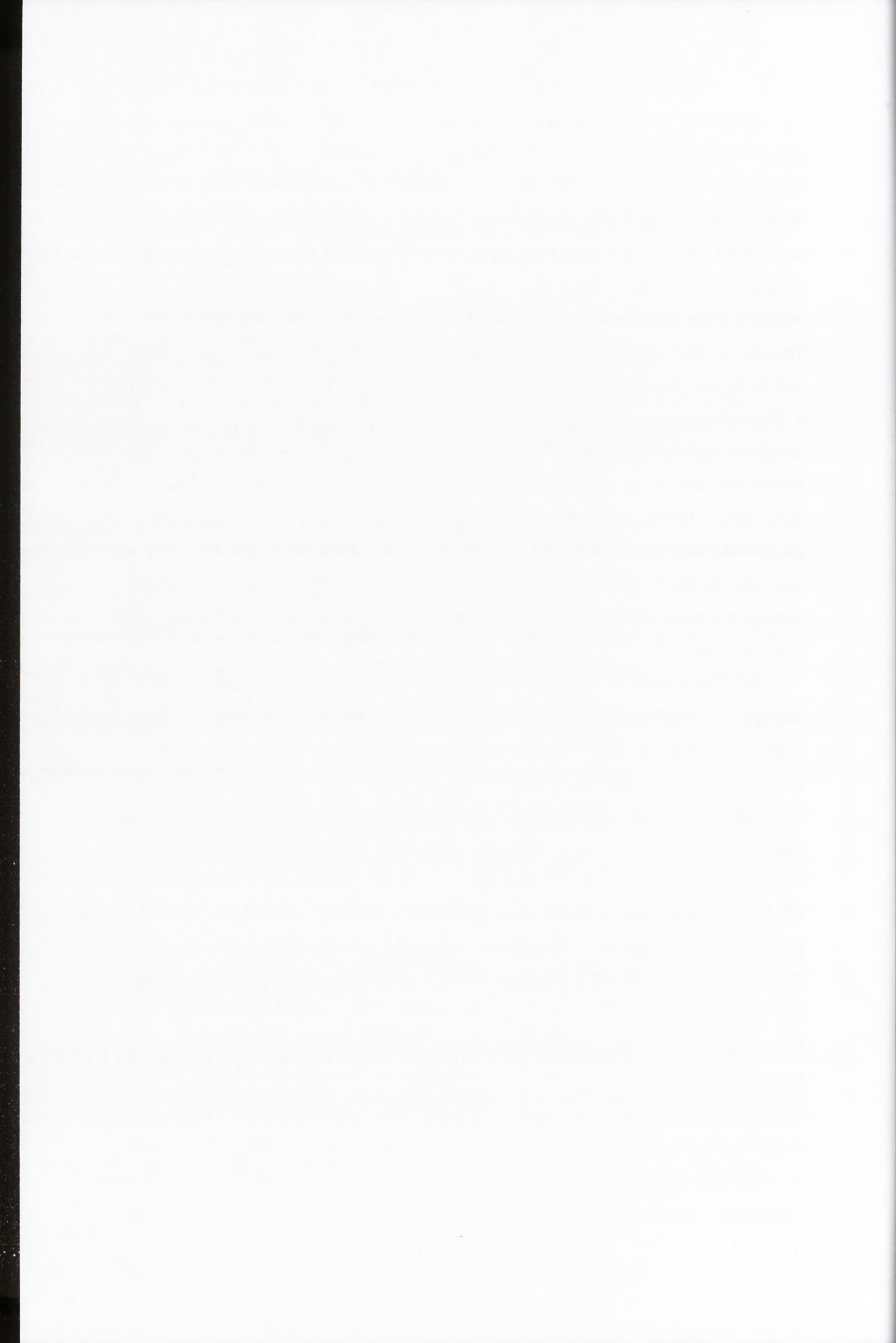
**C** - oglądany pod mikroskopem elektronowym preparat BMV składa się z ikozaedralnych wirionów o średnicy 25 nm, zawierających jedną cząsteczkę genomowego RNA1 lub RNA2 albo cząsteczki RNA3 oraz RNA4.





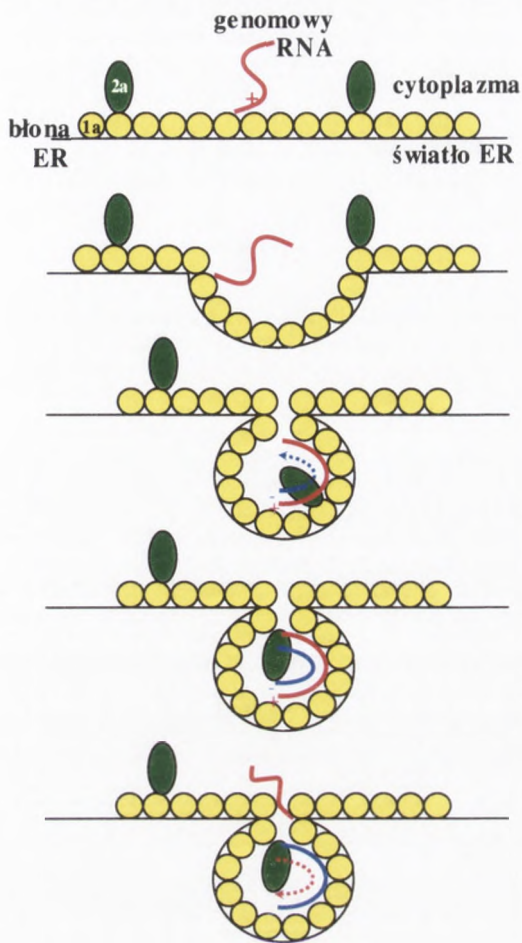
Białko 1a posiada najprawdopodobniej dwie aktywności enzymatyczne: jego część N-końcowa wykazuje cechy charakterystyczne dla wirusowych metylo- i nukleotydylotransferaz RNA, natomiast część C-końcowa zawiera motywy występujące w helikazach (Ahlquist i wsp, 1985; Ahola i wsp, 1999; O'Reilly i wsp 1998; Kong i wsp, 1999). Białko 2a posiada dużą, centralnie położoną domenę, zawierającą kilka motywów specyficznych dla polimeraz RNA zależnych od RNA. Domena ta jest otoczona przez mniej konserwatywne rejony N- i C- końcowe (O'Reilly i wsp 1998; Traynor i wsp., 1991). Kompleks replikacyjny BMV formowany jest dzięki elektrostatycznym oddziaływaniom ujemnie naładowanej N-końcowej części białka 2a z dodatnim ładunkiem obecnym w obrębie helikazowej domeny białka 1a. W skład kompleksu replikacyjnego BMV wchodzi też eukariotyczny czynnik inicjacji translacji (eIF3) oraz inne, bliżej nieokreślone czynniki komórkowe (Kao i wsp., 1992; Quad i wsp., 1990, 1993). Oddziaływanie pomiędzy białkami 1a i 2a jest specyficzne gatunkowo, bowiem białko 1a nie jest zdolne do przeprowadzenia syntezy RNA w obecności białka 2a pochodzącego od blisko spokrewnionego bromowirusa mozaiki wspięgi chińskiej (CCMV-*cowpea chlorotic mottle virus*) (Dinant i wsp., 1993; O'Reilly i wsp., 1995, 1997).

BMV w naturalnych warunkach rozprzestrzenia się za pośrednictwem owadów, wnikając do epidermalnych komórek roślinnych poprzez mechaniczne uszkodzenia (Lane, 1974; Rochow, 1959). Bardzo łatwo można zainfekować roślinę poprzez ręczną inokulację genomowymi cząsteczkami RNA otrzymanymi na drodze transkrypcji *in vitro* (Ahlquist i wsp., 1984b, 1984c). Po wniknięciu do komórki, wiriony ulegają odpłaszczeniu. W zbliżonym do obojętnego pH cytoplazmy są one niestabilne (Bancroft i wsp., 1967), kilka cząsteczek białka płaszczka dysocjuje, a koniec 5' genomowego RNA eksponowany jest do cytoplazmy (Verduin B. J. M., 1992). Do wirusowego RNA przyłączają się rybosomy i rozpoczynają translację niestrukturalnych białek BMV. Ruch rybosomów wzdłuż RNA w kierunku 3' prowadzi do całkowitego odpłaszczenia genomowych cząsteczek wirusa. Podczas translacji syntetyzowane są białka 1a i 2a, które wraz z czynnikami pochodzenia roślinnego (eIF-3 i inne, nieznanne czynniki) tworzą kompleks replikacyjny (Rys. 5). Białko 1a odgrywa kluczową rolę w modelu replikacji genomowego RNA zaproponowanym dla BMV (Schwartz i wsp., 2002). Dzięki obecności odpowiedniego sygnału w N-końcowym rejonie, jest ono kierowane do retikulum endoplazmatycznego (ER). Tam łączy się z błoną ER po stronie cytoplazmy i tworzy wgłębienia, a następnie liczne pęcherzyki wypełniające światło



ER, pozostające jednak w kontakcie z cytoplazmą (den Boon i wsp., 2001; Restrepo-Hartwig i wsp., 1996). Białko 1a, dzięki elektrostatycznym oddziaływaniom, sprowadza do wnętrza pęcherzyków białko 2a które stanowi około 5% ich zawartości (Chen i wsp., 2000). Wykazano również, że białko 1a posiada zdolność wiązania genomowego RNA za pośrednictwem sygnału obecnego w cząsteczce RNA (sekwencja box B zidentyfikowana w rejonie międzygenowym RNA3, a później znaleziona także w niekodujących końcach 5' RNA1 i RNA2, która odpowiada pętli TΨC tRNA gospodarza i konserwatywnemu motywowi w genach tRNA rozpoznawanych przez polimerazę RNA III) i pod nieobecność 2a silnie stabilizuje wirusowe RNA, blokując ich translację (Chen i wsp., 2001; Janda i wsp., 1998; Sullivan i wsp., 1999). Dysponując takimi danymi, zaproponowano model replikacji BMV w komórce roślinnej zakładający, że synteza genomowych cząsteczek wirusa zachodzi w sferulach utworzonych przez białko 1a w ER, zawierających jedną kopię matrycowego RNA BMV oraz wirusowy kompleks replikacyjny (Schwartz i wsp., 2002, Rysunek 4). W 3'-końcowym, tRNA-podobnym fragmencie genomowego RNA obecny jest promotor dla wirusowej polimerazy RNA zależnej od RNA (RdRp, ang. *RNA-dependent RNA polymerase*), z którego rozpoczyna się synteza nici ujemnej (Chapman i wsp., 1999; Dreher i wsp., 1989). Do końca 3' powstałego (-)RNA dołączany jest potranskrypcyjnie guanylan i tak zmodyfikowany (-)RNA służy jako matryca do syntezy wielu kopii (+)RNA (Sivakumaran i wsp., 1999). Do (+)RNA, za pośrednictwem domeny metylotransferazowej białka 1a, dodawany jest kap (Ahola i Ahlquist, 1999) i gotowe transkrypty wydostają się do cytoplazmy, gdzie podlegają translacji bądź enkapsydacji.





**Rysunek 4. Model replikacji RNA wirusa BMV w sferulkach retikulum endoplazmatycznego komórki roślinnej**

Białko 1a (żółty owal) jest kierowane do retikulum endoplazmatycznego (ER), dzięki obecności odpowiedniego sygnału w rejonie N-końcowym. Domena helikazowa białka 1a oddziałuje elektrostatycznie z N-końcową częścią białka 2a (zielony owal), transportując je do ER. Białko 1a posiada też zdolność wiązania genomowego RNA (czerwona linia) i sprowadza go do ER. Białko 1a łączy się z błoną ER i tworzy pęcherzyki w świetle ER, pozostając w kontakcie z cytoplazmą. Białko 2a stanowi około 5% zawartości pęcherzyków, a replikacja RNA wirusa zachodzi w ich wnętrzu. 3'UTR genomowego RNA zawiera promotor dla wirusowej polimerazy, z którego rozpoczyna się synteza nici ujemnej (niebieska linia). (-)RNA służy następnie jako matryca do syntezy wielu kopii (+)RNA. Nowo powstałe transkrypty wydostają się do cytoplazmy gdzie podlegają translacji bądź opłaszczeniu.

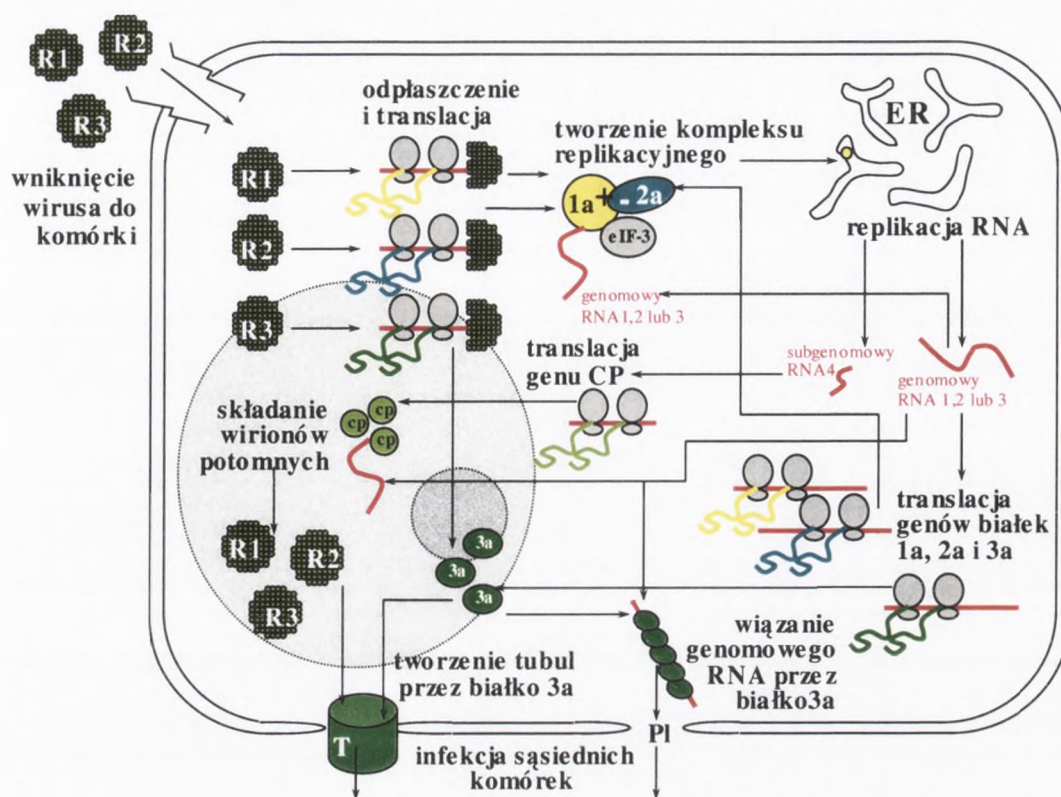
Za enkapsydację wirusowego RNA odpowiada białko płaszcz (CP – *coat protein*), którego translacja zachodzi z subgenomowego RNA4 (French i wsp., 1988). Segmenty RNA1 i RNA2 są opłaszczane indywidualnie, natomiast RNA3 i RNA4 często umieszczane są w jednym kapsydzie, przy czym pakowanie RNA4 jest zależne od RNA3 (Miller i wsp., 1985; Choi i wsp., 2003). Składanie wirionów BMV wymaga co najmniej dwóch sygnałów pakowania, obecnych w strukturze drugorzędowej wirusowego RNA. Pierwszy sygnał stanowi konserwatywny 201-nukleotydowy tRNA-podobny koniec 3' każdego z segmentów (3'TLS – *3'tRNA-like structure*). Wykazano, że cząsteczki CP BMV inkubowane wraz z genomowym, czy subgenomowym RNA BMV, pozbawionym 3'-końcowych 201 nukleotydów nie tworzą wirionów. Składanie cząstek wirusowych rozpoczyna się zaraz po dodaniu do mieszaniny inkubacyjnej sekwencji zawierającej 3'TLS. Zaobserwowano jednocześnie, że tRNA pochodzący z zarodków pszenicy i drożdży, inkubowany z CP i genomowymi cząsteczkami BMV pozbawionymi 3'TLS, indukuje enkapsydację, a utworzone wiriony zawierają tylko



cząsteczki BMV (Choi i wsp., 2003). Wyżej wymienione spostrzeżenia sugerują, że konserwatywny 3'TLS stanowi swego rodzaju chaperon inicjujący enkapsydację, natomiast w strukturze genomowego RNA muszą być obecne dodatkowe, specyficzne dla BMV sygnały, decydujące o włączeniu cząsteczki kwasu nukleinowego do wnętrza wirionu. Tego typu sygnał został zidentyfikowany w cząsteczce RNA3, jest to 187-nukleotydowy fragment genu białka 3a (Choi i wsp., 2003). Białko płaszczka, wraz z białkiem 3a (białko typu *movement protein*), bierze także udział w rozprzestrzenianiu się wirusa w zakażonej roślinie - wieloetapowym procesie, obejmującym różne rodzaje tkanek roślinnych (Carrington i wsp., 1996; Nelson i wsp., 1998; Hull, 1991; Lucas i wsp., 1994). Wirus, po namnożeniu się w pierwotnie zainfekowanych komórkach, atakuje komórki przyległe poprzez łączące je plazmodesmy. Następnie, przemieszczając się poprzez komórki mezofilu i komórki towarzyszące wiązki przewodzącej, wirus dociera do rurek przewodzących, za pośrednictwem których rozprzestrzenia się systemicznie w całej roślinie. Prawdopodobnie wirus rozprzestrzenia się z komórki do komórki na dwa sposoby: bądź w formie opłaszczonej, bądź w formie RNA związanego z białkiem 3a (Fujita i wsp., 1998, Takeda i wsp., 2005). Białko 3a tworzy wewnątrz plazmodesm tubule, przez które potomne wiriony przedostają się do sąsiadujących komórek gospodarza (Kasteel i wsp., 1997). Dodatkowo, białko 3a ma zdolność wiązania wirusowego RNA i transportowania go przez plazmodesmy, zmieniając rozmiar i strukturę tych ostatnich. Białko 3a uczestniczy także w systemicznym rozprzestrzenianiu się infekcji, jednak dokładny mechanizm tego procesu u BMV nie jest znany (Mise i wsp., 1993; Fujita i wsp., 1996). Na podstawie obserwacji przebiegu infekcji u innych wirusów roślinnych ustalono, że krytycznym momentem dla rozpoczęcia się transportu systemicznego jest przekroczenie przez wirusa bariery pomiędzy mezofilem i wiązką przewodzącą, ze względu na różną budowę plazmodesm tych dwóch typów tkanek. Na tym etapie istotną funkcję spełniają wirusowe białka MP, które poprzez gatunkowo-specyficzne oddziaływania z plazmodesmami zmieniają ich strukturę, umożliwiając przepływ wirionów do rurek przewodzących (Carrington i wsp., 1996).

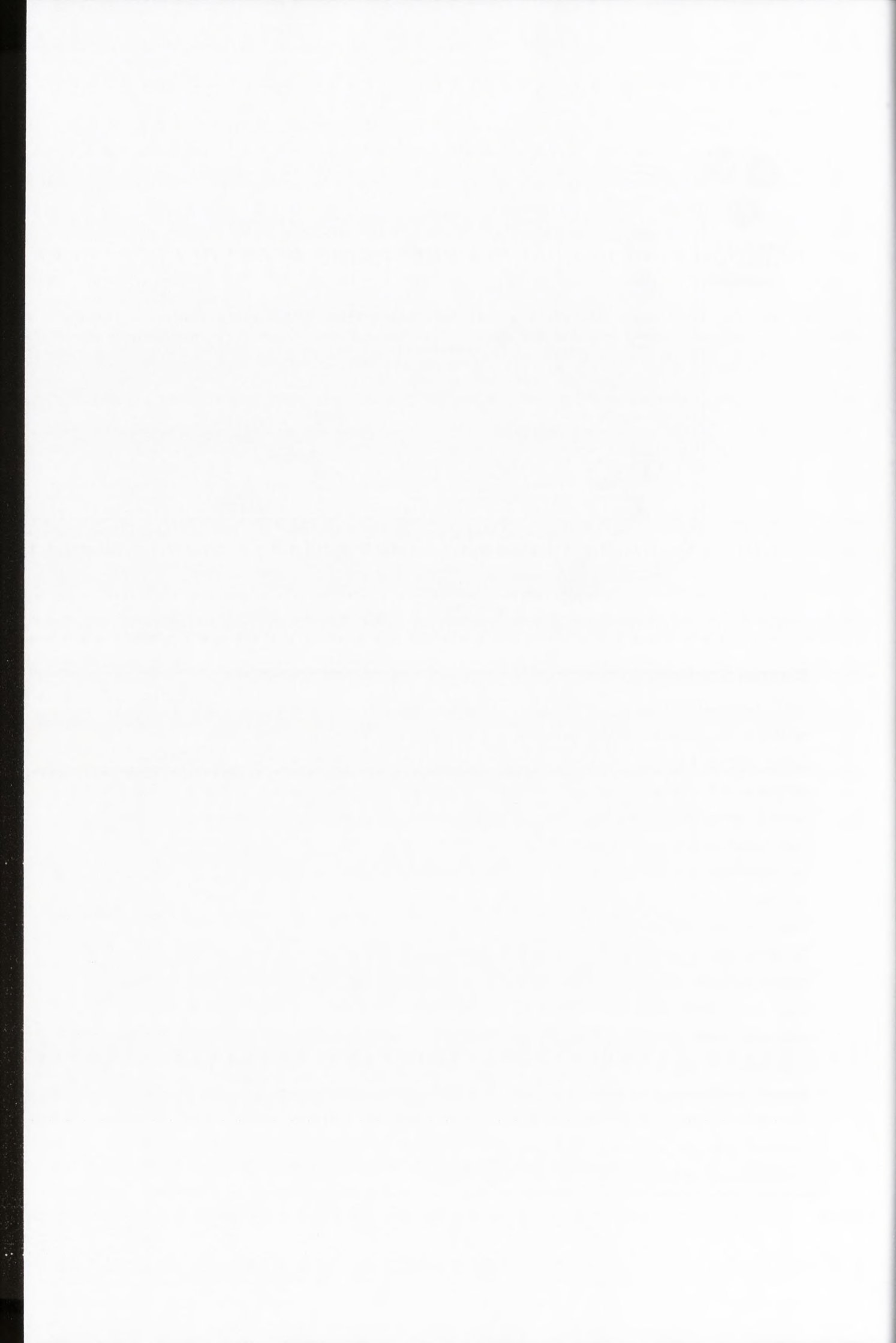


Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page. The text is arranged in approximately 25 horizontal lines.



**Rysunek 5. Schematyczny opis cyklu życiowego wirusa mozaiki stokłosa**

BMV rozprzestrzenia się za pośrednictwem owadów, wnikając do rośliny poprzez uszkodzenia epidermy. Aby doszło do infekcji, do komórki gospodarza musi dostać się kompletny wirusowy genom (każdy segment RNA jest enkapsydowany do osobnego wirionu - R1, R2 i R3). W zbliżonym do obojętnego pH cytoplazmy cząsteczki białka płaszcza oddysocjują z kapsydu i uwolnione zostają końce 5' genomowych RNA. Rybosomy rozpoczynają translację niestrukturalnych białek BMV, a ich ruch wzdłuż RNA w kierunku 3' prowadzi do całkowitego odplaszczania genomu wirusa. Początkowo powstają białka 1a i 2a, które wraz z czynnikami pochodzenia roślinnego (eIF-3) tworzą kompleks replikacyjny. Białko 1a jest kierowane do retikulum endoplazmatycznego (ER, *endoplasmatic reticulum*) dzięki obecności odpowiedniego sygnału w jego rejonie N-końcowym. Za pośrednictwem białka 1a do ER kierowane są też białko 2a oraz genomowy RNA. Replikacja cząsteczek wirusa zachodzi w pęcherzykach utworzonych przez białko 1a w świetle ER. Powstałe transkrypty wydostają się do cytoplazmy, gdzie podlegają translacji bądź enkapsydacji. Za enkapsydację wirusowego RNA odpowiada białko płaszcza (CP – *coat protein*) syntetyzowane z subgenomowego RNA4, który transkrybowany jest na matrycy (-)RNA3 z subgenomowego promotora. Wirus atakuje przyległe komórki poprzez łączące je plazmodesmy (PI). Białko 3a tworzy tubule wewnątrz plazmodesm, przez które potomne wiriony przedostają się do sąsiadujących komórek gospodarza. Białko 3a ma także zdolność wiązania wirusowego RNA i przeprowadzania go przez plazmodesmy w postaci nieopłaszczonej, zmieniając strukturę i rozmiar tych ostatnich.



### 1.3.2. BMV jako model do badań rekombinacji RNA

BMV jest pierwszym wirusem roślinnym, u którego zaobserwowano zjawisko rekombinacji RNA (Bujarski i Kaesberg, 1986). Odnotowano wtedy, że RNA3 z 20-nukleotydową delecją w konserwatywnym końcu 3' ulegał naprawie w wyniku rekombinacji z RNA1 lub RNA2 podczas infekcji w jęczmieniu. Na podstawie tego spostrzeżenia stworzony został bromowirusowy system doświadczalny, stosowany w badaniach rekombinacji RNA. W celu zwiększenia częstości rekombinacji, w niekodującym końcu 3' RNA3 wprowadzono dalsze modyfikacje (Bujarski i Nagy, 1994), mające na celu osłabienie zdolności replikacyjnych niezrekombinowanej cząsteczki rodzicielskiej RNA3. Dodatkowo zmiana gospodarza ze stosowanego wcześniej systemicznego na takiego, w którym wirus wywołuje jedynie infekcje lokalne (*Chenopodium quinoa*) pozwoliła wywołać w jednej roślinie wiele niezależnie rozwijających się zakażeń, występujących w postaci plamek nekrotycznych. Każda z plamek stanowi osobną infekcję, a powstające w niej rekombinanty tworzone są niezależnie od rekombinantów z pozostałych plamek. Dzięki zastosowaniu systemu bromowirusowego ustalono, że niehomologiczne przeskoki rekombinacyjne zachodzą w rejonach lokalnej komplementarności pomiędzy rekombinującymi cząsteczkami (Bujarski i Dzianott, 1991), natomiast rekombinacja homologiczna zachodzi w rejonach lokalnej homologii (Nagy i Bujarski, 1995). Dane te wykorzystano do skonstruowania tzw. wektora rekombinacyjnego (Nagy i Bujarski, 1993). W cząsteczce tej zmodyfikowano jedynie niekodujący koniec 3' tak, by nadal zawierała ona informację genetyczną niezbędną do normalnego rozwoju BMV. Modyfikacje te polegały na duplikacji konserwatywnej sekwencji z końca 3', po której wprowadzono fragment RNA pokrewnego wirusa żółtej chlorowatości wspanięgi chińskiej (CCMV – *cowpea chlorotic mottle virus*). Zmiany te miały na celu zmniejszenie zdolności zmodyfikowanych cząsteczek RNA3 do replikacji. Otrzymany wektorowy RNA3 był stabilny w trakcie infekcji (tzn. nie rekombinował), gdy został użyty do inokulacji roślin razem z RNA1 i RNA2 o sekwencji typu dzikiego zamiast wt RNA3 (sekwencja wt – *wild type*). Zaczynał on jednak rekombinować, gdy bezpośrednio za fragmentem z CCMV wprowadzono sekwencję wykazującą aktywność rekombinacyjną (Rysunek 6).

1. The first part of the document is a...

2. The second part of the document is a...

3. The third part of the document is a...

4. The fourth part of the document is a...

5. The fifth part of the document is a...

6. The sixth part of the document is a...

7. The seventh part of the document is a...

8. The eighth part of the document is a...

9. The ninth part of the document is a...

10. The tenth part of the document is a...

11. The eleventh part of the document is a...

12. The twelfth part of the document is a...

13. The thirteenth part of the document is a...

14. The fourteenth part of the document is a...

15. The fifteenth part of the document is a...

16. The sixteenth part of the document is a...

17. The seventeenth part of the document is a...

18. The eighteenth part of the document is a...

19. The nineteenth part of the document is a...

20. The twentieth part of the document is a...

21. The twenty-first part of the document is a...

22. The twenty-second part of the document is a...

23. The twenty-third part of the document is a...

24. The twenty-fourth part of the document is a...

25. The twenty-fifth part of the document is a...

26. The twenty-sixth part of the document is a...

27. The twenty-seventh part of the document is a...

28. The twenty-eighth part of the document is a...

29. The twenty-ninth part of the document is a...

30. The thirtieth part of the document is a...

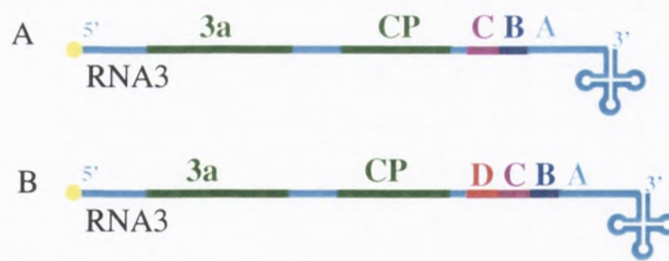
31. The thirty-first part of the document is a...

32. The thirty-second part of the document is a...

33. The thirty-third part of the document is a...

34. The thirty-fourth part of the document is a...

35. The thirty-fifth part of the document is a...



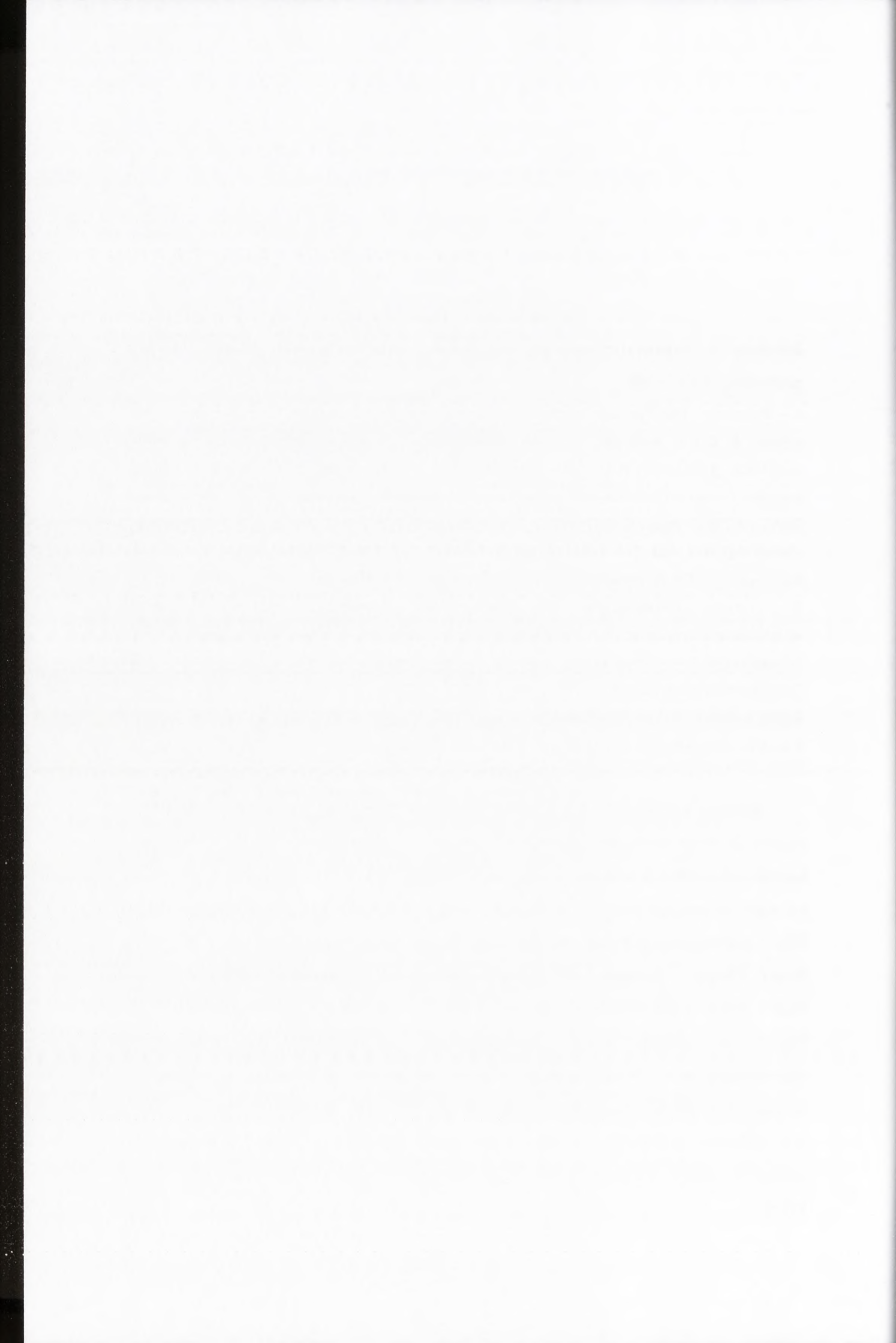
### Rysunek 6. Schematyczny opis wektorowej oraz aktywnej rekombinacyjnie pochodnej RNA3 BMV

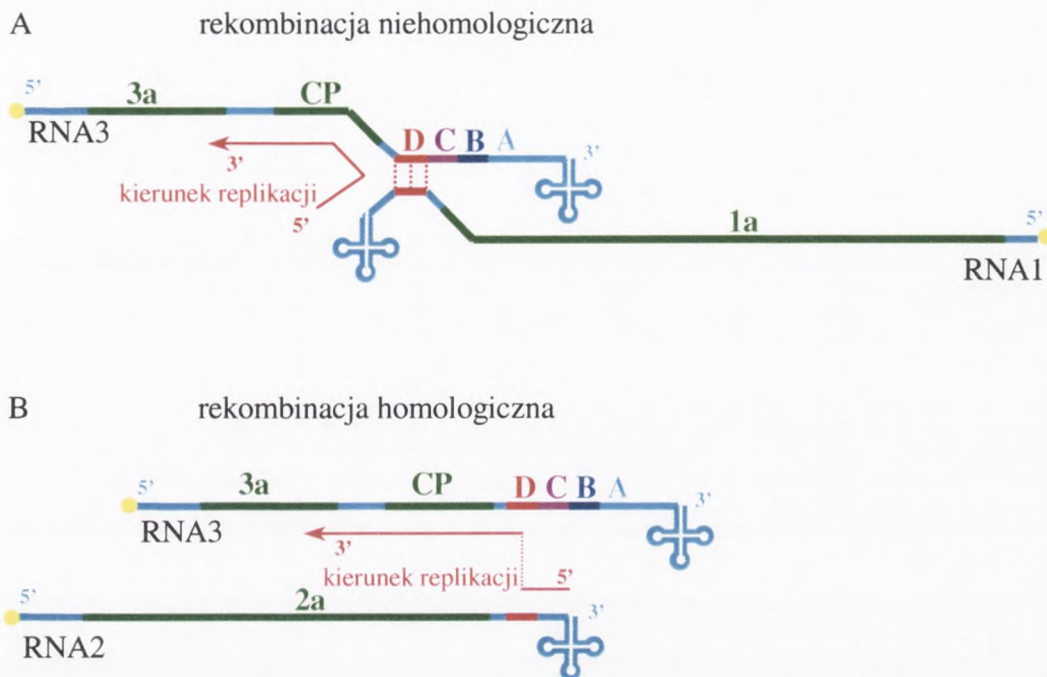
**A** – Wektorowy RNA3 posiada zmodyfikowany niekodujący koniec 3', który można podzielić na trzy regiony: A, B i C. Region A zawiera 236 nukleotydy 3'-końcowy fragment zachowawczy we wszystkich genomowych RNA. Część tego fragmentu została zduplikowana – region B (odcinek pomiędzy 7 a 200 nukleotydem licząc od końca 3'). Następnie został wprowadzony 3'-końcowy fragment RNA3 z CCMV- region C (197 nukleotydy w wektorowych RNA3 stosowanych w rekombinacji niehomologicznej oraz 765 nukleotydy w wektorowych RNA3 stosowanych w rekombinacji homologicznej). Tak skonstruowany wektor jest nieaktywny rekombinacyjnie.

**B** – Aktywny rekombinacyjnie RNA3 BMV posiada rekombinacyjnie sekwencję (region D) wprowadzoną za regionem C. Jest ona komplementarna do fragmentu niekodującego końca 3' RNA1 (rekombinacja niehomologiczna) lub homologiczna do fragmentu niekodującego z końca 3' RNA2 (rekombinacja homologiczna).

Rejony kodujące i niekodujące oznaczono jak na rysunku 3, rejony A, B, C i D oznaczono odpowiednio kolorami: niebieskim, granatowym, bordowym i czerwonym.

Stosując wektorowy RNA3, zidentyfikowano w genomowych cząsteczkach BMV regiony aktywne rekombinacyjnie i stworzono dwa analogiczne systemy umożliwiające badania rekombinacji homologicznej i niehomologicznej (Rysunek 7). Pierwszy z nich nazwano heterodupleksowym, a powstał on poprzez wprowadzenie do wektorowego RNA3 rekombinacyjnie aktywnej sekwencji komplementarnej do fragmentu z końca 3' RNA1 (Nagy i Bujarski, 1993). Umożliwiła ona tworzenie lokalnej struktury dwuniciowej (heterodupleksu) pomiędzy rekombinującymi cząsteczkami RNA3 i RNA1, w obrębie której dochodziło do niehomologicznych przeskoków rekombinacyjnych. Drugi system powstał dzięki wprowadzeniu do cząsteczki wektorowego RNA3 sekwencji z 3'-końcowego niekodującego fragmentu RNA2. W tym układzie przeskoki rekombinacyjne miały miejsce w obrębie identycznych sekwencji, służył on zatem do badania rekombinacji homologicznej (Nagy i Bujarski, 1995).





**Rysunek 7. Opis systemów rekombinacyjnych stworzonych w oparciu o BMV–rekombinacja niehomologiczna**

**A** - Do wektorowego RNA3 wprowadzano 40-141 nukleotydowe sekwencje komplementarne do niekodującego fragmentu pochodzącego z końca 3' wtRNA1. Dzięki temu Cząsteczki RNA1 i RNA3 tworzyć mogły lokalny heterodupleks (czerwona gruba linia). Podczas syntezy nici potomnej z końca 3' RNA1, w obrębie dwuniciowego fragmentu wirusowa replikaza mogła zmienić matrycę z RNA1 na RNA3. W ten sposób tworzony był rekombinant posiadający niezmodyfikowany koniec 3' z RNA1 i część kodującą oraz koniec 5' z RNA3.

**B** - Do wektorowego RNA3 wprowadzano 15-60 nukleotydowe sekwencje homologiczne do niekodującego fragmentu pochodzącego z końca 3' wt RNA2 (czerwona gruba linia). W obrębie regionów homologicznych syntetyzowana na donorowym RNA2 nić potomna była komplementarna do akceptorowego RNA3 i mogła zostać użyta przez replikazę wirusową jako starter do dalszej syntezy RNA na tej matrycy. W ten sposób tworzony był rekombinant posiadający niezmodyfikowany koniec 3' pochodzący z wt RNA2 oraz część kodującą i koniec 5' z RNA3.

Rejony kodujące i niekodujące oznaczono jak na rysunku 6. Kierunek replikacji oznaczono czerwoną strzałką, miejsce przeskoku rekombinacyjnego oznaczono czerwoną przerywaną linią.





Figure 1. Comparison of two models of performance improvement.

The first model, represented by the step function, suggests that performance improvement occurs in discrete, sudden jumps. This could be due to the acquisition of new skills or the consolidation of existing ones. The second model, represented by the smooth curve, suggests that performance improvement is a continuous process that occurs over time. This could be due to the gradual refinement of skills or the accumulation of experience. The figure illustrates the difference between these two models of performance improvement.

W obu systemach przesłoki rekombinacyjne prowadziły do naprawienia RNA3 - w utworzonych rekombinantach zmodyfikowany konserwatywny koniec 3' cząsteczki wektorowej był zastępowany przez wspólny dla wszystkich genomowych RNA 3'-końcowy fragment pochodzący z RNA1 (rekombinacja niehomologiczna) lub z RNA2 (rekombinacja homologiczna). 3'-końcowa sekwencja rekombinanta RNA3 była zatem zbliżona do istniejącej w natywnym RNA3, co zwiększało jego zdolność do replikacji w porównaniu z rodzicielskimi zmodyfikowanymi RNA3. W takim układzie presja selekcyjna wspierała akumulację rekombinantów i równocześnie eliminowała rodzicielskie cząsteczki wektorowego RNA3.

Dotychczasowe badania rekombinacji genetycznej BMV z użyciem wektora rekombinacyjnego ujawniły kilka istotnych szczegółów mechanizmu tego procesu. Ustalono między innymi, że spośród dwóch rodzajów rekombinacji, przesłoki homologiczne zachodzą z około 10 razy większą częstością niż niehomologiczne (Nagy i Bujarski, 1992). Stwierdzono, że w rekombinacji istotną rolę odgrywa zarówno struktura pierwszo- i drugorzędowa cząsteczek matrycowych jak i polimeraza wirusowa oraz że różny jest mechanizm rekombinacji homologicznej i niehomologicznej. Badając rekombinację niehomologiczną w systemie heterodupleksowym, (Bujarski i Nagy, 1993) wykorzystano 30-144-nukleotydowe sekwencje z niekodującego rejonu 3' RNA1 BMV, które umieszczone w wektorowym RNA3 w orientacji antysensownej, indukowały przesłoki niehomologiczne pomiędzy RNA3 i RNA1. Badając sekwencję rekombinantów odnotowano, że miejsca przesłoków skupiały się po lewej stronie (5') tworzonego heterodupleksu, oraz że długie rejony komplementarności (do 140 nukleotydów) silnie wspierają rekombinację, natomiast krótsze niż 30 nukleotydów nie generują rekombinantów na wykrywalnym poziomie. Poczynione obserwacje pozwoliły na zaproponowanie przez badaczy modelu niehomologicznego przesłoku rekombinacyjnego. Zakłada on, iż rekombinanty tworzą się w trakcie syntezy ujemnej nici potomnej, gdy kompleks replikazowy dociera do dwuniciowego rejonu i nie mogąc go rozpleść, przeskakuje z donorowego RNA1 na akceptorowy RNA3. Hipotezę tę wspiera fakt, że wprowadzenie choćby jednej substytucji nukleotydowej destabilizującej lewą stronę heterodupleksu pociąga za sobą przesunięcie w stronę prawą miejsca w którym lokalizują się przesłoki rekombinacyjne. W trakcie dalszych badań w systemie heterodupleksowym zaobserwowano, że poza komplementarnością matryc uczestniczących w rekombinacji, istnieją dodatkowe elementy uczestniczące w

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry should be supported by a valid receipt or invoice. This ensures transparency and allows for easy verification of the data.

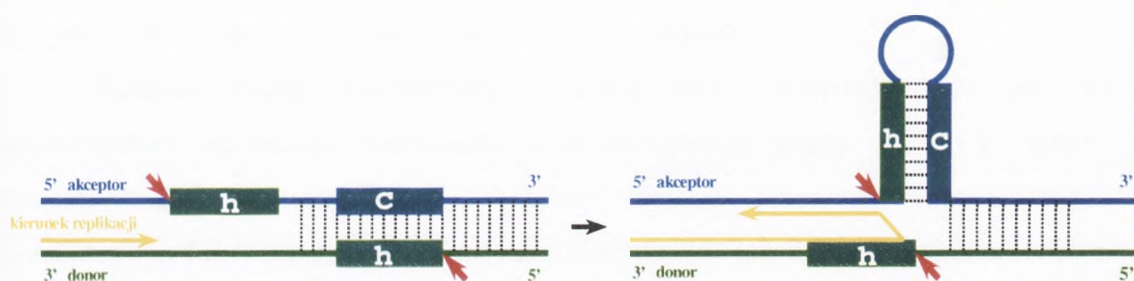
Secondly, the document highlights the need for regular audits. By conducting periodic reviews, any discrepancies or errors can be identified and corrected promptly. This proactive approach helps in maintaining the integrity of the financial data.

Furthermore, it is advised to use standardized accounting practices. This includes following established guidelines for recording income, expenses, and assets. Consistency in these practices is crucial for accurate financial reporting.

The document also mentions the importance of keeping records for a sufficient period. Depending on the jurisdiction, there may be legal requirements for how long certain records must be retained. It is essential to be aware of these regulations to avoid any legal complications.

In conclusion, the document provides a comprehensive overview of the best practices for record-keeping. By adhering to these guidelines, individuals and businesses can ensure that their financial records are accurate, reliable, and compliant with all relevant laws and regulations.

tym procesie (Figlerowicz, 2000). Stwierdzono, że przeskoki najczęściej zachodzą za pirymidyną, szczególnie za U. Dodatkowo zaobserwowano, że niektóre sekwencje powodują powstawanie wielu różnych rekombinantów, podczas gdy inne prowadzą do powstania tylko dwóch prawie identycznych produktów rekombinacji. Analiza strukturalna badanych cząsteczek doprowadziła do zaproponowania mechanizmu miejscowo-specyficjnej rekombinacji niehomologicznej wspieranej przez strukturę RNA.

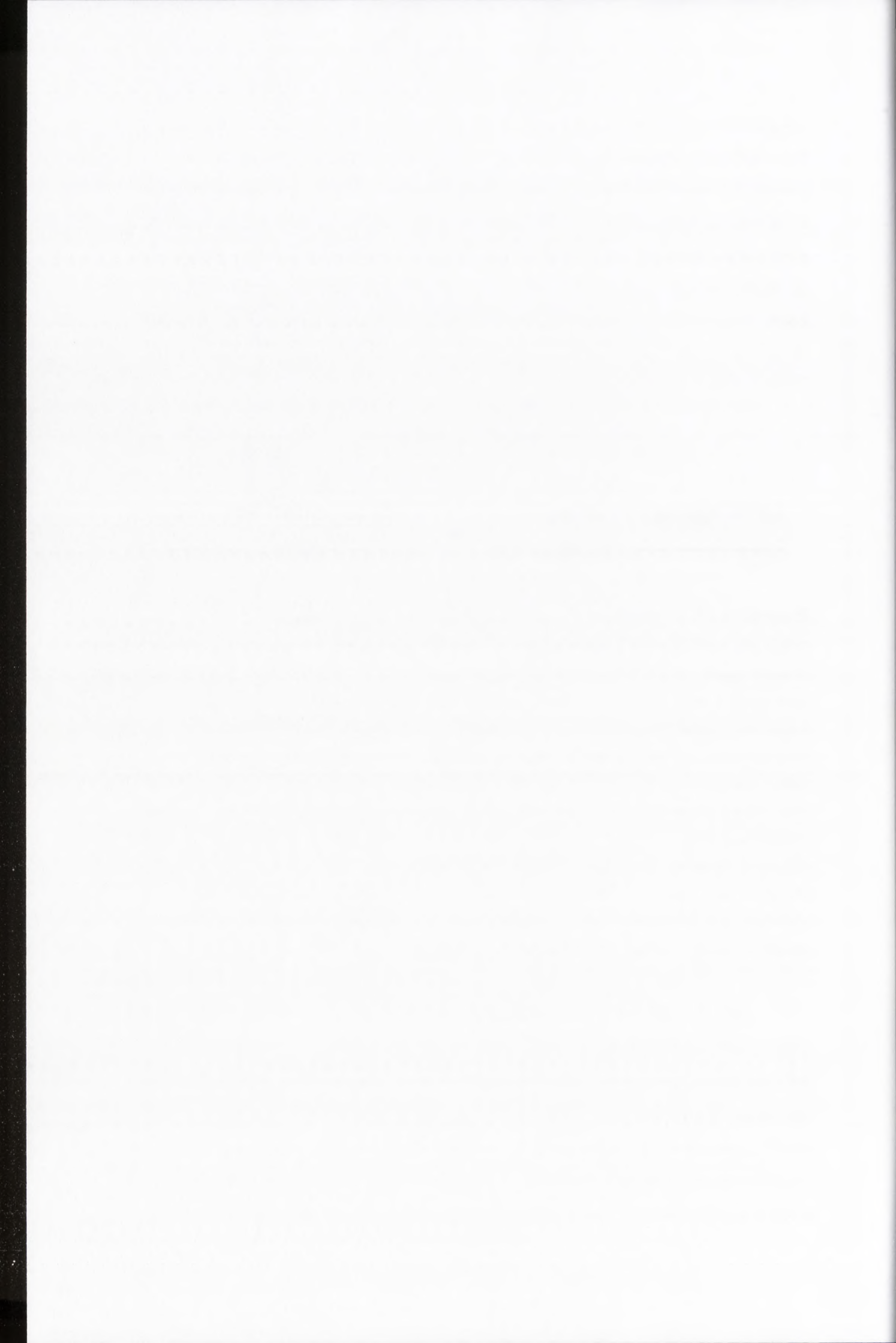


**Rysunek 8. Miejscowo-specyficjna rekombinacja niehomologiczna**

Dzięki obecności sekwencji komplementarnych (oznaczone prostokątem i literą c) oraz odpowiednio zlokalizowanych sekwencji homologicznych w matrycach donorowej i akceptorowej (oznaczone prostokątem i literą h), obie cząsteczki mogą tworzyć dupleks pełnej o długości, bądź część nukleotydów cząsteczki akceptorowej, zaangażowanych w tworzenie dupleksu z cząsteczką donorową, może utworzyć strukturę typu spinki do włosów, ułatwiając w ten sposób przeniesienie polimerazy z jednej cząsteczki matrycowej na drugą. Powstanie struktury spinki sprawia, że usytuowane na donorowym i akceptorowym RNA miejsca przeskoków (oznaczone czerwonymi strzałkami) znacznie zbliżają się do siebie.

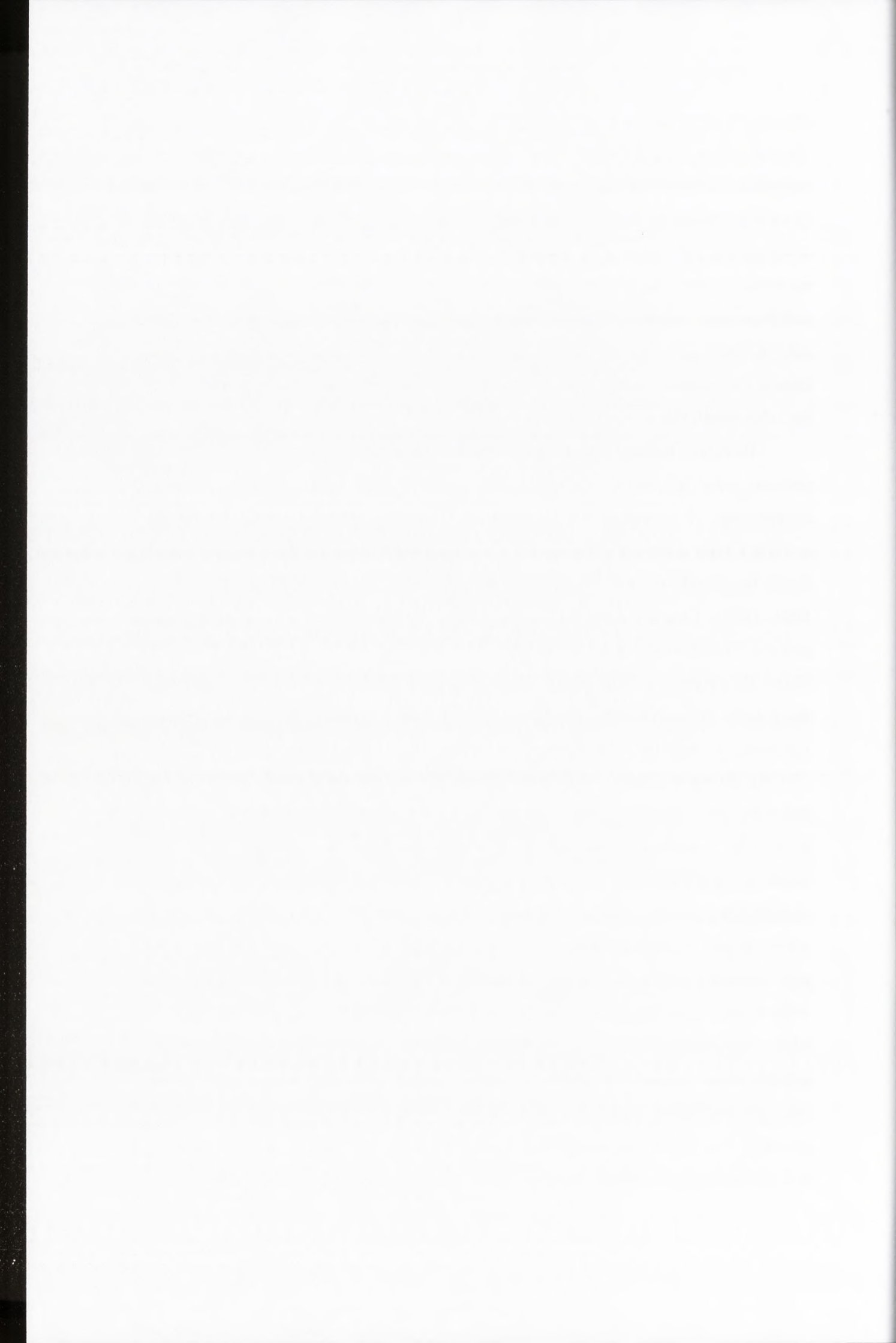
Cząsteczkę donorową oznaczono kolorem zielonym, cząsteczkę akceptorową – granatowym, sekwencje homologiczne – zakreskowanym prostokątem z literą h, sekwencje komplementarne – zakreskowanym prostokątem z literą c, kierunek replikacji – żółtymi strzałkami, miejsca przeskoku rekombinacyjnego – czerwonymi strzałkami.

Zgodnie z nim, wszystkie heterodupleksy wspierające rekombinację w sposób miejscowo-specyficjny charakteryzuje wspólna cecha: jeśli oddziaływania pomiędzy kilkoma pierwszymi parami zasad tworzącymi lokalną strukturę dwuniciową zostaną zaburzone (prawdopodobnie dzieje się tak, gdy wirusowa replikaza kopiuje fragment RNA1 zaangażowany w tworzenie heterodupleksu) to zmianie ulega drugorzędowa struktura rekombinujących cząsteczek RNA. Część heterodupleksu ulega rozpleceniu, a RNA akceptorowy formuje stabilną strukturę typu spinki do włosów. Jej powstanie



sprawia, że usytuowane na donorowym i akceptorowym RNA miejsca przeskoków znacznie zbliżają się do siebie. Dodatkowo, specyficzność rekombinacji powodować mogą kilkunukleotydowe sekwencje homologiczne występujące w badanej strukturze, sprawiające że nici potomna syntetyzowana na donorowym RNA jest komplementarna do akceptora. Gdy synteza RNA zostanie zatrzymana, cząsteczka nici potomnej może stanowić starter do wznowienia syntezy na akceptorowym RNA. Fakt, iż zablokowanie tworzenia się struktury typu spinki do włosów w akceptorze powodowało całkowity zanik specyficzności rekombinacji potwierdza hipotezę, że zmiany strukturalne matryc uczestniczących w rekombinacji niehomologicznej mogą być odpowiedzialne za selektywne tworzenie rekombinantów.

Podczas badań rekombinacji homologicznej stwierdzono, że już 15 nukleotydowa sekwencja pochodząca z niekodującego końca 3' RNA2 BMV, umieszczona w wektorze RNA3, wydajnie wspierała przeskoki rekombinacyjne pomiędzy tymi dwoma cząsteczkami, natomiast pięcio- lub dziewięcionukleotydowe rejony homologiczne indukowały rekombinację w stopniu nikłym (Nagy i Bujarski., 1993, 1995). Celem dokładniejszego określenia strukturalnych uwarunkowań tego procesu, szczegółowej analizie poddano 60-nukleotydowy rejon z końca 3' RNA2 (rejon R). Wprowadzenie go do wektorowego RNA3 powodowało powstanie i akumulację rekombinantów w ponad 90% infekcji. Analiza struktury rejonu R wykazała, że może on mieścić w sobie dwie stabilne struktury typu spinki do włosów (G i H). Zaproponowano, że do rekombinacji homologicznej dochodzi, gdy synteza potomnej nici (-)RNA2 jest zatrzymana przez strukturę drugorzędową na matrycy RNA, a jej 3'-końcowy fragment zostaje uwolniony. Jeżeli ma to miejsce w obrębie sekwencji homologicznej, to część nici potomnej, dzięki komplementarności zasad, może hybrydyzować z akceptorowym RNA3, służąc jako starter do dalszej syntezy na tejże matrycy. Prowadząc selektywną mutagenezę rejonu R, starano się określić, które jego elementy pełnią istotną rolę w badanym procesie. Stwierdzono, że częstość rekombinacji jest proporcjonalna do długości homologicznej sekwencji. Częstość rekombinacji ulegała natomiast obniżeniu, gdy wprowadzone mutacje zmniejszały podobieństwo rekombinujących sekwencji. Identyczność RNA nie jest jednak jedynym warunkiem zajścia homologicznego przeskoku rekombinacyjnego, o czym świadczy fakt, iż 66-nukleotydowa sekwencja z 3' UTR RNA1, która była aktywna rekombinacyjnie w układzie niehomologicznym, nie wywoływała rekombinacji, jeśli

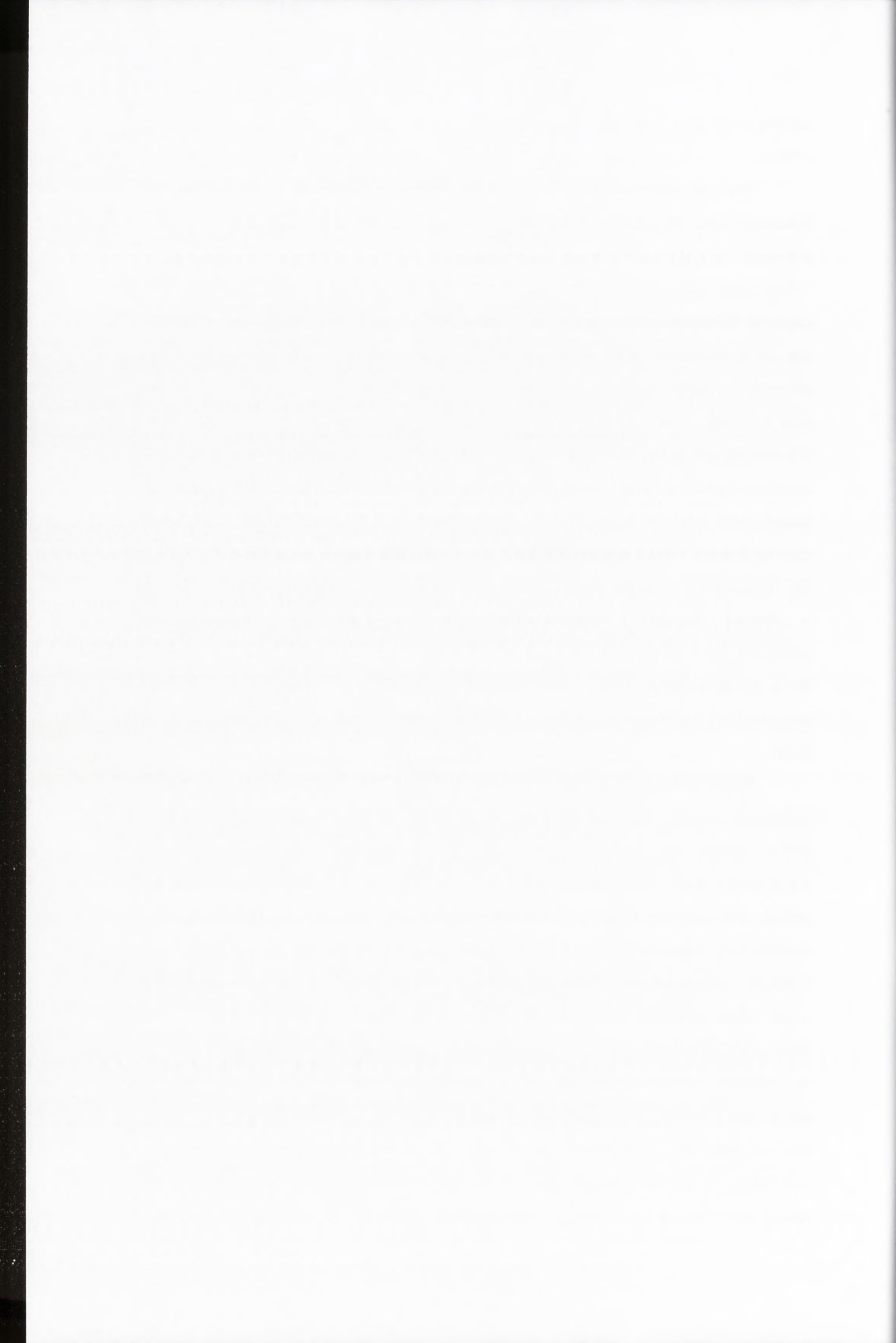


umieszczono ją w wektorze rekombinacyjnym w orientacji „sens” (Nagy i Bujarski, 1993).

Badając rekombinację RNA w układzie homologicznym stwierdzono także, że kilkunukleotydowe sekwencje bogate w adeninę lub uracyl generują nieprecyzyjne przeskoki homologiczne. Wprowadzenie dodatkowego fragmentu RNA złożonego z nukleotydów adeninowych i uracylowych po stronie 3' rejonu R znacznie zwiększało częstość homologicznych przeskoków rekombinacyjnych, zmieniając jednocześnie ich umiejscowienie, przy czym najefektywniejszą rekombinację obserwowano w obecności rejonów bogatych a adeninę i uracyl oraz R, zarówno w donorowej jak i w akceptorowej matrycy. Sekwencje bogate w AU umieszczone w wektorze rekombinacyjnym bez rejonu R wspierały rekombinację na bardzo niskim poziomie, natomiast gdy sekwencja AU poprzedzona była sekwencją bogatą w nukleotydy guaninowe i cytozynowe, wydajność rekombinacji rosła. Na podstawie tej obserwacji zaproponowano model rekombinacji homologicznej wspieranej przez sekwencje AU i GC. Zakłada on, że RdRp przeskakuje z matrycy donorowej na matrycę akceptorową w rejonach bogatych w pary AU w wyniku zatrzymania procesu syntezy nici potomnej. Rola rejonów GC polegałaby na ułatwianiu hybrydyzacji nici potomnej do RNA akceptorowego. Można więc określić rejony AU i GC mianem aktywatorów rekombinacji, indukujących przeskoki RdRp pomiędzy matrycowymi cząsteczkami RNA.

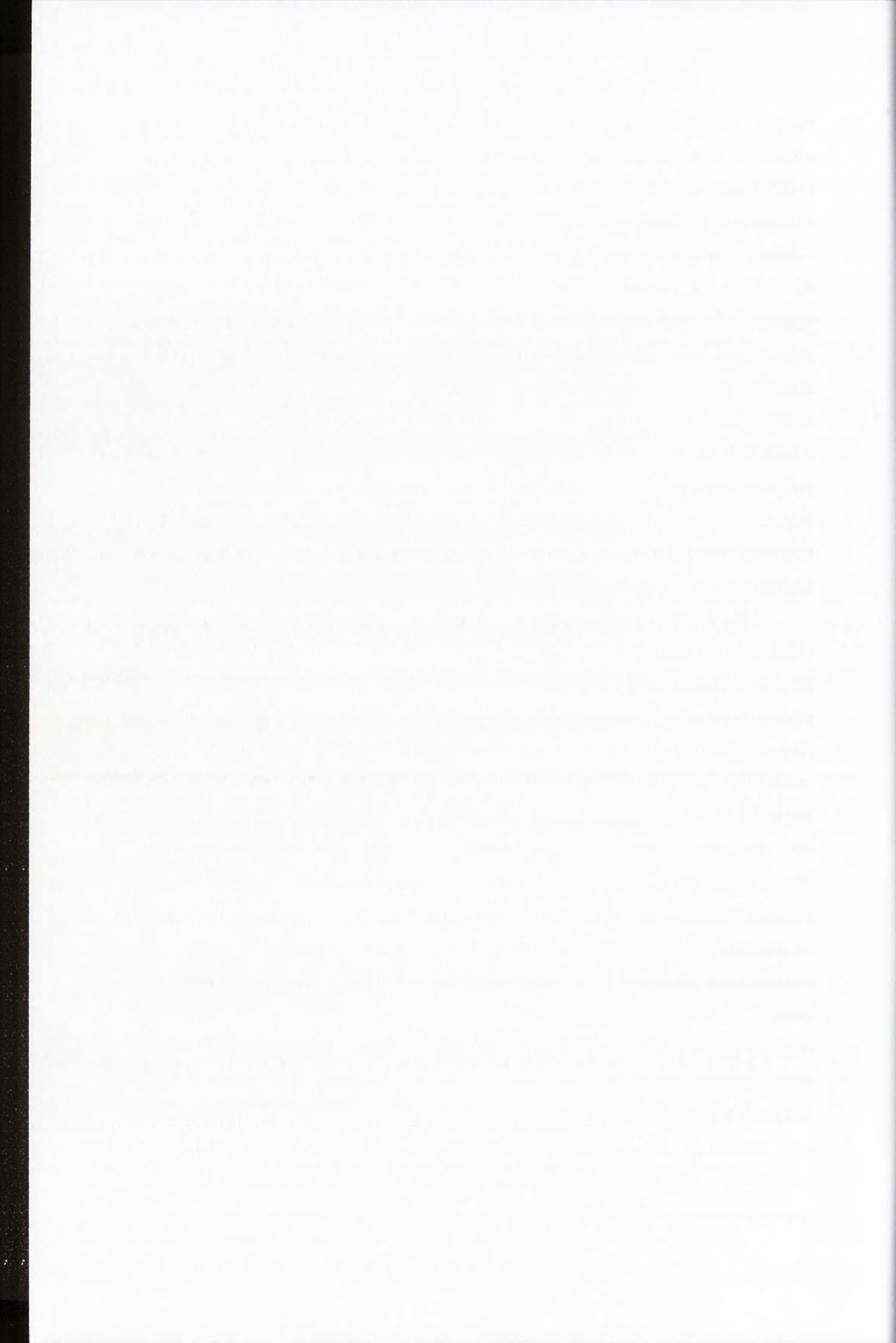
Rejon R, umiejscowiony w 3' UTR RNA2 i RNA3, wykorzystany został w badaniach wpływu stuktury drugorzędowej RNA na homologiczną rekombinację RNA, ze względu na fakt iż formuje on dwie struktury typu spinki do włosów (H i G) (Olsthoorn i wsp., 2002). RNA1 BMV również zawiera rejon homologiczny do R, jednak wykazuje on tylko 71% identyczności z sekwencją RNA2 i RNA3. Aby określić rolę struktury RNA w procesie homologicznej rekombinacji pomiędzy RNA3 i RNA2, wprowadzono dodatkową strukturę typu spinki do włosów pomiędzy wspomniane struktury H i G rejonu R RNA2 lub RNA3. Utworzono także takie konstrukty, w których dodatkowa struktura typu spinki do włosów umieszczona była w orientacji antysensownej, dzięki czemu stabilna struktura była formowana w cząsteczce (-)RNA, oraz konstrukty zawierające substytucje destabilizujące trzony struktur typu spinki do włosów w niciach (+) i (-)RNA. Analiza rekombinantów powstałych w czasie infekcji roślin mutantami BMV wykazała, że struktury typu spinki tworzące się w (-)RNA, obecne zarówno w RNA2 jak i w RNA3, znacznie





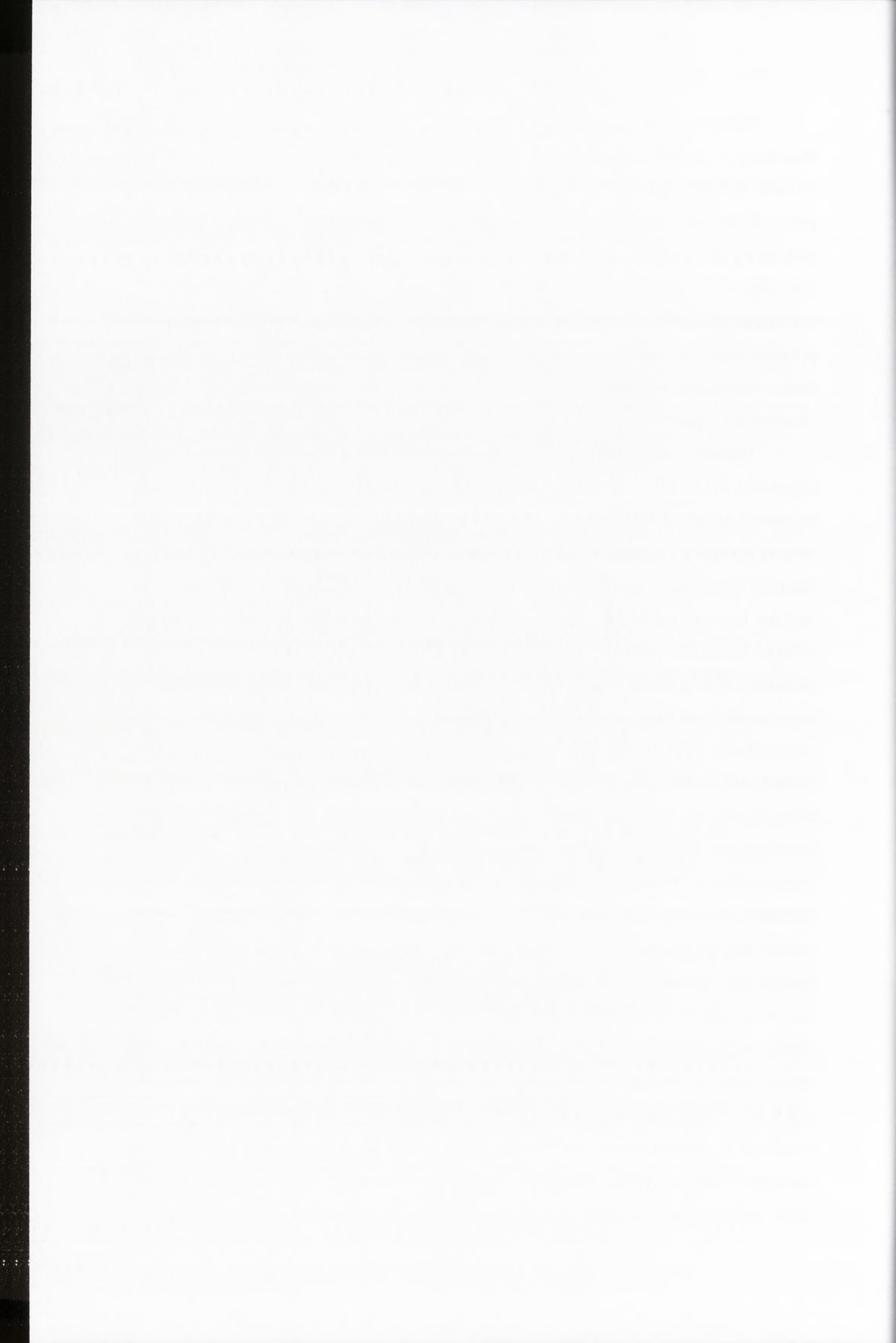
bardziej zmniejszyły ilość rekombinantów RNA2/RNA3 niż struktury typu spinki obecne w (+)RNA, lub inserty nie przyjmujące struktury spinkowej zarówno w (+)RNA jak i w (-)RNA. Podczas inokulacji przeprowadzonych przy pomocy mutantu wirusowego zawierającego insert tworzący strukturę typu spinki do włosów w (-)RNA2 zaobserwowano jeszcze większą redukcję ilości rekombinantów RNA2/RNA3, i tworzenie rekombinantów RNA3/RNA1, lub RNA3/RNA3. Wyniki opisanych doświadczeń wskazują, że stabilna struktura typu spinki do włosów umieszczona pomiędzy strukturami H i G w rejonie R w (-)RNA w akceptorze stanowi blokadę uniemożliwiającą ponowne przyłączenie się kompleksu replikacyjnego, który w takim wypadku łączy się do pozostałych cząsteczek RNA, tj. RNA1 lub RNA3. Rejon R RNA2 typu dzikiego jest jednak najbardziej preferowanym miejscem akceptorowym dla przeskoku polimerazy wirusowej. Najbardziej znaczący wpływ struktury drugorzędowej na częstość rekombinacji obserwowano, gdy matrycę stanowił (-)RNA, co sugeruje, że rekombinacja RNA zachodzi najczęściej podczas syntezy nici (+)RNA.

Udział białek wirusowych w rekombinacji RNA potwierdzono poprzez ukierunkowaną mutagenezę kodujących je genów. Zidentyfikowano mutant BMV, w przypadku którego substytucja jednej tylko reszty aminokwasowej w zachowawczym rejonie białka 1a o aktywności helikazowej powodowała zmianę lokalizacji niehomologicznych przeskoków rekombinacyjnych (Nagy i wsp., 1995a). Nie zachodziły one wewnątrz heterodupleksu, tak jak w przypadku niezmutowanego białka 1a BMV, lecz w jego początkowym, mniej stabilnym fragmencie, co mogło być związane z osłabieniem aktywności helikazowej zmutowanego enzymu. Stwierdzono także, że mutacje w obszarze katalitycznym białka 2a powodowały całkowite zahamowanie rekombinacji niehomologicznej, nie wpływając jednocześnie na częstość przeskoków homologicznych (Figlerowicz i wsp., 1997). Dwie mutacje wprowadzone do części N-końcowej białka 2a, która oddziałuje z białkiem 1a podczas tworzenia kompleksu replikacyjnego, różnie oddziaływały na częstość obydwu typów rekombinacji (Figlerowicz i wsp., 1998). Obie redukowały ilość niehomologicznych przeskoków rekombinacyjnych, natomiast tylko jedna z nich wpływała negatywnie na ilość przeskoków homologicznych, zmieniając jednocześnie ich lokalizację. Spostrzeżenia te dowodzą zarówno prawdziwości modelu wybiórczego kopiowania, jak i funkcjonowania innych mechanizmów podczas obydwu typów rekombinacji.

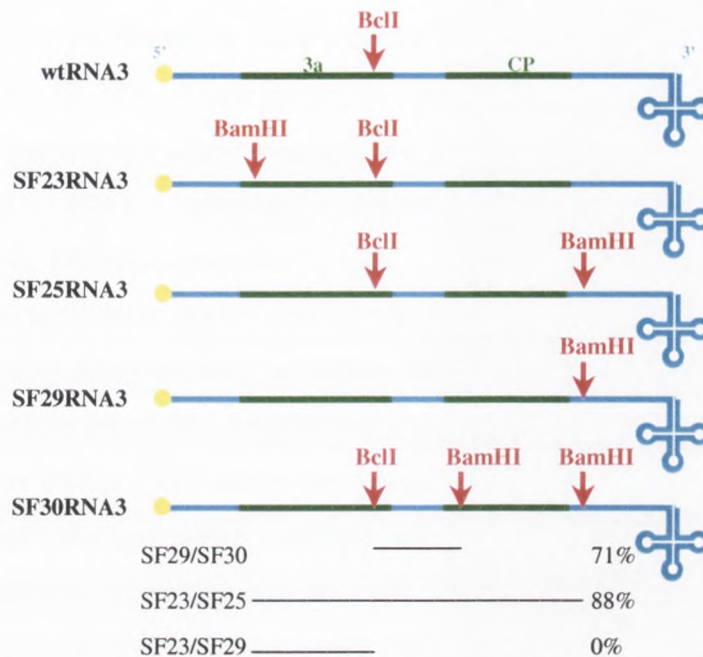


Badania w systemie rekombinacyjnym BMV dostarczyły wielu cennych informacji o czynnikach istotnych w procesie rekombinacji RNA zachodzącej według modelu wybiórczego kopiowania. Prowadzone one były jednak w warunkach silnej presji selekcyjnej faworyzującej rekombinanty, ze względu na modyfikacje obniżające przystosowanie rodzicielskich wirusów. Ta okoliczność uniemożliwia zrozumienie roli, jaką odgrywa homologiczna rekombinacja RNA w kształtowaniu populacji wirusowych czy kwazi-gatunków. Problem ten może być zgłębiany jedynie za pośrednictwem badań prowadzonych w warunkach jak najbardziej zbliżonych do naturalnych, w których presja selekcyjna nie powoduje eliminacji czy akumulacji cząsteczek potomnych o określonych właściwościach.

Pierwszą serię tego typu badań przeprowadzono z użyciem zmutowanej cząsteczki RNA3 BMV. Do cząsteczki tej wprowadzono substytucje, tworzące markery w postaci dodanych lub usuniętych miejsc restrykcyjnych. Mutacje te nie wpływały na przystosowanie powstałego mutantu wirusowego w porównaniu do typu dzikiego BMV. Infekcja wywołana w roślinie dwoma mutantami BMV, z których każdy zawierał inny wariant badanej cząsteczki, stwarzała możliwość powstania rekombinanta będącego efektem przeskoku pomiędzy tymi wariantami. (Bruyere i wsp., 2000). Efektem takiego przeskoku było przetasowanie markerów w nowosyntetyzowanej cząsteczce RNA3. W tym układzie możliwe było obserwowanie częstości, z jaką zachodzi homologiczna rekombinacja RNA pomiędzy tymi samymi segmentami genomowymi RNA3 BMV w warunkach naturalnych, bowiem zrekombinowane i niezrekombinowane cząsteczki akumulowały się w populacji wirusa z tą samą wydajnością. Analiza potomnych RNA3 powstających podczas inokulacji mutantami SFRNA3 pozwoliła ustalić, że obszar intercystronowy RNA3 jest miejscem o podwyższonej aktywności rekombinacyjnej (częstość rekombinacji wynosiła 71%). Autorzy zasugerowali, że rekombinacja w tym rejonie RNA3 zachodzi głównie podczas syntezy nici (+)RNA i zaproponowali jej mechanizm. Zakłada on, że kompleks replikacyjny BMV ulega poślizgowi w obrębie sekwencji polyU w (-)RNA, która osłabia oddziaływanie nici potomnej z matrycą. Dodatkowym czynnikiem utrudniającym postęp kompleksu replikacyjnego jest zawada przestrzenna w postaci subgenomowego promotora obecnego za rejonem polyU w (-)RNA3. W takich warunkach kontynuacja syntezy RNA przez RdRp BMV jest mniej korzystna z termodynamicznego punktu widzenia i prawdopodobieństwo rozpadu kompleksu replikacyjnego znacząco wzrasta. Po dysocjacji kompleksu, może z kolei dojść do reinicjacji syntezy RNA3 na tej samej lub innej cząsteczce (-)RNA3.



Niewykluczone, iż reasocjacja kompleksu replikacyjnego z matrycą jest wspomagana przez obecność subgenomowego promotora.



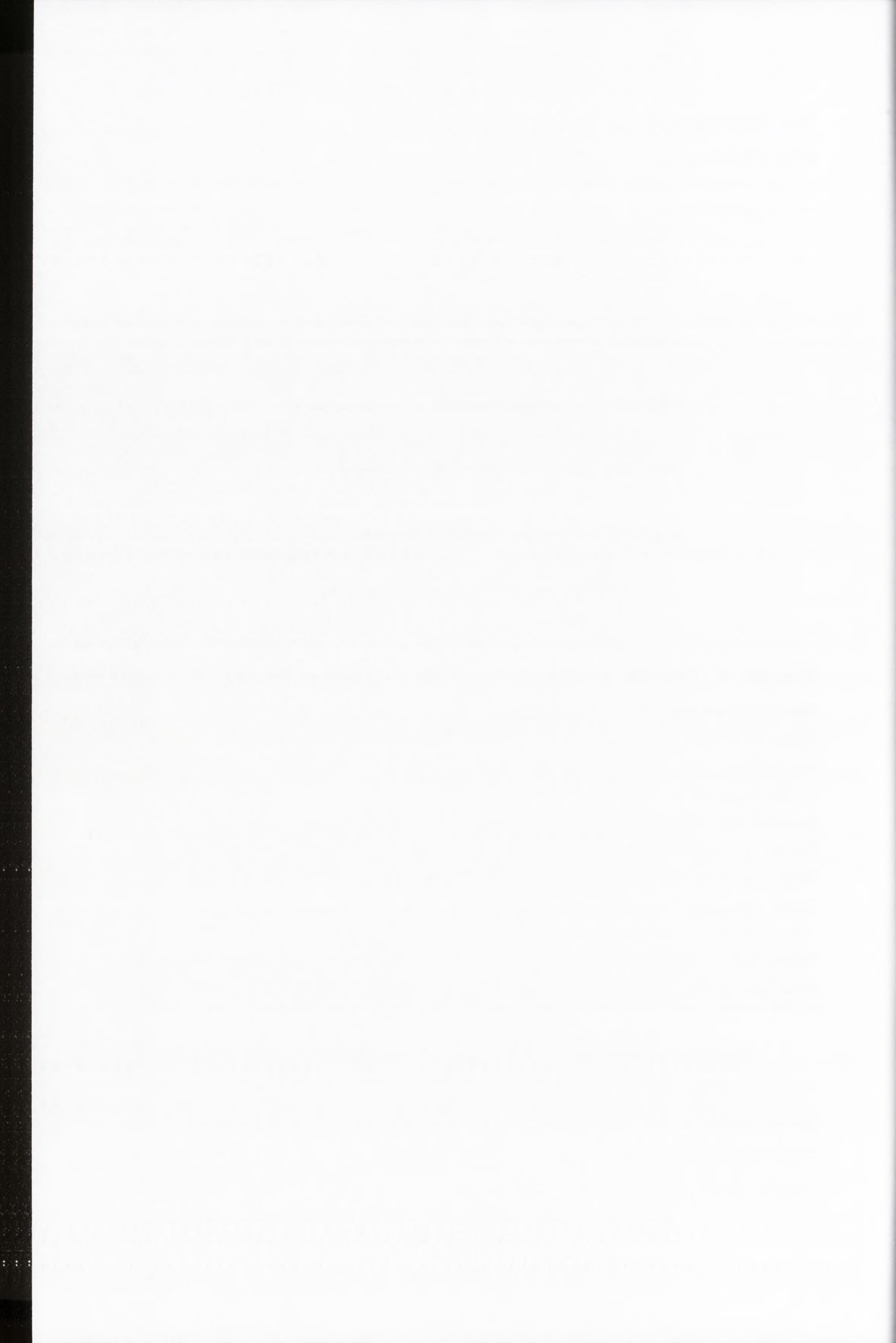
### Rysunek 9. Położenie mutacji markerowych w cząsteczce RNA3 BMV i obserwowana częstość rekombinacji

Mutant RNA3 SF23 posiada dodatkowe miejsce BamHI w pozycji 127, mutant SF25 posiada dodatkowe miejsce BamHI w pozycji 1862, mutant SF29 pozbawiony jest miejsca BclI w pozycji 860 oraz SF25 posiada dodatkowe miejsce BamHI w pozycji 1862, mutant SF30 posiada dodatkowe miejsca BamHI w pozycjach 1320 i 1862.

Poniżej schematycznie przedstawiono częstość rekombinacji zachodzącej pomiędzy mutantami SF RNA3, podczas koinfekcji roślin za pomocą RNA1 i RNA2 typu dzikiego oraz dwóch wariantów SF RNA3: pomiędzy SF23 i SF25 częstość rekombinacji oszacowano na 88%, u pary SF29 i SF30 zaobserwowano częstość rekombinacji 71%, natomiast para SF23 i SF29 nie dała rekombinantów.

Rejony kodujące cząsteczki oznaczono kolorem zielonym, strukturę kap kolorem żółtym, rejony niekodujące kolorem niebieskim, położenie markerowych mutacji – czerwonymi strzałkami.

Znaczenie ewolucyjne homologicznych przeskoków rekombinacyjnych w rejonie międzygenowym RNA3 BMV polegałoby na utrzymaniu stałej sekwencji genów białka 3a oraz białka płaszczka, gdyż ich wymiana pomiędzy poszczególnymi cząsteczkami umożliwiałoby wyeliminowanie błędów powstałych podczas replikacji. Z drugiej strony, homologiczna rekombinacja w tym rejonie mogłyby zwiększać



polimorfizm genetyczny populacji cząsteczek RNA3, dzięki kumulacji korzystnych lub neutralnych mutacji (Bruyere i wsp., 2000). Rekombinacja w rejonie genu białka 3a zachodziła z niewykrywalną częstością, natomiast późniejsze badania, prowadzone według podobnego jak wyżej schematu pokazały, że rekombinacja pomiędzy różnymi wariantami RNA3 z markerami w obrębie genu białka płaszcza zachodzi z częstością osiągającą wartości 10-22% (Wierzchoslawski i wsp., 2003).

W kolejnym etapie badań homologicznej rekombinacji RNA w obrębie rejonu międzygenowego BMV ustalono dokładne rozmieszczenie przeskoków rekombinacyjnych (Wierzchoslawski i wsp., 2004). Zachodziły one w obrębie sekwencji obejmującej trakt polyA oraz początkową część struktury typu spinki do włosów, stanowiącej subgenomowy promotor. Wynik ten potwierdził zaproponowany wcześniej mechanizm przeskoku rekombinacyjnego w rejonie międzygenowym BMV, zgodnie z którym RdRp BMV ulega dysocjacji na sekwencji polyU nici (-)RNA3, wspomaganej przez drugorzędową strukturę subgenomowego promotora. Późniejsza reasocjacja kompleksu replikacyjnego do innej lub tej samej matrycy (-)RNA3 jest wspomagana przez hybrydyzację sekwencji polyA potomnej nici z rejonem polyU matrycy oraz przez obecność subgenomowego promotora.



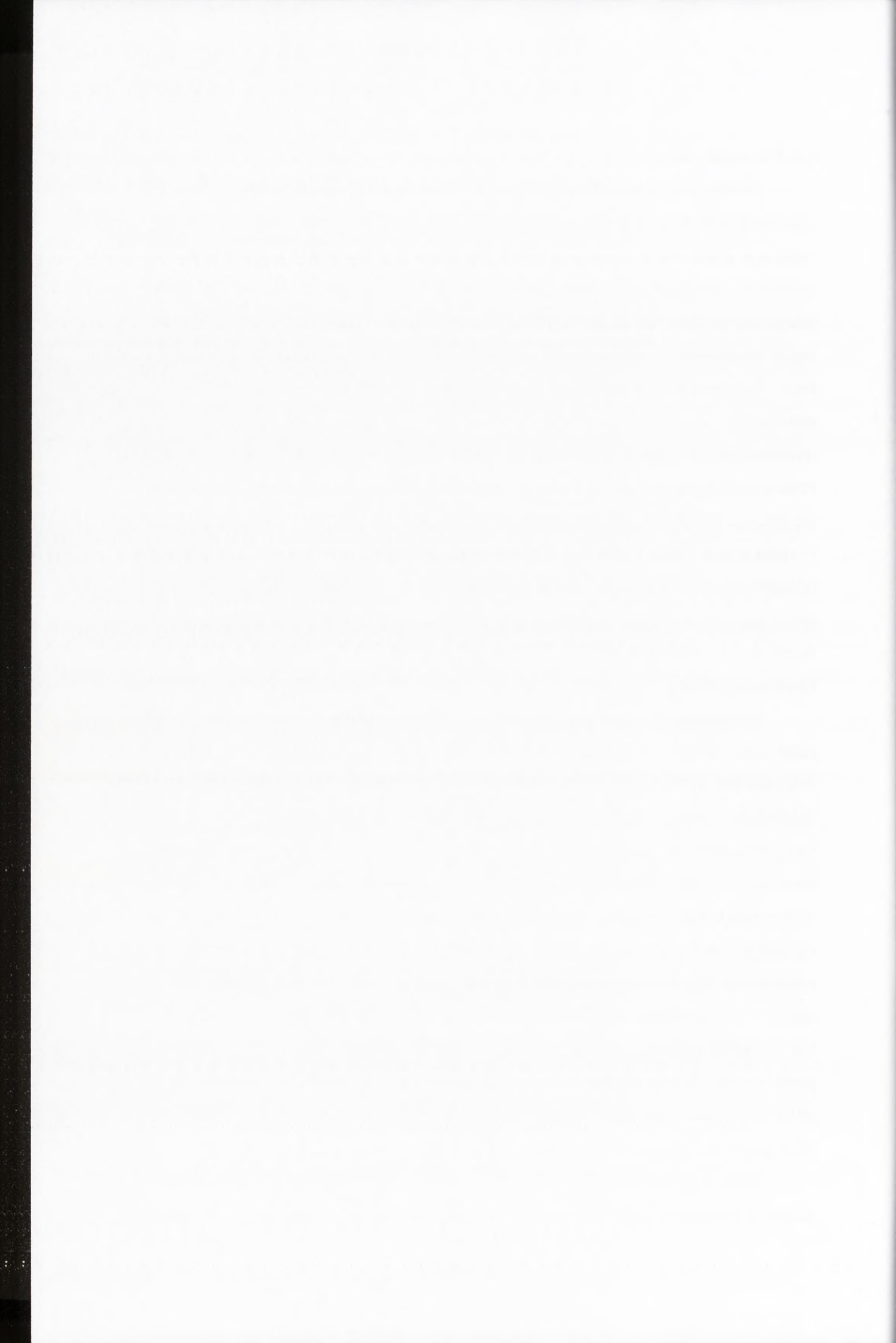
The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry should be supported by a valid receipt or invoice. The second part outlines the procedures for handling discrepancies and errors, including the steps to be taken when a mistake is identified. The third part provides a detailed breakdown of the financial data, including a summary of income and expenses. The final part concludes with a statement of the total balance and a recommendation for future actions.

#### 1.4. Podsumowanie

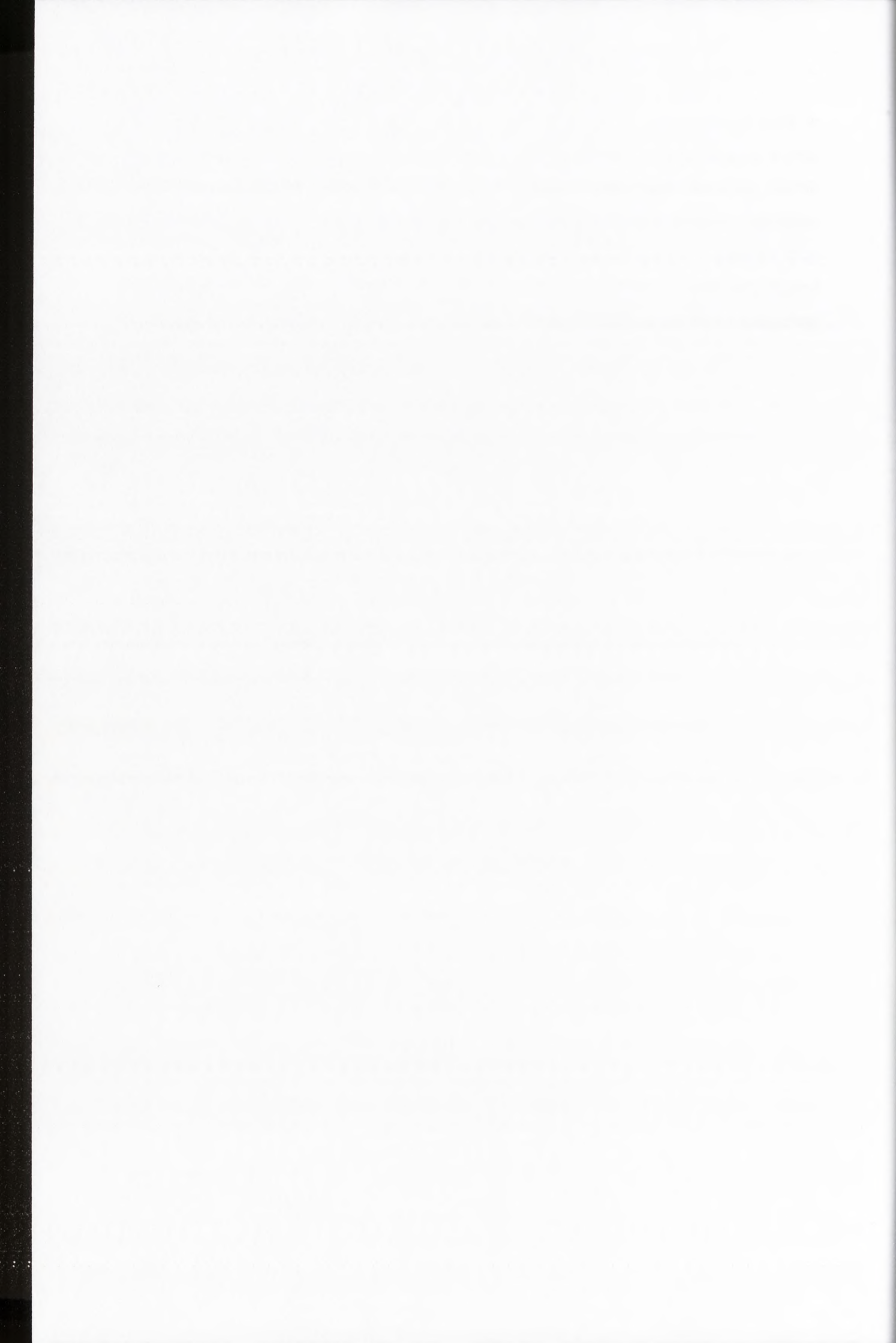
Genetyczna rekombinacja RNA jest zjawiskiem powszechnym w świecie wirusów typu RNA. W przeważającej większości przypadków zachodzi ona podczas replikacji genomowego RNA, zgodnie z modelem wybiórczego kopiowania. W nielicznych przypadkach obserwowano także rekombinację niezależną od replikacji, polegającą na pęknięciu cząsteczki RNA i ligacji z innym fragmentem. Spośród trzech typów rekombinacji, zdecydowanie najczęściej zachodzi rekombinacja homologiczna, która najprawdopodobniej wpływa na genomy wirusowe zarówno w sposób różnicujący jak i zachowawczy. Sugeruje się, że może ona przeciwdziałać występowaniu w świecie wirusów RNA i retrowirusów tzw. efektu zapadki Mullera. Ponieważ patogeny te nie rozmnażają się płciowo, w ich genomach mogą gromadzić się mutacje. Dzięki rekombinacji RNA możliwa jest wymiana materiału genetycznego i zachowanie stałej sekwencji genomowej. Z tego względu można uważać rekombinację u wirusów za zredukowany do minimum odpowiednik rozmnażania płciowego na poziomie molekularnym. Jednocześnie, dzięki rekombinacji RNA możliwe jest tworzenie nowych wariantów wirusowych zawierających korzystne kombinacje mutacji.

Informacje uzyskane podczas badań modelowego wirusa roślinnego (+)RNA, jakim jest BMV, oraz innych wirusów typu RNA, potwierdziły prawdziwość mechanizmu wybiórczego kopiowania. Wykazano, że proces ten jest uwarunkowany działaniem wielu złożonych czynników. Dowiedziono udziału wirusowego kompleksu replikacyjnego BMV w tym procesie i ustalono, że rządzą nim co najmniej dwa mechanizmy. Homologiczna rekombinacja RNA zachodzi w inny sposób niż niehomologiczna, bowiem mutacje wprowadzane do białek zaangażowanych w replikację inaczej oddziałują na obydwa procesy. Rekombinacja RNA może też być indukowana lub hamowana przez różnorodne elementy obecne w strukturze RNA, takie jak rejony bogate w nukleotydy adeninowe i uracylowe, rejony homologiczne lub komplementarne, zdolne do tworzenia heterodupleksów czy sekwencje promotorowe. Pewne struktury mogą także hamować ten proces, jak to się dzieje u BMV w przypadku struktury typu spinki do włosów, umieszczonej w akceptorowym RNA pomiędzy pseudowzłami rejonu R (-)RNA2.

Dane o rekombinacji RNA, którymi obecnie dysponujemy wskazują, że jak dotąd nie doceniano znaczenia tego procesu. Może on odgrywać istotną rolę nie tylko



w świecie wirusów typu RNA, lecz także może wpływać na budowę i ekspresję genów u organizmów o genomie DNA. Pomimo, że rekombinacja DNA jest dość dobrze poznana, współczesna wiedza o zjawisku genetycznej rekombinacji RNA obejmuje zaledwie podstawowe jego aspekty, stanowiąc swego rodzaju „wierzchołek góry lodowej”. Szczegóły mechanizmu i zakres oddziaływania rekombinacji RNA na kształt populacji i cykl życiowy wirusów RNA pozostaje w dużej mierze kwestią spekulacji i wymaga podjęcia dalszych badań.



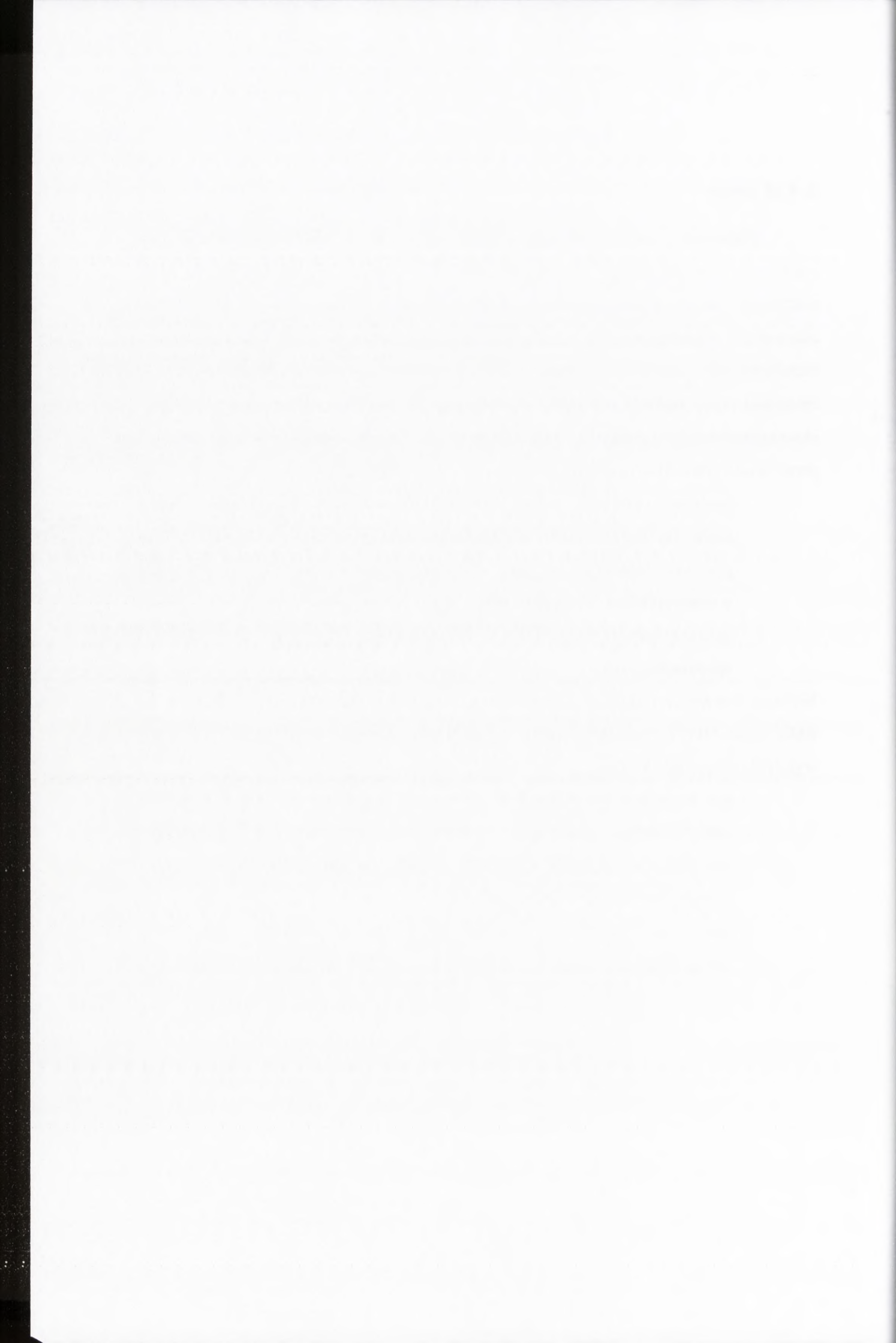
## 2. Cel pracy

Większość dotychczasowych badań rekombinacji RNA prowadzono w systemach doświadczalnych *in vitro* lub *in vivo*, w których presja selekcyjna silnie oddziałuje na akumulację rekombinantów. Układy te umożliwiają stwierdzenie aktywności rekombinacyjnej badanych elementów, natomiast nie dają możliwości określenia roli, jaką pełni rekombinacja w warunkach naturalnych. Przedstawione w niniejszej pracy badania rekombinacji homologicznej prowadzono z wykorzystaniem eksperymentalnego systemu bromowirusowego, w którym zminimalizowano czynnik presji selekcyjnej. Miały one na celu:

- poznanie częstości, z jaką zachodzi homologiczna rekombinacja RNA pomiędzy tymi samymi cząsteczkami genomowymi wirusa BMV, oraz poznania udziału tego procesu w kształtowaniu i ewolucji genomów wirusowych zbudowanych z RNA,
- poszukiwanie rejonów RNA BMV, aktywnych w procesie homologicznej rekombinacji RNA.

Wybrane sekwencje rekombinacyjnie aktywne z dwóch niespokrewnionych wirusów BMV oraz HIV-1 poddano analizie w systemie eksperymentalnym *in vitro*, aby wyjaśnić następujące kwestie:

- czy istnieją w strukturze RNA uniwersalne motywy indukujące przeskok rekombinacyjny enzymów replikacyjnych, czy też każdy wirusowy kompleks replikacyjny w sposób specyficzny rozpoznaje rejon RNA w którym może dojść do przeskoku,
- jaki jest mechanizm molekularny homologicznych przeskoczków rekombinacyjnych i jakie z elementy decydują o ich lokalizacji i częstości.



### 3. Materiały i metody

#### 3.1. Materiały

##### 3.1.1. Enzymy

- a) polimeraza DNA *Taq* (5U/μl), producent Fermentas
- b) inhibitor RNaz *Rnasin* (40U/ μl), ligaza DNA *T<sub>4</sub>* (20U/ μl), ligaza RNA *T<sub>4</sub>*, kinaza polinukleotydowa *T<sub>4</sub>*, polimeraza DNA *Pfu* (3 U/ μl), polimeraza RNA *T<sub>7</sub>* (20U/ μl), odwrotna transkryptaza *MMLV* (200U/ μl), DNaza *RQ1* (1U/ μl), enzymy restrykcyjne: *BamHI*, *BsaMI*, *BstBI*, *BstEII*, *DpnI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *KpnI*, *NcoI*, *NsiI*, *PflMI*, *PstI*, *SpeI*, *StuI* (wszystkie restryktazy 10U/ μl), producent Promega
- c) odwrotna transkryptaza HIV-1, otrzymana przez dr Annę Kurzyńską-Kokorniak w Zespole Wirusologii Molekularnej IChB PAN

##### 3.1.2. Izotopy

- a) dCTP [ $\alpha$  32P] 3000 Ci/mmol, CTP [ $\alpha$  32P] 3000 Ci/mol, producent ICN
- b) CTP [ $\alpha$  32P] 3000 Ci/mmol, CTP [ $\alpha$  32P] 3000 Ci/mol, producent ICN

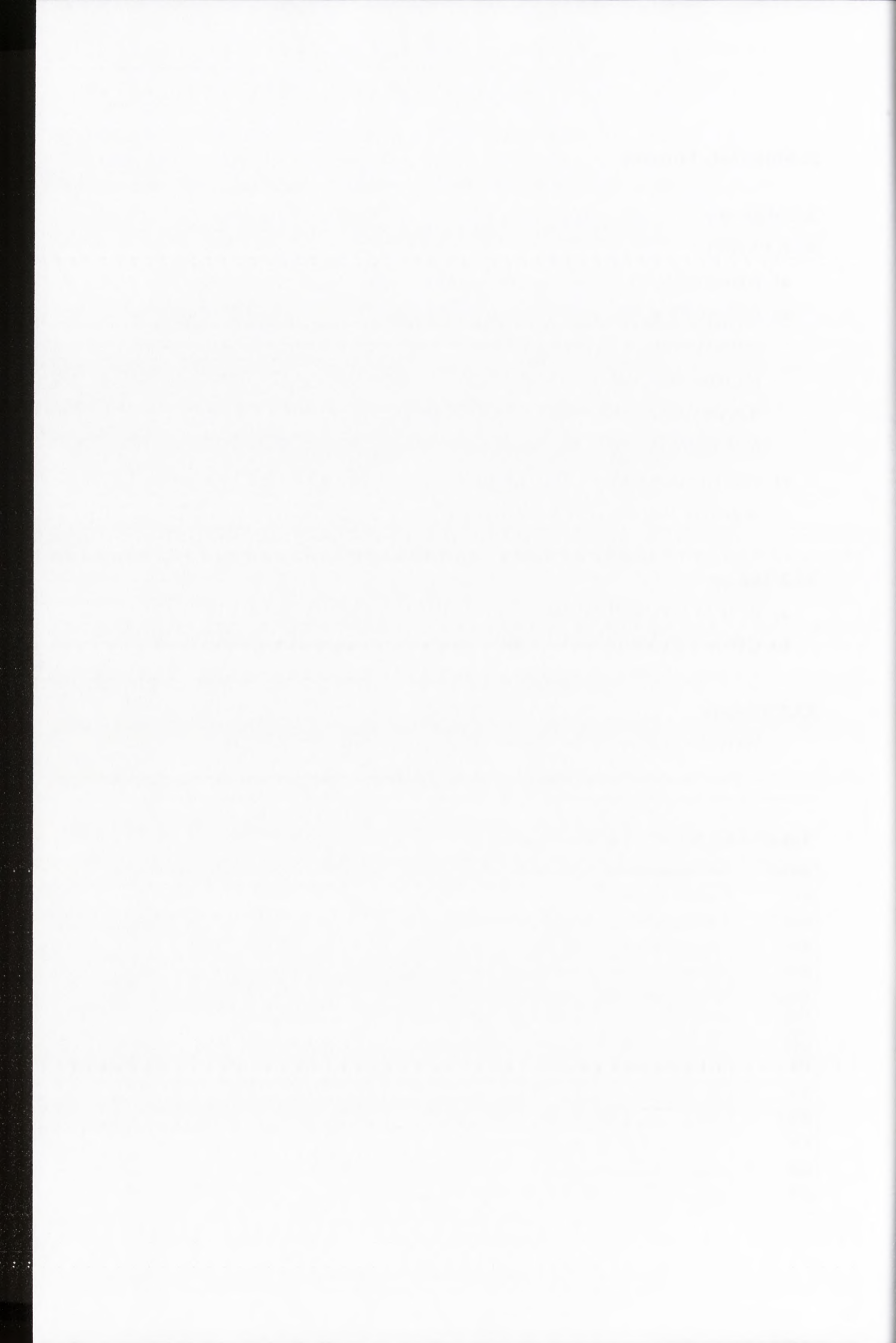
##### 3.1.3. Startery

Wszystkie startery zsyntetyzowane zostały przez firmy ARK lub IBB.

**Tabela 3.1.1. Startery i oligonukleotydy**

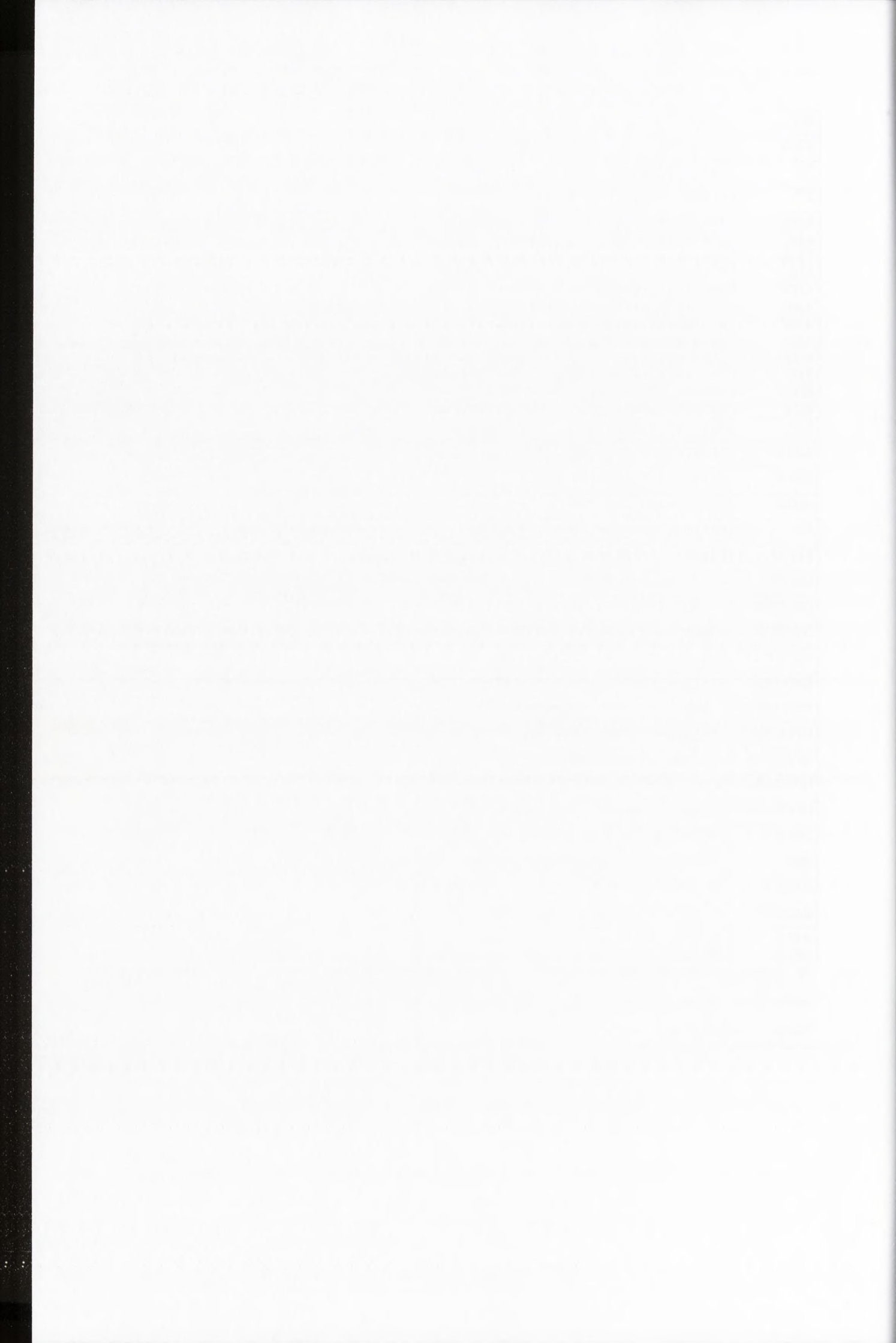
starter	sekwencja zapisana w kierunku 5' → 3'	miejsce restr.
R2A	catgcctgcaggctcgac	<i>PstI</i>
R2B	ttttcgaagacatcttggggatccctagaaag	<i>BstBI</i> , <i>BamHI</i>
R2G	ggaggcctaacgtcagttgatgc	<i>StuI</i>
R2H	caccgcattctaagacttgctatgcaagcccatgcaggatccccctaagg	<i>BsaMI</i> , <i>BamHI</i>
AN1a/ AN1b	ggttcaatcccttttcgaaacacggttctgctac gtagcagaaccgtgttcgaaaaggatgaacc	<i>BstBI</i>
AN7/ AN8	ggagagccctgttcgaaagtaggaacgttgtgg ccacaacgttctacttcgaaacagggtctctcc	<i>BstBI</i>
I39	gtaaaccacggaacgaggttc	-
Ko5	gggatgatgatttcgttcgc	-
R2B2	gaaccatttgttgacggtgtcgcaaatggatccc	<i>PflMI</i> , <i>BamHI</i>
R2C	ttccatggactttgataggatccctagaaag	<i>NcoI</i> , <i>BamHI</i>
R2D	ctggtaccgacataaatcagtc	<i>KpnI</i>
R2E	tgacgcgtttacatatttcggtaataactctgggtcaccatggc	<i>MluI</i> , <i>BstEII</i>





R2F	gggagctccttagtactacag	<i>SacI</i>
R2G2	ggaggcctaacgtcagttgatgcatg	<i>NsiI</i> , <i>BsaMI</i>
1 <sup>st</sup>	cagtgaattctggctcttttagagatttacag	<i>EcoRI</i>
2 <sup>nd</sup>	ctgaagcagtgctgctaaggcggtcp	-
ANB/ ANC	gaaaatcaacgttcgaaataagctctctattg caatagagagcttatttcgaacgttgattttc	<i>BstBI</i>
R1A/ R1B	gtgccgatgcaagagatcttgcaagaagcgatg catcgctttcttgcaagatctttcgcatgcgccac	<i>BglII</i>
AN3/ AN4	cactgtgtatggttcgaagacatatctaag cttagatatgtcttcgaaccatacacagtg	<i>BstBI</i>
AN5/ AN6	ccgtatgggagaagatcttaattgtgacggcg cgccgtcacaattgagatcttctcccatacgg	<i>BglII</i>
R1E/ R1F	gtttctgactcgtcttctcgaacgttgaagaatttg caaattcttcaacgttcgaaagacgagtcagaaac	<i>BstBI</i>
R1G/ R1H	cggcgagctcgtcggagatctgatctttaaatttg cacaattaaagatcagatctccagcgagctcgccg	<i>BglII</i>
I19	cggtcactattgaagagc	-
AN1.3	gtagtacgcgtactgcatgc	-
AN4.1	caaacgtgatatcggtacag	-
seq3.2	ggactcagggctcaactc	-
T <sub>7</sub>	taatacgactcactatagg	-
HIVA3	gaagcactcaaggcaagcttc	-
HIVD3	ctagttaccagagtcacacaacagacgggcacacactacttg	-
HIV3REC	atctgcagctagttaccagagtcacacaacag	<i>PstI</i>
HIV5REC	atgaattcgggagagctgctttttgctg	<i>EcoRI</i>
MB3RNA3	atgaattcgttgtgctcgagttg	<i>EcoRI</i>
BMV3REC	atctgcagtggtctcttttagagatttacagtg	<i>PstI</i>
BMV5REC	atgaattcgggagaagttgagcacgtaagg	<i>EcoRI</i>
HIVA5Spe	atactagtggtctctctggttagatcagat	<i>SpeI</i>
HIVA3Spe	atactagtgaagcactcaaggcaagcttc	<i>SpeI</i>
HIVD5Mlu	atacgcgtggtctctctggttagaccagat	<i>MluI</i>
HIVD3Eco	atgatatcgaagcactcaaggcaagcttc	<i>EcoRV</i>
MP1T <sub>7</sub>	taatacgactcactataggtaaaataccaactaattctcg	-
MP2	tttttttttttttttttttttaataaactcag	-
RADIO2	gctggacttctctgtgtccagtc	-
RADIO1T <sub>7</sub>	taatacgactcactatagggaatttgaaccaaacgagacgc	-
BB7.3	gttgagcttccgaccggtacgcataaattttaa	-
BB7.4	gttaaaatttatgcgtaccggtcggagactgcaac	-

W starterach użytych do miejscowo-specyficznego mutagenyzy markerowe miejsca restrykcyjne podkreślono, nukleotydy wprowadzające substytucje wytłuszczono a promotor T<sub>7</sub> zaznaczono kursywą. Startery komplementarne umieszczono w tych samych wierszach tabeli.



### 3.1.4. Plazmidy

#### a) plazmidy pB1TP3, pB2TP5 oraz pB3TP7

Zawierają one cDNA genomowych cząsteczek RNA1, RNA2 i RNA3 wirusa mozaiki stokłosy. Służą do otrzymania infekcyjnych transkryptów BMV typu dzikiego (dokładny opis zamieszczono w pracy: pt. „*High efficiency T<sub>7</sub> polymerase synthesis of infectious RNA from cloned brome mosaic virus cDNA and effects of 5' extensions on the transcripts infectivity*”, Janda M., French R., Alquist P, 1987, *Virology* 158: 259-262). cDNA odpowiadający wirusowemu RNA poprzedzony jest poprzedzony sekwencją promotorową rozpoznawaną przez polimerazę RNA *T<sub>7</sub>*, natomiast na końcu 3' cDNA znajduje się miejsce restrykcyjne rozpoznawane przez endonukleazę *EcoRI*, umożliwiające zliniowanie plazmidu w celu otrzymania prawidłowego końca 3' wirusowego RNA podczas transkrypcji *in vitro*. Plazmidy zawierają gen  $\beta$ -laktamazy, umożliwiający wzrost transformowanym nimi komórkom bakteryjnym w warunkach selekcji antybiotykowej (plazmid nadaje bakteriom zdolność hydrolizowania antybiotyków z grupy  $\beta$ -laktamów, np. na ampicyliny). Plazmidy otrzymano do prof. Józefa J. Bujarskiego z Plant Molecular Biology Center and the Department of Biological Sciences, Northern Illinois University, USA.

#### b) plazmidy serii pM-RNA2 (pM1-RNA2, pM2-RNA2, pM34-RNA2, pM5-RNA2, pM6-RNA2, pM1345-RNA2)

Plazmidy skonstruowano na bazie plazmidu pB2TP5, zawierają one zmutowany cDNA RNA2 wirusa mozaiki stokłosy, poprzedzony sekwencją promotorową rozpoznawaną przez polimerazę RNA *T<sub>7</sub>*. Służą do otrzymania transkryptów RNA2 BMV z mutacjami markerowymi. W plazmidach obecny jest gen  $\beta$ -laktamazy.

#### c) plazmidy serii pO-RNA1 (pO1-RNA1, pO2-RNA1, pO3-RNA1, pO4-RNA1, pO5-RNA1, pO6-RNA1, pO7-RNA1, pO8-RNA)

Plazmidy skonstruowano na bazie plazmidu pB1TP3, zawierają one zmutowany cDNA RNA1 wirusa mozaiki stokłosy, poprzedzony sekwencją promotorową rozpoznawaną przez polimerazę RNA *T<sub>7</sub>*. Służą do otrzymania transkryptów RNA2 BMV z mutacjami markerowymi. W plazmidach obecny jest gen  $\beta$ -laktamazy

The first part of the document deals with the general situation in the country and the progress of the revolution. It is a comprehensive overview of the current state of affairs, covering various aspects of the political and social landscape. The author discusses the challenges faced by the revolution and the strategies being employed to overcome them. The text is written in a clear and concise style, providing a detailed account of the events and the thoughts of the author. The second part of the document is a collection of letters and speeches, which provide a more personal and direct view of the author's thoughts and feelings. These documents are interspersed with the main text, providing a rich and varied perspective on the revolution. The letters and speeches are written in a more informal and passionate style, reflecting the author's deep involvement in the struggle. The overall tone of the document is one of optimism and determination, as the author expresses confidence in the success of the revolution and the future of the country.

The third part of the document is a collection of reports and documents, which provide a more formal and official view of the revolution. These documents are written in a more structured and professional style, reflecting the author's role as a leader and organizer. The reports and documents provide a detailed and systematic account of the progress of the revolution, covering various aspects of the political and social landscape. The author discusses the achievements of the revolution and the challenges that remain to be overcome. The text is written in a clear and concise style, providing a detailed and systematic account of the events and the thoughts of the author. The overall tone of the document is one of optimism and determination, as the author expresses confidence in the success of the revolution and the future of the country.

**d) plazmid pHIVRSd**

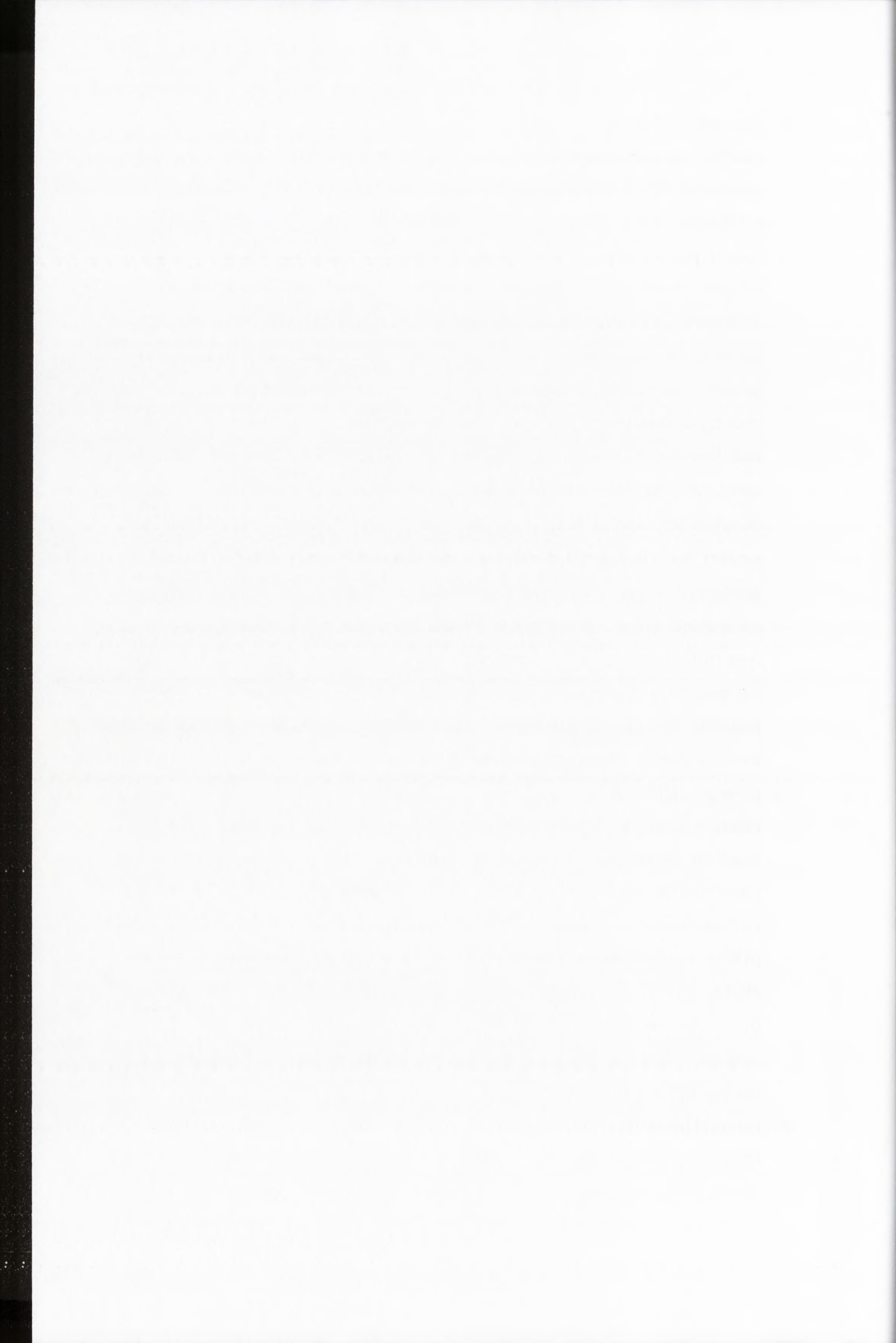
Plazmid zawiera fragment cDNA 5'-LTR (*long terminal repeats*) genomowej cząsteczki HIV-1 poprzedzony sekwencją promotorową rozpoznawaną przez polimerazę RNA *T*<sub>7</sub>. Służy do otrzymania matryc (produktów PCR) do transkrypcji *in vitro*. Jest to plazmid typu pUC19 z wligowanym pomiędzy miejsca *EcoRI* i *PstI* fragmentem sekwencji cDNA HIV-1 obejmującym nukleotydy +1/+157 (licząc od miejsca startu transkrypcji na wirusowym mRNA). W plazmidzie pUC19 obecny jest gen  $\beta$ -laktamazy, oraz gen  $\beta$ -galaktozydazy (*lacZ*), umożliwiające zastosowanie metody selekcyjnej opartej na insercyjnej inaktywacji genu (tzw. *blue-white screening*). Gen *lacZ* znajduje się pod kontrolą promotora *lac*. Dodanie do pożywki, na której hodowane są transformowane tym plazmidem bakterie, induktora w postaci IPTG, aktywuje ekspresję genu *lacZ*. Powstający w komórkach enzym ( $\beta$ -galaktozydaza) rozkłada zawarty w pożywce syntetyczny substrat 5-bromo-4-chloro-3-indoilo- $\beta$ -galaktozyd (*X-gal*), co prowadzi do powstania charakterystycznego niebieskiego zabarwienia kolonii bakteryjnych. Ponieważ miejsce klonowania w wektorach typu pUC19 znajduje się w obrębie genu *lacZ*, plazmid z wligowanym insertem nie umożliwia ekspresji  $\beta$ -galaktozydazy, *X-gal* nie jest rozkładany i na szalkach powstają białe kolonie bakteryjne. Plazmid został otrzymany przez dr Magdalenę Brodę w Pracowni Chemii i Biochemii RNA IchB PAN.

**e) plazmid pHIVRSa**

Plazmid zawiera fragment cDNA 5'-LTR genomowej cząsteczki HIV-1 z czterema markerowymi substytucjami nukleotydowymi poprzedzony sekwencją promotorową rozpoznawaną przez +157 (polimerazę RNA *T*<sub>7</sub>). Służy do otrzymania matryc (produktów PCR) do transkrypcji *in vitro*. Jest to plazmid typu pUC19 z wligowanym pomiędzy miejsca *EcoRI* i *PstI* fragmentem sekwencji cDNA HIV-1 obejmującym nukleotydy -20/+96 (licząc od miejsca startu transkrypcji na wirusowym mRNA). W plazmidzie obecne są geny  $\beta$ -laktamazy oraz *lacZ*. Został on otrzymany przez dr Magdalenę Brodę w Pracowni Chemii i Biochemii RNA IchB PAN.

**f) plazmid pBMVRd**

Plazmid zawiera fragment cDNA genomowej cząsteczki RNA2 BMV poprzedzony sekwencją promotorową rozpoznawaną przez polimerazę RNA *T*<sub>7</sub>.



Służy do otrzymania matryc (produktów PCR) do transkrypcji *in vitro*. Jest to plazmid typu pUC19 z wligowanym pomiędzy miejsca *EcoRI* i *PstI* fragmentem sekwencji cDNA RNA2 BMV obejmującym nukleotydy +2640/+2865 (licząc od miejsca startu transkrypcji na wirusowym mRNA). W plazmidzie obecne są geny  $\beta$ -laktamazy oraz *lacZ*. Został on otrzymany przez dr Magdalenę Brodę w Pracowni Chemii i Biochemii RNA IchB PAN.

**g) plazmid pBMVRa**

Plazmid zawiera fragment cDNA genomowej cząsteczki RNA3 BMV poprzedzony sekwencją promotorową rozpoznawaną przez polimerazę RNA *T*<sub>7</sub>. Służy do otrzymania matryc (produktów PCR) do transkrypcji *in vitro*. Jest to plazmid typu pUC19 z wligowanym pomiędzy miejsca *EcoRI* i *PstI* fragmentem sekwencji cDNA RNA3 BMV obejmującym nukleotydy +1763/+1961 (licząc od miejsca startu transkrypcji na wirusowym mRNA). W plazmidzie obecne są geny  $\beta$ -laktamazy oraz *lacZ*. Został on otrzymany przez dr Magdalenę Brodę w Pracowni Chemii i Biochemii RNA IchB PAN.

**h) plazmid pMat0-RNA3**

Plazmid skonstruowano na bazie plazmidu pB3TP7. Jest to tzw. wektor rekombinacyjny, zawierający zmutowany cDNA RNA3 wirusa mozaiki stokłosy poprzedzony sekwencją promotorową rozpoznawaną przez polimerazę RNA *T*<sub>7</sub>. Posłużył on do otrzymania plazmidu pMat-HIV-H-RNA3. cDNA RNA3 pMat0-RNA3. Zawiera szereg mutacji umożliwiających badanie procesu rekombinacji RNA. Modyfikacje te umiejscowione są w rejonie 3'UTR RNA3 i obejmują (w kierunku 5'→3'): miejsce klonowania 5'RAS (5' *recombination active site*) zawierające miejsce restrykcyjne *SpeI* i 198-nukleotydową sekwencję 3'UTR RNA3 CCMV (*cowpea chlorotic mottle virus*), miejsce klonowania 3'RAS (3' *recombination active site*) zawierające miejsca restrykcyjne *KpnI*, *MluI*, *BamHI* i *EcoRV* oraz 3'-końcową sekwencję RNA1 BMV obejmującą ostatnie 295 nukleotydów tej cząsteczki, zawierającą mutację markerową  $\Delta$ Xho. W plazmidzie obecny jest gen  $\beta$ -laktamazy. Został on otrzymany przez dr Magdalenę Alejską oraz inż. Nelli Malinowską w Zespole Wirusologii Molekularnej IchB PAN.

**i) plazmid pMAT-HIVH-RNA3**

Plazmid skonstruowano na bazie plazmidu pMat0-RNA3. Zawiera on dwie kopie cDNA rejonu R HIV-1 w miejscach klonowania 3' i 5' RAS. Służy do otrzymania



The first part of the report deals with the general situation of the country and the progress of the work done during the year. It also contains a list of the names of the members of the committee and the names of the persons who have been appointed to various positions.

The second part of the report deals with the work done during the year. It contains a list of the names of the persons who have been appointed to various positions and a list of the names of the persons who have been appointed to various positions.

The third part of the report deals with the work done during the year. It contains a list of the names of the persons who have been appointed to various positions and a list of the names of the persons who have been appointed to various positions.

The fourth part of the report deals with the work done during the year. It contains a list of the names of the persons who have been appointed to various positions and a list of the names of the persons who have been appointed to various positions.

The fifth part of the report deals with the work done during the year. It contains a list of the names of the persons who have been appointed to various positions and a list of the names of the persons who have been appointed to various positions.

infekcyjnych transkryptów Mat-HIV-H-RNA3. W plazmidzie obecny jest gen  $\beta$ -laktamazy. Został on otrzymany przez dr Magdalenę Alejską oraz inż. Nelli Malinowską w Zespole Wirusologii Molekularnej IchB PAN.

**j) plazmid pSON5'RNA3**

Plazmid skonstruowano na bazie plazmidu pUC19. Zawiera on fragment cDNA odpowiadający RNA3 BMV pomiędzy nukleotydami 1 - 100, poprzedzony sekwencją promotorową rozpoznawaną przez polimerazę RNA  $T_7$ . Służy do otrzymania sondy komplementarnej do końca 5' RNA3 i RNA5 BMV. W plazmidzie obecne są geny  $\beta$ -laktamazy oraz gen *lacZ*. Został on otrzymany przez dr Rafała Wierzchosławskiego w Plant Molecular Biology Center and the Department of Biological Sciences, Northern Illinois University, USA.

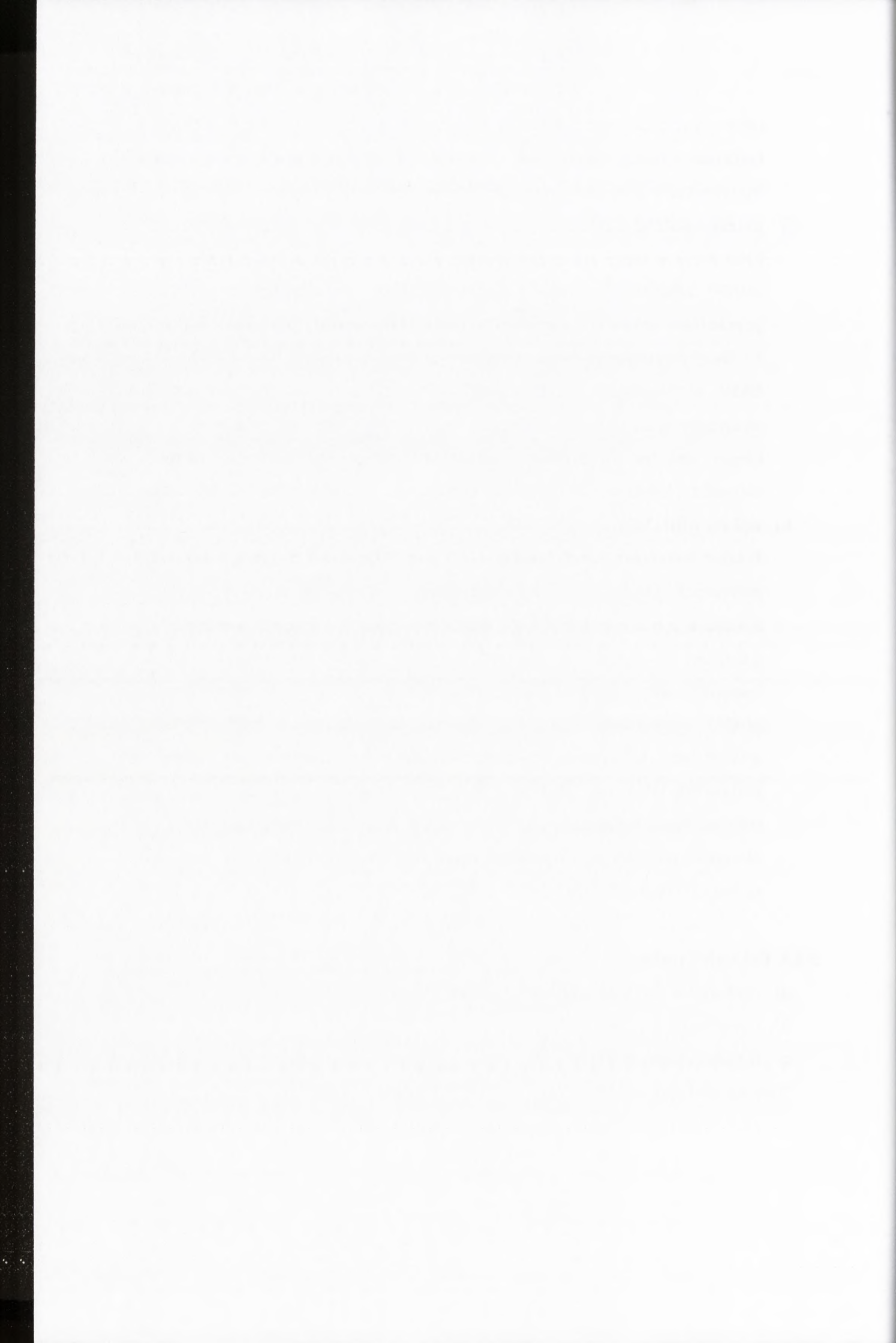
**k) wektor pDRIVE firmy QIAGEN**

Wektor umożliwia ligację produktów reakcji PCR prowadzonej z użyciem polimerazy DNA *Taq* (lub z użyciem innych polimeraz DNA, nie posiadających aktywności 3'→5' egzonukleazowej, dodających pojedyncze adenylany do końców 3' syntetyzowanych produktów), bez uprzedniego trawienia restrykcyjnego produktu PCR. Wektor ten jest liniową pochodną pUC19, zawierającą specjalnie przygotowane końce z pojedynczymi urydylanami, komplementarnymi do końcowych adenylanów produktów polimerazy DNA *Taq*. W bezpośrednim sąsiedztwie obu końców wektora (miejsca ligacji) znajdują się dwa miejsca restrykcyjne *EcoRI*, umożliwiające określenie długości insertu metodą analizy restrykcyjnej. W wektorze obecne są geny  $\beta$ -laktamazy oraz *lacZ*.

### 3.1.5. Bakterie i rośliny

- a) *Escherichia coli* szczep DH5 $\alpha$ , producent Gibco BRL
- b) *Chenopodium quinoa*
- c) *Hordeum sativum* odmiana *Wisconsin*

Nasiona roślin pochodziły z Northern Illinois University, USA



### 3.1.6. Gotowe zestawy do badań biochemicznych

- a) zestaw do transkrypcji *in vitro* T7-MEGAscript™, producent AMBION
- b) zestaw do sekwencjonowania ABI PRISM® Big Dye™ Terminator Ready Reaction Cycle Sequencing Kit, producent ABI-PRISM
- c) zestaw klonowania produktów PCR QIAGEN PCR Cloning Kit, zawierający wektor pDRIVE, producent QIAGEN
- d) zestawy do oczyszczania DNA: PCR Purification Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, Plasmid Maxi Kit, producent QIAGEN

### 3.1.7. Pozostałe odczynniki

Pozostałe odczynniki pochodziły z firm Sigma, Promega, Fermentas lub Prona i były to:

agarozą, akrylamid, N,N'-metyleno-bis-akryloamid, pepton, trypton, wyciąg drożdżowy, bacto-agar, IPTG, X-Gal, membrana Hbond-R+ i Whatmann paper, DNA ze spermy śledzia, cytrynian sodu ( $C_5H_5O_7Na_3$ ), BSA, ficoll, poliwinylpyrrolidon (PVP), dekstroza, glicyna, etanol, izopropanol, fenol, chloroform, ampicylina, dodecylosiarczan sodu (SDS), glikol polietylenowy (PEG, przeciętna masa cząsteczkowa 8000), kwas etylenodwuaminotetraoctowy (EDTA), dwutiotreitol (DTT), chlorek sodu (NaCl), Tris, kwaśny fosforan potasu ( $K_2HPO_4$ ), wodorotlenek sodu (NaOH), octan amonu ( $CH_3COONa$ ), octan sodu ( $CH_3COONa$ ), kwas borowy ( $H_2BO_3$ ), chlorek magnezu ( $MgCl_2$ ), 5'-trójfosforany deoksyrybonukleozydowe (dNTPs), 5'-trójfosforany rybonukleozydowe (NTPs), kap ( $m^7GpppG$ ).

### 3.1.8. Roztwory

a) roztwory do minipreparacji plazmidowego DNA metodą lizy w warunkach alkalicznych:

- roztwór ALM1

50mM dekstroza

10mM EDTA

25mM Tris

- roztwór ALM2 (świeżo przygotowany)

1% SDS

0,2M NaOH

1. The first part of the report...

2. The second part of the report...

3. The third part of the report...

4. The fourth part of the report...

5. The fifth part of the report...

6. The sixth part of the report...

7. The seventh part of the report...

8. The eighth part of the report...

9. The ninth part of the report...

10. The tenth part of the report...

11. The eleventh part of the report...

12. The twelfth part of the report...

13. The thirteenth part of the report...

14. The fourteenth part of the report...

15. The fifteenth part of the report...

16. The sixteenth part of the report...

17. The seventeenth part of the report...

18. The eighteenth part of the report...

19. The nineteenth part of the report...

20. The twentieth part of the report...

21. The twenty-first part of the report...

22. The twenty-second part of the report...

23. The twenty-third part of the report...

24. The twenty-fourth part of the report...

25. The twenty-fifth part of the report...

26. The twenty-sixth part of the report...

27. The twenty-seventh part of the report...

28. The twenty-eighth part of the report...

29. The twenty-ninth part of the report...

30. The thirtieth part of the report...

31. The thirty-first part of the report...

b) roztwór do wybarwiania kwasów nukleinowych po elektroforezie w żelu agarozowym - bromek etydyny (roztwór wodny 0,5µg/ml)

a) roztwór X-gal (0,5mg/ml) w dimetyloformamidzie (DMF)

b) wodny roztwór IPTG (1M lub 0,1M)

c) wodny roztwór ampicyliny (0,1g/ml)

d) roztwory używane podczas analizy *northern blot*:

- 20xSSC

3M NaCl

0,3M C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Na<sub>3</sub>

- roztwór Denharta

2%BSA

2% Fikoll

2%PVP

- RP1

2xSSC

0,1%SDS

- RP2

1xSSC

0,1%SDS

- RP3

0,1xSSC

0,1%SDS

### 3.1.9. Bufory

a) bufor do odwrotnej transkrypcji:

50mM Tris-HCl, pH 8,3

75mM KCl

3mM MgCl<sub>2</sub>

10mM DTT

b) bufor do elektroforezy kwasów nukleinowych (TBE)

100mM Tris-HCl pH 8.3

100mM kwas borowy

1mM EDTA



**c) bufor 5x do inokulacji roślin**

50mM glicyna  
30mM  $K_2HPO_4$   
0,1% bentonit  
0,1% celit  
ustalono pH 9,2

**d) bufor 10x do ekstrakcji całkowitego RNA z roślin**

1M glicyna  
1M NaCl  
0,1M EDTA  
ustalono pH 9,0

**e) bufor 1x do ekstrakcji całkowitego RNA z roślin**

1x bufor 10x do ekstrakcji całkowitego RNA z roślin  
10% SDS  
8ml  $H_2O$

**f) bufor do ekstrakcji wirusa z roślin**

0,5 M octan sodu  
0,3 M kwas borny  
0,01 M chlorek magnezu

**g) bufor do ekstrakcji wirusowego RNA z wirusa**

0,5 M glicyna  
0,5 M chlorek sodu  
0,1 M EDTA  
ustalono pH 9.0

**h) bufor do przechowywania wirusa**

0,05 M octan sodu  
0,01 M kwas octowy  
1 mM  $Na_2EDTA$   
1 mM chlorek magnezu

**i) bufor ekstrakcyjny do zarodków jęczmienia, pH 7,6**

10 mM Tris/ $CH_3COOH$   
3nM  $Mg(CH_3COO)_2$   
50mM  $KCH_3COO$   
1mM DTT





**j) bufory do rozdzielania elektroforetycznego**

- barwnik do rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych w żelu agarozowym, w warunkach natywnych (6x)

100µl 1M Tris-HCl, pH 7,5 ( $C_k=10\text{mM}$ )

186mg EDTA ( $C_k=50\text{mM}$ )

1g Ficoll 400 ( $C_k=10\%$ )

25mg błękitu bromofenolowego ( $C_k=0,25\%$ )

25mg cyjanolu ksylenowego ( $C_k=0,25\%$ )

dopełniono  $\text{H}_2\text{O}$  do 10ml

- barwnik do rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych w żelu poliakryloamidowym, w warunkach denaturujących

0,05% błękit bromofenolowy i/lub 0,05% cyjanol ksylenowy

7M mocznik

**3.1.10. Pożywki****a) pożywka płynna LB**

10g Bacto<sup>®</sup>-tryptonu

5g wyciągu drożdżowego

10g NaCl

Dopełniono  $\text{H}_2\text{O}$  do 1000ml i sterylizowano przez autoklawowanie.

**b) pożywka płynna LB z ampicyliną (0,2mg/ml)**

Do 1l wysterylizowanej i schłodzonej poniżej 55°C pożywki LB dodano

2ml roztworu ampicyliny (0,1g/ml).

**c) pożywka stała z ampicyliną (0,2mg/ml)**

2g Bacto<sup>®</sup>-tryptonu

1,25g wyciągu drożdżowego

1,25g NaCl

3,75g bacto-agaru

Dopełniono  $\text{H}_2\text{O}$  do 250ml i sterylizowano przez autoklawowanie,

do roztworu o temperaturze poniżej 55°C dodano 0,5ml roztworu ampicyliny (0,1g/ml) i wylewano na szalki Petriego.

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

### 3.1.11. Żele

#### a) żele agarozowe

-1,0% żel agarozowy

0,45g agarozy rozpuszczano w 450ml buforu TBE

-1,5 % żel agarozowy

0,675 g agarozy rozpuszczano w 450ml buforu TBE

Mieszanki wylewano do aparatów do elektroforezy.

#### b) żele poliakrylamidowe do rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych

- 40% roztwór wodny bis-akrylamidu (29:1)

386,7g akrylamidu

13,3g N,N'-metyleno-bis-akrylamidu

dopełniono H<sub>2</sub>O do 1000ml

- 8% PAA, 7M mocznik

200ml 40% roztworu wodnego bis-akrylamidu

420g mocznika

100ml 10xTBE

dopełniono H<sub>2</sub>O do 1000ml

Roztwór bis-akrylamidu i mocznika dejonizowano 1 godzinę z wykorzystaniem 0,2V żywicy jonowymiennej AG<sup>®</sup> 501-X8 (Bio-Rad). Po przesączeniu roztworu przez bibułę, dodano 10xTBE i dopełniono H<sub>2</sub>O do 1000ml.

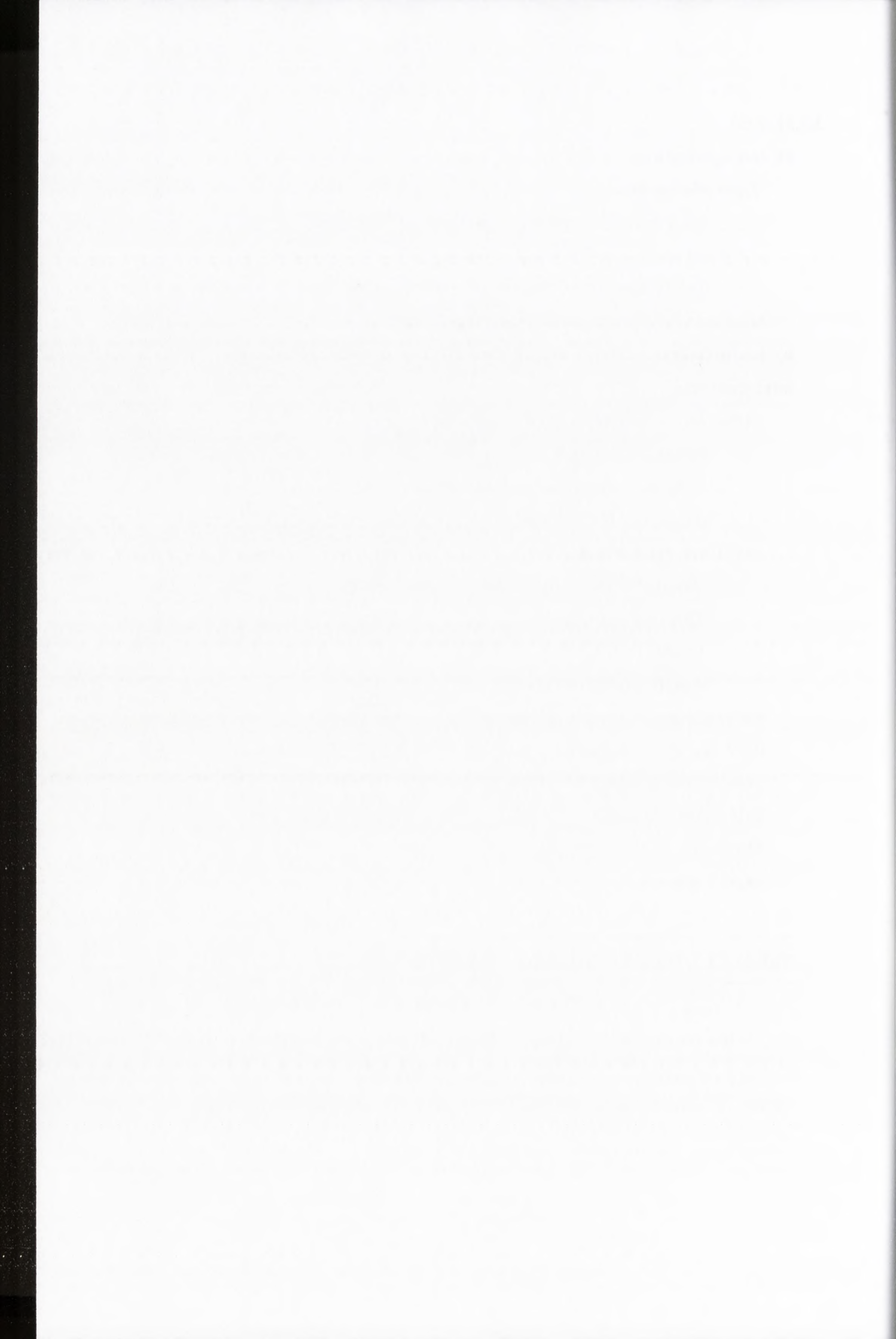
Żele poliakrylamidowe przygotowywano według schematu z tabeli 3.1.2.

Mieszanki wylewano między szyby i pozostawiano do polimeryzacji przez około 1 godzinę.

**Tabela 3.1.2. Otrzymywanie żeli poliakrylamidowych**

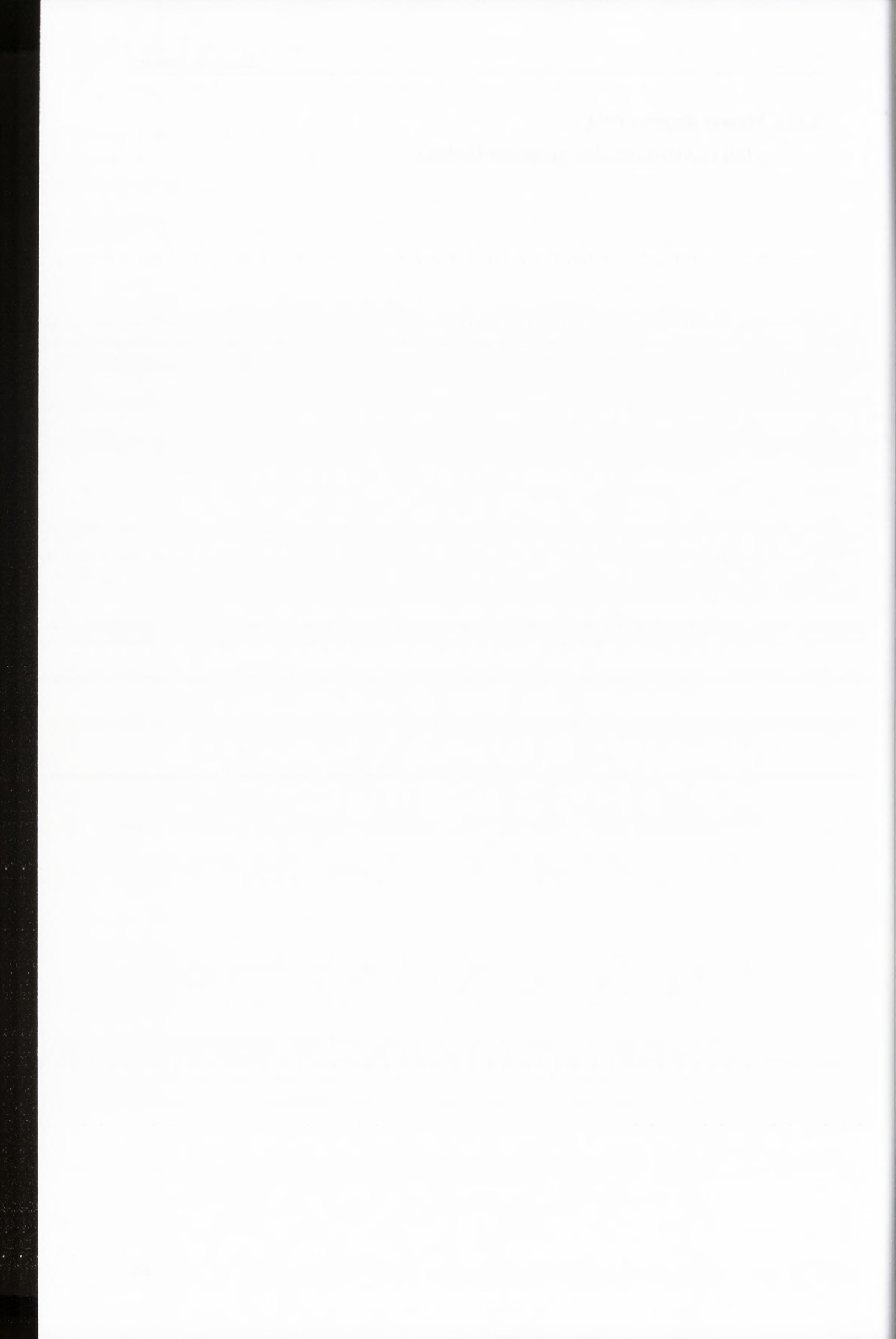
wymiary żelu [mm]	8% PAA*	APS	TEMED
180 x 195 x 1	45ml	450μl	12μl
400 x 325 x 0,5	95ml	900μl	27μl

\*PAA – roztwór poliakrylamidu w przypadku denaturujących żeli poliakrylamidowych zawierał 7M mocznik.



**3.1.12. Wzorce długości DNA**

- 1kB i 0,1kB (0,5mg/ml, producent SIGMA)



## 3.2. Metody

### 3.2.1. Metody stosowane podczas badań częstości homologicznych przeskoków rekombinacyjnych zachodzących pomiędzy genomowymi cząsteczkami RNA BMV

#### 3.2.1.1. Otrzymanie dwóch serii plazmidów (pM-RNA2 i pO-RNA1), zawierających cDNA BMV z mutacjami markerowymi, metodą miejscowo-specyficznej mutagenazy w oparciu o reakcję łańcuchowej polimeryzacji (*polymerase chain reaction* – PCR)

##### a) otrzymanie serii plazmidów pM-RNA2

###### - PCR

Do skonstruowania poszczególnych plazmidów używano matrycy pB2TP5 oraz następujących par starterów:

- R2A i R2B (otrzymanie plazmidu pM1-RNA2),
- R2A i R2B2 (otrzymanie plazmidu pM2-RNA2),
- R2C i R2D oraz R2E i R2F (otrzymanie plazmidu pM34-RNA2),
- R2G i R2H (otrzymanie plazmidu pM5-RNA2),
- R2G2 i 1<sup>st</sup> (otrzymanie plazmidu pM6-RNA2),
- R2A i R2B, R2C i R2D, R2E i R2F oraz R2G i R2H (otrzymanie plazmidu pM1345-RNA2).

PCR prowadzono zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale.3.2.5.a.

###### - trawienie enzymami restrykcyjnymi otrzymanych produktów PCR oraz plazmidu pB2TP5

- produkt PCR z użyciem starterów R2A i R2B oraz plazmid pB2TP5 trawiono restryktazami *PstI* i *BstBI* (otrzymanie plazmidu pM1-RNA2),
- produkt PCR z użyciem starterów R2A i R2B2 oraz plazmid pB2TP5 trawiono restryktazami *PstI* i *PflMI* (otrzymanie plazmidu pM2-RNA2),
- produkt PCR z użyciem starterów R2C i R2D oraz plazmid pB2TP5 trawiono restryktazami *NcoI* i *KpnI*, ligowano produkt PCR do plazmidu i klonowano (patrz niżej) a następnie otrzymany plazmid oraz produkt PCR ze starterami R2E i R2F trawiono restryktazami *MluI* i *SacI* (otrzymanie plazmidu pM34-RNA2),
- produkt PCR z użyciem starterów R2G i R2H oraz plazmid pB2TP5 trawiono restryktazami *StuI* i *BsaMI* (otrzymanie plazmidu pM5-RNA2),



The first part of the report deals with the general situation of the country and the progress of the work. It is followed by a detailed account of the work done during the year, and a summary of the results. The report concludes with a list of references and a list of names of the staff members who have worked on the project.

The second part of the report deals with the results of the work. It is divided into several sections, each dealing with a different aspect of the work. The first section deals with the results of the field work, and the second section deals with the results of the laboratory work. The third section deals with the results of the theoretical work, and the fourth section deals with the results of the practical work.

The third part of the report deals with the conclusions of the work. It is a summary of the main findings of the work, and a discussion of their significance. The report concludes with a list of references and a list of names of the staff members who have worked on the project.

- produkt PCR ze starterami R2G2 i 1<sup>st</sup> oraz plazmid pB2TP5 trawiono restryktazami *StuI* i *BsaMI* (otrzymanie plazmidu pM6-RNA2), R2A i R2B,
- otrzymany wcześniej plazmid pM34-RNA2 (powyżej) oraz produkt PCR z użyciem starterów R2A i R2B trawiono restryktazami *PstI* i *BstBI*, ligowano produkt PCR do plazmidu i klonowano (poniżej), a następnie otrzymany plazmid oraz produkt PCR ze starterami R2G i R2H trawiono restryktazami *StuI* i *BsaMI* (otrzymanie plazmidu pM1345RNA2).

Reakcje trawienia prowadzono zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale 3.2.6.a.

#### **- ligacja**

Produkty PCR oraz plazmidy pB2TP5 trawione tymi samymi enzymami restrykcyjnymi poddano ligacji.

Reakcję ligacji prowadzono w następującej mieszance reakcyjnej:

1μl 10x buforu do ligacji

0,1μg wektora

insert ( stosunek molowy wektor : insert wynosił 1:5)

1U ligazy DNA *T<sub>4</sub>*

uzupełniano H<sub>2</sub>O do 10μl

Do reakcji kontrolnej nie dodawano insertu. Mieszaninę reakcyjną inkubowano 12 godzin w temperaturze 16°C.

#### **b) otrzymanie serii plazmidów pO-RNA1 metodą PCR**

Do skonstruowania poszczególnych plazmidów używano matrycy pB1TP3 oraz następujących par starterów:

- AN1a/AN1b (otrzymanie plazmidu pO1-RNA1),
- ANB i ANC (otrzymanie plazmidu pO2-RNA1),
- R1A i R1B (otrzymanie plazmidu pO3-RNA1),
- AN3 i AN4 (otrzymanie plazmidu pO4-RNA1),
- AN5 i AN6 (otrzymanie plazmidu pO5-RNA1),
- R1E i R1F (otrzymanie plazmidu pO6-RNA1),
- AN7/AN8 (otrzymanie plazmidu pO7-RNA1),
- R1G i R1H (otrzymanie plazmidu pO8-RNA1).

Reakcję prowadzono zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale 3.2.5.b.

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records for all transactions. It emphasizes that proper record-keeping is essential for financial transparency and accountability.

In addition, the document outlines the various methods used to collect and analyze data. These methods include surveys, interviews, and focus groups, each designed to gather specific insights into the research objectives.

The second part of the document provides a detailed overview of the research methodology. It describes the selection of participants, the design of the study, and the procedures for data collection and analysis.

Furthermore, the document discusses the ethical considerations that must be taken into account during the research process. It highlights the need for informed consent and the protection of participants' privacy.

The third part of the document presents the results of the study. It includes a summary of the key findings and a discussion of their implications for the field of research.

Finally, the document concludes with a series of recommendations for future research. It suggests areas for further exploration and provides practical advice for researchers in the field.

The document is intended to serve as a comprehensive guide for researchers and practitioners alike. It provides a clear and concise overview of the research process, from the initial planning stages to the final reporting of results.

By following the guidelines outlined in this document, researchers can ensure that their studies are conducted in a rigorous and ethical manner. This will help to advance the field of research and provide valuable insights into the issues at hand.

The document is a valuable resource for anyone interested in research methodology. It provides a wealth of information and practical advice that can be applied to a wide range of research projects.

In conclusion, the document is a comprehensive and accessible guide to research methodology. It covers all the essential aspects of the research process, from the initial planning stages to the final reporting of results. It is a must-read for anyone involved in research.

c) transformacja produktów ligacji do komórek kompetentnych *E. coli* DH5 $\alpha$  (rozdział 3.2.7.a)

d) minipreparacja plazmidowego DNA (rozdział 3.2.7.c)

e) analiza otrzymanych plazmidów (sprawdzenie markerowych miejsc restrykcyjnych)

- **analiza restrykcyjna** - trawienie otrzymanych plazmidów zawierających markerowe miejsca restrykcyjne przy pomocy odpowiednich enzymów restrykcyjnych:

- plazmidy pM1-, pM2- i pM5-RNA2 trawiono enzymem *Bam*HI,
- plazmid pM34-RNA2 trawiono enzymem *Bst*EII,
- plazmid pM6-RNA2 trawiono enzymem *Nsi*I,
- plazmid pM1345-RNA2 trawiono enzymami *Bam*HI i *Bst*EII,
- plazmidy pO1-, pO2-, pO4-, pO6- i pO7-RNA1 trawiono enzymem *Bst*BI,
- plazmidy pO3-, pO5- i pO8-RNA1 trawiono enzymem *Bgl*III.

Reakcje trawienia prowadzono zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale 3.2.6.b.

- **sekwencjonowanie plazmidów w rejonie wprowadzonych mutacji markerowych** (rozdział 3.2.9.)

Aby potwierdzić obecność poszczególnych mutacji markerowych, używano następujących starterów:

- dla mutacji M1, M2, O1, O2 i O3 zastosowano starter 139,
- dla mutacji M3 zastosowano starter R2D,
- dla mutacji M4 zastosowano starter 139,
- dla mutacji M5, M6, O7 i O8 zastosowano starter 1<sup>st</sup>,
- dla mutacji O4 zastosowano starter AN4.1,
- dla mutacji O5 zastosowano starter R1E,
- dla mutacji O6 zastosowano starter seq3.2.

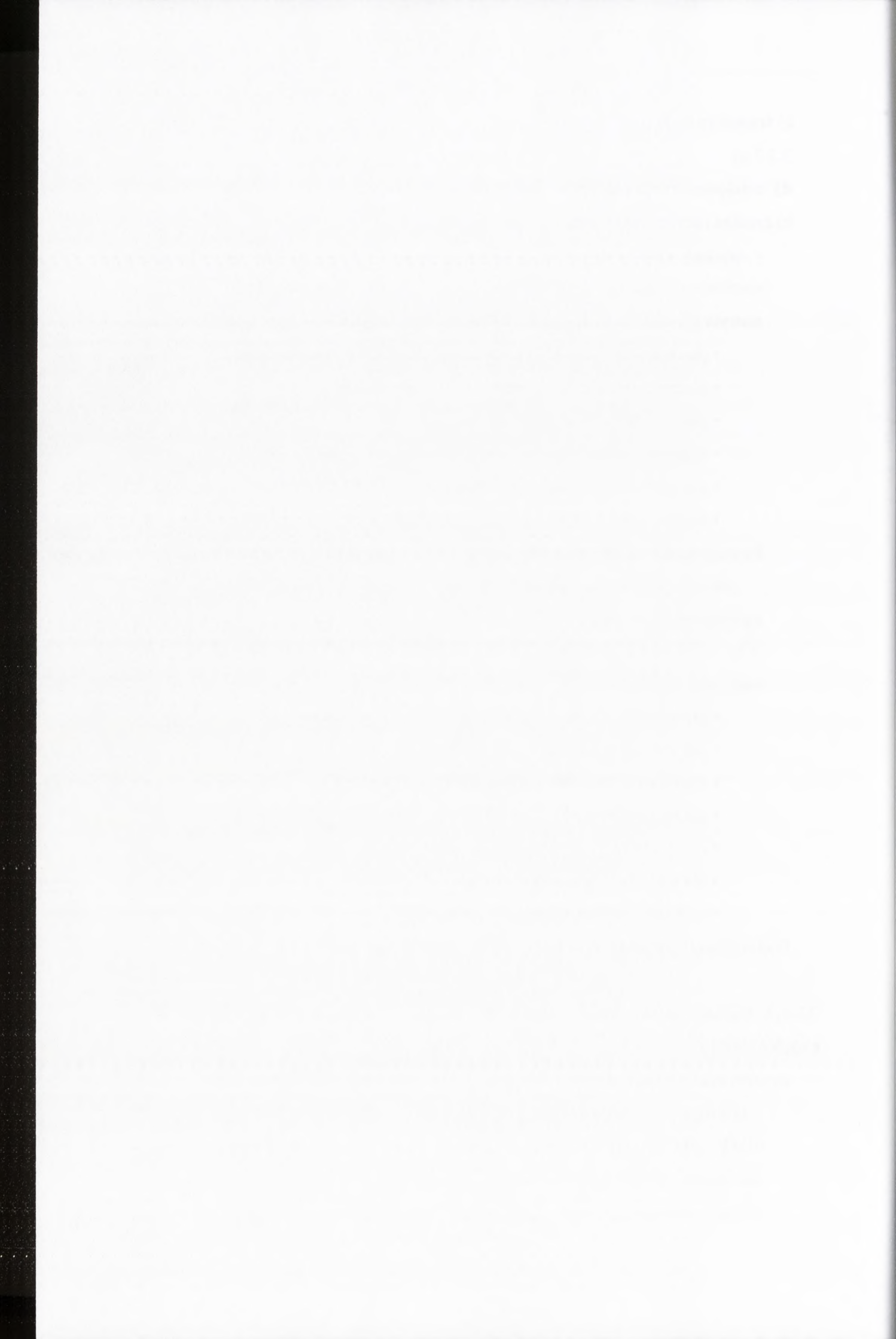
f) otrzymanie plazmidów w dużej skali (rozdział 3.2.7.a i b)

### 3.2.1.2. Badanie infekcyjności i stabilności mutantów wirusowych M-RNA2-BMV i O-RNA1-BMV.

a) otrzymanie genomowych cząsteczek BMV metodą transkrypcji *in vitro*

- liniowanie plazmidów zawierających cDNA genomowych cząsteczek RNA BMV (pB1TP3, pB2TP5, pB3TP7, oraz plazmidów serii pM-RNA2 i pO-RNA1) enzymem restrykcyjnym *Eco*RI

Reakcje trawienia prowadzono zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale 3.2.6.a.



**- transkrypcja *in vitro***

Reakcję prowadzono w następującej mieszance reakcyjnej:

10 $\mu$ l 5x buforu do transkrypcji

20U RNasin

10mM DTT

0,4mM ATP

0,4mM CTP

0,4mM UTP

0,08mM mM GTP

0,6mM m<sup>7</sup>GpppG

5-7 $\mu$ g matrycy DNA

10U polimerazy RNA T<sub>7</sub>

uzupełniano H<sub>2</sub>O do 50 $\mu$ l

- mieszaninę reakcyjną inkubowano 1,5 godziny w temperaturze 37°C,
- dodawano 2,5U RQ DNase i inkubowano 15 minut w temperaturze 37°C,
- otrzymany RNA oczyszczano (rozdział 3.2.8.b), a jego jakość sprawdzano metodą elektroforezy w 1% żelu agarozowym (rozdział 3.2.10.).

**b) inokulacja roślin**

Przed inokulacją rośliny *C. quinoa* pozostawiano na 6 godzin w ciemności, natomiast siewek *H. sativum* nie poddawano inkubacji.

Przygotowano mieszaninę inokulacyjną zawierającą:

40 $\mu$ l RNA1 (typu dzikiego lub jeden z mutantów)

40 $\mu$ l RNA2 (typu dzikiego lub jeden z mutantów)

40 $\mu$ l RNA3 (typu dzikiego)

40 $\mu$ l H<sub>2</sub>O

40 $\mu$ l 5x buforu inokulacyjnego

Na liście roślin nanoszono 15 $\mu$ l mieszaniny i wcierano ręcznie.

Zainokulowane rośliny lekko spryskiwano wodą, dodatkowo *C. quinoa* pozostawiano w ciemnym miejscu przez 12 godzin, po czym hodowano 2 tygodnie w szklarni w standardowych warunkach.

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

**Tabela 3.2.1. Genomowe cząsteczki RNA wchodzące w skład poszczególnych mutantów BMV**

wariant wirusa	wirusowe RNA użyte do inokulacji
wt	wtRNA1, wtRNA2, wtRNA3
M1-RNA2-BMV	wtRNA1, M1-RNA2, wtRNA3
M2-RNA2-BMV	wtRNA1, M2-RNA2, wtRNA3
M34-RNA2-BMV	wtRNA1, M34-RNA2, wtRNA3
M5-RNA2BMV	wtRNA1, M5-RNA2, wtRNA3
M6-RNA2-BMV	wtRNA1, M6-RNA2, wtRNA3
M1345-RNA2-BMV	wtRNA1, M1345-RNA2, wtRNA3
O1-RNA1-BMV	O1-RNA1, wtRNA2, wtRNA3
O2-RNA1-BMV	O2-RNA1, wtRNA2, wtRNA3
O3-RNA1-BMV	O3-RNA1, wtRNA2, wtRNA3
O4-RNA1-BMV	O4-RNA1, wtRNA2, wtRNA3
O5-RNA1-BMV	O5-RNA1, wtRNA2, wtRNA3
O6-RNA1-BMV	O6-RNA1, wtRNA2, wtRNA3
O7-RNA1-BMV	O7-RNA1, wtRNA2, wtRNA3
O8-RNA1-BMV	O8-RNA1, wtRNA2, wtRNA3

### c) ekstrakcja całkowitego RNA z roślin

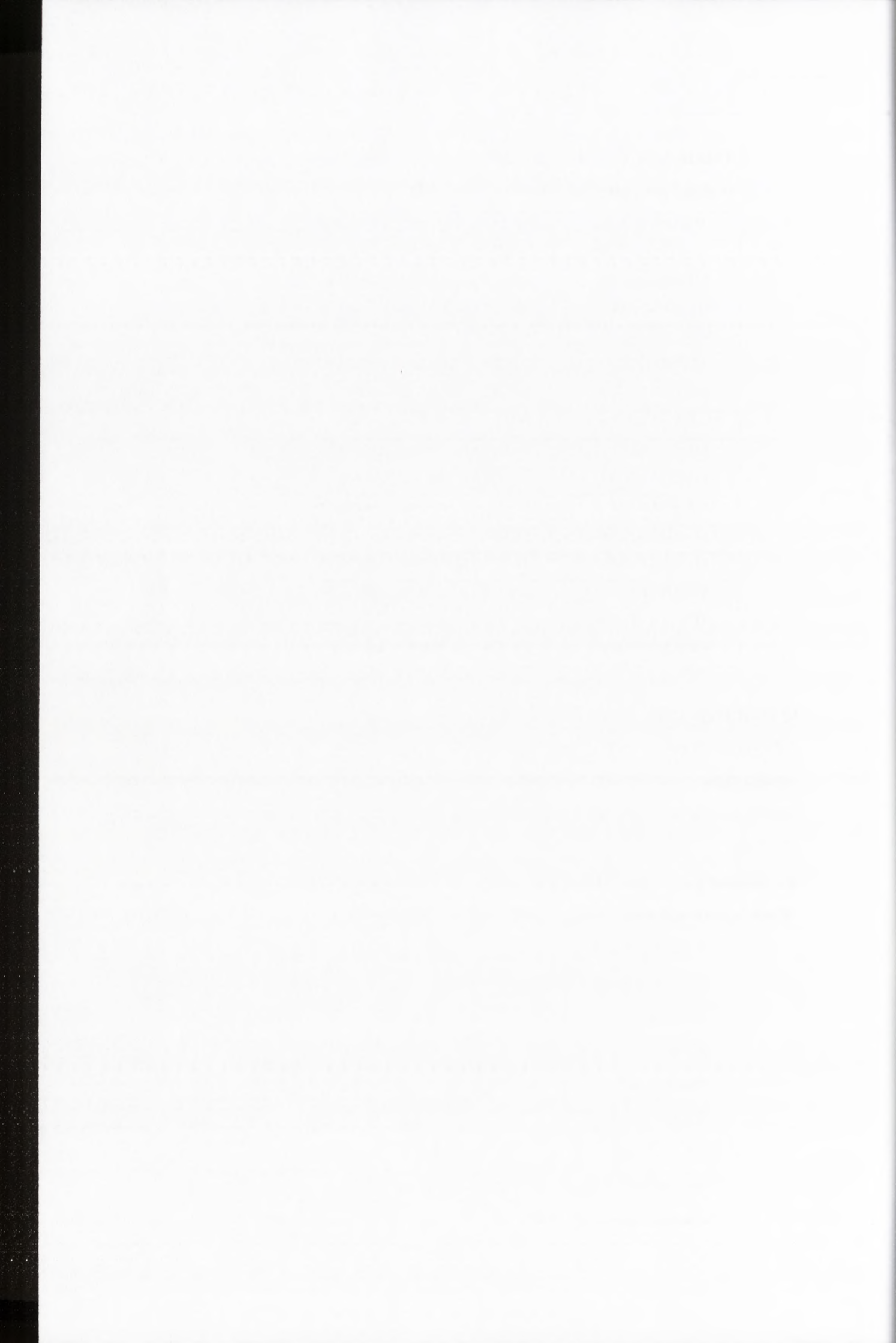
Używając skalpela, wycinano fragment rośliny (kwadrat o boku około 3 mm), umieszczano w probówce, dodawano 100µl 1x buforu ekstrakcyjnego i homogenizowano, po czym przeprowadzano ekstrakcję fenol-chloroform (rozdział 3.2.7.b).

### d) otrzymywanie jednoniciowego DNA - odwrotna transkrypcja (RT)

Reakcję prowadzono w następującej mieszance reakcyjnej:

- 3,5µl roztworu RNA
- 1µl 10x buforu do PCR
- 3mM MgCl<sub>2</sub>
- 0,5 mM dNTPs
- 50mM DTT
- 20pmol starter 1<sup>st</sup>
- 20U RNasin
- 40 U odwrotnej transkryptazy *MLLV*
- uzupełniano H<sub>2</sub>O do 10µl





Do reakcji kontrolnej (-) nie dodawano RNA, do reakcji kontrolnej (+) dodawano RNA wyizolowany z niezakażonej rośliny.

Mieszaninę reakcyjną inkubowano 1 godzinę w temperaturze 45° C a następnie 5 minut w temperaturze 95° C, po czym schładzano 5 minut na lodzie.

#### e) otrzymywanie dwuniciowego DNA (PCR)

Zależnie od analizowanego mutantu BMV, używano następujące pary starterów:

- dla M1- i M2-RNA2-BMV używano pary starterów 139 i R2D,
- dla M34-RNA2-BMV używano pary starterów 139 i R2F,
- dla M5- i M6-RNA2-BMV używano pary starterów 1<sup>st</sup> i 119,
- dla O1- i O3-RNA1-BMV używano pary starterów R2A i AN1.3,
- dla O4-RNA1-BMV używano pary starterów R2A i AN4.1,
- dla O7- i O8-RNA1-BMV używano pary starterów 1<sup>st</sup> i R1E,
- dla O6-RNA1-BMV używano pary starterów sek3.2 i AN3.

Reakcję prowadzono zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale.3.2.5.a.

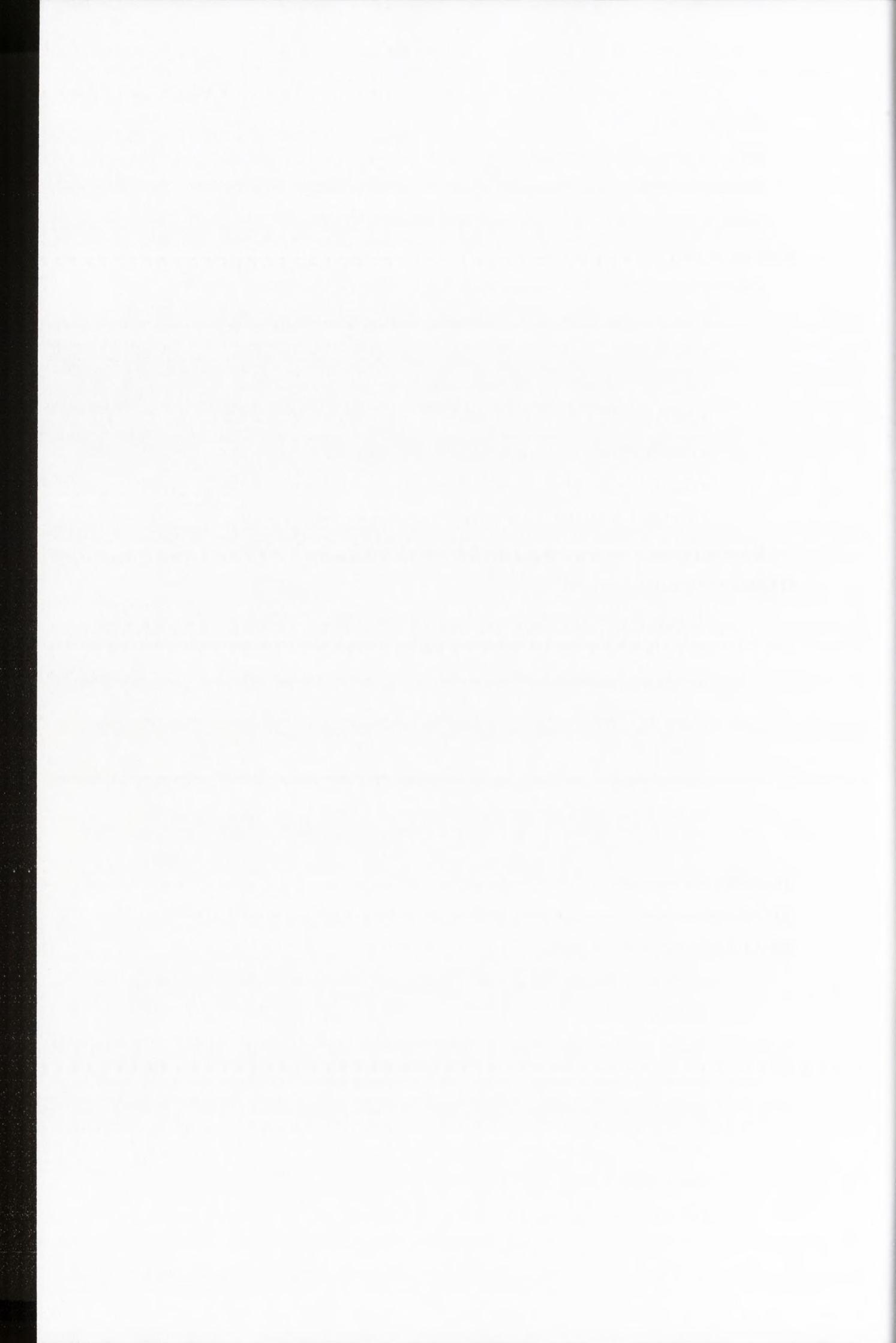
#### f) klonowanie produktów PCR

- ligację prowadzono przy pomocy zestawu do klonowania produktów PCR firmy QIAGEN (QIAGEN PCR Cloning Kit), wg zaleceń producenta,
- uzyskanym plazmidem transformowano komórki *E. coli* DH5 $\alpha$ ,
- przeprowadzano minipreparacje plazmidowego DNA (rozdział 3.2.7.a i c),
- uzyskany DNA trawiono restryktazą *EcoRI* (rozdział 3.2.6.b) w celu identyfikacji plazmidów zawierających insert pożądanej długości (zawarty w zestawie QIAGEN PCR Cloning Kit wektor pDRIVE zawiera dwa miejsca restrykcyjne *EcoRI*, oskrzydlaające insert).

#### g) analiza wirusowego cDNA (rozdział 3.2.1.1.e)

#### h) izolacja wirusa z zakażonych mutantami wirusowymi M-RNA2-BMV i O-RNA1-BMV roślin *H. sativum*

- zainfekowaną roślinę ważono, umieszczano w moździerz i zalewano ciekłym azotem,
- dodawano 1 ml buforu do ekstrakcji wirusa na 1g tkanki i rozcierano,
- roztwór przenoszono do probówek i dodawano 200 $\mu$ l chloroformu na 500  $\mu$ l roztworu, wytrząsano 30 sekund,
- wirowano 5 minut z prędkością 6000 rpm w temperaturze 4°C a supernatant przenoszono do nowej probówki,
- zalewano 175 $\mu$ l 30%PEG, wytrząsano i inkubowano na lodzie 30 minut,



- wirowano 15 minut z prędkością 14000 rpm w temperaturze 4°C ,
- roztwór dekantowano a osad rozpuszczano w 200μl buforu do przechowywania wirusa,
- dodawano 200μl chloroformu, wytrząsano 30 sekund,
- wirowano 5 minut z prędkością 14000 rpm w temperaturze 4 °C a supernatant przenoszono do nowej probówki,
- dodawano 175μl 30% PEG, wytrząsano i inkubowano na lodzie 30 minut,
- wirowano 15 minut z prędkością 14000 rpm w 4°C,
- roztwór dekantowano a osad rozpuszczano w 200μl buforu do przechowywania wirusa,
- stężenie oczyszczonego wirusa określono mierząc absorpcję promieniowania UV dla  $\lambda_{260}$  (1OD = 0,2 mg wirusa),
- przechowywano w temperaturze -70°C.

#### i) ekstrakcja wirusowego RNA BMV

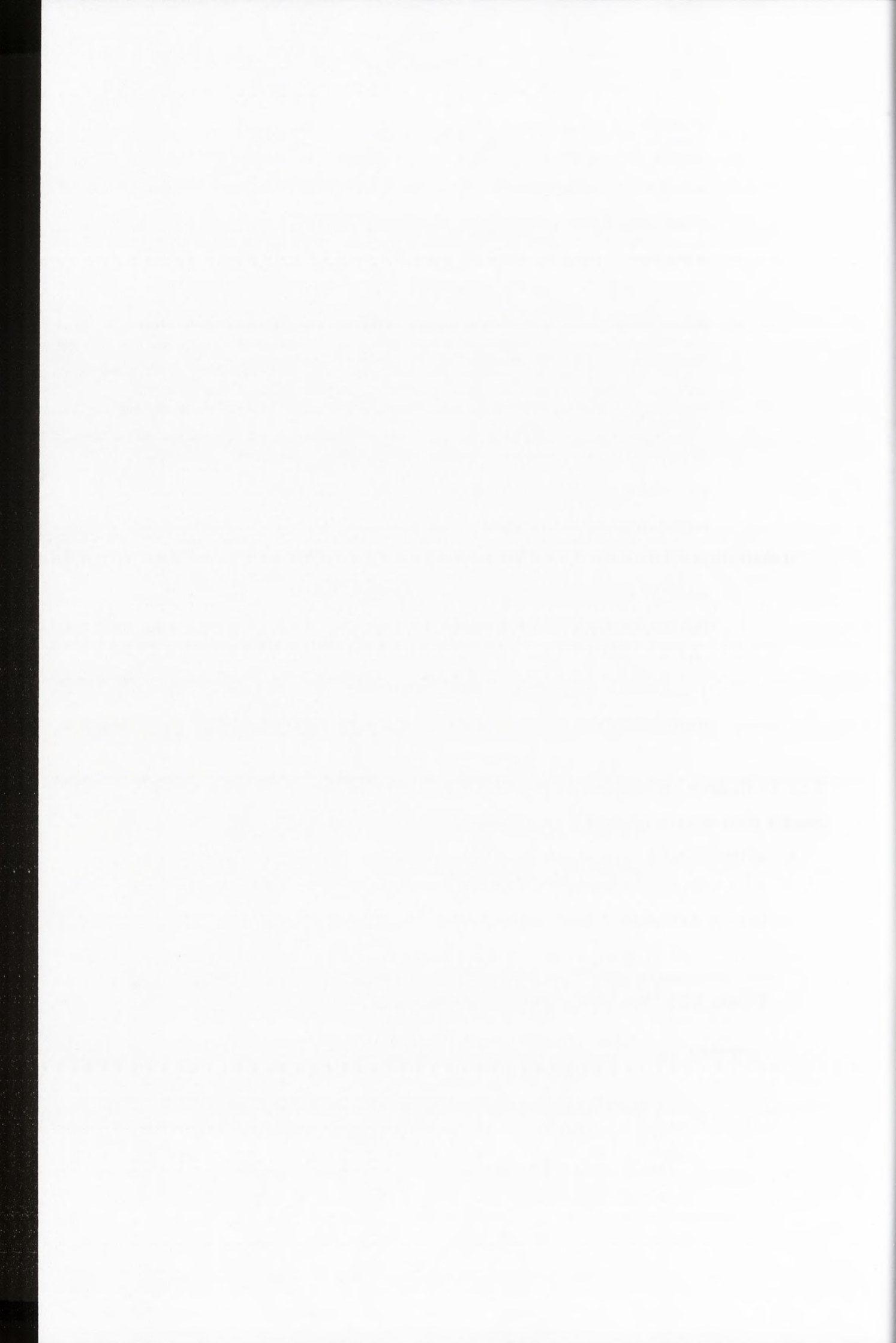
- do 200μl ml oczyszczonego wirusa dodawano 25μl 10% SDS, 25μl 10x buforu do ekstrakcji wirusowego RNA,
- otrzymany RNA oczyszczano metodą fenol-chloroform (rozdział 3.2.8.b) a jego jakość sprawdzano metodą elektroforezy w 1% żelu agarozowym (rozdział 3.2.10.).

### 3.2.1.3. Badanie homologicznych przeskoków rekombinacyjnych zachodzących między tymi samymi cząsteczkami wirusowych mutantów M-BMV i O-BMV

- a) koinokulacje *C. quinoa* oraz *H. sativum* parami wirusowych mutantów (tabela 3.2.3.) Rośliny inokulowano poprzez wcieranie w liście roztworu wirusa w buforze do przechowywania wirusa.

**Tabela 3.2.2. Przeprowadzane koinokulacje**

gospodarz	mutanty wirusowe używane do koinokulacji	
	badania RNA2	badania RNA1
<i>H. sativum</i>	M2-RNA2-BMV/M34-RNA2-BMV M34-RNA2-BMV M6-RNA2-BMV	O3-RNA1BMV/O6-RNA1-BMV O6-RNA1-BMV/O8-RNA1-BMV
<i>C. quinoa</i>	M2-RNA2-BMV/M34-RNA2-BMV M34-RNA2-BMV M6-RNA2-BMV	-



**b) izolacja całkowitego RNA** (rozdział 3.2.1.2.c)

**c) otrzymywanie jednoniciowego DNA** (rozdział 3.2.1.2.d)

**d) otrzymywanie dwuniciowego DNA (PCR)**

Zależnie od analizowanej koinokulacji, używano następujących par starterów:

- koinokulacja M2RNA2-BMV/M34-RNA2-BMV - używano starterów ko5 iR2D lub Ko5 i R2F,
- koinokulacja M34-RNA2-BMV/M6-RNA2-BMV - używano starterów 1<sup>st</sup> i 119,
- koinokulacja O3-RNA1-BMV/O6-RNA1-BMV - używano starterów ANB i sek3.2,
- koinokulacja O6-RNA1-BMV/O8-RNA1-BMV - używano starterów 1<sup>st</sup> i AN3.

Reakcję prowadzono zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale.3.2.5.a.

**d) klonowanie wirusowego cDNA** (rozdział 3.2.1.2.f)

**e) analiza restrykcyjna wirusowego cDNA** – trawienie otrzymanych klonów markerowymi enzymami restrykcyjnymi (rozdział 3.2.6.b).

**f) określenie częstości rekombinacji** na podstawie stosunku ilości klonów zawierających zrekombinowany wirusowy cDNA do ilości wszystkich klonów.

### 3.2.2. Identyfikacja nowego subgenomowego RNA5

#### 3.2.2.1. Identyfikacja nowego subgenomowego RNA5 metodą *northern blot*

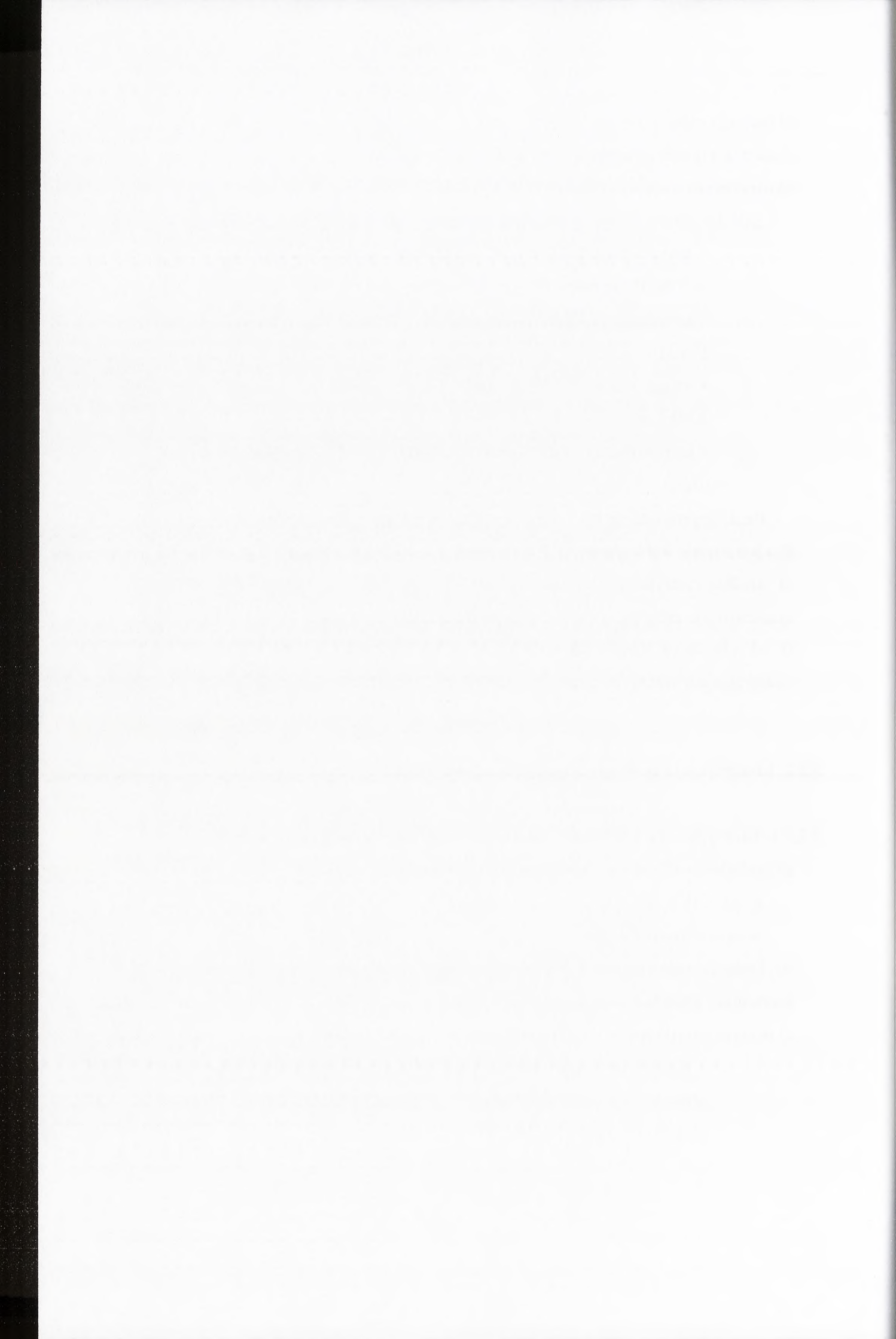
**a) inokulacja *H. sativum* wirusem typu dzikiego**

Rośliny inokulowano poprzez wcieranie w liście roztworu wirusa w buforze do przechowywania wirusa.

**b) izolacja całkowitego RNA z zakażonych roślin oraz niezakażonej rośliny kontrolnej** (rozdział 3.2.1.2.c)

**c) otrzymywanie matryc do transkrypcji *in vitro* metodą PCR**

- matrycę do transkrypcji markera długości RNA5 (RNA o sekwencji obejmującej 1-1221 nukleotydy RNA3 BMV), otrzymywano metodą PCR ze starterami MP1T<sub>7</sub> i MP2 (PCR1),



- matrycę do transkrypcji sondy RNA komplementarnej do sekwencji RNA3 BMV i RNA5 obejmującej nukleotydy 962-1110, otrzymywano metodą PCR ze starterami RADIO1T<sub>7</sub> i RADIO2 (PCR2).

Reakcje prowadzono zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale.3.2.4.a.

**d) otrzymywanie metodą transkrypcji *in vitro* markerów długości RNA**

- genomowy RNA3 BMV. Reakcję transkrypcji *in vitro* prowadzono zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale 2.3.1.2.a, na matrycy pB3TP7 zliniowanej restryktazą *EcoRI*,
- subgenomowy RNA5, obejmujący fragment RNA3 BMV od 1-1221 nukleotydu. Reakcję transkrypcji *in vitro* prowadzono zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale 3.2.1.2.a, wobec matrycy PCR1 otrzymanej w wyżej opisanej PCR.

**e) otrzymywanie metodą transkrypcji *in vitro* sondy RNA znakowanej CTP [ $\alpha$  32P] komplementarnej do sekwencji RNA3 BMV i RNA5 obejmującej nukleotydy 962-1110**

Transkrypcję *in vitro* prowadzono w mieszaninie reakcyjnej zawierającej:

- 4 $\mu$ l 5x buforu do polimerazy RNA T<sub>7</sub>
- 20U RNasine
- 5mM DTT
- 0,5mM ATP
- 0,5mM GTP
- 0,5mM UTP
- 12,5 $\mu$ M CTP
- 2 $\mu$ l CTP [ $\alpha$  32P] 3000 Ci/mmol
- 2 $\mu$ g produktu PCR2
- 10U polimerazy RNA T<sub>7</sub>
- uzupełniano H<sub>2</sub>O do 20 $\mu$ l

Mieszaninę reakcyjną inkubowano 1,5 godziny w temperaturze 37°C, po czym dodawano 2,5U *RQ* Dnase i inkubowano 15 minut w temperaturze 37°C.

**f) otrzymywanie sondy RNA znakowanej CTP [ $\alpha$  32P] komplementarnej do końca 5' RNA3 BMV i RNA5, obejmującej nukleotydy 1-100**

- plazmid pSON5'RNA3 trawiono enzymem *HindIII* (rozdział 3.2.6.a)
- transkrypcja *in vitro* wg procedury opisanej w poprzednim punkcie (rozdział 3.2.2.1.e)



The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that proper record-keeping is essential for the success of any business and for the protection of the interests of all parties involved. The text also mentions the need for transparency and accountability in financial reporting.

In addition, the document highlights the role of technology in streamlining financial processes. It suggests that the use of modern accounting software can significantly reduce the risk of errors and improve the efficiency of financial management. The text also touches upon the importance of regular audits and reviews to ensure the integrity of the financial data.

Furthermore, the document discusses the impact of external factors on financial performance. It notes that changes in market conditions, regulatory requirements, and economic trends can all influence a company's financial health. Therefore, it is crucial for businesses to stay informed and adapt their financial strategies accordingly.

The document also addresses the importance of communication in financial management. It stresses that clear and concise communication is necessary for ensuring that all stakeholders have a good understanding of the company's financial situation and the actions being taken to address any challenges. Regular reporting and updates are seen as key to maintaining trust and confidence.

In conclusion, the document provides a comprehensive overview of the key aspects of financial management. It underscores the need for a proactive and disciplined approach to handling financial affairs, one that prioritizes accuracy, transparency, and adaptability. By following the principles outlined in the text, businesses can better navigate the complexities of the financial world and achieve long-term success.

Finally, the document offers some practical advice for implementing these principles. It suggests that businesses should invest in quality accounting software, establish clear financial policies, and foster a culture of financial responsibility. These steps are presented as essential for building a strong and resilient financial foundation.

**g) analiza northern blot**

- RNA wyizolowany z zakażonych roślin, z rośliny niezakażonej oraz markery długości RNA rozdzielano elektroforetycznie w 1% żelu agarozowym (3.2.10),
- RNA przenoszono na membranę Hybond-N+ w aparacie Transfer-Blot SB firmy BIODRA, wg zaleceń producenta,
- membranę przemywano 2xSSC i zapiekano 2 godziny w temperaturze 80°C,
- membranę inkubowano 1 godzinę w temperaturze 60°C w 25ml roztworu prehybrydyzacyjnego zawierającego:
  - 5x SSC
  - 5x roztwór Denharta
  - 0,5% SDS
  - 0,5mg zdenaturowanego w temperaturze 100°C DNA śledzia,
- do roztworu dodawano uprzednio zdenaturowaną w 100°C sondę RNA znakowaną CTP [ $\alpha$  32P] (20 $\mu$ l-mieszanina reakcyjna transkrypcji *in vitro*) i inkubowano w 65°C przez co najmniej 12 godzin,
- membranę przemywano:
  - 2 razy po 10 minut w 25ml roztworu RP1 w temperaturze pokojowej;
  - 15 minut w 25ml roztworu RP2 w temperaturze 65°C;
  - 10 minut w 25ml roztworu RP3 w temperaturze 65°C,
- membranę owijano w folię i analizowano z użyciem skanera materiałów znakowanych radioizotopowo (Phosphoimager, Typhoon 8600).

**3.2.2.2. Sekwencjonowanie subgenomowego RNA5 BMV****a) fosforylacja 5'-końcowej grupy OH startera BB7.3**

Reakcję fosforylacji prowadzono w następującej mieszaninie reakcyjnej:

1 $\mu$ l 10x bufor do kinazowania PNK A

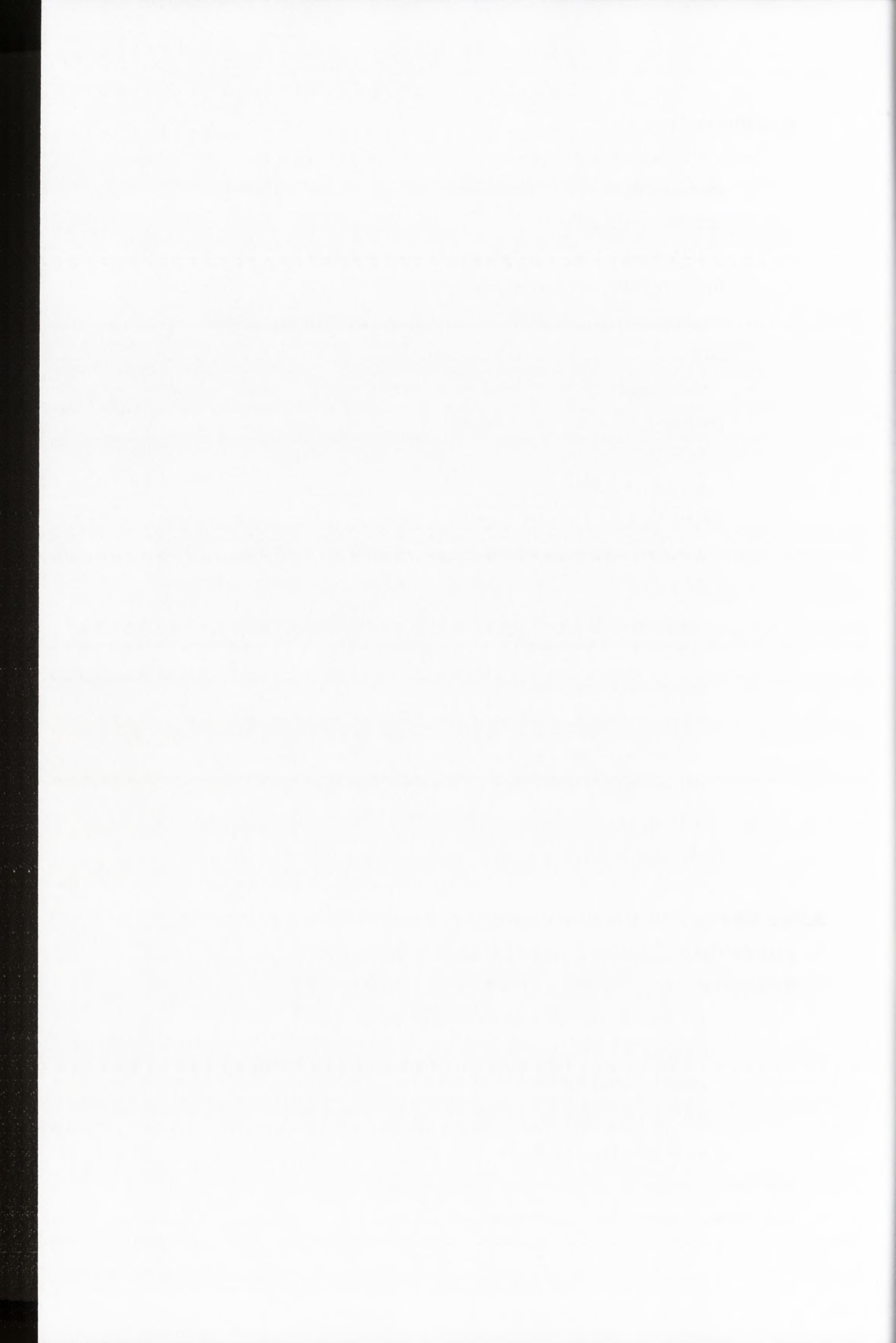
4 mM ATP

100pM startera BB7.3

10U kinazy polinukleotydowej  $T_4$

uzupełniano H<sub>2</sub>O do 10  $\mu$ l

Mieszaninę reakcyjną inkubowano 1 godzinę w temperaturze 37°C, po czym fosforylowany starter BB7.3 oczyszczano (rozdział 3.2.8.b).



**b) izolacja wirusowego RNA o długości około 1221-nt żelu agarozowego**

- całkowity RNA z zakażonego jęczmienia oraz wirusowy RNA z otrzymanego uprzednio wirusa izolowano (rozdział 3.2.1.2.c i 3.2.1.2.h)
- RNA rozdzielano elektroforetycznie w 2% żelu agarozowym LMT,
- z żelu wycinano produkt o długości około 1221 nukleotydów,
- na 100g żelu dodawano 260μl buforu TE pH 6,8 oraz 40μl 10% SDS,
- wytrząsano w 65°C do całkowitego rozpuszczenia żelu,
- ekstrakcja fenol/chloroform (rozdział 3.2.8.b),

**b) ligacja**

Reakcję ligacji prowadzono w następującej mieszance reakcyjnej:

- 250ng wirusowego RNA
- 500ng fosforylowanego startera BB7.3 (rozdział 3.2.2.2.a)
- 4μl 10x buforu do ligazy RNA  $T_4$
- 40U RNasine
- 20μl 40%PEG
- 12U ligazy RNA  $T_4$
- H<sub>2</sub>O do 40μl

Mieszanie reakcyjną inkubowano 12 godzin w temperaturze 16°C.

**d) ekstrakcja fenol-chloroform** (rozdział 3.2.8.b).**e) otrzymywanie jednoniciowego DNA - odwrotna transkrypcja**

Reakcję prowadzono wg metodyki opisanej w rozdziale 3.2.1.2.d, używając startera BB7.4.

**f) otrzymywanie dwuniciowego DNA (PCR)**

Reakcję prowadzono zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale 3.2.5.a, używając starterów BB7.4 i MP1T<sub>7</sub>.

**g) sekwencjonowanie produktu PCR** przy pomocy startera RADIO2 (rozdział 3.2.9.)**h) klonowanie produktu PCR** (rozdział 3.2.1.2.f)**i) sekwencjonowanie cDNA** ze starterem RADIO2 i RADIO1 (rozdział 3.2.9.)**3.2.2.3. Analiza stabilności RNA3 BMV w ekstrakcie komórkowym****a) przygotowanie ekstraktu z zarodków jęczmienia**

- 50g zarodków wrzucano do mieszanki 500 ml CCl<sub>4</sub> i 110 ml cykloheksanu, zarodki zbierano z powierzchni roztworu, czynność

Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page. The text is arranged in several paragraphs and appears to be a formal document or report.

powtarzano dwa razy a następnie zarodki suszono na powietrzu co najmniej 12 godzin,

- 5g zarodków rozcierano w schłodzonym móżdżerku z piaskiem kwarcowym,
- dodawano 15 ml buforu ekstrakcyjnego i homogenizowano,
- homogenat wirowano przy 16 00 rpm w 4°C przez 10 minut,
- górne 4/5 roztworu zbierano i wirowano jeszcze raz w tych samych warunkach,
- pobierano górne 3/4 roztworu i dializowano 20 godzin w temperaturze 0°C do 100 objętości buforu ekstrakcyjnego (3-krotna zmiana buforu)
- dializat wirowano w 12000 rpm w 4°C przez 15 minut,
- supernatant umieszczano w probówkach typu eppendorf i przechowywano w -70°C po uprzednim zamrożeniu w ciekłym azocie,
- stężenie białka mierzono metodą Bradforda.

**b) otrzymanie RNA3 BMV i RNA5 BMV metodą transkrypcji *in vitro*** (rozdział 3.2.1.2.a)

**c) izolacja transkryptu RNA3 z żelu agarozowego**

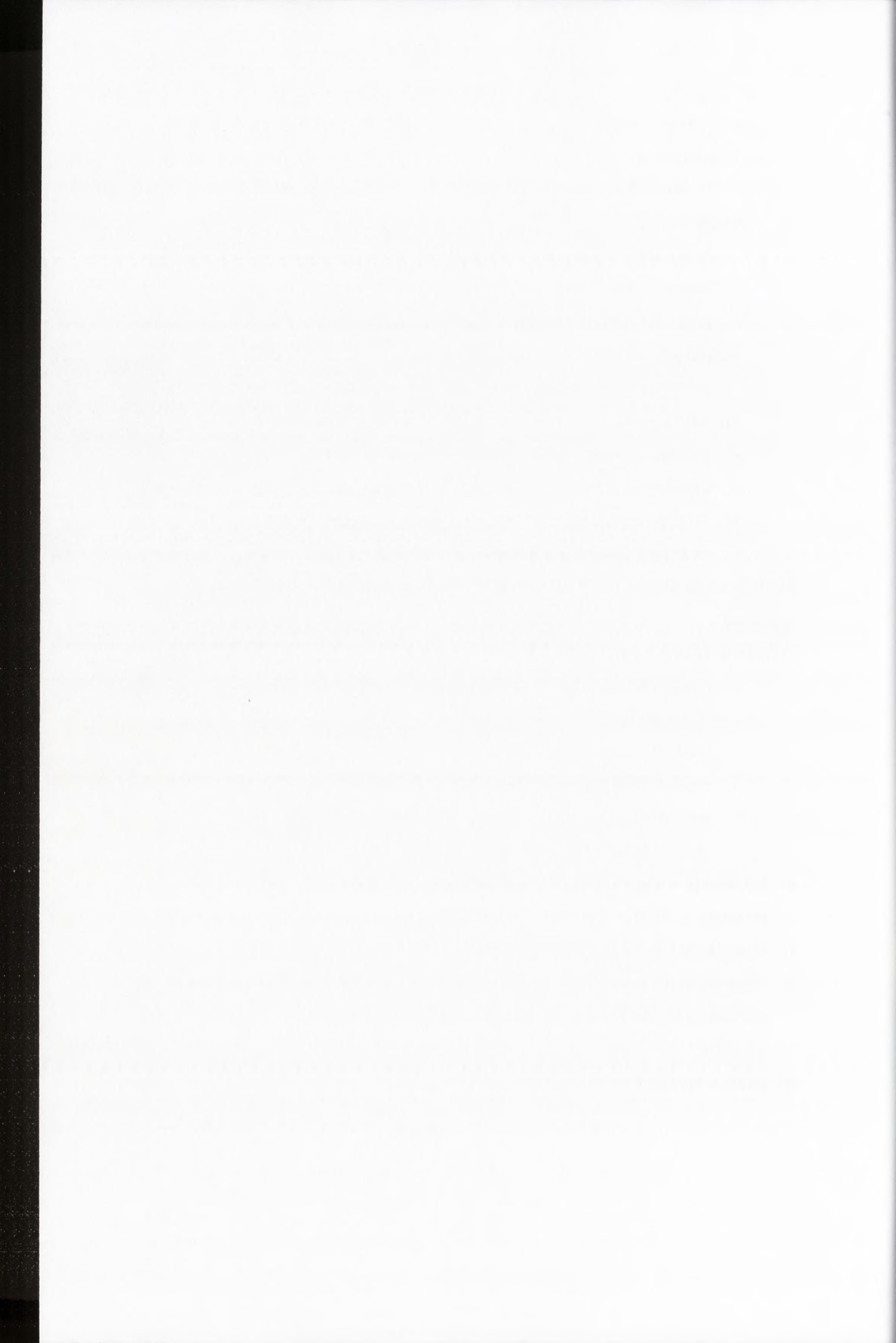
- produkt transkrypcji rozdzielano elektroforetycznie w 2% żelu agarozowym LMT,
- produkt odpowiedniej długości wycinano z żelu i ważono,
- na 100g żelu dodawano 260µl buforu TE pH 6,8 oraz 40µl 10% SDS,
- wytrząsano w 65°C do całkowitego rozpuszczenia żelu,
- ekstrakcja fenol/chloroform (rozdział 3.2.8.b),

**e) inkubacja wirusowego RNA w ekstraktach z zarodków jęczmienia** (czas inkubacji 5,10,20,30 i 60 minut, temperatura pokojowa).

**f) ekstrakcja fenol-chloroform inkubowanego RNA** (rozdział 3.2.8.b)

**g) otrzymywanie sondy RNA znakowanej CTP [ $\alpha$  32P] komplementarnej do sekwencji RNA3 i RNA5 obejmującej nukleotydy 962-1110** (rozdział 3.2.2.1.e)

**h) analiza *northern blot*** (rozdział 3.2.2.1.f)



### 3.2.3. Metody stosowane podczas badań *in vitro* homologicznej rekombinacji RNA z wykorzystaniem HIV-1 RT wobec matryc zawierających rekombinacyjnie aktywne rejony R HIV-1 i BMV

#### a) otrzymywanie matryc RNA do reakcji wydłużania startera z HIV-1 RT

##### - otrzymywanie matryc DNA do reakcji transkrypcji *in vitro* metodą PCR

Podczas PCR używano następujących matryc i par starterów:

- pHIVRSd, startery T7 i HIVD3 (otrzymanie donora HIVR1/137),
- pHIVRSa, startery T7 i HIVA3 (otrzymanie akceptora HIVR9520/9635),
- pBMVRd, startery T7 i BMV3REC (otrzymanie donora BMVRd),
- pBMVRa, startery T7 i MB3RNA3 (otrzymanie akceptora BMVRa).

Reakcję prowadzono zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale 3.2.5.a

##### - otrzymywanie matryc RNA do reakcji wydłużania startera metodą transkrypcji *in vitro* (AMBION T7-MEGAscript™)

Reakcję prowadzono w następującej mieszance reakcyjnej:

1μl 10x buforu do transkrypcji

1μl ATP 75mM

1μl CTP 75mM

1μl GTP 75mM

1μl UTP 75mM

matryca DNA – produkty PCR opisane w poprzednim punkcie (zgodnie z zaleceniami producenta)

1μl T<sub>7</sub> MEGA ENZYME MIX

uzupełniono H<sub>2</sub>O do objętości 10μl

Reakcję kontrolną prowadzono bez matrycy.

Mieszankę reakcyjną inkubowano 24 godziny w temperaturze 37°C, po czym dodawano jedną objętość buforu do rozdzielacza elektroforetycznego kwasów nukleinowych w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących i rozdzielano w denaturującym żelu poliakryloamidowym (rozdział 3.2.11.). Produkt transkrypcji izolowano z żelu i odzyskiwano (rozdział 3.2.12.).

#### b) reakcja wydłużania startera wobec matrycy RNA z użyciem HIV-1 RT

Reakcję prowadzono w mieszance reakcyjnej przedstawionej w tabeli 3.2.3.

Używano następujących matryc RNA i starterów:

- donor HIVR1/137, akceptor HIVR9520/9635 oraz starter HIV-3REC,



Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page. The text is arranged in several paragraphs and appears to be a formal document or report.

- donor BMVRd, akceptor BMVRa oraz starter BMV-3REC.

Reakcję kontrolną prowadzono bez matrycy.

Reakcję prowadzono 1 godzinę w temperaturze 45°C.

**Tabela 3.2.3. Skład mieszaniny reakcyjnej**

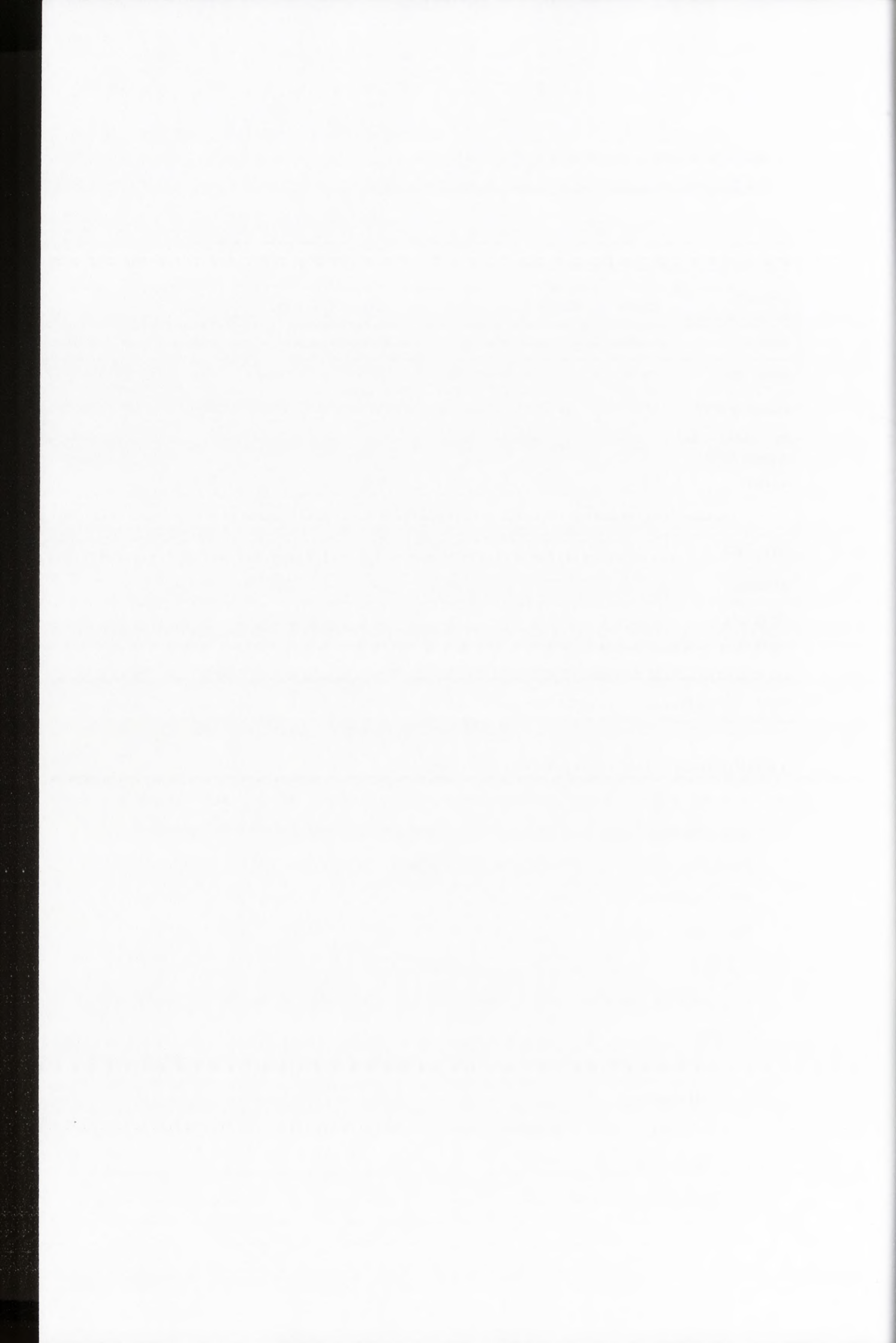
stosunek donor:akceptor	donor	akceptor	1:0,5	1:1	1:2	1:5
H <sub>2</sub> O	do 40μl	do 40μl	do 40μl	do 40μl	do 40μl	do 40μl
donor RNA	10pmol	-	10pmol	10pmol	10pmol	10pmol
akceptor RNA	-	10pmol	5pmol	10pmol	20pmol	50pmol
5x bufor do syntezy DNA	8μl	8μl	8μl	8μl	8μl	8μl
starter	30pmol	30pmol	30pmol	30pmol	30pmol	30pmol
<b>denaturacja 3minuty w 95°C i powolne schładzanie do 45°C (1°C/minutę)</b>						
HIV-1 RT	1μl	1μl	1μl	1μl	1μl	1μl
RNasine	20U	20U	20U	20U	20U	20U
dNTPmix*	8,3μl	8,3μl	8,3μl	8,3μl	8,3μl	8,3μl

\*dNTPmix. Do każdej pojedynczej mieszaniny reakcyjnej podawano 8,3μl mieszaniny dNTPmix, zawierającej: 0,25mM dATP/dGTP/dTTP, 0,125mM dCTP (8μl) oraz 0,3μl dCTP [ALPHA 32P] 3000 Ci/mmol ( $C_{k(dATP/dGTP/dTTP)}=50\mu\text{M}$ ,  $C_{k(dCTP)}=25\mu\text{M}$ )

### c) analiza produktów reakcji wydłużania startera

- do reakcji wydłużania startera dodawano 1V barwnika do rozdziału elektroforetycznego kwasów nukleinowych w warunkach denaturujących (2x). Produkty reakcji wydłużania startera (ssDNA) analizowano w denaturującym żelu poliakryloamidowym (nakładano po 20μl mieszaniny reakcyjnej na kieszonkę, rozdział 3.2.11.), a następnie izolowano i odzyskiwano (rozdział 3.2.12.),
- ssDNA używano jako matrycy podczas PCR. Używano następujących starterów:
  - podczas PCR z matrycą HIV ssDNA używano startery HIV5REC i HIV3REC,
  - podczas PCR z matrycą BMV ssDNA używano startery BMV5REC i BMV3REC,

Reakcje prowadzono zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale 3.2.5.a,



- produkty PCR oraz plazmid pUC19 trawiono restryktazami *EcoRI* i *PstI* wg schematu opisanego w rozdziale 3.2.6.a,
- trawiony plazmid i produkt PCR poddawano ligacji (rozdział 3.2.1.1.a), uzyskanym plazmidem transformowano komórki *E. coli* DH5 $\alpha$  (rozdział 3.2.7.a)
- przeprowadzano minipreparacje plazmidowego DNA zawierającego sekwencje wirusowe (rozdział 3.2.7.c),
- inserty sekwencjonowano (rozdział 3.2.9.).

### **3.2.4. Metody stosowane podczas badań in vivo homologicznej rekombinacji RNA z wykorzystaniem wektora rekombinacyjnego BMV zawierającego rejon R HIV-1**

#### **3.2.4.1. Otrzymywanie plazmidu pMat-HIVH-RNA3 zawierającego rekombinacyjnie aktywną pochodną RNA3 z dwiema sekwencjami cDNA rejonu R HIV-1 metodą miejscowo-specyficznej mutagenyzy w oparciu o PCR**

##### **- otrzymywanie insertów zawierających rejon R HIV-1 metodą PCR**

Podczas PCR używano następujących matryc i par starterów:

- matryca pHIVRSa, startery HIVA5Spe i HIVA3Spe (insert HIV-5'RAS),
- matryca pHIVRSd, startery HIVD5Mlu i HIVD3Eco (insert HIV-3'RAS),

PCR prowadzono zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale 3.2.5.a.

##### **- trawienie restrykcyjne *SpeI* i ligacja insertu HIV-5'RAS oraz plazmidu pMat0-RNA3**

Reakcje trawienia prowadzono wg metodyki opisanej w rozdziale 3.2.6.a. i 3.2.1.1.a.

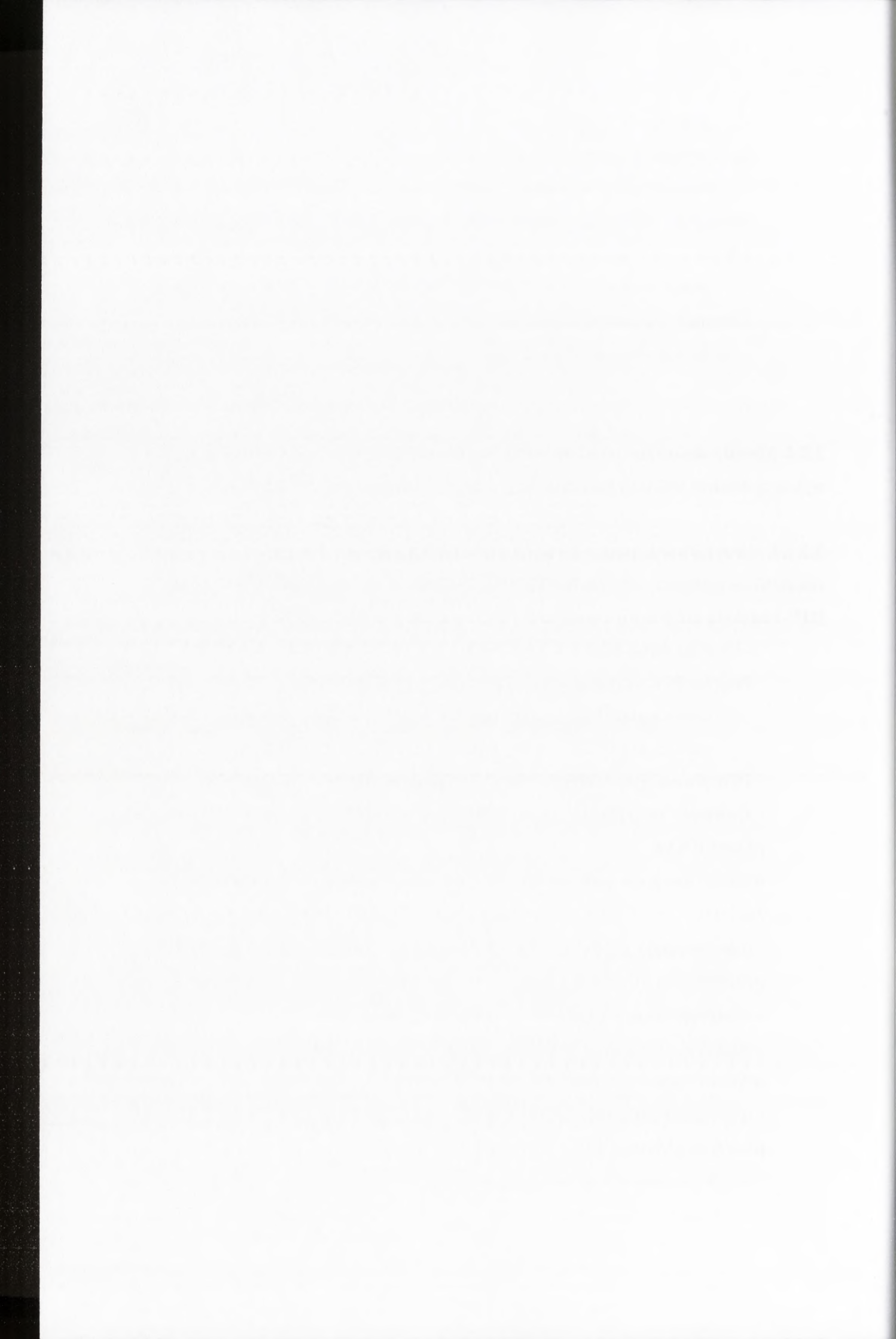
##### **- transformacja produktów ligacji do komórek kompetentnych *E. coli* DH5 $\alpha$ (rozdział 3.2.7.a)**

##### **- minipreparacja plazmidowego DNA (rozdział 3.2.7.c)**

**- sekwencjonowanie** otrzymanego plazmidu w rejonie wprowadzonego insertu z użyciem startera 1<sup>st</sup> (rozdział 3.2.9)

##### **- trawienie restrykcyjne *MluI* i *EcoRV* oraz ligacja insertu 3'HIV-RAS oraz plazmidu pMat0-RNA3 z sekwencją HIV-RAS5'**

Reakcje prowadzono wg metodyki opisanej w rozdziale 3.2.6.a. i 3.2.1.1.a.



- transformacja komórek kompetentnych *E. coli* DH5 $\alpha$  produktami ligacji (rozdział 3.2.7.a)
- minipreparacja plazmidowego DNA (rozdział 3.2.7.c) i sekwencjonowanie plazmidu pMat-HIVH-RNA3 w rejonie wprowadzonego insertu 1<sup>st</sup> (rozdział 3.2.9)
- otrzymywanie pMat-HIVH-RNA3 w dużej skali (rozdział 3.2.7a i b)

#### 3.2.4.2. Badanie infekcyjności wirusowego mutantu Mat-HIVH-BMV oraz homologicznych przeskoków rekombinacyjnych zachodzących pomiędzy cząsteczkami RNA3 tegoż mutantu (wg metodyki opisanej w rozdziale 3.2.1.2.a-f)

- *C. quinoa* infekowano mutantem Mat-HIVH-BMV,
- izolowano całkowity RNA,
- otrzymywano wirusowy cDNA, używając podczas RT-PCR starterów 1<sup>st</sup> i 2<sup>nd</sup>
- zrekombinowane cząsteczki RNA3 BMV identyfikowano, oglądając cDNA w 1,5% żelu agarozowym i sekwencjonując po uprzednim ich sklonowaniu w wektorze pDRIVE.

#### 3.2.5. PCR

##### a) PCR z użyciem polimerazy DNA *Taq*

Wszystkie reakcje prowadzono w następującej mieszance reakcyjnej:

5 $\mu$ l 10x buforu do polimerazy *Taq*

3mM MgCl<sub>2</sub>

0,2mM dNTPs

matryca\*

para starterów (każdy po 32 pmol)

5U polimerazy DNA *Taq* (5U/ $\mu$ l)

uzupełniano H<sub>2</sub>O do 50  $\mu$ l

\*0,01 $\mu$ g plazmidowego DNA lub 1 $\mu$ l mieszaniny reakcyjnej RT zawierającej produkt w postaci ssDNA

Reakcję kontrolną prowadzono bez matrycy.

Produkty PCR oczyszczano (rozdział 3.2.8.) a stężenie oczyszczonego DNA określano mierząc absorpcję promieniowania UV dla  $\lambda_{260}$ .

The first part of the document is a letter from the...

The second part of the document is a letter from the...

The third part of the document is a letter from the...

The fourth part of the document is a letter from the...

The fifth part of the document is a letter from the...

The sixth part of the document is a letter from the...

The seventh part of the document is a letter from the...

The eighth part of the document is a letter from the...

The ninth part of the document is a letter from the...

The tenth part of the document is a letter from the...

The eleventh part of the document is a letter from the...

The twelfth part of the document is a letter from the...

The thirteenth part of the document is a letter from the...

The fourteenth part of the document is a letter from the...

The fifteenth part of the document is a letter from the...

The sixteenth part of the document is a letter from the...

The seventeenth part of the document is a letter from the...

The eighteenth part of the document is a letter from the...

**Tabela 3.2.4 Warunki PCR**

	czas*	temperatura	ilość powtórzeń etapu
denaturacja	3 minuty	94°C	1
denaturacja	30 sekund – 1 minuta	94°C	30
hybrydyzacja	30 sekund - 1minuta	60°C	
elongacja	20 sekund -2minuty	72°C	

\* czas denaturacji i elongacji zależny od długości produktu PCR, czas hybrydyzacji zależny od długości starterów

### b) PCR z użyciem polimerazy DNA *Pfu*

Wszystkie reakcje prowadzono w następującej mieszance reakcyjnej:

5 µl 10x buforu do polimerazy *Pfu*

0,2mM dNTPs

matryca pB2TP5 (0,5µg)

para starterów (każdy po 32 pmol)

1,5 U polimerazy DNA *Pfu* (3U/µl)

uzupełniano H<sub>2</sub>O do 50 µl

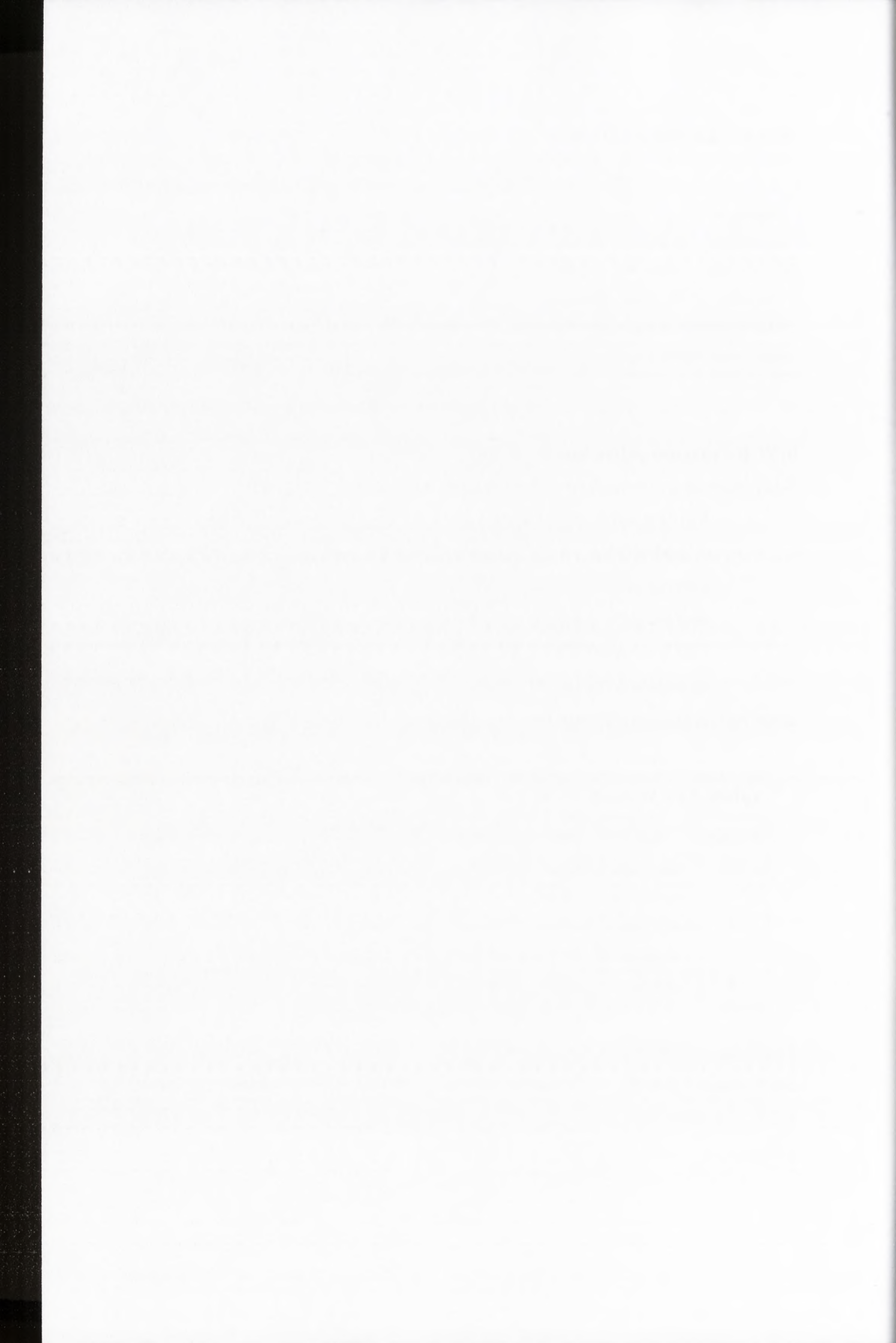
Dwie reakcje kontrolne prowadzono bez matrycy i bez starterów.

**Tabela 3.2.5 Warunki PCR**

nr etapu	etap	czas	temperatura	ilość powtórzeń etapu
1	denaturacja	1minuta	96°C	1
2	denaturacja	50sekund	96°C	18
	hybrydyzacja	50sekund	60°C	
	elongacja	12minut	68°C	
3	elongacja	7minut	68°C	1

Po zakończeniu PCR do każdej mieszanki reakcyjnej dodano 10U restryktazy *DpnI* i inkubowano 2 godziny w temperaturze 37°C. Produkty PCR oczyszczano (rozdział 3.2.8.) a stężenie oczyszczonego DNA określano mierząc absorpcję promieniowania UV dla  $\lambda_{260}$ .





### 3.2.6. Trawienia restrykcyjne

#### a) trawienia restrykcyjne w dużej skali

Reakcje prowadzono w następującej mieszance reakcyjnej:

- 5μl 10x buforu
- 5 - 10μg DNA
- 10U enzymu restrykcyjnego
- uzupełniano H<sub>2</sub>O do 50μl

Mieszanicę reakcyjną inkubowano w temperaturze i czasie zgodnym z zaleceniami producenta.

Produkty reakcji analizowano metodą elektroforezy w żelu agarozowym (2μl mieszaniny reakcyjnej, 2μl barwnika do rozdzielania kwasów nukleinowych w żelu agarozowym i 2μl H<sub>2</sub>O), a następnie oczyszczono (rozdział 3.2.7) i określono stężenie mierząc absorpcję promieniowania UV dla λ<sub>260</sub>

#### b) trawienia restrykcyjne w małej skali

Reakcje prowadzono w następującej mieszance reakcyjnej:

- 1μl 10x buforu
- 1μg DNA
- 5U enzymu restrykcyjnego
- uzupełniano H<sub>2</sub>O do 10μl

Mieszanicę reakcyjną inkubowano w temperaturze i czasie zgodnym z zaleceniami producenta.

Produkty reakcji analizowano metodą elektroforezy żelu agarozowym (rozdział 3.2.10.).

### 3.2.7. Otrzymywanie plazmidów

#### a) transformacja metodą *heat-shock*

- 50 μl zawiesiny komórek kompetentnych *E. coli* DH5α zawierającej 1 ng plazmidu inkubowano 45 minut na lodzie,
- zawiesinę inkubowano 45 sekund w temperaturze 42°C, po czym schładzano 5 minut na lodzie,
- do transformowanych komórek dodawano 1 ml pożywki płynnej 2 x YT i wytrząsano 30 – 45 minut w temperaturze 37°C,

1.1. Introduction

The first part of the report...

is devoted to a general...

1.2. Methodology

The methodology used...

is described in detail...

in the following...

sections. The data...

was collected...

through a series of...

interviews and...

focus group...

discussions. The...

results are presented...

in the following...

2.1. Results

The results...

are shown in...

Table 1.

The data shows...

that there is a...

strong correlation...

between the two...

2.2. Discussion

The discussion...

focuses on the...

implications of...

the findings...

and their...

relevance to...

the field...

of research...

in this area...

and the...

conclusion...

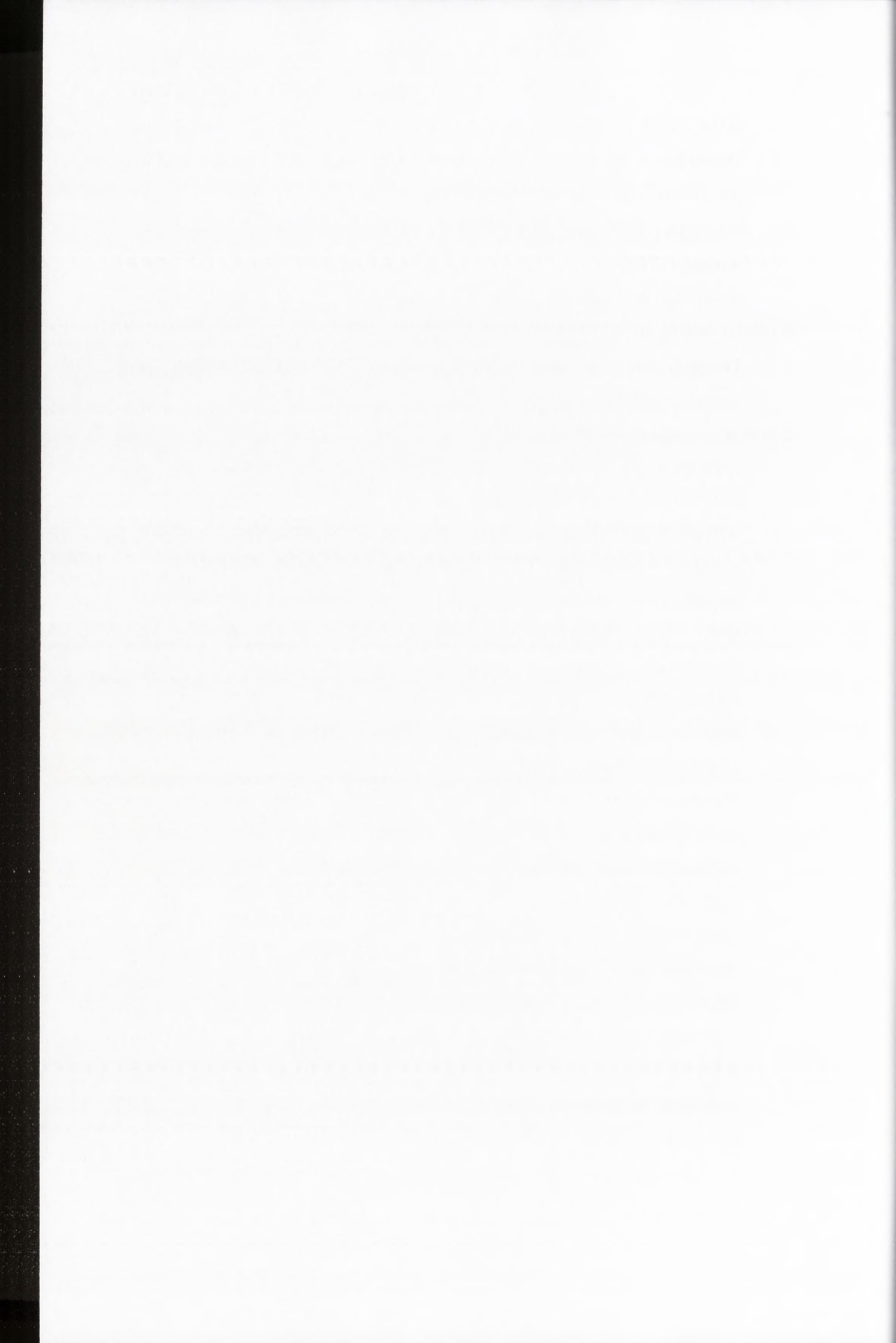
- 200µl zawiesiny bakterii nanoszono na płytkę z pożywką stałą zawierającą ampicylinę i inkubowano przez noc w temperaturze 37°C (w przypadku plazmidów zawierających *blue/white color screening*, do 200µl zawiesiny bakteryjnej dodawano 30µl X-gal (50µg/ml) oraz 15µl 0,1M roztworu wodnego IPTG),
- następnego dnia otrzymywano kolonie bakteryjne.

#### **b) otrzymywanie dużej ilości plazmidów (około 500µg)**

Plazmidy izolowano przy pomocy zestawu QIAGEN Plasmid Maxi kit zgodnie z zaleceniami producenta.

#### **c) minipreparacja plazmidowego DNA**

- pojedyncze kolonie wyhodowanych wcześniej bakterii przenoszono do 2ml pożywki 2xYT zawierającej ampicylinę,
- wytrząsano 12–14 godzin w temperaturze 37°C; dodatkowo w jednej probówce wytrząsano samą pożywkę w celu sprawdzenia jej sterylności,
- następnego dnia zawiesinę bakterii wirowano 1 minutę z prędkością 10000 rpm,
- dekantowano roztwór a zawierający bakterie osad zawieszano w 100µl roztworu MP1,
- dodawano 200µl świeżo przygotowanego roztworu MP2, delikatnie mieszano i inkubowano 5 minut na lodzie
- dodawano 150µl 7,5 M CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>, mieszano i inkubowano około 20 minut na lodzie,
- wirowano 15 minut z prędkością 14000 rpm w temperaturze pokojowej,
- supernatant przenoszono do nowej probówki i dodawano 1ml 96 % etanolu ,
- inkubowano na lodzie około 20 minut,
- wirowano 10 minut z prędkością 14000 rpm,
- dekantowano roztwór a osad przemywano 1 ml 70 % etanolu,
- wirowano 5 minut z prędkością 14000 rpm,
- dekantowano roztwór a osad po wysuszeniu rozpuszczano w 50µl H<sub>2</sub>O z dodatkiem 2µl RNazy A (0,1µg/µl ),
- stężenie DNA określano mierząc absorpcję promieniowania UV dla λ<sub>260</sub>.



### 3.2.8. Oczyszczanie kwasów nukleinowych

#### a) oczyszczanie DNA

DNA oczyszczano przy pomocy zestawu QIAGEN PCR Purification Kit, zgodnie z zaleceniami producenta.

#### b) ekstrakcja fenol-chloroform

- mieszaninę reakcyjną rozcieńczano do objętości co najmniej 100µl i dodano 0,5V fenolu oraz 0,5V chloroformu,
- wytrząsano i wirowano 1 minutę z prędkością 14000 rpm,
- zawierającą kwas nukleinowy fazę wodną przenoszono do nowej probówki i dodawano do niej 1 objętość chloroformu, wytrząsano i wirowano 1 minutę z prędkością 14000 rpm (dwukrotnie),
- do fazy wodnej dodawano 0,1V 3M CH<sub>3</sub>COONa i 3 objętości 96% etanolu,
- roztwór inkubowano 30 minut w temperaturze 4°C,
- wirowano 20 minut z prędkością 14000 rpm w temperaturze 4°C,
- roztwór dekantowano, a osad przemywano 500µl 70% etanolu,
- wirowano 20 minut z prędkością 14000 rpm w temperaturze 4°C,
- roztwór dekantowano, a osad suszono i rozpuszczano w 50µl H<sub>2</sub>O,
- stężenie określano mierząc absorpcję promieniowania UV dla λ<sub>260</sub>.

### 3.2.9. Sekwencjonowanie za pomocą ABI PRISM® Big Dye™ Terminator Ready Reaction Cycle Sequencing Kit

#### a) PCR

Reakcję prowadzono w następującej mieszance reakcyjnej:

4µl Terminator Ready Reaction Mix

3,2pmola startera

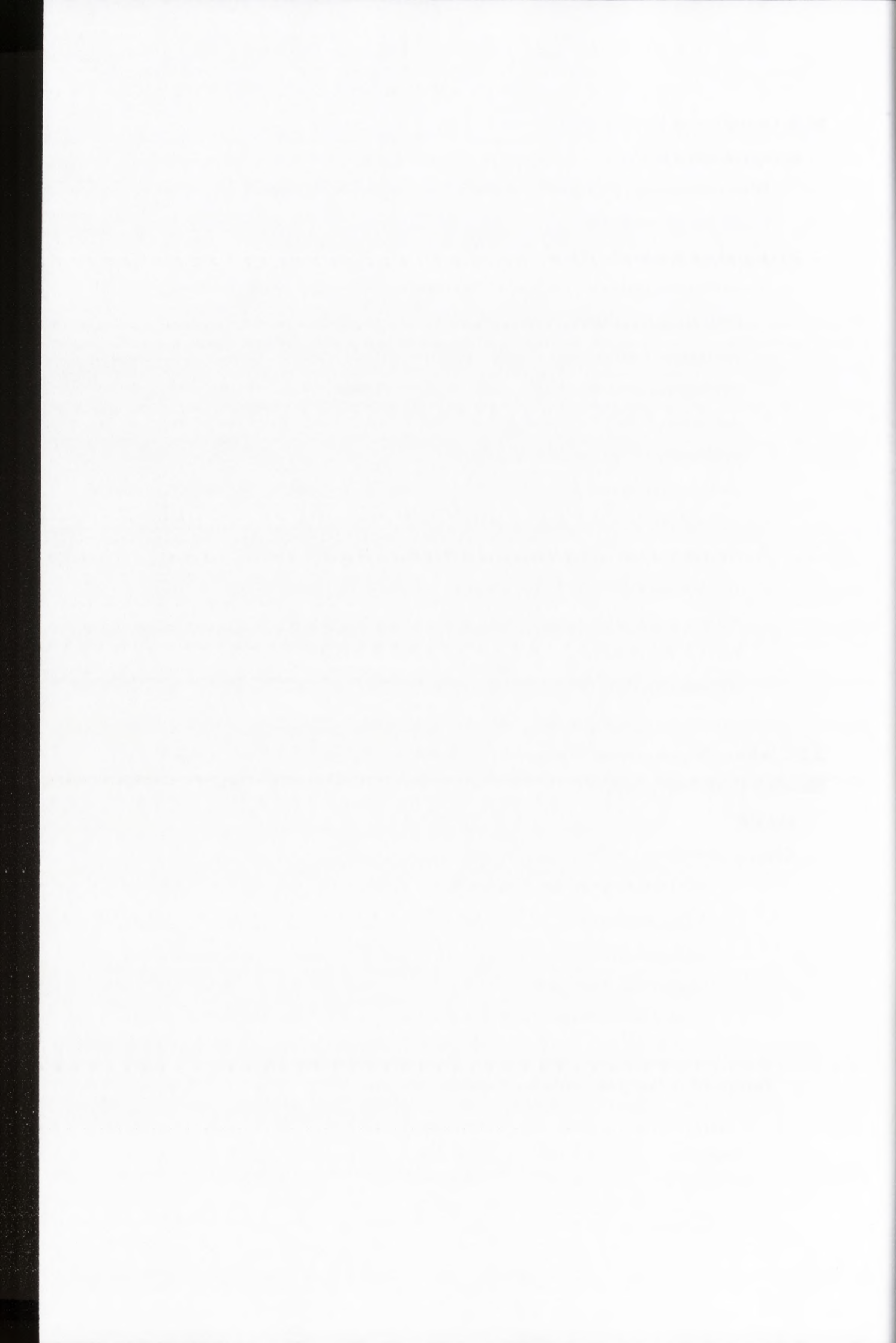
matryca\*

uzupełniano H<sub>2</sub>O do 10 µl

\*około 300ng w przypadku plazmidu, około 30 ng w przypadku produktu PCR

**Tabela 3.2.6. Warunki reakcji sekwencjonowania**

etap	czas	temperatura	ilość powtórzeń etapu
denaturacja	30 sekund	96°C	30
hybrydyzacja	15 sekund	50°C/60°C	
elongacja	4 minuty	60°C	



**b) oczyszczanie produktów reakcji sekwencjonowania**

- do 10 $\mu$ l mieszaniny reakcyjnej dodawano 2 $\mu$ l 3M octanu sodu pH 4,6 i 50 $\mu$ l 96% etanolu,
- inkubowano 10 minut w temperaturze 4°C,
- wirowano 30 minut z prędkością 14000 rpm w temperaturze 4°C,
- roztwór dekantowano, a osad przemywano 250 $\mu$ l 70% etanolu,
- wirowano 15 minut z prędkością 14000 rpm, w temperaturze 4°C,
- roztwór dekantowano, a osad osuszono,
- osad rozpuszczono w 8 $\mu$ l TSR (*Template Suppressing Reagent*, ABI PRISM),
- przygotowany preparat denaturowano 3 minuty w temperaturze 96°C,
- preparat inkubowano 5 minut w temperaturze 4°C,
- sekwencjonowanie przeprowadzono w sekwentatorze ABI-PRISM.

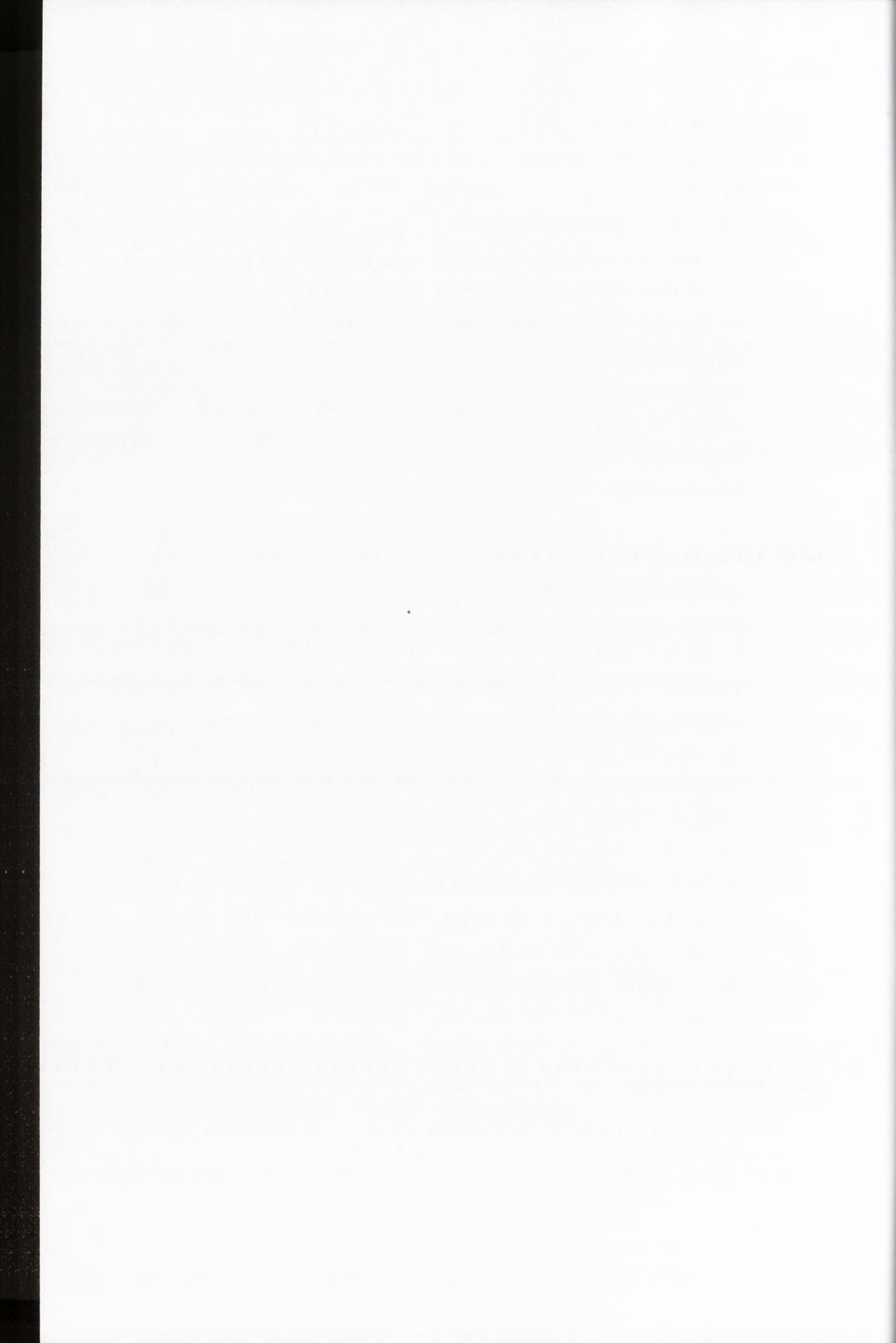
**3.2.10. Analiza produktów reakcji w żelach agarozowych**

- produkty PCR, trawienia restrykcyjnego oraz oczyszczania poddawane były analizie metodą elektroforezy w żelu agarozowym (1% w przypadku produktów o długości powyżej 300 pz oraz 1,5% w przypadku produktów krótszych, 2% w przypadku izolacji z żelu agarozowego LMT (*low melting temperature*)),
- do preparatów rozdzielanych w żelu dodawano barwnik do rozdziału elektroforetycznego kwasów nukleinowych w warunkach natywnych, do uzyskania 1-krotnego stężenia końcowego. Jako wzorzec długości DNA użyto 2 $\mu$ g 0,1kB (w przypadku produktów o długości poniżej 1000 pz) lub 1kB (w przypadku produktów długości powyżej 1000 pz),
- rozdzielanie prowadzono przy natężeniu 40-50mA i napięciu 120-130V,
- produkty rozdzielania elektroforetycznego wybarwiano w wodnym roztworze bromku etydyny (0,5 $\mu$ g/ml) przez 1 godzinę i analizowano wykorzystując promieniowanie UV.

**3.2.11. Analiza produktów reakcji w żelach poliakryloamidowych**

- produkty reakcji wydłużania startera (ssDNA), poddawane były analizie elektroforetycznej w 8% denaturującym żelu poliakryloamidowym,





- do preparatów rozdzielanych w żelu dodawano barwnik do rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych w warunkach denaturujących, do uzyskania 1-krotnego stężenia końcowego,
- tak przygotowane preparaty poddawano denaturacji w temperaturze 94°C trwającej 3 minuty, a następnie inkubowano 5 minut w temperaturze 4°C,
- rozdział prowadzono po wcześniejszej pre-elektroforezie przy natężeniu 10mA i napięciu 100-200V w żelu na małych o wymiarach 180 x 195 x 1 mm (max 25W) lub przy natężeniu 10mA i napięciu 300V w żelu na szybach o wymiarach 400 x 325 x 0,5 mm (max 50W). Po wejściu preparatów w żel, parametry podwyższano: natężenie do 40mA, napięcie do 500V (max 25W) dla małych żeli oraz natężenie do 40mA, napięcie do 1500V (max 50W) dla dużych żeli,
- jako wzorce długości użyto odpowiedniej długości dsDNA, wyznakowane ATP [ $\alpha$  32P] na końcu 5'
- produkty rozdzielania elektroforetycznego analizowano z użyciem skanera materiałów znakowanych radioizotopowo (Phosphorimager, Typhoon 8600).

### 3.2.12. Izolowanie i odzyskiwanie kwasów nukleinowych z żeli poliakryloamidowych

- produkty reakcji denaturowano 2-5minut w temperaturze 95°C i chłodzono 5 minut w temperaturze 4°C,
- zdeanturowane preparaty rozdzielano w denaturującym żelu poliakryloamidowym,
- pożądanej długości prążki wycinano z żelu i umieszczano w osobnych probówkach,
- dodano 150 $\mu$ l buforu elucyjnego (10% roztwór wodny 3M octanu sodu pH 5) i wytrząsano 1,5 godziny. Czynność powtarzano dwa razy,
- zebrane frakcje połączono, kwasy nukleinowe wytrącano 3V 96% etanolu przez noc w temperaturze -20°C,
- wirowano 20 minut z prędkością 14000rpm,
- roztwór dekantowano, a osad osuszono i rozpuszczono w 50 $\mu$ l H<sub>2</sub>O,
- stężenie oczyszczonego DNA bądź RNA określono mierząc absorpcję promieniowania UV dla  $\lambda_{260}$ .

Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page. The text is too light to transcribe accurately.

## 4. Wyniki

### 4.1. Badanie częstości homologicznych przeskoków rekombinacyjnych zachodzących pomiędzy genomowymi cząsteczkami RNA BMV

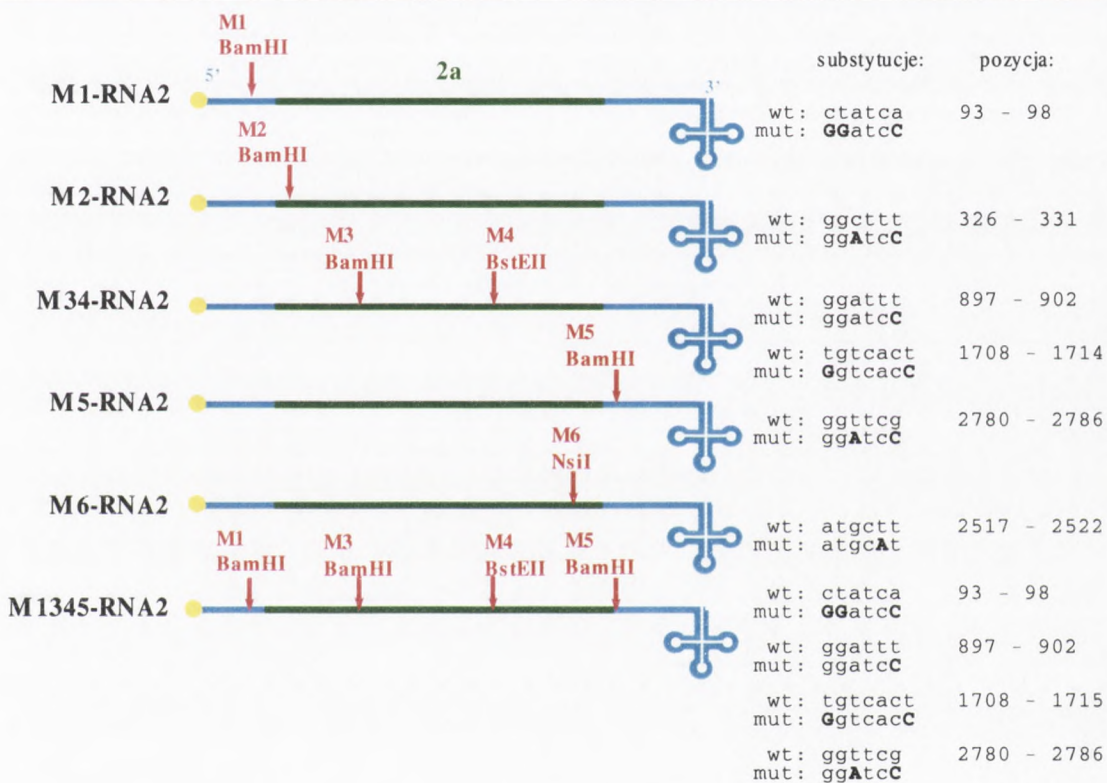
Ze względu na prostą budowę i dobrą znajomość cyklu replikacyjnego, wirus mozaiki stokłosa stanowi model służący poznaniu różnorodnych procesów zachodzących podczas infekcji wirusowej, między innymi rekombinacji RNA. Jedną z metod pozwalających na określenie częstości homologicznych przeskoków rekombinacyjnych zachodzących pomiędzy tymi samymi genomowymi cząsteczkami RNA BMV polega na wprowadzeniu substytucji nukleotydowych w taki sposób, aby w cDNA odpowiadającym wirusowemu RNA powstały markery w postaci dodanych lub usuniętych miejsc restrykcyjnych. Tzw. infekcja mieszana, wywołana dwoma mutantami BMV noszącymi substytucje w różnych miejscach tej samej genomowej cząsteczki, stwarza możliwość powstania potomnych RNA będących wynikiem przeskoku rekombinacyjnego pomiędzy dwoma wariantami zmutowanej cząsteczki zachodzącego podczas replikacji. Efektem takiego przeskoku jest przetasowanie markerów, a ilość rekombinantów w badanej populacji wirusowej można łatwo oszacować poprzez analizę restrykcyjną klonów wirusowego cDNA. Częstość rekombinacji homologicznej zachodzącej pomiędzy dwoma różnymi wariantami tej samej cząsteczki genomowego RNA w badanej populacji wirusowej odpowiada procentowej zawartości rekombinantów w całej puli badanych klonów wirusowego cDNA. Należy jednak pamiętać, że wprowadzone do RNA substytucje nukleotydowe nie mogą wpływać na zdolności replikacyjne wirusowych mutantów w porównaniu do typu dzikiego BMV. W przeciwnym wypadku presja selekcyjna spowoduje akumulację lepiej przystosowanego wariantu wirusa i otrzymane wyniki nie będą odzwierciedlały naturalnej częstości homologicznej rekombinacji.

Stosując takie podejście, określono częstość homologicznych przeskoków rekombinacyjnych zachodzących między różnymi wariantami genomowego RNA<sub>3</sub> BMV (Rozdział 1.3.2, Bruyere i wsp., 2000, Wierchoslawski i wsp., 2003). Otrzymane wyniki pozwoliły zidentyfikować miejsce o podwyższonej aktywności rekombinacyjnej zlokalizowane w obszarze intercystronowym RNA<sub>3</sub>. Aby uzupełnić dane na temat homologicznej rekombinacji RNA u BMV, podobnej analizie poddano pozostałe segmenty genomu BMV, czyli RNA<sub>1</sub> i RNA<sub>2</sub>.



#### 4.1.1. Otrzymanie serii mutantów M-RNA2-BMV zawierających markery w genomowych cząsteczkach RNA2

W pierwszej fazie badań do plazmidu pB2TP5, zawierającego cDNA odpowiadający RNA2 BMV, wprowadzono cztery serie substytucji nukleotydowych, tworzących markery (M1, M3, M4 i M5) w postaci miejsc restrykcyjnych. Otrzymano plazmidy pM1-, pM34- i pM5-RNA2 (Metody, rozdział 3.2.1.1.a). Markery stwarzały możliwość obserwacji przeskoków homologicznych w trzech oskrzydłanych przez nie, około 1000-nukleotydowych rejonach zmutowanego RNA2. Lokalizację markerów zawartych w serii mutantów M-RNA2 pokazano na rysunku 4.1 oraz w tabeli 4.1.



**Rysunek 4.1. Rozmieszczenie markerowych miejsc restrykcyjnych w serii mutantów M-RNA2**

Po lewej stronie rysunku przedstawiono schemat poszczególnych mutantów RNA2, po prawej stronie przedstawiono sekwencje typu dzikiego oraz sekwencje zawierającą substytucje tworzące markerowe miejsce restrykcyjne (wytluszczone) wraz z ich położeniem.

Rejon kodujący oznaczono kolorem zielonym, rejon niekodujący – niebieskim, strukturę kap – żółtym, markerowe miejsca restrykcyjne - czerwonym.

1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that proper record-keeping is essential for the success of any business and for the protection of the interests of all parties involved. The text also mentions the need for regular audits and the importance of having a clear system in place for recording and organizing financial data.



2. The second part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that proper record-keeping is essential for the success of any business and for the protection of the interests of all parties involved. The text also mentions the need for regular audits and the importance of having a clear system in place for recording and organizing financial data.

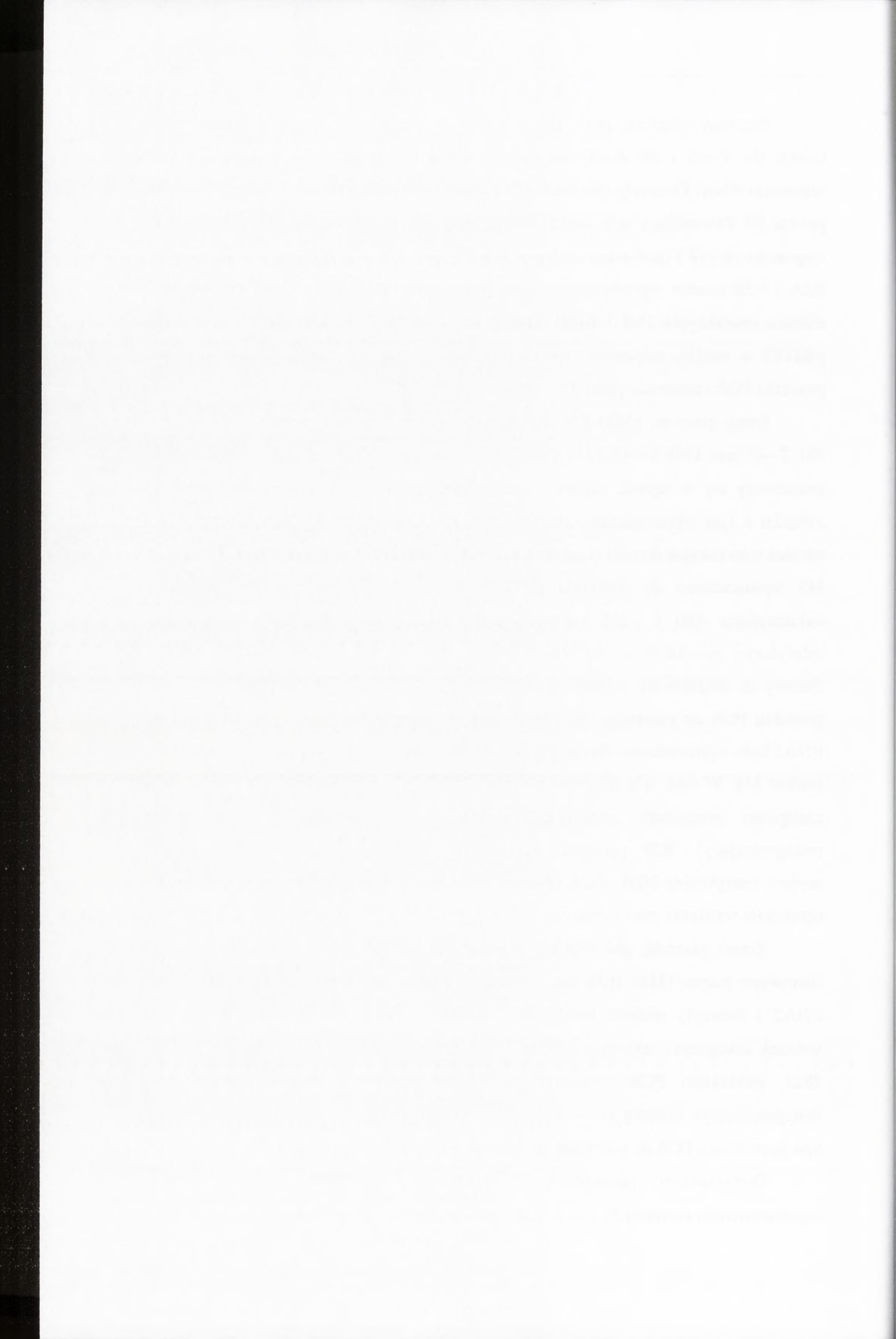
Pierwszy plazmid, pM1-RNA2, zawierał trzy substytucje nukleotydowe: 93 C→G, 94 T→G i 98 A→C w rejonie cDNA odpowiadającym 5'UTR badanej cząsteczki RNA. Tworzyły one marker M1 w postaci miejsca restrykcyjnego *Bam*HI w pozycji 93. Zawierający je konstrukt cDNA powstał wskutek amplifikacji metodą PCR fragmentu pB2TP5 pomiędzy nukleotydami 6014 i 116, oskrzydłanego przez startery R2A i R2B (starter wprowadzający substytucje). Startery obejmowały, odpowiednio, miejsca restrykcyjne *Pst*I i *Bst*BI. Otrzymany produkt PCR ligowano do plazmidu pB2TP5 w miejsce sekwencji typu dzikiego, po uprzednim trawieniu restrykcyjnym produktu PCR i plazmidu pB2TP5 enzymami *Pst*I i *Bst*BI.

Drugi plazmid, pM34-RNA2, zawierał substytucje nukleotydowe: 328 C→A i 331 T→C oraz 1708 T→G, 1714 T→C, które stanowiły markery M3 i M4. Markery te znajdowały się w rejonie cDNA, odpowiadającym genowi białka 2a w RNA2, w związku z tym wprowadzone substytucje musiały być synonimiczne. Tworzyły one miejsca restrykcyjne *Bam*HI w pozycji 326 (M3) i *Bst*EII w pozycji 1708 (M4). Marker M3 wprowadzono do plazmidu pB2TP5, zastępując fragment cDNA pomiędzy nukleotydami 880 i 1255 odpowiadającym mu produktem PCR zawierającym substytucje, powstałym z użyciem starterów R2C (starter mutagenizujący) i R2D. Startery te obejmowały miejsca restrykcyjne *Nco*I i *Kpn*I, umożliwiające ligowanie produktu PCR do plazmidu pB2TP5. Kolejnym etapem otrzymania plazmidu pM34-RNA2 było wprowadzenie do otrzymanego konstrukt dalszych substytucji tworzących marker M4. W tym celu fragment plazmidu pB2TP5, zawierającego już marker M3, zastąpiono produktem amplifikacji metodą PCR ze starterami R2E (starter mutagenizujący) i R2F, pomiędzy nukleotydami 1678 – 2379. Startery te zawierały miejsca restrykcyjne *Mlu*I i *Sac*I, co umożliwiło ligację produktu PCR do plazmidu, po uprzednim trawieniu restrykcyjnym.

Trzeci plazmid, pM5-RNA2, zawierał substytucje: 2782 T→A, 2785 G→C, stanowiące marker (M5). Były one położone w rejonie cDNA odpowiadającym 3'UTR RNA2 i tworzyły miejsce restrykcyjne *Bam*HI w pozycji 2780. Plazmid powstał wskutek zastąpienia sekwencji cDNA typu dzikiego pomiędzy nukleotydami 2498 – 2822, produktem PCR powstałym z użyciem starterów R2G i R2H (starter mutagenizujący). Startery zawierały miejsca restrykcyjne *Stu*I i *Bsa*MI, umożliwiające ligację produktu PCR do plazmidu, po uprzednim trawieniu restrykcyjnym.

Otrzymanymi plazmidami (pM1-RNA2, pM34-RNA2 i pM5-RNA2) transformowano komórki *E. coli* (szczep DH5 $\alpha$ ) a następnie hodowano na pożywkach





zawierających ampicylinę. Obecność markera antybiotykowego (gen  $\beta$ -laktamazy) w plazmidach pM-RNA2 umożliwiła wzrost w warunkach selekcji antybiotykowej (ampicylina) tylko transformowanym klonom bakteryjnym. Z wybranych klonów izolowano plazmidy, które analizowano w celu potwierdzenia obecności substytucji poprzez sekwencjonowanie i trawienia enzymami rozpoznającymi markerowe miejsca restrykcyjne powstałe w rezultacie wprowadzenia opisanych powyżej mutacji (Metody, rozdział 3.2.1.1.c-f). Stwierdzono, iż plazmidy pM1-RNA2, pM34-RNA2 i pM5-RNA2 zawierały wszystkie wprowadzone mutacje.

Kolejnym etapem tworzenia wirusowych mutantów serii M-RNA2-BMV było otrzymanie genomowych cząsteczek BMV, w tym zmutowanych M-RNA2 (Metody, rozdział 3.2.1.2.a). Mutanty wirusowe będą nadawały się do badań rekombinacji tylko wtedy, gdy mutacje zawarte w ich genomowych cząsteczkach RNA będą stabilne w czasie infekcji oraz neutralne względem cyklu replikacyjnego wirusa. Aby otrzymać cząsteczki RNA BMV, plazmidy pM1-RNA2, pM34-RNA2 i pM5-RNA2 oraz plazmidy pB1TP3 i pB3TP7, zawierające odpowiednio cDNA odpowiadający RNA1 i RNA3 BMV, trawiono endonukleazą *EcoRI*. Miejsce restrykcyjne rozpoznawane przez ten enzym znajduje się na końcach 3' cDNA wszystkich trzech plazmidów zawierających cDNA BMV, natomiast koniec 5' cDNA poprzedzony jest sekwencją promotorową rozpoznawaną przez polimerazę RNA zależną od DNA faga *T7*. Zliniowane plazmidy stanowią więc matrycę do transkrypcji *in vitro*. Transkrypcję *in vitro* prowadzono w mieszaninie reakcyjnej zawierającej, obok czterech trójfosforanów rybonukleotydowych, także i kap, którego obecność na końcu 5' genomowych cząsteczek BMV jest niezbędna w późniejszym procesie translacji wirusowych białek.

Otrzymane w rezultacie transkrypcji *in vitro* poszczególne warianty RNA2 łączono z pozostałymi komponentami genomu BMV (RNA1 i RNA3) oraz buforem do inokulacji i taką mieszaniną ręcznie infekowano 5-dniowy jęczmień siewny (*Hordeum sativum*) oraz 14-dniową komosę ryżową (*Chenopodium quinoa*) (Tabela 4.1, Metody, rozdział 3.2.1.2.b, schemat eksperymentu na rysunku 4.2). W jęczmieniu, będącym naturalnym gospodarzem BMV, infekcja obejmuje całą roślinę i objawia się jasną mozaiką występująca na liściach (Rysunek 4.2). Komosa zainfekowana BMV wytwarza plamki nekrotyczne wokół komórek do których dostał się wirus, dzięki czemu infekcja przebiega w sposób ograniczony. Rośliny kontrolne zakażono typem dzikim (wt) BMV (tzn. wtRNA1, wt RNA2 i wt RNA3).

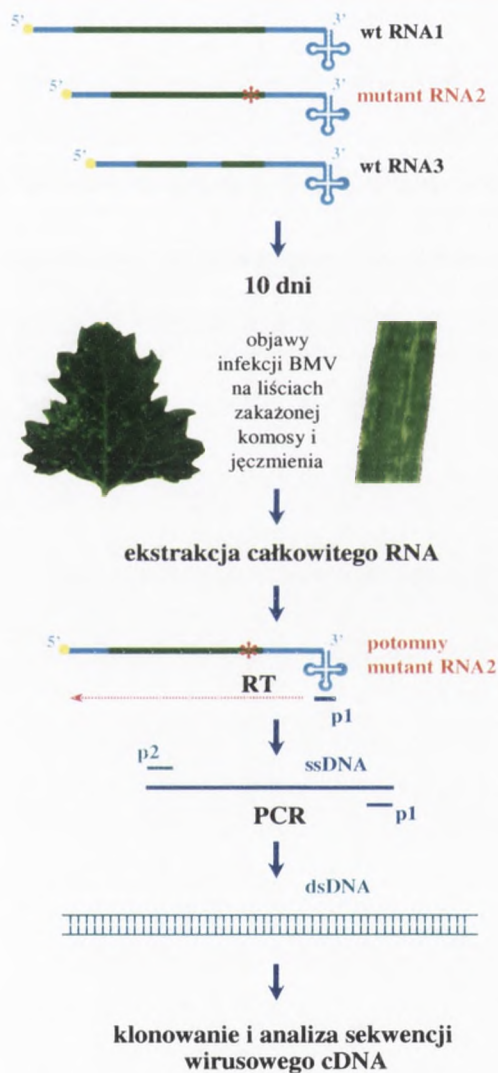
The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that proper record-keeping is essential for the success of any business and for the protection of the interests of all parties involved. The text outlines various methods for recording transactions, including the use of journals, ledgers, and account books. It also discusses the importance of regular audits and the role of accountants in ensuring the accuracy of the records.

The second part of the document focuses on the principles of accounting. It explains the basic accounting equation, which states that assets equal liabilities plus equity. It also discusses the importance of the double-entry system, which ensures that every transaction is recorded in two different accounts, thereby maintaining the balance of the accounting equation. The text also covers the various types of accounts used in accounting, such as assets, liabilities, equity, and income and expense accounts.

The third part of the document discusses the process of preparing financial statements. It explains how the information recorded in the accounting system is used to prepare the balance sheet, the income statement, and the statement of cash flows. It also discusses the importance of these statements for the management of the business and for the information of external stakeholders, such as investors and creditors.

The final part of the document discusses the role of accountants in the business. It explains that accountants are responsible for ensuring the accuracy and reliability of the financial information. They also provide advice to management on financial matters and help to ensure that the business complies with applicable laws and regulations. The text concludes by emphasizing the importance of a strong accounting system for the long-term success of any business.

Rośliny hodowano w szklarni przez około 10 dni (dni po infekcji), po czym obserwowano objawy infekcji i porównywano z roślinami kontrolnymi, zainfekowanymi typem dzikim BMV (schemat eksperymentu pokazano na rysunku 4.2). Stwierdzono, że infekcyjność mutantów wirusowych nie odbiegała od infekcyjności wirusa typu dzikiego, ponieważ czas pojawienia się oraz ilość objawów chorobowych na zainfekowanych serią M-RNA2-BMV oraz wt BMV roślinach były podobne (Tabela 4.1).



**Rysunek 4.2. Schemat badania stabilności i infekcyjności mutantów BMV**

Jęczmień siewny i komosę ryżową infekowano otrzymanymi metodą transkrypcji *in vitro* genomowymi cząsteczkami BMV, tzn. wtRNA1, M-RNA2 i wtRNA3 w przypadku badań RNA2, lub O-RNA1, wtRNA2 i wtRNA3 w przypadku badań RNA1, bądź wtRNA1, 2 i 3 w przypadku roślin kontrolnych. Po upływie 10 dni na liściach zakażonych roślin pojawiły się objawy infekcji: plamki nekrotyczne w przypadku komosy oraz mozaika u jęczmienia. Z roślin izolowano całkowity RNA, który następnie używano jako matrycy do odwrotnej transkrypcji ze starterem komplementarnym do końca 3' wszystkich trzech genomowych cząsteczek BMV. Uzyskany jednoniciowy DNA posłużył jako matryca w PCR ze starterami oskrzydłającymi badaną mutację markerową. W celu określenia stabilności wprowadzonych substytucji otrzymany podczas PCR cDNA klonowano i analizowano jego sekwencję poprzez sekwencjonowanie oraz trawienia restrykcyjne enzymem rozpoznającym markerowe miejsca restrykcyjne.



Aby potwierdzić stabilność mutacji wprowadzonych do RNA2 BMV, otrzymano cDNA odpowiadający potomnym cząsteczkom wirusowym powstałym po infekcji mutantami M-RNA2-BMV (Metody, rozdział 3.2.1.2.c-g). W tym celu przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji, stosując całkowity RNA wyizolowany z zakażonych roślin jako matrycę oraz starter 1<sup>st</sup>, komplementarny do końca 3' wszystkich trzech genomowych cząsteczek BMV. W ten sposób otrzymano jednoniciowy DNA (ssDNA – *single stranded DNA*). Mieszaninę reakcyjną odwrotnej transkrypcji zawierającą ssDNA używano następnie jako matrycy w reakcji PCR ze starterami oskrzydłającymi mutacje markerowe (dokładny opis użytych starterów znajduje się w rozdziale 3.2.1.1.e Metod). Uzyskane produkty PCR klonowano do wektora pDRIVE, wchodzącego w skład zestawu do klonowania QIAGEN PCR cloning kit. Wektor ten pozwala na ligowanie produktów reakcji PCR z użyciem polimerazy DNA *Taq* bez uprzedniego trawienia (dokładny opis wektora zawarty jest w rozdziale 3.1.4 Materiałów). Wektor pDRIVE zawiera gen  $\beta$ -laktamazy, umożliwiający selekcję antybiotykową klonów, oraz gen *lacZ*, umożliwiający selekcję insercyjną plazmidów zawierających inserty (tzw. *blue-white screening*). Uzyskane plazmidy transformowano do komórek *E. coli*, klonowano i izolowano. Zawarty w plazmidach cDNA odpowiadający wirusowemu RNA2 trawiono restryktazą *EcoRI*, w celu wyselekcjonowania plazmidów zawierających odpowiedniej długości insert (sekwencje rozpoznawane przez *EcoRI* oskrzydłają miejsce klonowania). Właściwe plazmidy, zawierające cDNA RNA2, trawiono restryktazami rozpoznającymi markerowe miejsca restrykcyjne oraz sekwencjonowano. Po przeanalizowaniu uzyskanych wyników stwierdzono, że substytucje w rejonie kodującym RNA2 (M3 i M4) pozostały niezmienione w trakcie infekcji w roślinie, natomiast substytucje w niekodujących rejonach 3' i 5' RNA2 (M1 i M5) uległy rewersji do typu dzikiego.

Stabilność substytucji nukleotydowych w rejonie kodującym RNA2 i niestabilność w rejonach niekodujących potwierdzono dodatkowo, przeprowadzając eksperyment polegający na zainfekowaniu jęczmienia mutantem M1345-RNA2-BMV, zawierającym w RNA2 wszystkie cztery markery (Rysunek 4.1, Tabela 4.1) i analizie potomnych cząsteczek RNA2 BMV. Aby otrzymać mutant M1345-RNA2-BMV, do plazmidu pM34-RNA2 wprowadzono markery M1 i M5, postępując według opisanej wyżej procedury dla plazmidów pM1-RNA2 i pM5-RNA2. Na podstawie zliniowanego enzymem *EcoRI* plazmidu M1345-RNA2-BMV, otrzymano metodą transkrypcji *in vitro* M1345-RNA2, który, wraz z transkryptami wtRNA1 i wtRNA3 używano do

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry should be supported by a valid receipt or invoice, and that these documents should be stored in a secure and accessible location. The text also mentions the need for regular audits to ensure the integrity of the financial data.

In the second section, the author outlines the various methods used for data collection and analysis. This includes the use of surveys, interviews, and focus groups to gather qualitative data, as well as the application of statistical models to quantitative data. The importance of choosing the right method for the specific research objectives is highlighted.

The third part of the document focuses on the ethical considerations of research. It discusses the need for informed consent from participants, the protection of their privacy, and the avoidance of any potential conflicts of interest. The author stresses that ethical standards are not only a moral obligation but also a legal requirement in many cases.

Finally, the document concludes with a summary of the key findings and a call to action for researchers to adhere to the highest standards of academic integrity and transparency. It encourages the sharing of results and the collaboration between different research teams to advance the field.

inokulacji komosy i jęczmienia. Po 10 dpi z zakażonych roślin izolowano całkowity RNA, który używano jako matrycę do otrzymania cDNA odpowiadającego RNA2 w reakcji RT-PCR zgodnie z wyżej opisaną metodyką (Metody, rozdział 3.2.1.2.c-g). cDNA ligowano do wektora pDRVE, a otrzymane plazmidy klonowano w komórkach *E. coli* DH5 $\alpha$ , poddawano analizie restrykcyjnej enzymami rozpoznającymi markery oraz sekwencjonowano. Ponownie stwierdzono, iż substytucje M1 i M5 uległy rewersji do typu dzikiego, natomiast substytucje M3 i M4 pozostały niezmienione.

**Tabela 4.1. Położenie markerowych mutacji, czas po którym pojawiły się objawy infekcji na zakażonych roślinach, ilość plamek nekrotycznych powstałych na liściach komosy oraz stabilność mutantów serii M-RNA2**

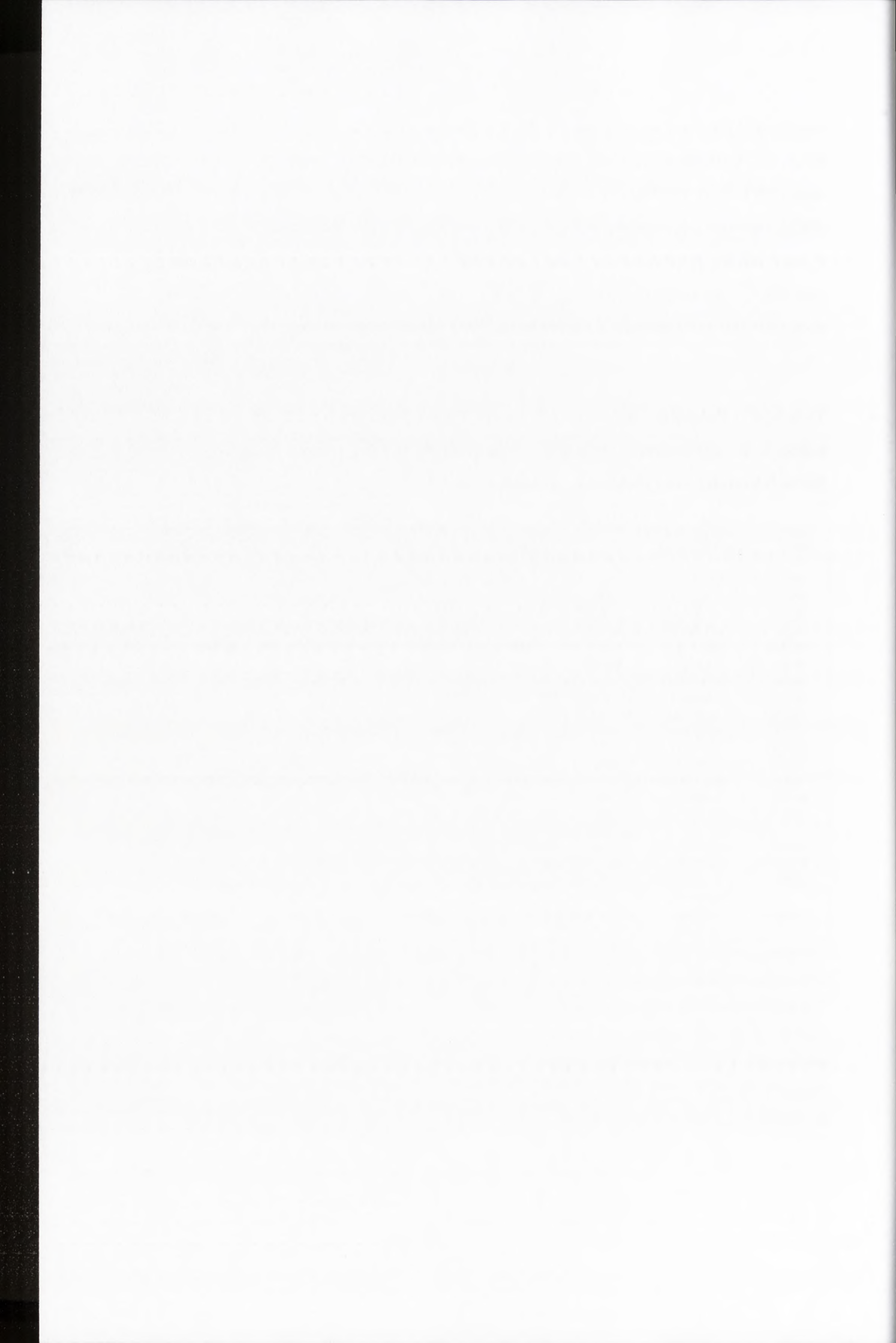
mutant BMV	skład mieszaniny inokulacyjnej <sup>1)</sup>	marker <sup>2)</sup>	położenie markera	ilość plamek nekrotycznych	czas rozwoju infekcji	stabilność mutacji markerowych <sup>3)</sup>
M1-RNA2-BMV	M1-RNA2 wtRNA1, wt RNA3	M1 BamHI	5'UTR, pozycja 93	33	9 dni	niestabilna
M2-RNA2-BMV	M2-RNA2 wtRNA1, wt RNA3	M2 BamHI	ORF, pozycja 326	27	10 dni	stabilna
M34-RNA2-BMV	M34-RNA2 wtRNA1, wt RNA3	M3 BamHI M4 BstEII	ORF, poz. 897 ORF, poz. 1708	31	9 dni	stabilna
M5-RNA2-BMV	M5-RNA2 wtRNA1, wt RNA3	M5 BamHI	3'UTR, pozycja 2780	37	9 dni	niestabilna
M6-RNA2-BMV	M6-RNA2 wtRNA1, wt RNA3	M6 NsiI	ORF, pozycja 2517	22	11 dni	stabilna
M1345-RNA2-BMV	M1345-RNA2 wtRNA1, wt RNA3	M1 BamHI M3 BamHI M4 BstEII M5 BamHI	5' UTR, poz. 93 ORF, poz. 897 ORF, poz. 1708 3'UTR, poz. 2780	29	10 dni	M1-niestabilna M3- stabilna M4-stabilna M5- niestabilna
WT	wt RNA1 wtRNA2, wt RNA3	nie dotyczy		36	9 dni	nie dotyczy

<sup>1)</sup> Ponieważ genom BMV składa się z trzech segmentów, rośliny inokulowano zsyntetyzowanymi *in vitro* trzema komponentami genomu.

<sup>2)</sup> Nowoutworzone miejsce restrykcyjne.

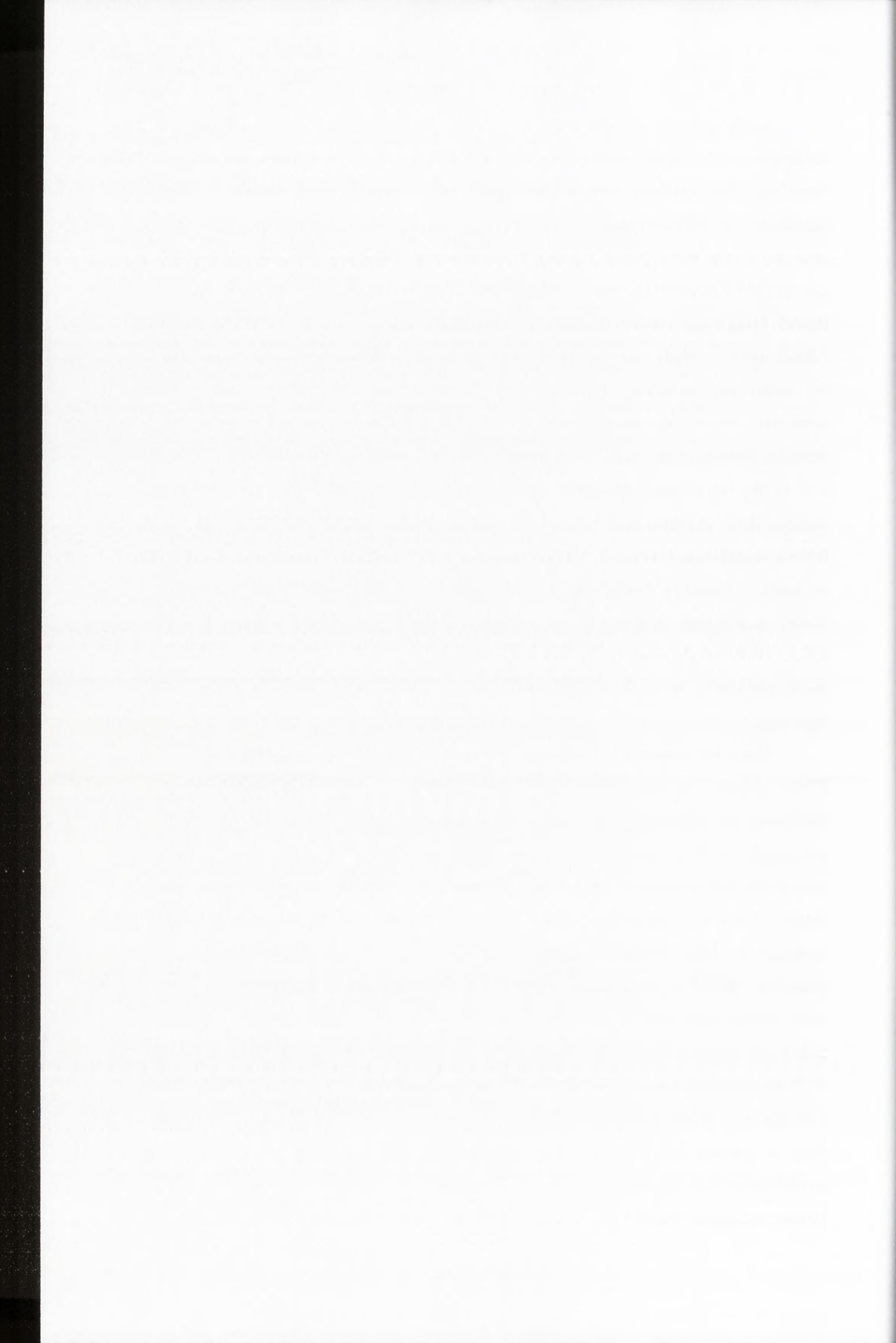
<sup>3)</sup> Stabilność mutacji markerowych potwierdzono poprzez sekwencjonowanie cDNA odpowiadającego wirusowemu RNA2 i analizę restrykcyjną około 24 klonów cDNA dla każdej z mutacji. cDNA otrzymano metodą RT-PCR na matrycy całkowitego RNA wyizolowanego z 3-4 roślin jęczmienia i 3-4 plamek nekrotycznych powstałych na komosie po zakażeniu poszczególnymi mutantami wirusowymi.





Zanik mutacji markerowych w niekodujących rejonach RNA2 mógł być rezultatem działania jednego z dwóch zjawisk. Pierwsze z nich to rekombinacja RNA z homologicznym rejonem jednej z pozostałych genomowych cząsteczek BMV (RNA1 lub RNA3). W takim wypadku sekwencja 3' lub 5'UTR cząsteczek RNA2 w pokoleniu potomnym powstałym podczas infekcji mutantami M1-RNA2-BMV, M5-RNA2-BMV czy M1345-RNA2-BMV, byłaby identyczna z sekwencją 3' lub 5' UTR RNA1 lub RNA3. Drugim ze zjawisk mogących powodować usunięcie markerów z 3' i 5'UTR RNA2 BMV są błędy replikacji RNA popełniane przez wirusową RdRp, prowadzące do odtworzenia sekwencji typu dzikiego. W przypadkach obydwu zjawisk, presja selekcyjna faworyzuje cząsteczki nie zawierające sztucznie wprowadzonych mutacji, prawdopodobnie ze względu na ich lepsze właściwości replikacyjne. Dzięki temu, iż 3' i 5' UTRy poszczególnych genomowych cząsteczek BMV różnią się pojedynczymi nukleotydami, porównanie sekwencji tych rejonów w potomnym RNA2 oraz RNA1 lub RNA3 umożliwiło określenie, który z tych dwóch mechanizmów odpowiedzialny jest za zanik substytucji. Sekwencja nukleotydowa 3' i 5' UTR cząsteczek potomnych RNA2 powstałych podczas infekcji M1-RNA2-BMV, M5-RNA2-BMV i M1345-RNA2-BMV uległa rewersji do sekwencji typu dzikiego RNA2. Fakt ten wskazuje, że zanik markerów w tych rejonach wirusowego RNA jest efektem nieprecyzyjnej replikacji.

Ponieważ markery M1 i M5, położone w 3' i 5' UTRach genomowego RNA2 BMV okazały się niestabilne, zaistniała konieczność otrzymania dwóch nowych wariantów tej cząsteczki. Tym razem markery umieszczono w rejonach kodujących, postępując według opisanego wcześniej schematu (Metody, rozdział 3.2.1.1.a-f), pamiętając jednocześnie o zachowaniu sekwencji aminokwasowej kodowanego przez RNA2 białka 2a. Marker M2 stanowiły dwie substytucje (328 C→A i 231 T→C) tworzące w cDNA miejsce restrykcyjne *Bam*HI w pozycji 326. Wprowadzono je do plazmidu pB2TP5, poprzez amplifikację PCR fragmentu pomiędzy 6014 i 360 nukleotydem przy pomocy starterów R2A i R2B2 (starter mutagenizujący). Startery te pokrywały miejsca restrykcyjne *Pst*I i *Pfl*MI pB2TP5, co umożliwiło ligację produktu PCR do plazmidu. Ostatni marker, jaki został wprowadzony do RNA2, nosił nazwę M6 i składał się z jednej substytucji (2520 T→A), tworzącej w cDNA miejsce restrykcyjne *Nsi*I w pozycji 2517. Substytucję wprowadzono do plazmidu pB2TP5 poprzez amplifikację PCR fragmentu pomiędzy nukleotydami 2498 i 2865, ze starterami R2G2 (starter mutagenizujący) i 1<sup>st</sup>, które obejmowały miejsca restrykcyjne *Eco*RI i *Bsa*MI



plazmidu. Miejsca te zostały wykorzystane do ligacji produktu PCR i plazmidu.

Uzyskanymi plazmidami zawierającymi markery (pM2-RNA2 oraz pM6-RNA2) transformowano komórki kompetentne *E. coli*. Z wybranych klonów izolowano plazmidy i potwierdzano obecność mutacji poprzez sekwencjonowanie i analizę restrykcyjną. Aby przetestować stabilność markerów M2 i M6 w czasie infekcji, jęczmień siewny i komosę ryżową infekowano dwoma nowymi mutantami, M2-RNA2-BMV i M6-RNA2-BMV (Metody, rozdział 3.2.1.2). W tym celu otrzymano metodą transkrypcji *in vitro* cząsteczki M2-RNA2 i M6-RNA2 oraz wtRNA1 i RNA3, stosując jako matryce zliniowane *EcoRI* plazmidy pM2-RNA21, pM6-RNA2, pB1TP3 i pB3TP7. Rośliny inokulowano wtRNA1, mutantem RNA2 oraz wtRNA3, zawieszonymi w buforze inokulacyjnym. Po 10 dpi objawy infekcji porównywano z roślinami kontrolnymi, zainfekowanymi typem dzikim BMV (schemat eksperymentu pokazano na rysunku 4.2). Stwierdzono, że infekcyjność mutantów M2-RNA2-BMV i M6-RNA2-BMV nie odbiegała od infekcyjności wirusa typu dzikiego, ponieważ czas występowania oraz nasilenie objawów chorobowych na zainfekowanych i zdrowych roślinach były podobne (Tabela 4.1). Aby określić, czy markery M2 i M6 nie ulegają rewersji do typu dzikiego, z zakażonych roślin izolowano całkowity RNA i stosowano go jako matrycę w reakcji odwrotnej transkrypcji ze starterem 1<sup>st</sup>. Na bazie ssDNA otrzymywano wirusowy cDNA obejmujący markery, który klonowano w wektorze pDRIVE, a następnie sekwencjonowano i analizowano poprzez trawienia enzymami rozpoznającymi markerowe miejsca restrykcyjne (Metody, rozdział 3.2.1.2). Stwierdzono stabilność markerów M2 i M6 w trakcie infekcji, a mutanty M2-RNA2-BMV i M6-RNA2-BMV uznano za zdadne do wykorzystania w eksperymencie rekombinacyjnym.

Kończącym etapem otrzymywania wariantów BMV zawierających markery w genomowym RNA2 była izolacja mutantów M2-RNA2-BMV, M34-RNA2-BMV i M6-RNA2-BMV z zakażonego nimi jęczmienia. Preparaty wirusowe otrzymano zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 3.2.1.2.h Metod.

Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page. The text is too light to transcribe accurately.

#### 4.1.2. Badanie homologicznej rekombinacji RNA zachodzącej pomiędzy genomowymi cząsteczkami RNA2 BMV

Badania homologicznej rekombinacji pomiędzy RNA2 BMV prowadzono z użyciem mutantów BMV (M2-RNA2-BMV, M34-RNA2-BMV i M6-RNA2-BMV), zawierających trzy warianty tej cząsteczki (M2-RNA2, M34-RNA2 i M6-RNA2), z markerami umiejscowionymi w rejonie kodującym. Markery wyznaczały w RNA2 trzy obszary, w których możliwa była obserwacja procesu rekombinacji. Obszar pierwszy pomiędzy mutacjami M2 i M3 obejmował 571 nukleotydów (326 *Bam*HI – 897 *Bam*HI). Kolejny obszar o długości 811 nukleotydów wyznaczały mutacje M3 i M4 (897 *Bam*HI – 1708 *Bst*EII). Ostatni obszar, o długości 809 nukleotydów, był oskrzydłony przez mutacje M4 i M6 (1708 *Bst*EII – 2517 *Nsi*I). Przeprowadzono dwie serie koinokulacji: M2-RNA2-BMV / M34-RNA2-BMV i M34-RNA2-BMV / M6-RNA2-BMV (schemat eksperymentu pokazano na rysunku 4.2, jednak zamiast otrzymanych metodą transkrypcji *in vitro* genomowych cząsteczek RNA BMV, używano par wirusowych mutantów, wyizolowanych wcześniej z zakażonych roślin). Podczas replikacji w roślinie obydwie warianty RNA2 użyte do koinokulacji mogły służyć zarówno jako donator jak i akceptor. Analiza restrykcyjna cDNA odpowiadającego potomnemu RNA2 umożliwiła obserwację przetasowania markerów, będącego efektem przeskoku rekombinacyjnego, oraz poznanie częstości rekombinacji w badanym rejonie oskrzydłanym przez dwa markery. Obliczając częstość rekombinacji zakładano, iż powstałe rekombinanty były rezultatem pojedynczego przeskoku RdRp w obrębie badanego rejonu dwóch różnych wariantów RNA2.

Aby określić, czy gospodarz lub ilość cykli replikacyjnych wpływa na częstość rekombinacji, zainfekowano dwa gatunki roślin: jęczmień siewny i komosę ryżową. W jęczmieniu, jako gospodarzu systemicznym, wirus replikuje i rozprzestrzenia się bez ograniczeń w całej roślinie, natomiast komosa wytwarza plamki nekrotyczne, ograniczając infekcję do pierwotnie zakażonych komórek.

##### 4.1.2.1. Koinfekcje M2-RNA2-BMV / M34-RNA2-BMV

Po pojawieniu się objawów infekcji (około 10 dpi), z zakażonych mutantami M2-RNA2-BMV / M34-RNA2-BMV roślin izolowano całkowity RNA i metodą odwrotnej transkrypcji ze starterem 1<sup>st</sup> otrzymywano ssDNA, który stosowano jako matrycę w reakcji PCR ze starterami Ko5 i R2D lub Ko5 i R2F, oskrzydłającymi dwa obszary RNA2, w których badana była rekombinacja. Produktem reakcji PCR były

1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that proper record-keeping is essential for the success of any business and for the protection of the interests of all parties involved. The text outlines the various methods and systems that can be used to ensure the accuracy and reliability of financial data.

2. The second part of the document focuses on the role of the auditor in the financial reporting process. It describes the responsibilities of the auditor and the standards that must be followed to ensure the integrity of the financial statements. The text also discusses the importance of communication between the auditor and the management of the company.

3. The third part of the document addresses the issue of fraud and the measures that can be taken to prevent it. It highlights the need for a strong internal control system and the importance of regular audits. The text also discusses the legal consequences of fraud and the role of the courts in resolving such cases.

4. The fourth part of the document discusses the importance of transparency and disclosure in financial reporting. It emphasizes that companies should provide clear and concise information about their financial performance and the risks they face. The text also discusses the role of the regulatory authorities in ensuring that companies comply with the relevant disclosure requirements.

5. The fifth part of the document discusses the importance of ethical behavior in the financial reporting process. It emphasizes that companies should always act in the best interests of their shareholders and the public. The text also discusses the role of the professional bodies in promoting and enforcing ethical standards.

6. The sixth part of the document discusses the importance of the role of the board of directors in financial reporting. It emphasizes that the board is responsible for ensuring that the financial statements are accurate and reliable. The text also discusses the role of the board in overseeing the internal control system and the audit process.

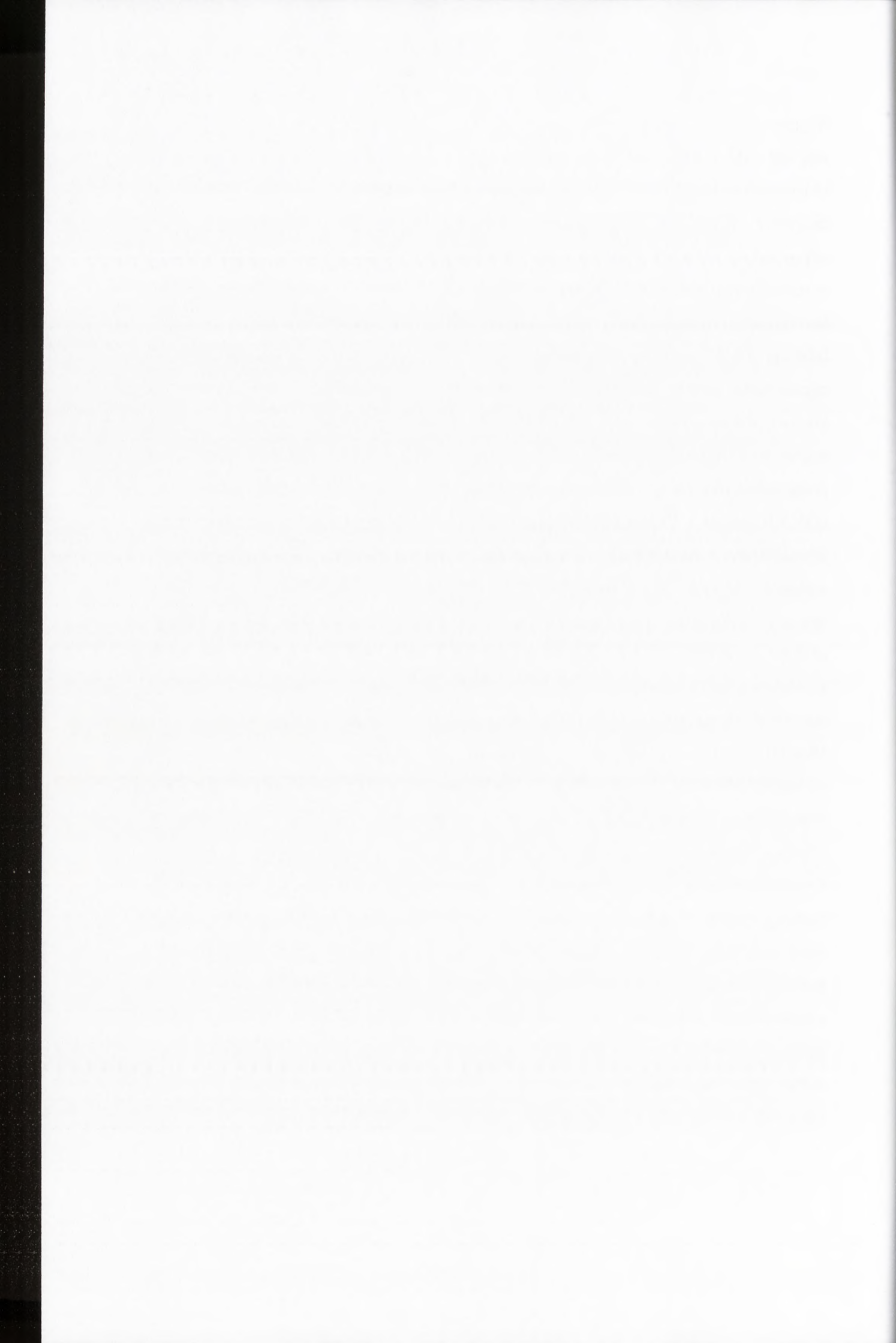
7. The seventh part of the document discusses the importance of the role of the external auditors in financial reporting. It emphasizes that external auditors play a crucial role in providing independent assurance on the financial statements. The text also discusses the role of the external auditors in promoting transparency and disclosure.

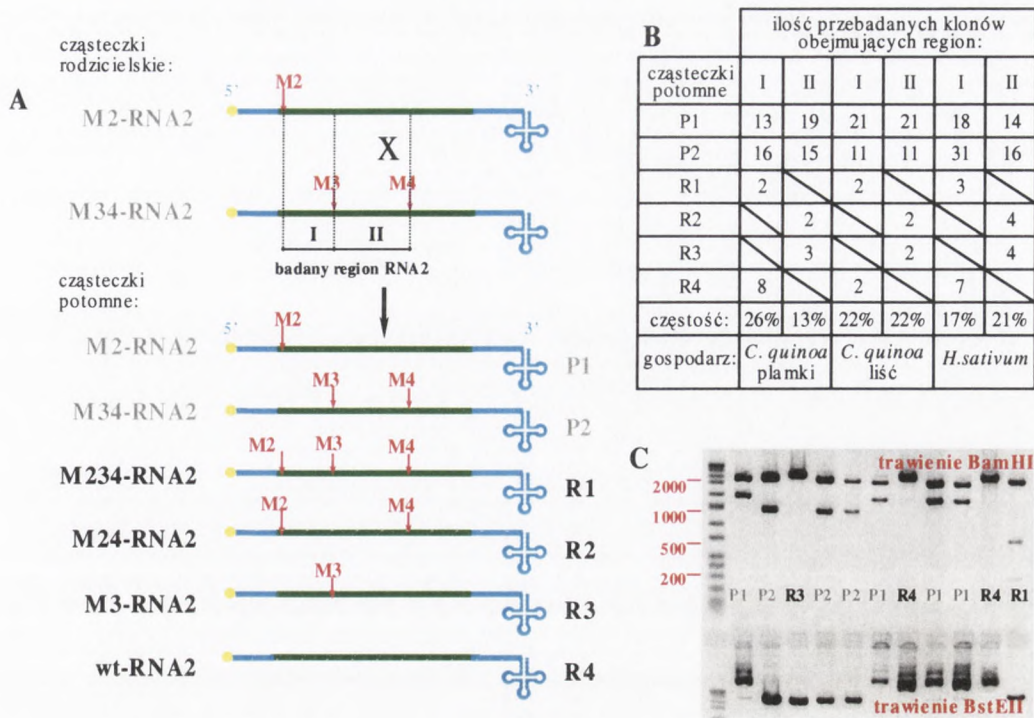
8. The eighth part of the document discusses the importance of the role of the regulatory authorities in financial reporting. It emphasizes that the regulatory authorities are responsible for ensuring that companies comply with the relevant financial reporting requirements. The text also discusses the role of the regulatory authorities in promoting transparency and disclosure.

fragmenty cDNA o długości 1125pz lub 2260 pz (cDNA obejmujący markery M2 i M3 lub M2, M3 i M4). cDNA ligowano do wektora pDRIVE, a otrzymane plazmidy klonowano w komórkach *E. coli*. Z wybranych klonów izolowano plazmidy i trawiono enzymem *EcoRI* w celu wyselekcjonowania plazmidów zawierających insert odpowiedniej długości. Właściwe klony trawiono restryktazami *BamHI* i *BstEII* w celu określenia rozmieszczenia markerów w potomnych cząsteczkach RNA2 i częstości homologicznych przeskoków rekombinacyjnych (Metody, rozdział 3.2.1.3).

Infekcja BMV w komosie ryżowej nie przebiega w sposób systemiczny, a jest ograniczona jedynie do plamek nekrotycznych. W przypadku koinokulacji liścia komosy dwoma mutantami, nie wszystkie plamki nekrotyczne zawierają obydwie warianty wirusowe, ponieważ brak jest przepływu wirusowego RNA pomiędzy poszczególnymi plamkami. Z tego powodu, przed przystąpieniem do klonowania, cDNA uzyskany z 24 plamek nekrotycznych z liścia komosy zakażonej mutantami M2-RNA2-BMV / M34-RNA2-BMV poddano trawieniu *BamHI* i *BstEII*. Analiza ta wykazała, że tylko w połowie plamek nekrotycznych obecne były obydwie warianty wirusowe. Pozostałe plamki zawierały tylko jednego z mutantów BMV. Dalszej analizie poddano cDNA uzyskany z RNA izolowanego dwóch podwójnie zainfekowanych plamek nekrotycznych (RNA z dwóch plamek połączono przed reakcją odwrotnej transkrypcji), klonując go w wektorze pDRIVE. Rozkład markerów M2 (*BamHI*) i M3 (*BamHI*) badano wśród 39 klonów cDNA. Analiza restrykcyjna wykazała obecność 13 klonów typu rodzicielskiego M2-RNA2, 16 klonów typu rodzicielskiego M34-RNA2, 2 zrekombinowane klony M234-RNA2 zawierające obydwie markery oraz 8 zrekombinowanych klonów odpowiadających wtRNA2. Częstość rekombinacji, rozumiana jako zawartość procentowa rekombinantów w badanej próbie, wynosiła 26%. Częstość rekombinacji homologicznej między markerami M3 (*BamHI*) i M4 (*BstEII*) osiągnęła wartość 13%, co określono na podstawie analizy restrykcyjnej tych samych 39 klonów zawierających cDNA odpowiadający rejonowi RNA2 zawierającemu markery M2, M3 i M4. Spośród badanych klonów, 19 zawierało cDNA typu rodzicielskiego M2-RNA2 i 15 zawierało cDNA typu rodzicielskiego M34-RNA2. 5 klonów stanowiły rekombinanty RNA2: 2 zawierały marker M24, a 3 zawierały marker M3 (Rysunek 4.3).







**Rysunek 4.3. Homologiczna rekombinacja podczas koinfekcji M2-RNA2-BMV / M34-RNA2-BMV**

**A** - Rozmieszczenie markerów w parze rodzicielskich wariantów M2-RNA2 i M34-RNA2 i w cząsteczkach potomnych. Podczas koinfekcji wskutek pojedynczego przeskoku rekombinacyjnego mogą powstać cząsteczki rodzicielskie (P1 i P2) oraz cztery typy rekombinantów (R1-R4).

Markery oznaczono kolorem czerwonym, rejony kodujące - zielonym, a niekodujące - niebieskim.

**B** - Rozkład markerów w wirusowym RNA2 wyizolowanym z roślin zakażonych parą M2-RNA2 i M34-RNA2 oraz częstość rekombinacji (częstość rekombinacji dla RNA2 wyizolowanego z całego liścia komosy szacowano dzieląc ilość obserwowanych rekombinantów przez połowę badanych klonów, ponieważ tylko 50% plamek nekrotycznych zawierała obydwa mutanty wirusowe).

**C** - Przykładowa analiza restrykcyjna cDNA w 1% natywnym żelu agarozowym. Trawieniu enzymami BamHI (M2 i M3) i BstEII (M4) poddano plazmid o długości 6110 par zasad (pz.) złożony z insertu w postaci cDNA o długości 2260pz obejmującego trzy mutacje markerowe wprowadzone do RNA2 BMV oraz wektora pDRIVE o długości 3850pz. Wskutek trawienia restrykcyjnego BamHI (górną część żelu) obserwowano fragmenty DNA o długości: 227pz / 5883pz lub 2070pz / 4040pz (miejsce BamHI w pDRIVE i M2, insert może być wligowany w dwóch orientacjach w stosunku do wektora), 799pz / 5311pz lub 1496pz / 4614pz (miejsce BamHI w pDRIVE i M3), 227pz / 572pz / 5311pz lub 1496pz / 572pz / 4042pz (miejsce BamHI w pDRIVE, M2 i M3). Po trawieniu restrykcyjnym BstEII tych samych klonów (dolną część żelu), obserwowano fragment DNA o długości 6110pz (M4 - zliniowany plazmid) lub niezliniowany plazmid (wt RNA2).

Marker długości DNA oznaczono czerwonymi cyframi, cząsteczki rodzicielskie oznaczono literami P1 i P2. Rekombinanty oznaczono literami R1-R4.

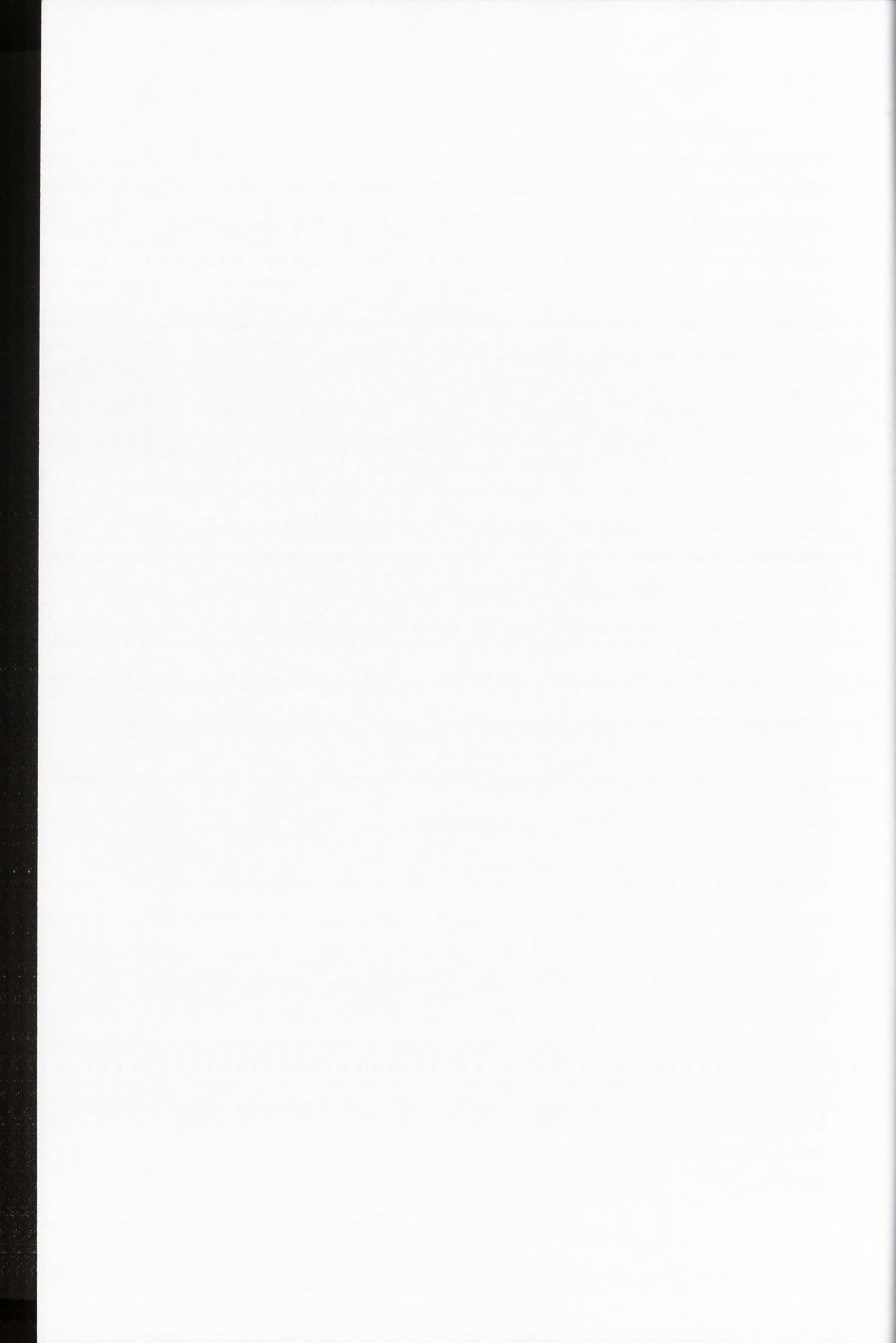
Year	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990
...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

The following table shows the results of the survey conducted in 1990. The data is presented in a table format, with the first column representing the year and the subsequent columns representing the different categories of the survey. The data shows a general upward trend in the number of respondents over the period from 1980 to 1990.

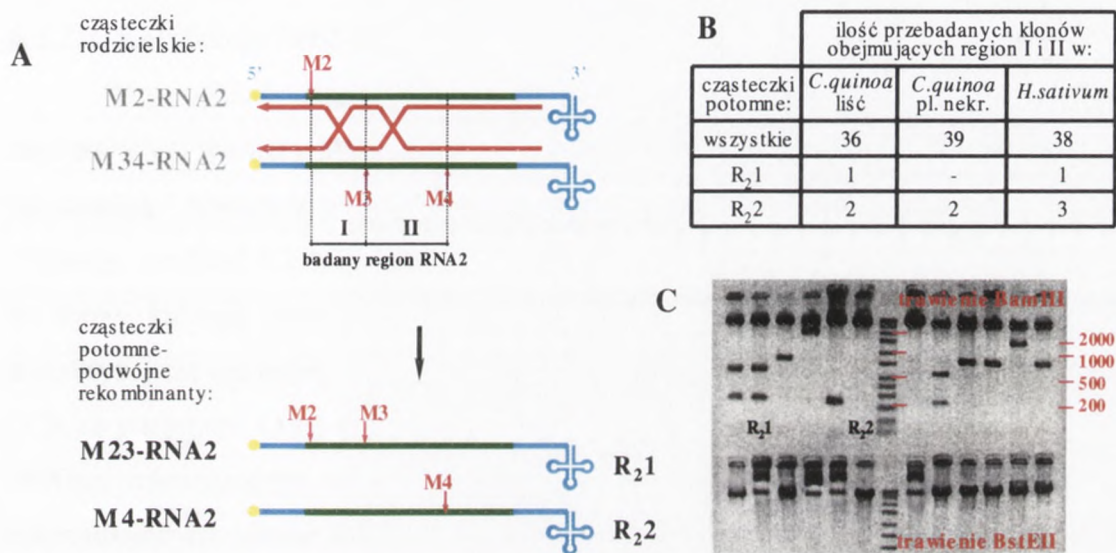
The survey results indicate that the majority of respondents are in the 25-34 age group, followed by the 35-44 age group. The data also shows that the majority of respondents are male, with a smaller proportion being female. The survey was conducted in 1990, and the results are presented in a table format. The data shows a general upward trend in the number of respondents over the period from 1980 to 1990.

W podobny sposób przebadano wirusowy RNA2, obecny wśród całkowitego RNA wyizolowanego z liścia komosy, zainfekowanej mutantami M2-RNA2-BMV / M34-RNA2-BMV. Otrzymany na podstawie całkowitego RNA cDNA odpowiadający fragmentowi RNA2 zawierającemu markery M2, M3 i M4 klonowano w wektorze pDRIVE i trawiono *Bam*HI i *Bst*EII. Częstość rekombinacji szacowano, dzieląc ilość obserwowanych zrekombinowanych klonów cDNA przez połowę wszystkich badanych klonów cDNA, ponieważ tylko 50% plamek nekrotycznych zawierała obydwie mutanty wirusowe. Rekombinacja homologiczna w rejonie oskrzydłanym markerami M2 i M3 osiągnęła wartość 22%. Spośród 36 przebadanych klonów, 21 zawierało cDNA typu rodzicielskiego M2-RNA2, 11 zawierało cDNA typu rodzicielskiego M34-RNA2 i po 2 klony zawierały zrekombinowany M234-RNA2 i wtRNA2. W rejonie pomiędzy markerami M3 i M4 obserwowano 21 klonów cDNA odpowiadających rodzicielskiemu M2-RNA2, 11 klonów odpowiadających rodzicielskiemu M34-RNA2 oraz po dwa zrekombinowane klony M3-RNA2 i M24-RNA2. Obserwowane rekombinanty stanowiły 22% wszystkich przeanalizowanych klonów (Rysunek 4.3).

W jęczmieniu infekcja BMV przebiega w sposób systemiczny, tak więc obydwie warianty wirusowe, jeżeli już dostaną się do komórek gospodarza, rozprzestrzenia się bez ograniczeń w całej roślinie. Aby poznać częstość homologicznej rekombinacji zachodzącej pomiędzy markerami M2, M3 i M4 wprowadzonymi do RNA2, z fragmentu liścia zakażonego jęczmienia izolowano całkowity RNA i na jego podstawie otrzymywano cDNA odpowiadający pożądanemu fragmentowi RNA2. cDNA klonowano w wektorze pDRIVE i trawiono enzymami rozpoznającymi markery M2, M3 i M4. Stwierdzono, że w rejonie między markerami M2 i M3 rekombinacja homologiczna zachodziła z częstością 17%. Po przeanalizowaniu 59 klonów zawierających cDNA odpowiadający temu rejonowi RNA2, stwierdzono obecność 18 klonów odpowiadających rodzicielskiemu M2-RNA2 i 31 klonów odpowiadających rodzicielskiemu M34-RNA2. 10 klonów cDNA odpowiadało zrekombinowanemu RNA2: 3 klony zawierały markery M2 i M3, natomiast 7 – wtRNA2. Efekty homologicznych przeskoków rekombinacyjnych w rejonie między markerami M3 i M4 obserwowano w 8 klonach cDNA na 38 przebadanych (po 4 dla rekombinantów M3-RNA2 i M24-RNA2), a częstość rekombinacji osiągnęła 21%. Rodzicielskie cząsteczki RNA2 reprezentowało 14 klonów cDNA M2-RNA2 i 16 klonów cDNA M34-RNA2 (Rysunek 4.3).



Mutanty M2-RNA2-BMV i M34-RNA2-BMV oskrzydlaają 1391-nukleotydowy fragment RNA2 zawierający markerowe miejsca restrykcyjne: M2 (326 *Bam*HI), M3 (897 *Bam*HI) i M4 (1708 *Bst*EII). Dzięki obecności w tym rejonie trzech markerów można badać, z jaką częstością zachodzą dwukrotne przeskoki rekombinacyjne. Wskutek dwóch przeskoków rekombinacyjnych mogą powstać dwa rodzaje rekombinantów: M23 i M4 (Rysunek 4.4).



**Rysunek 4.4. Powstawanie podwójnych homologicznych rekombinantów podczas koinfekcji M2-RNA2-BMV / M34-RNA2-BMV**

**A** - Rozmieszczenie markerów w rodzicielskich wariantach M2-RNA2 i M34-RNA2 i w podwójnie zrekombinowanych cząsteczkach potomnych (R<sub>2</sub>1 i R<sub>2</sub>2).

Markery i kierunek syntezy cząsteczek potomnych oznaczono kolorem czerwonym, rejony kodujące RNA - zielonym, niekodujące - niebieskim.

**B** - Ilość podwójnych rekombinantów spośród RNA2 wyizolowanego z roślin zakażonych parą M2-RNA2 i M34-RNA2.

**C** - Przykładowa analiza restrykcyjna cDNA w 1% natywnym żelu agarozowym. Trawieniu enzymami *Bam*HI (M2 i M3) i *Bst*EII (M4) poddano plazmid o długości 6110pz złożony z insertu cDNA o długości 2260pz, obejmującego trzy markery wprowadzone do RNA2 BMV oraz wektora pDRIVE o długości 3850pz. Wskutek trawienia restrykcyjnego *Bam*HI (górna część żelu) obserwowano fragmenty cDNA o długości: 227pz / 5883pz lub 2070pz / 4040pz (miejsce *Bam*HI w pDRIVE i M2, insert może być wligowany w dwóch orientacjach), 799pz / 5311pz lub 1496pz / 4614pz (miejsce *Bam*HI w pDRIVE i M3), 227pz / 572pz / 5311pz lub 1496pz / 572pz / 4042pz (miejsce *Bam*HI w wektorze pDRIVE, M2 i M3). Po trawieniu restrykcyjnym *Bst*EII tych samych klonów (dolna część żelu), obserwowano fragmenty cDNA o długości 6110pz (M4 - zliniowany plazmid) lub niezliniowany plazmid (wt RNA2). Marker długości DNA oznaczono czerwonymi cyframi, podwójne rekombinanty - literami R<sub>2</sub>1 i R<sub>2</sub>2.

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry should be supported by a valid receipt or invoice. The text also mentions the need for regular audits to ensure the integrity of the financial data.

Date	Description	Amount	Category
2023-01-15	Office Supplies	150.00	Operating Expenses
2023-01-20	Client Meeting	200.00	Revenue
2023-02-01	Monthly Rent	500.00	Operating Expenses
2023-02-10	Software License	300.00	Operating Expenses
2023-02-15	Client Payment	1000.00	Revenue



The second part of the document provides a detailed breakdown of the company's revenue streams. It lists various services offered and the corresponding revenue generated from each. The text also discusses the impact of market conditions on the company's performance.

The third part of the document discusses the company's financial strategy for the upcoming year. It outlines the goals for revenue growth and cost reduction. The text also mentions the importance of maintaining a strong relationship with investors and creditors.

The final part of the document provides a summary of the key findings and recommendations. It emphasizes the need for continued monitoring and reporting to ensure the company remains on track with its financial goals. The text also mentions the importance of transparency and communication with stakeholders.

Pośród 39 klonów zawierających cDNA obejmujący markery M2, M3 i M4, pochodzących z RNA wyizolowanego z dwóch plamek nekrotycznych obecne były 2 podwójne rekombinanty. Analiza 36 klonów RNA2 BMV powstałych na całym liściu komosy po koinokulacji wyżej wymienionymi mutantami BMV ujawniła obecność 3 podwójnych rekombinantów, podczas gdy pośród 38 klonów RNA2 BMV pochodzących z zakażonego mutantami M2-RNA2-BMV i M34-RNA2-BMV jęczmienia zaobserwowano 4 podwójne rekombinanty.

#### 4.1.2.2. Koinfekcje M34-RNA2-BMV / M6-RNA2-BMV

Aby poznać częstość homologicznej rekombinacji RNA w rejonie RNA2 zawierającym markery M3, M4 i M6, jęczmień siewny i komosę ryżową koinfekowano mieszaniną, zawierającą preparaty wirusowe M34-RNA2-BMV i M6-RNA2-BMV (Metody, rozdział 3.2.1.3). Po 10 dpi z zakażonych roślin izolowano całkowity RNA, na bazie którego otrzymywano ssDNA odpowiadający RNA2, metodą odwrotnej transkrypcji ze starterem 1<sup>st</sup>. ssDNA wykorzystywano następnie jako matrycę w reakcji PCR ze starterami 119 i 1<sup>st</sup>, umożliwiającymi amplifikację fragmentu cDNA o długości 1490pz, mieszczącego w sobie markery M4 i M6, lub ze starterami Ko5 i R2F, oskrzydłającymi obszar RNA2 o długości 2260 pz, zawierający markery M3 i M4 (ten fragment cDNA analizowano jedynie w przypadku koinokulacji M34-RNA2-BMV / M6-RNA2-BMV w jęczmieniu). cDNA klonowano w wektorze pDRIVE, a plazmidy zawierające cDNA pożądanej długości poddawano analizie restrykcyjnej enzymami rozpoznającymi markerowe miejsca restrykcyjne (*Bam*HI, *Bst*EII i *Nsi*I).

cDNA otrzymany z RNA izolowanego z 24 plamek nekrotycznych powstałych wskutek koinfekcji M34-RNA2-BMV i M6-RNA2-BMV trawiono endonukleazami *Bst*EII i *Nsi*I rozpoznającymi markerowe miejsca restrykcyjne, w celu określenia, jaka ich część zawierała obydwa warianty wirusowe. Podobnie jak w przypadku koinfekcji RNA2-BMV / M34-RNA2-BMV, tylko 50% z plamek nekrotycznych powstało wskutek zakażenia obydwojma mutantami. cDNA uzyskany na podstawie RNA wyizolowanego z dwóch podwójnie zainfekowanych plamek nekrotycznych klonowano w wektorze pDRIVE, a następnie izolowano i poddawano analizie restrykcyjnej enzymami *Bst*EII i *Nsi*I. Wykazała ona, że częstość rekombinacji homologicznej w 809-nukleotydowym rejonie pomiędzy markerami M4 (1708 *Bst*EII) i M6 (2517 *Nsi*I) osiągała wartość 18%. Wynik ten uzyskano po przebadaniu 17 klonów cDNA, spośród których po 7 zawierało cDNA odpowiadający cząsteczkom rodzicielskich, natomiast

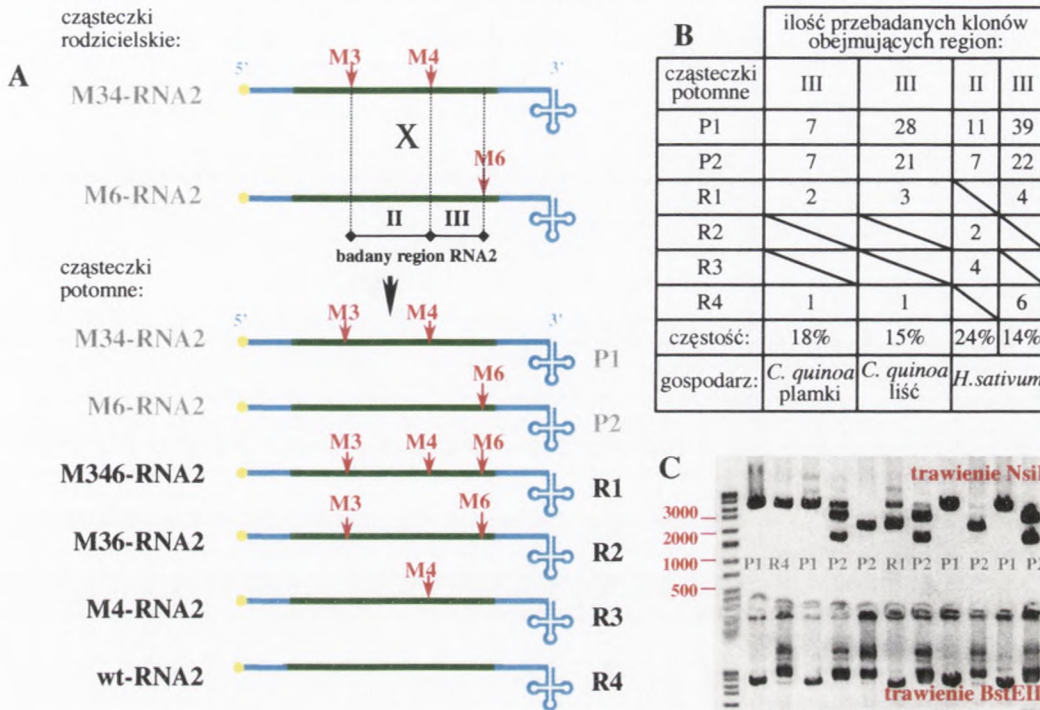


The first part of the paper discusses the importance of...

The second part of the paper discusses the importance of...

The third part of the paper discusses the importance of...

trzy były rekombinantami (2 zawierały obydwie mutacje markerowe, jeden miał sekwencję odpowiadającą wtRNA2, Rysunek 4.5).



### Rysunek 4.5. Homologiczna rekombinacja podczas koinfekcji M34-RNA2-BMV / M6-RNA2-BMV

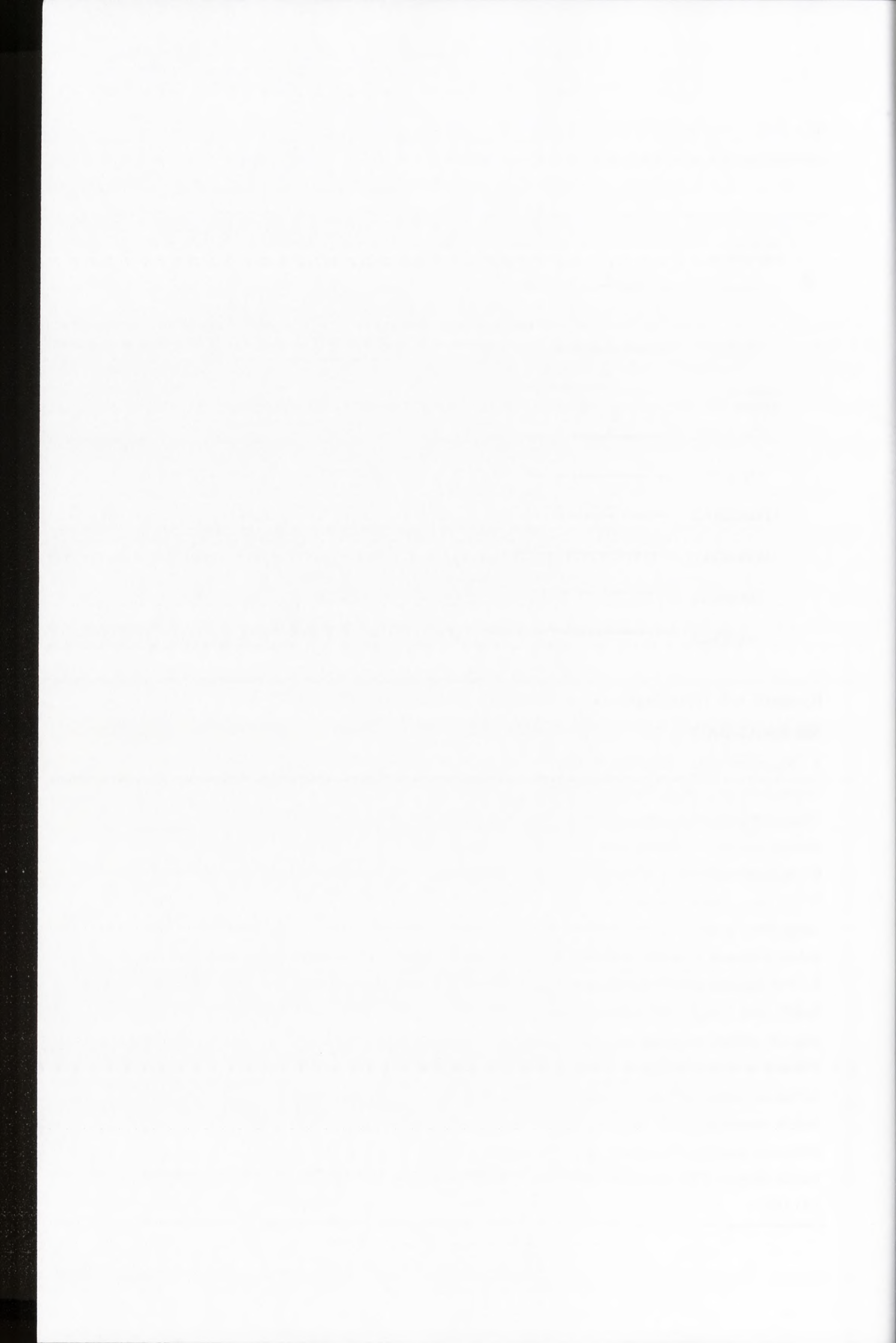
**A** - Rozmieszczenie markerów w parze rodzicielskich wariantów M34-RNA2 i M6-RNA2 i w cząsteczkach potomnych. Podczas koinfekcji w roślinie odtwarzane są cząsteczki rodzicielskie (P1 i P2). Wskutek pojedynczego przeskoku rekombinacyjnego powstają cztery typy rekombinantów (R1-R4).

Markery oznaczono kolorem czerwonym, rejony kodujące - zielonym, a niekodujące - niebieskim.

**B** - Rozkład markerów w wirusowym RNA2 wyizolowanym z roślin zakażonych parą M34-RNA2 i M6-RNA2 oraz częstość rekombinacji (częstość rekombinacji dla wirusowego RNA2 wyizolowanego z całego liścia komosy szacowano dzieląc ilość obserwowanych rekombinantów przez połowę wszystkich badanych klonów, ponieważ tylko 50% plamek nekrotycznych zawierała obydwa mutanty wirusowe).

**C** - Przykładowa analiza restrykcyjna cDNA w 1% natywnym żelu agarozowym. Trawieniu enzymami BstEII (M4) i NsiI (M6) poddano plazmid o długości 5340pz złożony z insertu cDNA o długości 1490pz obejmującym dwie mutacje markerowe oraz wektora pDRIVE o długości 3850pz. Wskutek trawienia NsiI (górna część żelu) obserwowano fragmenty DNA o długości: 266pz / 1796pz / 3278pz lub 266pz / 2502pz / 2572pz (dwa miejsca NsiI w pDRIVE i M6, insert może być wligowany w dwóch orientacjach). Po trawieniu BstEII tych samych klonów (dolna część żelu), obserwowano zliniowany plazmid o długości 5340pz (M4) lub plazmid niezliniowany (wtRNA2).

Marker długości DNA oznaczono czerwonymi cyframi, cząsteczki rodzicielskie - P1 i P2, rekombinanty - R1 i R4.

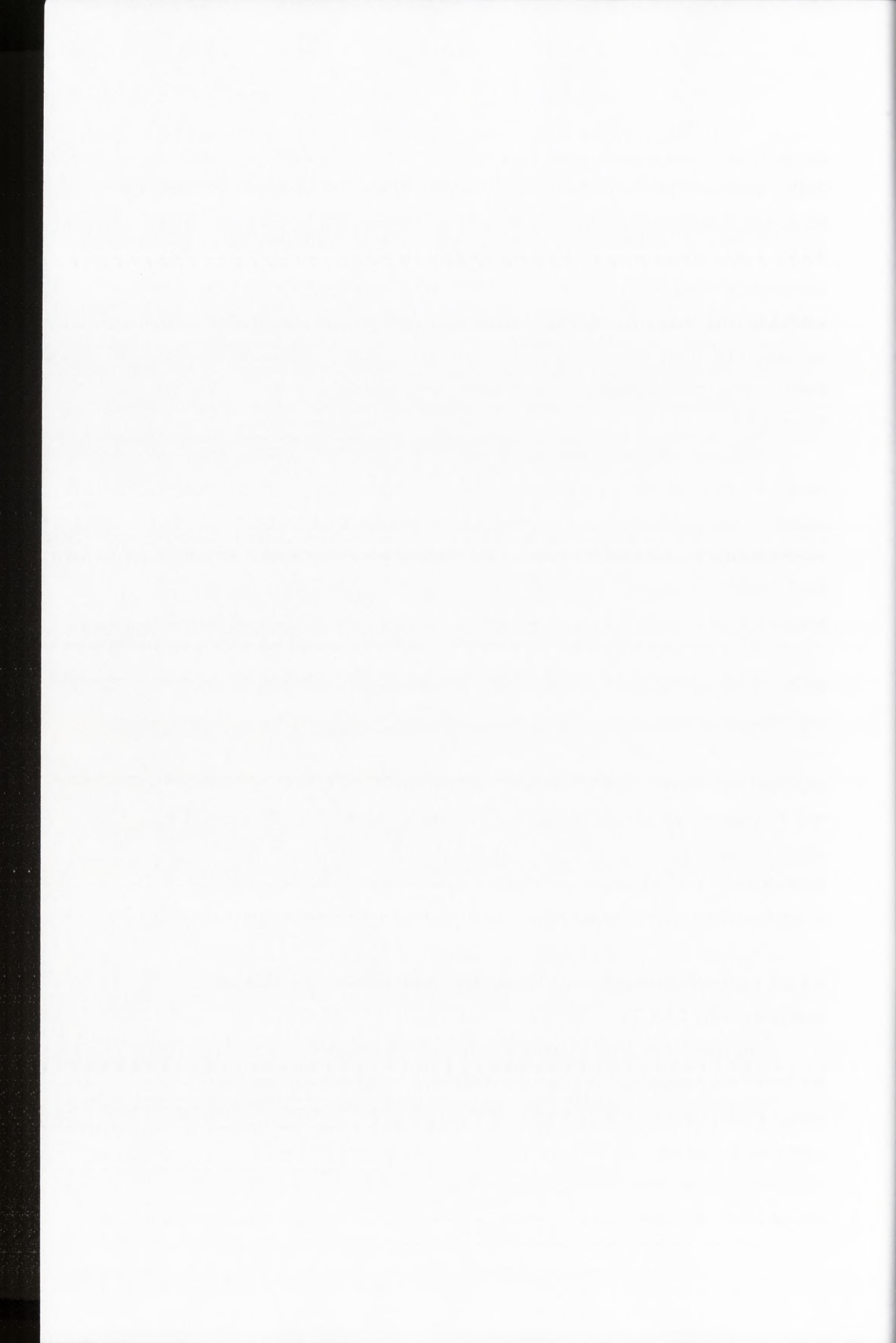


W kolejnym etapie badań analizowano wirusowy RNA2 wyizolowany z całego liścia komosy zainfekowanego mutantami M34-RNA2-BMV / M6-RNA2-BMV. Spośród 53 klonów cDNA w wektorze pDRIVE, odpowiadających odcinkowi RNA2 oskrzydlanemu przez markery M4 i M6, 28 zawierało typ rodzicielski M34-RNA2 i 21 zawierało typ rodzicielski M6-RNA2. 4 klony zawierały cDNA odpowiadający zrekombinowanemu RNA2 (3 klony typu M346-RNA2 i 1 klon typu wtRNA2). Obliczono, iż częstość rekombinacji pomiędzy markerami M4 i M6 wynosiła 15% (ilość rekombinantów dzielono przez połowę wszystkich badanych klonów, gdyż 50% plamek nekrotycznych zawierała obydwa mutanty wirusowe, Rysunek 4.5).

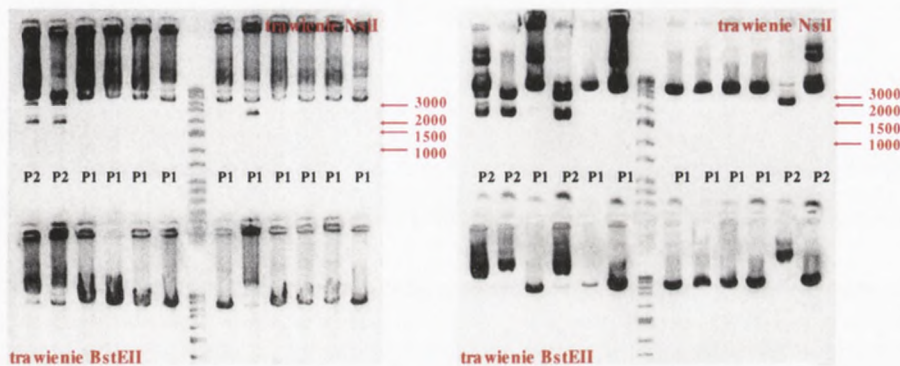
Następnie przebadano sklonowany w wektorze pDRIVE cDNA uzyskany w reakcji RT-PCR na matrycy całkowitego RNA wyizolowanego z fragmentu liścia jęczmienia (gospodarz systemiczny), koinfekowanego mutantami M34-RNA2-BMV i M6-RNA2-BMV. Przeanalizowano 24 klony cDNA odpowiadające fragmentowi RNA2 między markerami M3 i M4 i zaobserwowano obecność 11 klonów typu rodzicielskiego M34-RNA2, 7 klonów typu rodzicielskiego M6-RNA2 oraz 6 klonów odpowiadających zrekombinowanemu RNA2: 2 typu M36-RNA2 oraz 4 typu M4-RNA2. Taki rozkład mutacji markerowych w pokoleniu potomnym oznacza, iż rekombinacja homologiczna między markerami M3 i M4 wRNA2 zachodziła z częstością 24%. Trawienie restrykcyjne BstEII i NsiI 71 klonów zawierających cDNA odpowiadający rejonowi RNA2 pomiędzy mutacjami M4 i M6 wykazało, że zawierały one 39 klonów cDNA odpowiadającym rodzicielskim M34-RNA2, 22 klony cDNA odpowiadające rodzicielskim M6-RNA2 oraz 4 klony reprezentujące zrekombinowany M346-RNA2 i 6 klonów reprezentujących zrekombinowany wtRNA2 (Rysunek 4.5). Częstość homologicznej rekombinacji RNA w tym eksperymencie osiągnęła więc 14%.

#### **4.1.2.3. Kontrola aktywności rekombinacyjnej odwrotnej transkryptazy *MMLV* oraz polimerazy DNA *Taq***

Aby upewnić się, że zaobserwowane rekombinanty nie powstają podczas reakcji RT-PCR, przeprowadzono eksperyment kontrolny. Zainfekowano jęczmień (dwie osobne rośliny) mutantem M34-RNA2-BMV lub M6-RNA2-BMV. Po pojawieniu się symptomów choroby (10 dpi) wyizolowano z roślin całkowity RNA. Następnie zmieszano ze sobą równe ilości RNA pochodzącego z każdej z roślin i przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji ze starterem 1<sup>st</sup>, stosując takie same warunki jak podczas



wyżej opisanych badań. Uzyskany ssDNA posłużył następnie jako matryca w reakcji PCR ze starterami 119 i 1<sup>st</sup>, umożliwiającymi amplifikację fragmentu cDNA o długości 1490pz, mieszczącego w sobie markery M4 i M6. Otrzymany cDNA klonowano w wektorze pDRIVE i wyizolowane z klonów 24 plazmidy zawierające pożądaną cDNA odpowiadającą wirusowemu RNA2 poddano analizie restrykcyjnej enzymami *BstEII* i *NsiI* (markery M4 i M6).



#### Rysunek 4.6. Kontrolna aktywności rekombinacyjnej MMLV RT oraz polimerazy DNA Taq

Kontrolną RT-PCR prowadzono z użyciem matryc będących mieszaniną całkowitego RNA izolowanego z dwóch roślin, osobno zakażonych mutantami M34-RNA2- lub M6-RNA2-BMV. cDNA klonowano i analizowano restrykcyjnie, a rezultat obserwowano w 1% natywnym żelu agarozowym. Trawieniu enzymami *BstEII* (M4) i *NsiI* (M6) poddano plazmid o długości 5340pz złożony z insertu w postaci cDNA o długości 1490pz, obejmującego dwie mutacje markerowe oraz wektora pDRIVE o długości 3850pz. Wskutek trawienia *NsiI* (górną część żelu) powstały fragmenty DNA o długości: 266pz / 1796pz / 3278pz lub 266pz / 2502pz / 2572pz (dwa miejsca *NsiI* w pDRIVE i M6). Po trawieniu tych samych klonów enzymem *BstEII* (dolną część żelu), obserwowano fragmenty DNA: zliniowany plazmid o długości 5340pz (M4) lub niezliniowany plazmid (wtRNA2).

Marker długości DNA oznaczono czerwonymi cyframi, cząsteczki rodzicielskie - literami P1 (M34-RNA2) i P2 (M6-RNA2), cząsteczek zrekombinowanych nie zaobserwowano.

Po przeanalizowaniu produktów trawienia stwierdzono, że wśród badanych klonów cDNA obecne były tylko cząsteczki odpowiadające rodzicielskim RNA2 (17 klonów typu M34-RNA i 7 klonów typu M6-RNA2). Nie zaobserwowano rekombinantów. Wynik ten dowodzi, że podczas RT-PCR nie dochodzi do rekombinacji homologicznej i że reakcja ta nie zmienia sekwencji markerów (Rysunek 4.6).

The first part of the report discusses the general situation of the country and the progress of the work done during the year. It also mentions the various committees and their work.

## REPORT OF THE

### COMMISSIONERS OF THE

#### LAND OFFICE

The Land Office has during the year been engaged in the following work:—  
1. To examine the claims of the various proprietors of land in the country, and to determine the extent of their rights.  
2. To prepare a plan of the land in each parish, and to ascertain the names of the proprietors.  
3. To settle the boundaries between the different proprietors, and to determine the extent of their respective shares.  
4. To settle the rights of the various proprietors, and to determine the extent of their respective shares.  
5. To settle the rights of the various proprietors, and to determine the extent of their respective shares.

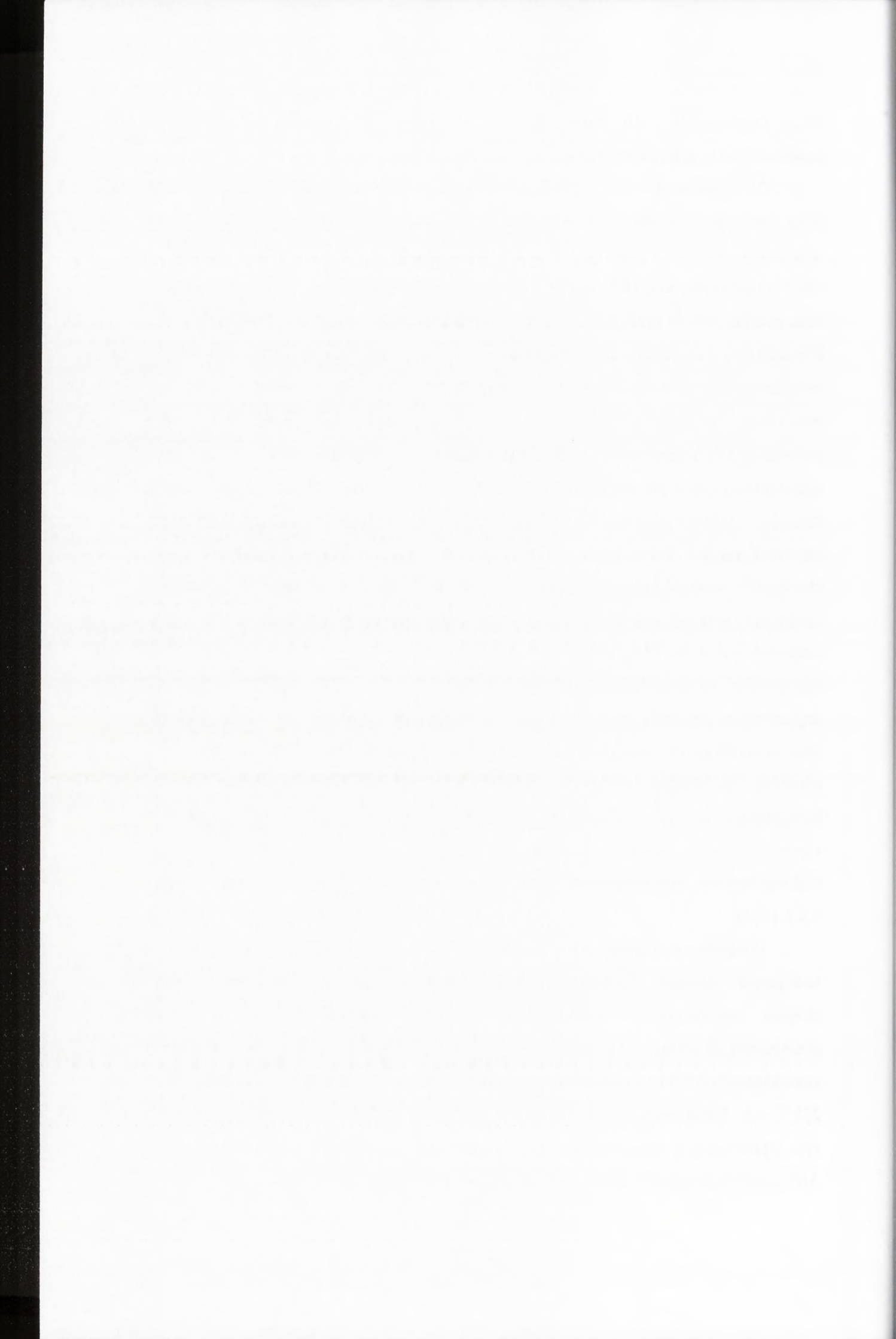
The work of the Land Office has during the year been attended with great success, and the various claims have been settled in a manner which has satisfied all parties concerned. It is hoped that the same success will be attended with in the future.

#### 4.1.3. Otrzymanie serii mutantów O-RNA1-BMV zawierających markery w genomowych cząsteczkach RNA1

Aby dowiedzieć się, z jaką częstością zachodzi homologiczna rekombinacja RNA pomiędzy cząsteczkami RNA1 BMV i dokonać porównania z pozostałymi segmentami genomu wirusa, przygotowano serię mutantów O-RNA1-BMV. Mutacje do cDNA odpowiadającego RNA1 BMV, zawartego w plazmidzie pB1TP3, wprowadzono inną metodą niż w przypadku wcześniej opisanych mutantów serii M-RNA2-BMV. Polegała ona na amplifikacji PCR całych plazmidów przy pomocy dwóch, wzajemnie komplementarnych starterów wprowadzających substytucje, bez potrzeby wycinania i ponownego ligowania modyfikowanych sekwencji. W reakcji PCR wykorzystywano polimerazę DNA *Pfu* o wysokiej precyzji kopiowania, wynikającej z aktywności 3'→5' egzonukleazowej tego enzymu (*proofreading activity*). Zastosowanie tego enzymu znacznie zmniejszyło ryzyko wprowadzenia dodatkowych substytucji do cDNA odpowiadającego wirusowemu RNA1. W po reakcji PCR powstała mieszanina plazmidów, w skład której wchodziły niezmutowane cząsteczki matrycowe (plazmidy izolowane z bakterii, posiadające metylowane zasady) oraz niemetylowane, zmutowane cząsteczki potomne. Mieszaninę tę poddawano działaniu enzymu restrykcyjnego *DpnI*, specyficznie rozpoznającego zmetylowane sekwencje, i w ten sposób selektywnie degradowano plazmidy matrycowe pochodzenia bakteryjnego. W rezultacie trawienia *DpnI* w mieszaninie reakcyjnej pozostały tylko powstałe podczas PCR, niemetylowane plazmidy zawierające zmutowany cDNA RNA1, którymi transformowano komórki kompetentne *E. coli*. Z bakterii izolowano plazmidy i potwierdzano obecność wprowadzonych mutacji poprzez sekwencjonowanie i analizę restrykcyjną endonukleazami rozpoznającymi markerowe miejsca restrykcyjne (Metody, rozdział 3.2.1.1.b-f).

Początkowo zaprojektowano cztery mutanty RNA1 BMV z markerami w kodujących rejonach cząsteczki. Stanowiły je synonimiczne substytucje tworzące miejsca restrykcyjne w cDNA RNA1, niezmiennie kodowanej informacji genetycznej (Rysunek 4.1). Marker O2 w pozycji 217 cDNA plazmidu pO2-RNA1, zawierającego RNA1 stanowiło miejsce restrykcyjne *BstBI* utworzone przez substytucję 221 C→A. Substytucję wprowadzono opisaną wyżej metodą PCR z polimerazą DNA *Pfu*, wykorzystując dwa mutagenizujące, wzajemnie komplementarne startery ANB i ANC, hybrydujące do cDNA pomiędzy nukleotydami 206-237.





Marker O4 - miejsce restrykcyjne *Bst*BI - wprowadzono do cDNA w pozycji 990 dzięki substytucji 992 T→C. Zawierający go plazmid, pO4-RNA1, powstał poprzez amplifikację PCR plazmidu pB1TP3 z parą komplementarnych mutagenizujących starterów AN3 i AN4, hybrydujących do cDNA pomiędzy nukleotydami 978 – 1007.

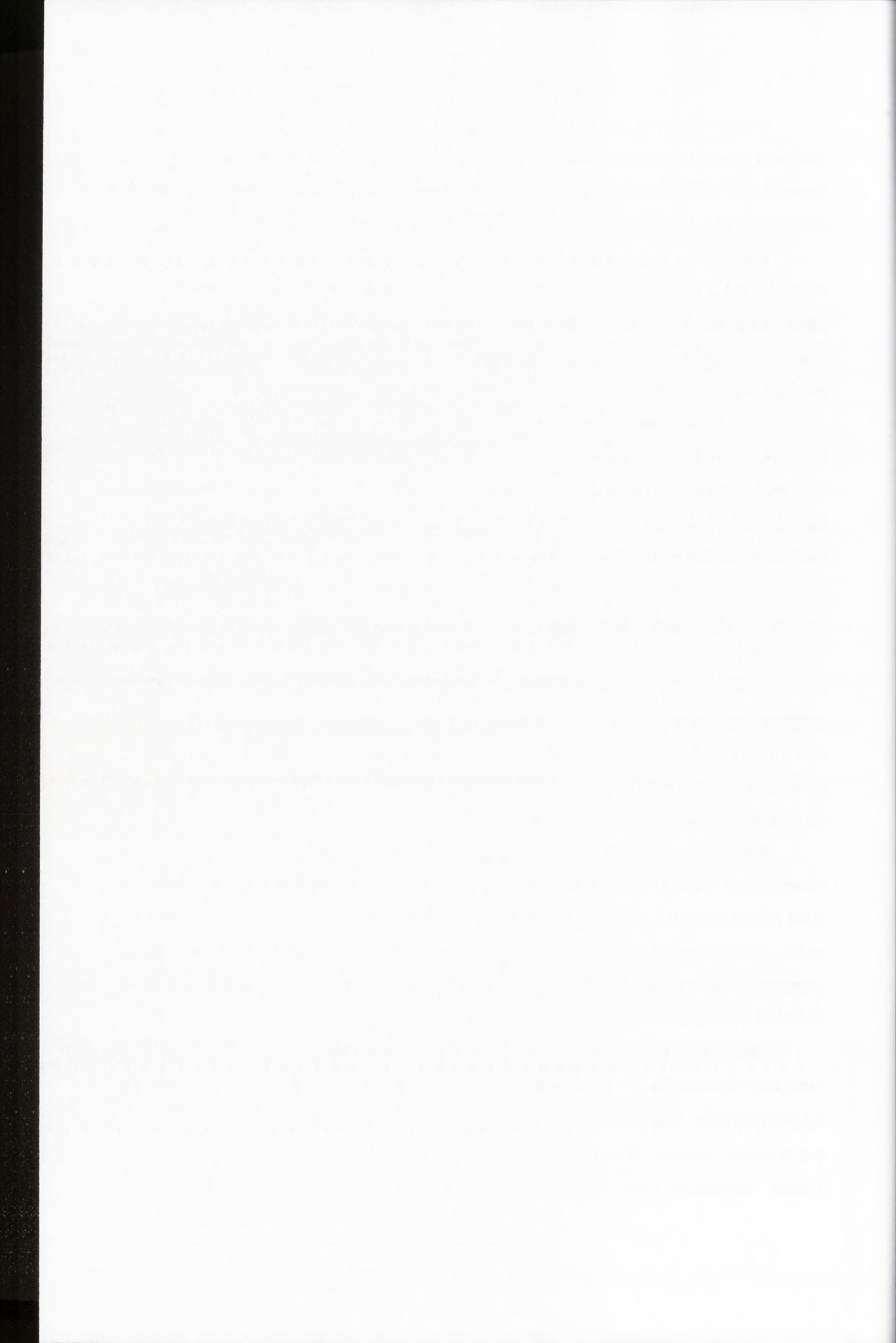
Marker O5 uzyskano przez dwie substytucje (2183 G→A i 2186 C→) tworzące w cDNA RNA1 miejsce restrykcyjne *Bgl*III w pozycji 2183. W tym celu plazmid pB1TP3 amplifikowano metodą PCR z udziałem polimerazy DNA *Pfu* oraz wzajemnie komplementarnych mutagenizujących starterów AN5 i AN6, hybrydujących do pB1TP5 w pozycji 2181 – 2201. W ten sposób powstał plazmid pO5-RNA1.

Marker O8 stanowiło miejsce restrykcyjne *Bgl*III w pozycji 2933, wprowadzone do cDNA RNA1 dzięki substytucjom 2933 T→A i 2937 T→C. Plazmid z markerem O8, pO8-RNA1, uzyskano przez manmożenie metodą PCR plazmidu pB1TP3 z komplementarnymi do siebie, mutagenizującymi starterami, hybrydującymi do matrycy pomiędzy nukleotydami 2918 i 2952.

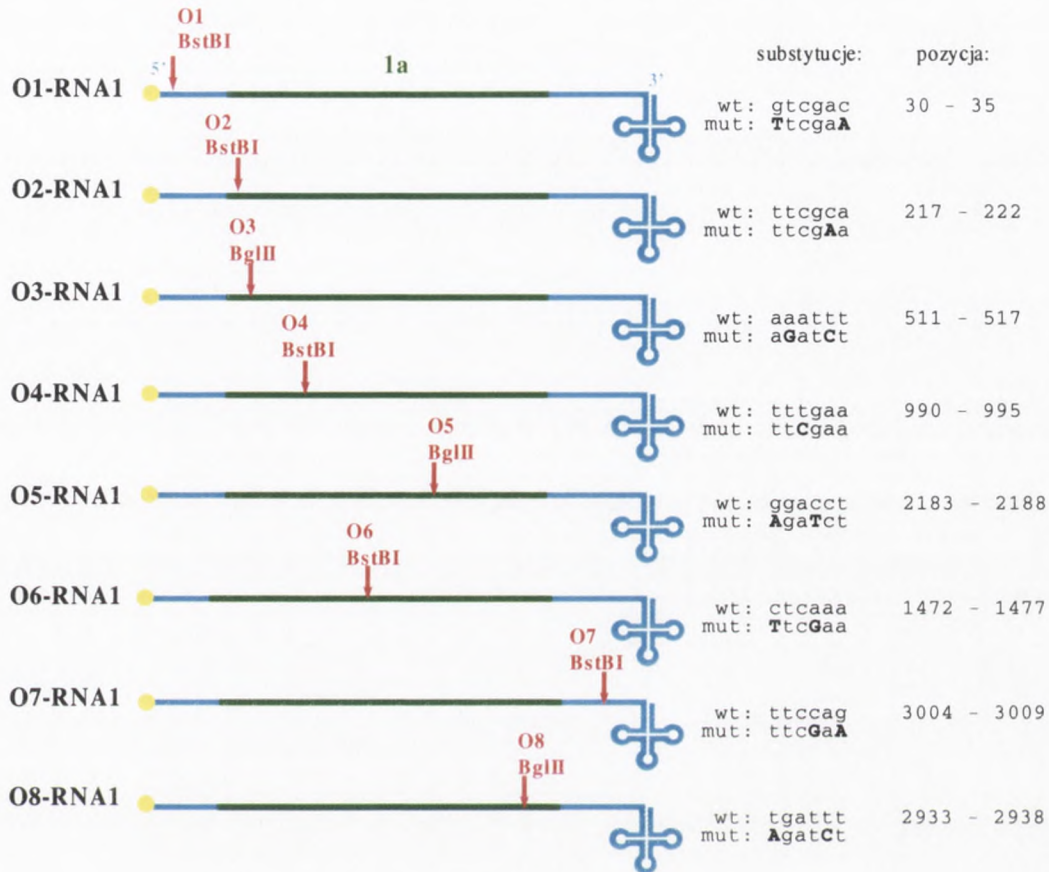
Aby zweryfikować wcześniejsze obserwacje dotyczące niestabilności mutacji w niekodujących końcach genomowych cząsteczek RNA2, postanowiono wprowadzić również po jednym markerze do 3' i 5' UTRów rejonach 3' i 5' RNA1 BMV. Marker O1, znajdujący się w niekodującym rejonie 5' RNA1, stanowiło miejsce restrykcyjne *Bst*BI utworzone w pozycji 30 cDNA RNA1 przez dwie substytucje nukleotydowe: 30 G→T i 35 C→A. Zawierający je plazmid pO1-RNA1 powstał wskutek reakcji PCR z parą komplementarnych, mutagenizujących starterów AN1a i AN1b, hybrydujących do pB1TP3 pomiędzy nukleotydami 17 i 49.

Położony w niekodującym rejonie 3' RNA1 marker O7 wprowadzono dzięki substytucjom: 3007 C→G i 3009 G→A i było to miejsce restrykcyjne *Bst*BI w pozycji 3004 cDNA. Plazmid pO7-RNA1 powstał w reakcji PCR z parą komplementarnych do siebie, mutagenizujących starterów AN7 i AN8, hybrydujących do matrycy pB1TP3 pomiędzy nukleotydami 2991 i 3024. Położenie markerowych mutacji w serii mutantów O-RNA1 pokazano na rysunku 4.7 oraz w tabeli 4.2.

Otrzymane metodą PCR plazmidy trawiono enzymem restrykcyjnym *Dpn*I a następnie klonowano w komórkach *E. coli*. Obecność w plazmidach markera antybiotykowego (gen  $\beta$ -laktamazy) umożliwiła selekcję transformowanych klonów bakteryjnych podczas hodowli na pożywce zawierającej ampicylinę. Z wybranych klonów izolowano plazmidy i ich sekwencję analizowano w celu potwierdzenia



obecności markerów. Tą metodą otrzymano plazmidy pO1-RNA1, pO2-RNA1 pO4-RNA1, pO5-RNA1, pO7-RNA1 i pO8-RNA1 (Metody, 3.2.1.1.b-f).

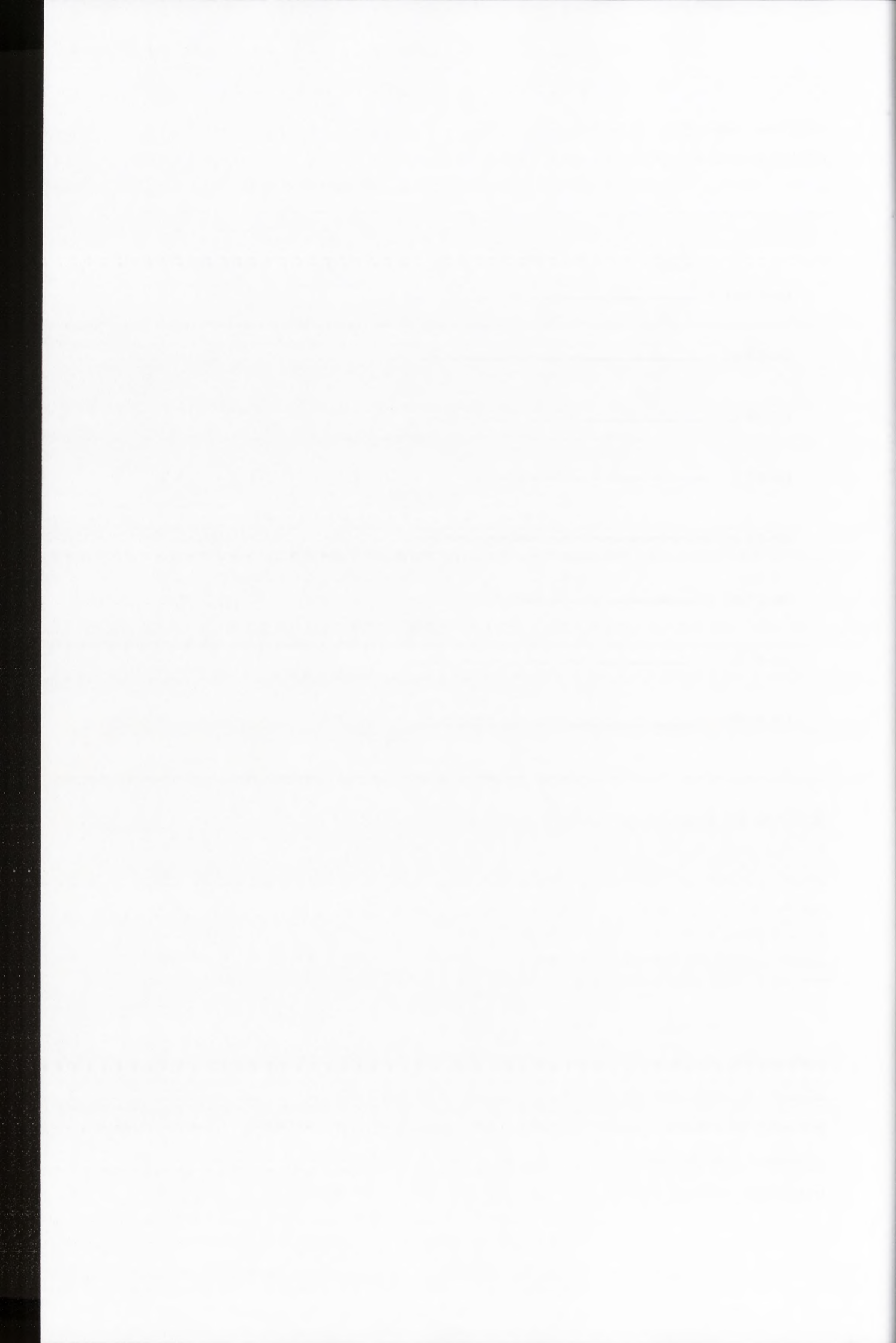


#### Rysunek 4.7. Rozmieszczenie markerów w serii mutantów O-RNA1

Po lewej stronie rysunku przedstawiono nazwy poszczególnych mutantów RNA1, po prawej stronie podano sekwencje typu dzikiego oraz sekwencje zawierające substytucje tworzące markerowe miejsca restrykcyjne wraz z ich położeniem. Substytucje oznaczono tłustym drukiem.

Rejon kodujący oznaczono kolorem zielonym, rejon niekodujący – niebieskim, strukturę kap – żółtym, markerowe miejsca restrykcyjne - czerwonym.

Aby sprawdzić, czy wprowadzone markery nie zanikają podczas infekcji w roślinie oraz czy nie wpływają na cykl replikacyjny wirusa, przeprowadzono inokulacje komosy ryżowej oraz jęczmienia siewnego (Metody, rozdział 3.2.1.2). W tym celu plazmidy pO1-RNA1, pO2-RNA1 pO4-RNA1, pO5-RNA1, pO7-RNA1 i pO8-RNA1 trawiono restrykcyjnie *EcoRI*, aby otrzymać odpowiednie matryce do reakcji transkrypcji *in vitro*. Poszczególne transkrypty serii O-RNA1-BMV łączono z wtRNA2



i wtRNA3, uzyskanymi metodą transkrypcji *in vitro* na matrycach stanowiących przez zliniowane *EcoRI* plazmidy pB2TP5 i pB3TP7 (tabela 4.2). Mieszaniną zmutowanych RNA1, wtRNA2 i wtRNA3 w buforze inokulacyjnym inokulowano jęczmień siewny i komosę ryżową. Rośliny kontrolne zakażano typem dzikim BMV. Po około 10-dniowej inkubacji zakażonych roślin w szklarni obserwowano objawy infekcji i porównywano z roślinami kontrolnymi (schemat eksperymentu pokazano na rysunku 4.2).

**Tabela 4.2. Położenie markerowych mutacji, czas po którym pojawiły się objawy infekcji na zakażonych roślinach, ilość plamek nekrotycznych powstałych na liściach komosy oraz stabilność mutantów serii O-RNA1**

mutant BMV	skład mieszaniny inokulacyjnej <sup>1</sup>	nazwa markera	marker <sup>2</sup>	ilość plamek nekrotycznych	czas rozwoju infekcji	stabilność mutacji markerowych <sup>3</sup>
O1-RNA1-BMV	O1-RNA1 wtRNA2, wt RNA3	O1	30 BstBI	35	9 dni	niestabilna
O2-RNA1-BMV	O2-RNA1 wtRNA2, wt RNA3	O2	217 BstBI	-	10 dni	mutant nieinfekcyjny
O3-RNA1-BMV	O3-RNA1 wtRNA2, wt RNA3	O3	511 BglIII	28	10 dni	stabilna
O4-RNA1-BMV	O4-RNA1 wtRNA2, wt RNA3	O4	990 BstBI	25	9 dni	stabilna
O5-RNA1-BMV	O5-RNA1 wtRNA2, wt RNA3	O5	2183 BglIII	-	10 dni	mutant nieinfekcyjny
O6-RNA1-BMV	O6-RNA1 wtRNA2, wt RNA3	O6	1472 BstBI	27	10 dni	stabilna
O7-RNA1-BMV	O7-RNA1 wtRNA2, wt RNA3	O7	3004 BstBI	38	9 dni	niestabilna
O8-RNA1-BMV	O8-RNA1 wtRNA2, wt RNA3	O8	2933 BglIII	24	10 dni	stabilna
WT	wt RNA1 wtRNA2, wt RNA3	nie dotyczy		36	9 dni	nie dotyczy

<sup>1</sup> Ponieważ genom BMV składa się z trzech segmentów, rośliny inokulowano zsyntetyzowanymi *in vitro* trzema komponentami genomu.

<sup>2</sup> Nowoutworzone miejsce restrykcyjne.

<sup>3</sup> Stabilność mutacji markerowych potwierdzono sekwencjonując cDNA RNA1 otrzymany z całkowitego RNA wyizolowanego z 3-4 roślin jęczmienia i 3-4 plamek nekrotycznych powstałych na komosie po zakażeniu poszczególnymi mutantami wirusowymi.

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry should be supported by a valid receipt or invoice. This ensures transparency and allows for easy verification of the data.

Table 1 provides a summary of the data collected over the period from January to December. The table is organized into columns for the month, the number of transactions, and the total amount.

Month	Number of Transactions	Total Amount
January	120	\$15,000
February	110	\$14,000
March	130	\$16,500
April	140	\$17,500
May	150	\$18,500
June	160	\$19,500
July	170	\$20,500
August	180	\$21,500
September	190	\$22,500
October	200	\$23,500
November	210	\$24,500
December	220	\$25,500
<b>Total</b>	<b>2,000</b>	<b>\$250,000</b>

The data shows a steady increase in both the number of transactions and the total amount over the year. This growth is consistent with the overall market trends and indicates a strong performance for the business.

W przypadku wirusowych mutantów O1-, O3-, O7- i O8-RNA1-BMV, czas pojawienia się oraz ilość objawów chorobowych na zainfekowanych roślinach nie odbiegał od typu dzikiego wirusa. Jednak mutanty O2- i O5-RNA1-BMV nie były zdolne do wywołania infekcji, co wskazuje, że wprowadzone mutacje, mimo że nie zmieniały sekwencji aminokwasowej kodowanych białek, były dla wirusa letalne (Tabela 4.2). Ponieważ konstrukty te nie nadawały się do dalszych badań, stosując opisaną wyżej metodykę przygotowano dwa nowe warianty RNA1 BMV: O3-RNA1 i O6-RNA1 (Metody, rozdział 3.2.1.1.b-f).

Pierwszy z nich otrzymano, wprowadzając do plazmidu pB1TP3 markerowe miejsce restrykcyjne *Bgl*III w pozycji 511 (O3) stworzone przez dwie substytucje: 512 A→G i 515 T→C. Zawierający je plazmid, pO3-RNA1, powstał w reakcji PCR z polimerazą DNA *Pfu* i parą wzajemnie komplementarnych mutagenizujących starterów R1A i R1B, hybrydujących z matrycą pB1TP3 pomiędzy nukleotydami 496 i 531.

Ostatni mutant, O6-RNA1, posiadał marker w postaci miejsca *Bgl*III w pozycji 2933 cDNA RNA1 (marker O6), utworzony przez dwie substytucje: 2933 T→A i 2937 T→C. Marker O6 zawarty był w plazmidzie pO6-RNA1, powstałym w reakcji PCR z parą wzajemnie komplementarnych starterów R1E i R1F, hybrydujących do plazmidu pB1TP3 pomiędzy nukleotydami 2918 i 2952.

Plazmidy klonowano w komórkach *E. coli*, a następnie potwierdzano obecność mutacji poprzez sekwencjonowanie i analizę restrykcyjną enzymami rozpoznającymi markery. Aby otrzymać wirusowy RNA, plazmidy trawiono *Eco*RI i używano jako matryc w reakcji odwrotnej transkrypcji. Uzyskany RNA1 mieszano z typem dzikim RNA2 i RNA3 oraz buforem do inokulacji i używano do inokulacji jęczmienia siewnego i komosy ryżowej (Metody, rozdział 3.2.1.2). Infekcyjność mutantów wirusowych określono zakażając rośliny i porównując objawy i czas infekcji z typem dzikim BMV. Stwierdzono, że nowe mutanty O3-RNA1-BMV i O6-RNA1-BMV oraz typ dziki BMV wywołują w roślinie równie silne objawy chorobowe (tabela 4.2).

Kolejnym krokiem w ocenie przydatności serii O-RNA1-BMV do dalszych badań było potwierdzenie stabilności wprowadzonych do RNA1 mutacji w trakcie infekcji w roślinach. W tym celu z roślin zakażonych mutantami serii O-RNA1-BMV izolowano całkowity RNA i na jego bazie prowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji ze starterem 1<sup>st</sup>. ssDNA posłużył następnie jako matryca w reakcji PCR ze starterami obejmującymi markery (dokładny opis znajduje się w rozdziale 3.2.1.2.c-g). Uzyskany cDNA klonowano w wektorze pDRIVE, a otrzymane plazmidy sekwencjonowano i



The first part of the report deals with the general situation of the country and the progress of the work done during the year. It is followed by a detailed account of the various projects and the results achieved. The report concludes with a summary of the work done and a list of the names of the staff members who have been engaged in the work.

The second part of the report deals with the financial statement of the year. It shows the total income and expenditure for the year and the balance carried forward to the next year. It also shows the details of the various items of income and expenditure and the reasons for the variations from the budget.

The third part of the report deals with the personnel statement of the year. It shows the total number of staff members employed during the year and the details of their salaries and allowances. It also shows the details of the various items of expenditure on staff and the reasons for the variations from the budget.

The fourth part of the report deals with the general statement of the year. It shows the total number of projects completed during the year and the details of the various items of expenditure on projects and the reasons for the variations from the budget. It also shows the details of the various items of income and expenditure on projects and the reasons for the variations from the budget.

The fifth part of the report deals with the general statement of the year. It shows the total number of projects completed during the year and the details of the various items of expenditure on projects and the reasons for the variations from the budget. It also shows the details of the various items of income and expenditure on projects and the reasons for the variations from the budget.

analizowano trawiąc endonukleazami rozpoznającymi markerowe miejsca restrykcyjne. Stwierdzono, że podobnie jak w przypadku RNA2, mutacje w rejonie kodującym cząsteczki (O3, O4, O6, O8) są stabilne, natomiast mutacje w 3' i 5'UTR RNA1 (O1 i O7) zastąpione zostały sekwencją wtRNA1.

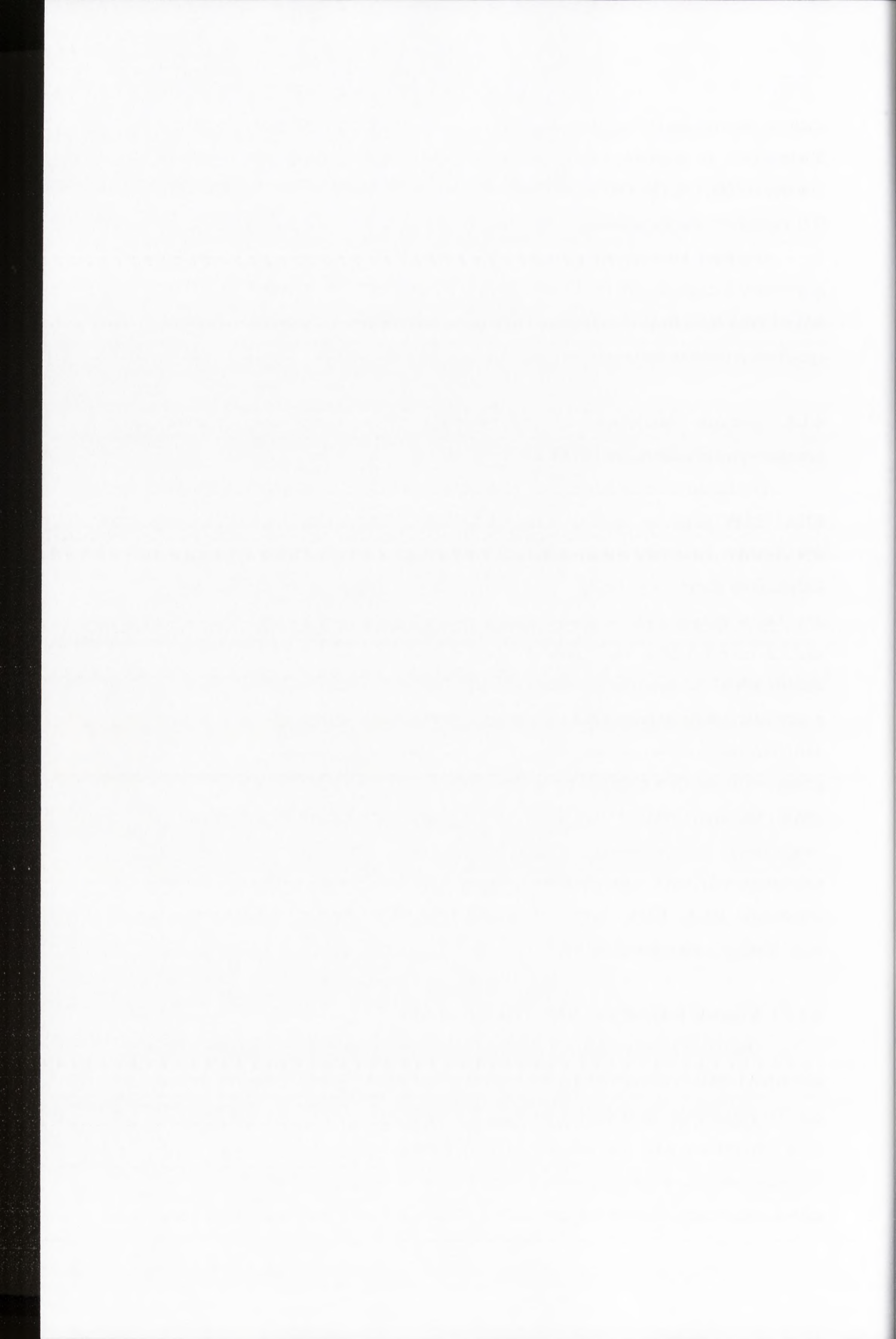
Ostatnim krokiem otrzymywania wariantów BMV zawierających markery w genomowych cząsteczkach RNA1 była izolacja mutantów O3-RNA1-BMV, O6-RNA1-BMV i O8-RNA1-BMV z zakażonego nimi jęczmienia. Preparaty wirusowe otrzymano zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 3.2.1.2.h Metod.

#### **4.1.4. Badanie homologicznej rekombinacji RNA zachodzącej pomiędzy genomowymi cząsteczkami RNA1 BMV**

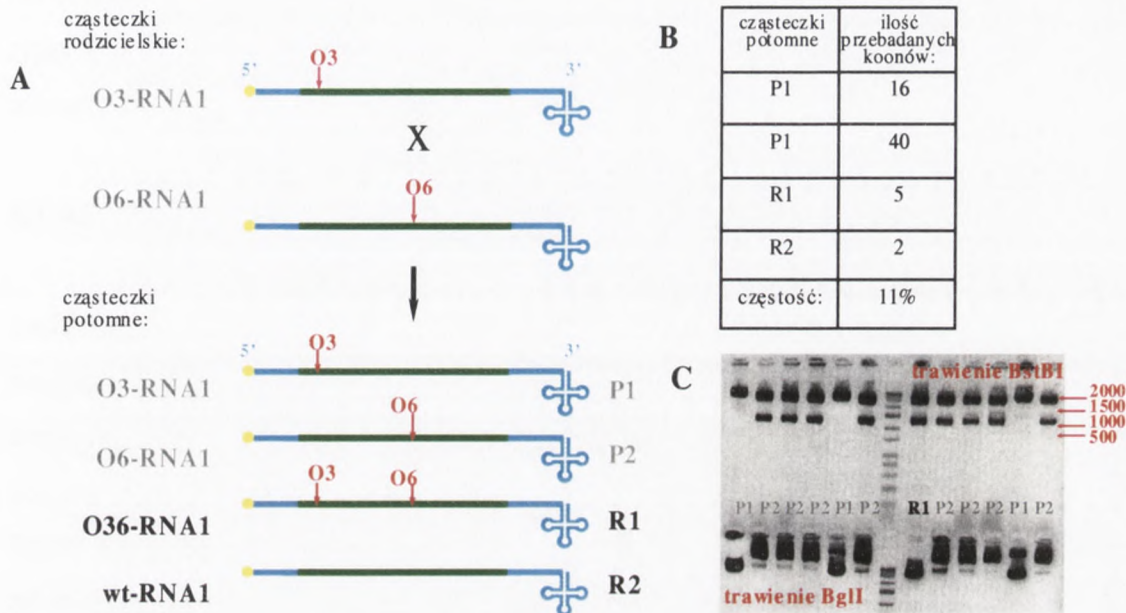
Do badań homologicznej rekombinacji zachodzącej pomiędzy cząsteczkami RNA1 BMV używano mutanty wirusowe O3-RNA1-BMV, O6-RNA1-BMV i O8-RNA1-BMV. Zawierały one następujące markery w cDNA odpowiadającym rejonowi kodującemu białko 1a w RNA1: O3 w postaci miejsca restrykcyjnego *Bgl*III w pozycji 511, O6 w pozycji 1472 w postaci miejsca restrykcyjnego *Bst*BI oraz O8 w postaci miejsca restrykcyjnego *Bgl*III położonego w pozycji 2933 (Rysunek 4.7). Markery dzieliły RNA1 na dwa obszary umożliwiające obserwację badanego procesu: pierwszy z nich oskrzydlały mutacje O3 i O6 i obejmował 961 nukleotydów a drugi, o długości 1461 nukleotydów, wyznaczały mutacje O6 i O8. Używając mutantów wirusowych, przeprowadzono dwa rodzaje koinokulacji jęczmienia: O3-RNA1-BMV / O6-RNA1-BMV i O6-RNA1-BMV / O8-RNA1-BMV, w czasie których obydwie warianty RNA1 mogły służyć zarówno jako donor jak i jako akceptor (schemat eksperymentu pokazany na rysunku 4.2, jednak zamiast otrzymanych metodą transkrypcji *in vitro* genomowych cząsteczek RNA BMV, używano dwóch wariantów wirusa, które wcześniej wyizolowano z zakażonych roślin).

##### **4.1.4.1. Koinfekcje O3-RNA1-BMV / O6-RNA1-BMV**

Jęczmień siewny infekowano mieszaniną preparatów dwóch wariantów wirusa (O3-RNA1-BMV i O6-RNA1-BMV), po czym hodowano w szklarni przez dziesięć dni. Po pojawieniu się objawów infekcji, z zakażonych roślin izolowano całkowity RNA. Służył on jako matryca w reakcji odwrotnej transkrypcji ze starterem 1<sup>st</sup>. Uzyskany ssDNA wykorzystywano w reakcji PCR, w rezultacie której otrzymywano cDNA obejmujący 961-nukleotydowy rejon RNA1 pomiędzy markerami O3 i O6. W



reakcji PCR zastosowano startery ANB i sek3.2, amplifikujące fragment cDNA RNA1 o długości 1475pz. Uzyskany cDNA klonowano w wektorze pDRIVE i plazmidy wyizolowane z wybranych klonów trawiono restrykcyjnie *EcoRI* w celu wyłonienia konstruktyw, zawierających cDNA o właściwej długości (Metody, rozdział 3.2.1.2).



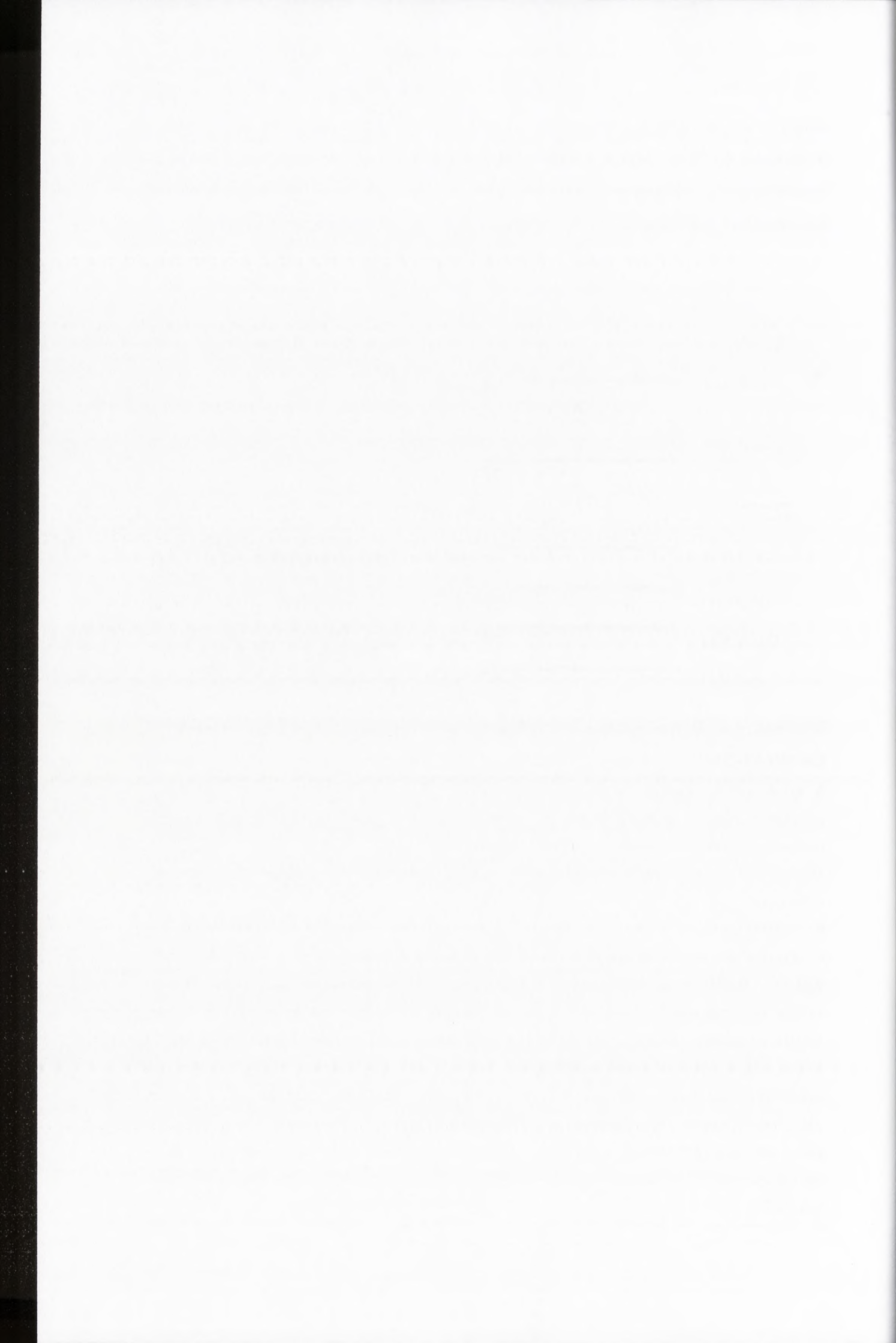
#### Rysunek 4.8. Homologiczna rekombinacja podczas koinfekcji O3-RNA1-BMV / O6-RNA1-BMV

**A** - Rozmieszczenie markerów w parze rodzicielskich wariantów O3-RNA1 i O6-RNA1 i w cząsteczkach potomnych. Podczas koinfekcji w roślinie wskutek pojedynczego przeskoku rekombinacyjnego mogą powstać cząsteczki rodzicielskie (P1 i P2) oraz rekombinanty R1 i R2.

Mutacje markerowe oznaczono kolorem czerwonym, rejony kodujące RNA1 - zielonym, a niekodujące - niebieskim.

**B** - Rozkład markerów w RNA1 wyizolowanym z roślin zakażonych parą O3-RNA1- i O6-RNA1-BMV.

**C** - Przykładowa analiza restrykcyjna cDNA w 1% natywnym żelu agarozowym. Trawieniu enzymami BglII (O3) i BstBI (O6) poddano plazmid o długości 5325pz złożony z insertu w postaci cDNA o długości 1475pz, obejmującego dwa markery wprowadzone do RNA1 BMV oraz wektora pDRIVE o długości 3850pz. Po trawieniu restrykcyjnym BglII (dolna część żelu) powstawał zliniowany plazmid o długości 5325pz (O3) lub plazmid pozostał niezliniowany (wtRNA1). Po trawieniu restrykcyjnym tych samych klonów enzymem BstBI (górna część żelu), obserwowano fragmenty DNA o długości 4071pz i 1254pz (O6 oraz dodatkowe miejsce restrykcyjne BstBI wprowadzone przez starter podczas RT-PCR) lub zliniowany plazmid (wt RNA1, dodatkowe miejsce restrykcyjne BstBI wprowadzone podczas RT-PCR). Marker długości DNA oznaczono czerwono, cząsteczki rodzicielskie - literami P1 i P2 rekombinanty - literami R1 i R2.



Klony zawierające cDNA odpowiadający rejonowi RNA1 obejmującemu markery O3 i O6 poddano trawieniu *Bgl*III i *Bst*BI – enzymami rozpoznającymi markerowe miejsca restrykcyjne. Analiza produktów trawienia wykazała, że spośród 63 przebadanych klonów cDNA RNA1 wyizolowanego z jęczmienia zakażonego parą mutantów O3-RNA1-BMV i O6-RNA1-BMV, obecnych było 16 klonów cDNA typu rodzicielskiego O3-RNA1, 40 klonów cDNA typu rodzicielskiego O6-RNA1, 5 rekombinantów typu O36-RNA1 zawierających obydwa markery oraz 2 rekombinanty typu dzikiego RNA1 bez markerów (Rysunek 4.8). Częstość rekombinacji, czyli zawartość rekombinantów w całkowitej ilości przebadanych klonów, wynosiła 11%.

#### 4.1.4.2. Koinfekcje O6-RNA1-BMV / O8-RNA1-BMV

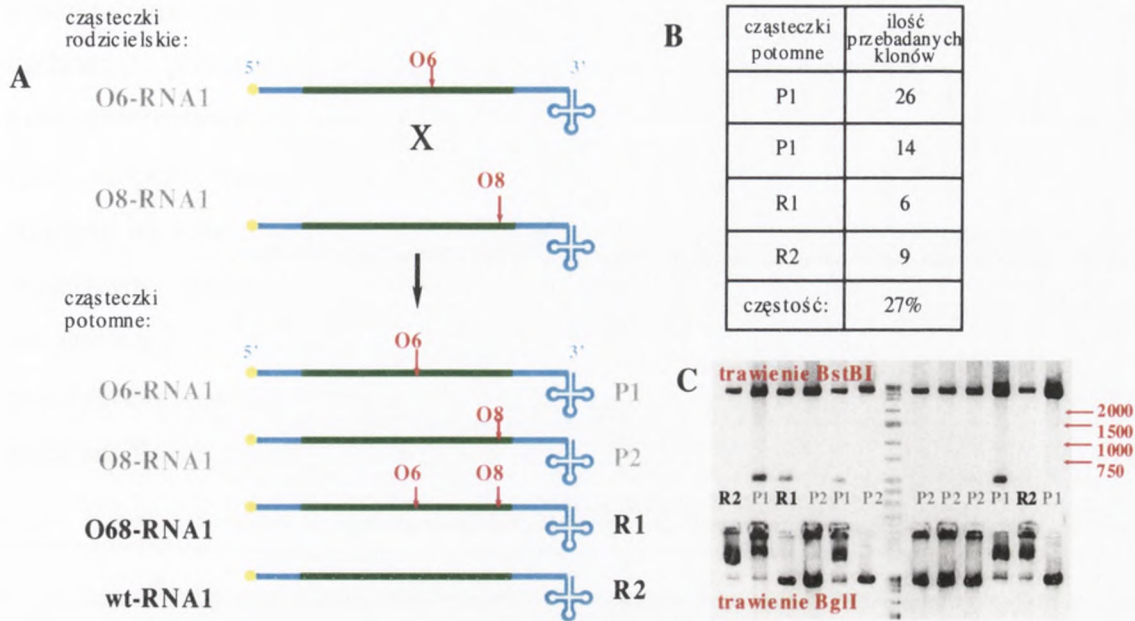
Aby określić częstość homologicznych przeskoków rekombinacyjnych zachodzących pomiędzy genomowymi cząsteczkami RNA1 BMV w 1461-nukleotydowym rejonie pomiędzy markerami O6 i O8, jęczmień koinfekowano dwoma wirusowymi wariantami O6-RNA1-BMV i O8-RNA1-BMV. Rośliny hodowano w szklarni przez około dziesięć dni, po czym z fragmentu liścia izolowano całkowity RNA. Na bazie wyizolowanego RNA przeprowadzano reakcję odwrotnej transkrypcji ze starterem 1<sup>st</sup>, a uzyskany ssDNA używano z kolei jako matrycy w reakcji PCR, ze starterami 1<sup>st</sup> i AN3, amplifikującymi fragment cDNA o długości 2270bp. Tą drogą uzyskano cDNA odpowiadający badanemu rejonowi RNA1, zawierającemu markery O6 i O8. cDNA klonowano w wektorze pDRIVE, izolowano plazmidy z wybranych klonów i trawiono je *Eco*RI w celu wyłonienia klonów cDNA o odpowiedniej długości. Docelowe plazmidy trawiono restrykcyjnie *Bgl*III i *Bst*BII, aby poznać rozkład markerów w potomnych cząsteczkach RNA1 BMV (Metody, rozdział 3.2.1.2). Ogółem przeanalizowano 55 klonów cDNA, spośród których 26 stanowiło typ rodzicielski O6-RNA1, 14 - typ rodzicielski O8-RNA1, 15 zawierało zrekombinowany cDNA, z czego 6 stanowiły rekombinanty typu O68-RNA1 posiadające obydwa markery, oraz 9 były to rekombinanty typu dzikiego RNA1 (Rysunek 4.9). Częstość rekombinacji, w 1461-nukleotydowym odcinku RNA1 pomiędzy markerami O6 i O8 wyniosła 27%.

Faint, illegible text at the top of the page, possibly a header or introductory paragraph.

STUDY ON THE HISTORY OF THE ...

Main body of faint, illegible text, appearing to be the start of a study or report.

Faint, illegible text at the bottom of the page, possibly a conclusion or footer.



#### Rysunek 4.9. Homologiczna rekombinacja podczas koinfekcji O6-RNA1-BMV / O8-RNA1-BMV

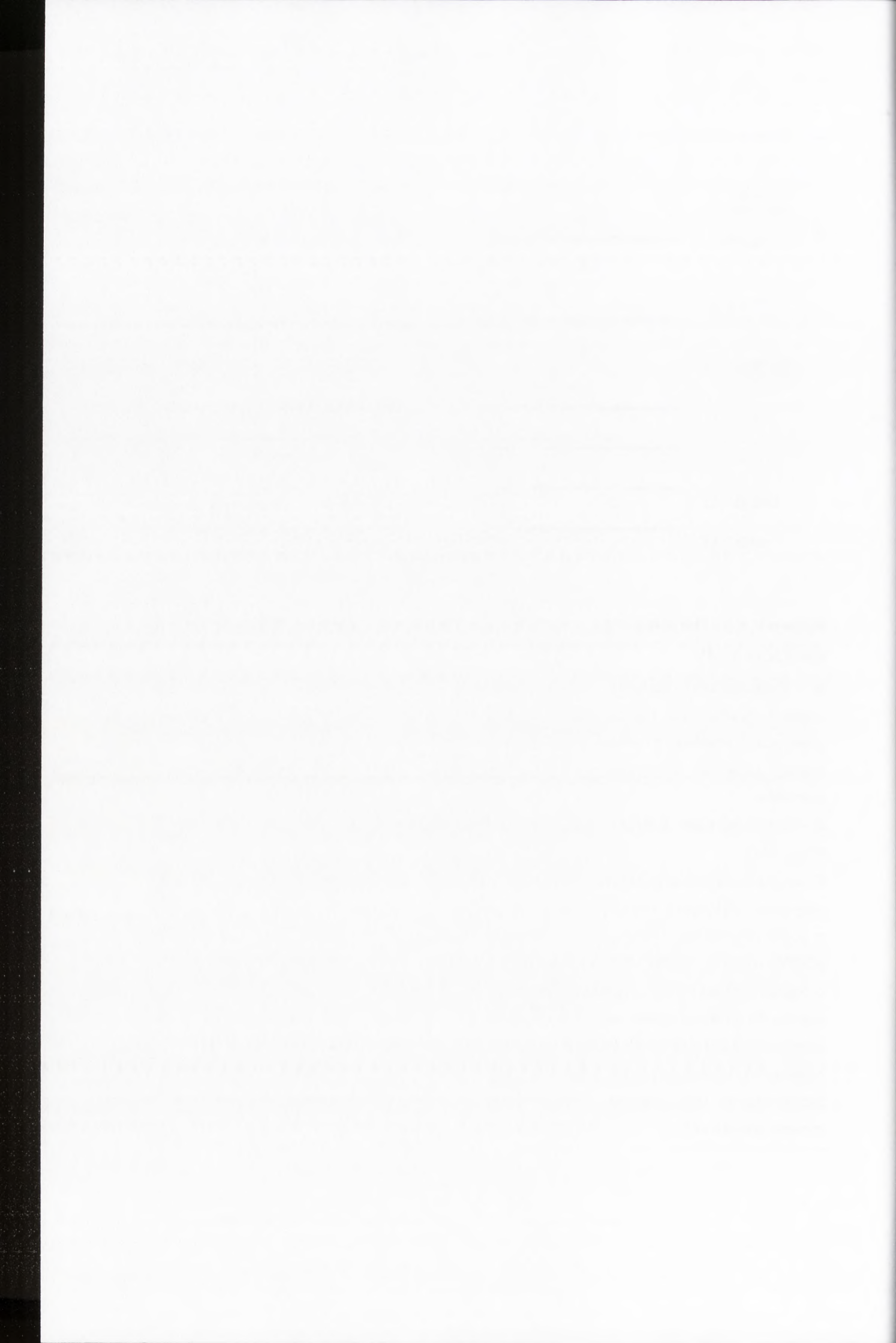
**A** - Rozmieszczenie markerów w parze rodzicielskich wariantów O6-RNA1 i O8-RNA1 i w cząsteczkach potomnych. Podczas koinfekcji odtwarzane są cząsteczki rodzicielskie (P1 i P2), wskutek pojedynczego przeskoku rekombinacyjnego mogą też powstać rekombinanty R1 i R2.

Markery oznaczono kolorem czerwonym, rejony kodujące RNA1 - zielonym, a niekodujące - niebieskim.

**B** - Rozkład markerów w RNA1 wyizolowanym z roślin zakażonych parą wariantów O6-RNA1- i O8-RNA1-BMV.

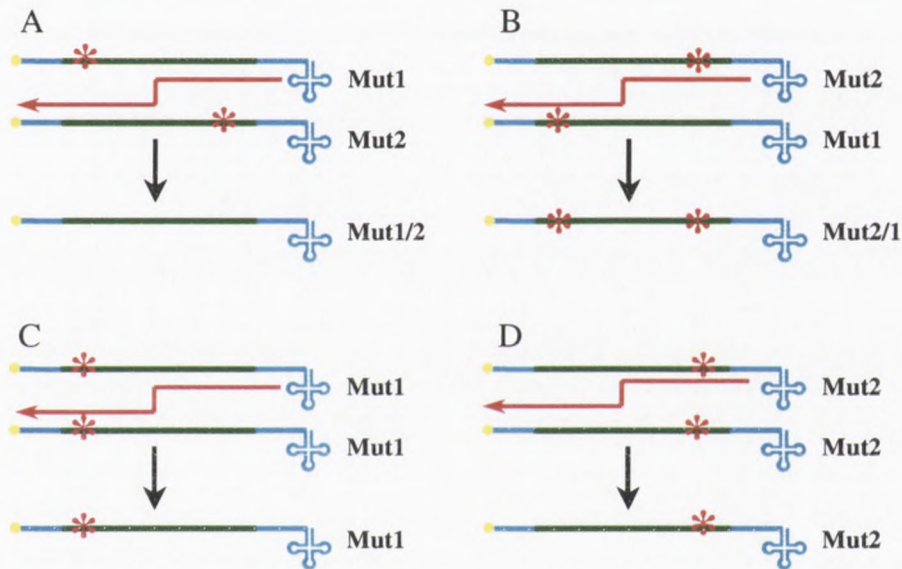
**C** - Przykładowa analiza restrykcyjna wirusowego cDNA w 1% natywnym żelu agarozowym. Trawieniu enzymami BstBI (marker O6) i BglII (marker O8) poddano plazmid o długości 6124pz złożony z insertu w postaci wirusowego cDNA o długości 2270pz obejmującego dwie mutacje markerowe oraz wektora pDRIVE o długości 3850pz. Wskutek trawienia BstBI (dolna część żelu) obserwowano fragmenty DNA o długości: 5645pz i 479pz (O6 oraz dodatkowe miejsce restrykcyjne BstBI wprowadzone przez starter podczas RT-PCR) lub zliniowany plazmid o długości 6124pz (wt RNA1 oraz dodatkowe miejsce restrykcyjne BstBI podczas RT-PCR). Skutkiem trawienia tych samych klonów BglII (górna część żelu), obserwowano zliniowany plazmid o długości 6124pz (O8) lub plazmid niezliniowany (typ dziki RNA1). Marker długości DNA oznaczono czerwonymi cyframi, cząsteczki rodzicielskie oznaczono P1 i P2, rekombinanty R1 i R2.





#### 4.1.5. Obserwowana i rzeczywista częstość rekombinacji

Mutanty genomowych cząsteczek RNA2 i RNA1 BMV zawierały markery w postaci miejsc restrykcyjnych, uwidaczniające homologiczne przeskoki rekombinacyjne zachodzące pomiędzy dwoma różnymi wariantami tej samej cząsteczki RNA. Podczas infekcji w roślinie zachodzą także homologiczne przeskoki rekombinacyjne pomiędzy tymi samymi wariantami, jednak obserwacja rekombinantów jest niemożliwa ze względu na brak różnic między cząsteczkami rodzicielskimi i zrekombinowanymi. W niniejszym rozdziale przedstawiono rozważania nad rzeczywistą częstością rekombinacji z uwzględnieniem wszystkich rekombinantów powstałych wskutek pojedynczego przeskoku rekombinacyjnego oraz wpływu aktywności replikacyjnej poszczególnych wariantów rodzicielskich na proces rekombinacji.



**Rysunek 4.10. Cztery typy rekombinantów powstających podczas infekcji rośliny dwoma wariantami cząsteczki BMV zawierającymi różne mutacje markerowe**

A - BMV RdRp rozpoczyna replikować na cząsteczkę Mut1, po czym przeskakuje na Mut2, syntetyzując rekombinanta Mut1/2,

B - RdRp rozpoczyna syntezę Mut2 i przeskakuje na cząsteczkę Mut1, tworząc rekombinanta Mut2/1,

C - RdRp rozpoczyna syntezę cząsteczki Mut1 po czym przeskakuje na inną cząsteczkę Mut1, wskutek czego odtworzona zostaje cząsteczka Mut1,

D - RdRp rozpoczyna syntezę cząsteczki Mut2 po czym przeskakuje na inną cząsteczkę Mut2, wskutek czego odtworzona zostaje cząsteczka Mut2.

Markery oraz kierunek syntezy oznaczono kolorem czerwonym, niekodujące rejony - niebieskim, kodujące - zielonym.



W sytuacji idealnej obydwie mutacje wirusowe użyte w eksperymencie mają takie same zdolności replikacyjne i akumulacyjne. Dla uproszczenia, pierwszego mutantu oznaczono jako Mut1 (marker na końcu 5') a drugiego jako Mut2 (marker na końcu 3'). W czasie infekcji z tym samym prawdopodobieństwem mogą powstać cztery typy rekombinantów (Rysunek 4.10). Pierwszy z nich zostanie utworzony, gdy RdRp rozpocznie replikować na cząsteczce Mut1 po czym przeskoczy na cząsteczkę Mut2, syntetyzując rekombinanta Mut1/2 (bez mutacji markerowych). Drugi rekombinanta Mut2/1 (zawierający obydwa markery) będzie efektem rozpoczęcia syntezy przez RdRp na matrycy Mut2 i przeskoku na cząsteczkę Mut1. Trzeci i czwarty typ rekombinantów powstaje, gdy RdRp rozpocznie syntezę cząsteczki Mut1 lub Mut2 po czym przeskoczy na inną cząsteczkę RNA tego samego typu (odpowiednio Mut1 lub Mut2), wskutek czego odtworzona zostaje cząsteczka rodzicielska. Analiza rozmieszczenia markerowych mutacji w potomnym RNA umożliwia identyfikację około 50% rekombinantów, a rzeczywista częstość rekombinacji (cRF) będzie około dwukrotnie większa od częstości obserwowanej (oRF). Ponadto w czasie infekcji może dojść do wielokrotnych przeskoczków rekombinacyjnych, tak więc podwojona oRF reprezentuje minimalną wartość jaką może przyjąć cRF.

W czasie koinfekcji w roślinie dwa wirusowe mutacje zwykle nie akumulowały się na idealnie równym poziomie. W takim wypadku cRF nie może być obliczona jako zwykle podwojenie wartości jaką osiąga oRF. Należy obliczyć prawdopodobieństwo każdego przeskoku rekombinacyjnego w oparciu o rozkład cząsteczek wirusowych w pokoleniu potomnym (spośród  $N$  klonów cDNA reprezentujących całą populację badanego RNA należy eksperymentalnie oznaczyć ilość Mut1, Mut2, Mut1/2 i Mut2/1 - odpowiednio  $N_1$ ,  $N_2$ ,  $N_{1/2}$  i  $N_{2/1}$ ). W poniższych rozważaniach przyjęto także dwa założenia: (1) stosunek pomiędzy Mut1 i Mut2 nie zmienia się podczas infekcji i (2) przeskoki rekombinacyjne zachodzą jedynie pomiędzy cząsteczkami Mut1 i Mut2, tak więc całkowita ilość cząsteczek uczestniczących w rekombinacji nie wynosi  $N$  lecz  $N_1 + N_2$ , natomiast dalsze przeskoki pomiędzy rekombinantami nie są brane pod uwagę. Prawdopodobieństwo powstania każdego z rekombinantów można obliczyć w następujący sposób:

- prawdopodobieństwo utworzenia rekombinanta Mut1/2 ( $P_{1/2}$ ) jest iloczynem prawdopodobieństwa wybrania przez polimerazę cząsteczki Mut1 [ $P_1 = N_1 / (N_1 + N_2)$ ], ilość cząsteczek Mut1 ( $N_1$ ) podzielona przez całkowitą ilość cząsteczek Mut1 i Mut2 uczestniczących w rekombinacji

[The text on this page is extremely faint and illegible. It appears to be a multi-paragraph document, possibly a letter or a report, but the specific content cannot be discerned.]

$(N_1+N_2)$ ] i prawdopodobieństwa wybrania przez polimerazę cząsteczki Mut2 [ $P_2=N_2/(N_1+N_2)$ , ilość cząsteczek Mut2 ( $N_2$ ) podzielona przez całkowitą ilość cząsteczek Mut1 i Mut2 uczestniczących w rekombinacji ( $N_1+N_2$ )].

Tak więc prawdopodobieństwo utworzenia rekombinanta:  $P_{1/2} = N_1N_2/(N_1+N_2)^2$ .

- podobnie, prawdopodobieństwa utworzenia rekombinantów Mut2/1, Mut1/1 i Mut2/2 będą wynosiły:

$$P_{2/1} = P_2P_1 = N_2/N_1 + N_2N_1/(N_1+N_2) = N_2N_1/(N_1+N_2)^2,$$

$$P_{1/1} = P_1P_1 = N_1/N_1 + N_2N_1/(N_1+N_2) = N_1^2/(N_1+N_2)^2,$$

$$P_{2/2} = P_2P_2 = N_2/N_1 + N_2N_2/(N_1+N_2) = N_2^2/(N_1+N_2)^2.$$

- spośród czterech typów potencjalnych rekombinantów, dwa są możliwe do zaobserwowania (Mut1/2 i Mut2/1) i dwa są niewykrywalne (Mut1/1 i Mut2/2). Prawdopodobieństwo utworzenia rekombinanta wykrywalnego ( $P_d$ ) lub niewykrywalnego ( $P_u$ ) stanowi, odpowiednio, suma  $P_{1/2}$  i  $P_{2/1}$  lub  $P_{1/1}$  i  $P_{2/2}$ .

Tak więc:  $P_d = 2N_1N_2/(N_1+N_2)^2$ , natomiast  $P_u = (N_1^2 + N_2^2)/(N_1+N_2)^2$

- stosunek  $P_d$  do  $P_u$  jest równy stosunkowi ilości wykrywalnych i niewykrywalnych rekombinantów:  $P_d/P_u = N_d/N_u$ , gdzie:

$$(1) N_d = N_{1/2} + N_{2/1},$$

$$(2) N_u = N_{1/1} + N_{2/2},$$

- ponieważ  $P_d/P_u = N_d/N_u$ , więc:

$$N_u = N_d P_u / P_d = N_d (N_1^2 + N_2^2) / (N_1 + N_2)^2 / 2N_1N_2 / (N_1 + N_2)^2,$$

$$i: (3) N_u = N_d (N_1^2 + N_2^2) / 2N_1N_2.$$

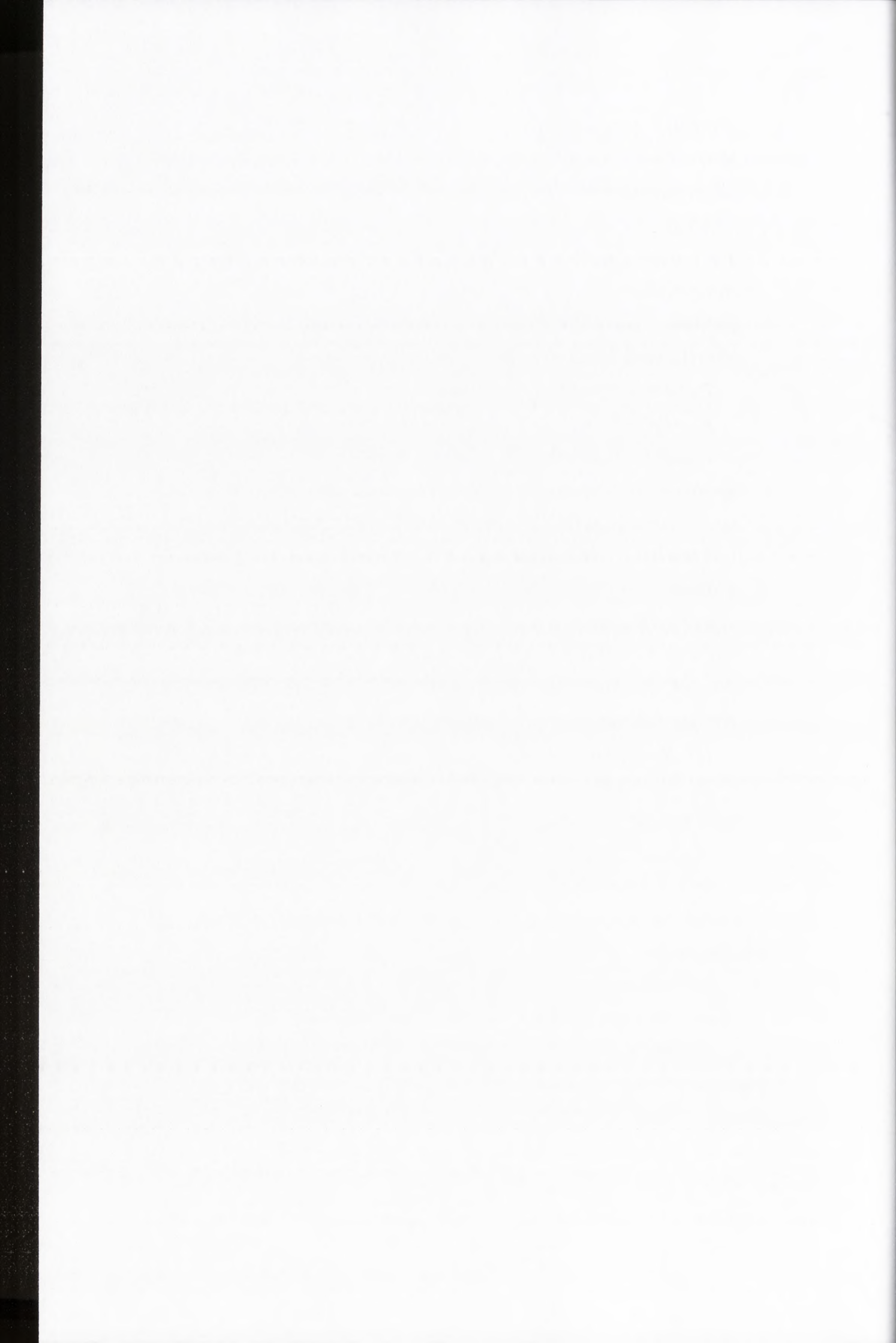
- bazując na wszystkich danych można obliczyć rzeczywistą ilość rekombinantów:

$$(4) N_r = N_d + N_u,$$

- rzeczywistą częstość rekombinacji można obliczyć następująco:

$$(5) cRF = N_r / N$$

Używając wyżej opisanych wzorów (1-5), obliczono  $cRF$  dla poszczególnych rejonów RNA BMV oraz rzeczywistą częstość rekombinacji w przeliczeniu na 100 nukleotydów ( $cRF/100nt$ ). Jak pokazano w Tabeli 4.3, w rejonie 5' RNA2,  $cRF/100nt$  osiągała 9% podczas infekcji w *C. quinoa*, natomiast część środkowa i 3' wspierały homologiczne przeskokki rekombinacyjne z



częstością odpowiednio 3%-6% i 4% na 100 nukleotydów. Podczas infekcji w jęczmieniu *cRF/100nt* dla poszczególnych rejonów osiągała podobne wartości jak podczas infekcji w *C. quinoa* (6-4%). W dwóch badanych rejonach RNA1 *cRF/100nt* wynosiła 3% i 4% podczas infekcji w jęczmieniu.

**Tabela 4.3. Rzeczywista częstość rekombinacji (*cRF*) zachodzącej pomiędzy genomowymi cząsteczkami RNA2 i RNA1 BMV<sup>2)</sup>**

region między markerami	gospodarz	$N^3)$	$N_1$	$N_2$	$N_d$	$oRF = \frac{N_d}{N}$	$N_r$	$cRF = \frac{N_r}{N}$	$cRF/100nt$
M2/M3 RNA2 571nt	<i>C. quinoa</i> –plamki nekrotyczne	39	13	16	10	26%	20,21	51%	8,9%
	<i>C. quinoa</i> –liść <sup>1)</sup>	36	21	11	4	22%	8,9	49%	8,6%
	<i>H. sativum</i>	59	18	31	10	17%	21,5	36%	6,3%
M3/M4 RNA2 811nt	<i>C. quinoa</i> –plamki nekrotyczne	39	19	15	5	13%	10,1	26%	3,2%
	<i>C. quinoa</i> –liść <sup>1)</sup>	36	21	11	4	22%	8,9	49%	6,0%
	<i>H. sativum</i> <sup>4)</sup>	62	27	21	14	22%	28,4	45%	5,5%
M4/M6 RNA2 809nt	<i>C. quinoa</i> –plamki nekrotyczne	17	7	7	3	18%	6	35%	4,4%
	<i>C. quinoa</i> –liść <sup>1)</sup>	53	28	21	4	15%	8,2	31%	3,8%
	<i>H. sativum</i>	71	39	22	10	14%	21,7	31%	3,8%
O3/O6 RNA1 962nt	<i>H. sativum</i>	63	40	16	7	11%	17,1	27%	2,8%
O6/O8 RNA1 1465nt	<i>H. sativum</i>	55	26	14	15	27%	31,25	57%	3,9%

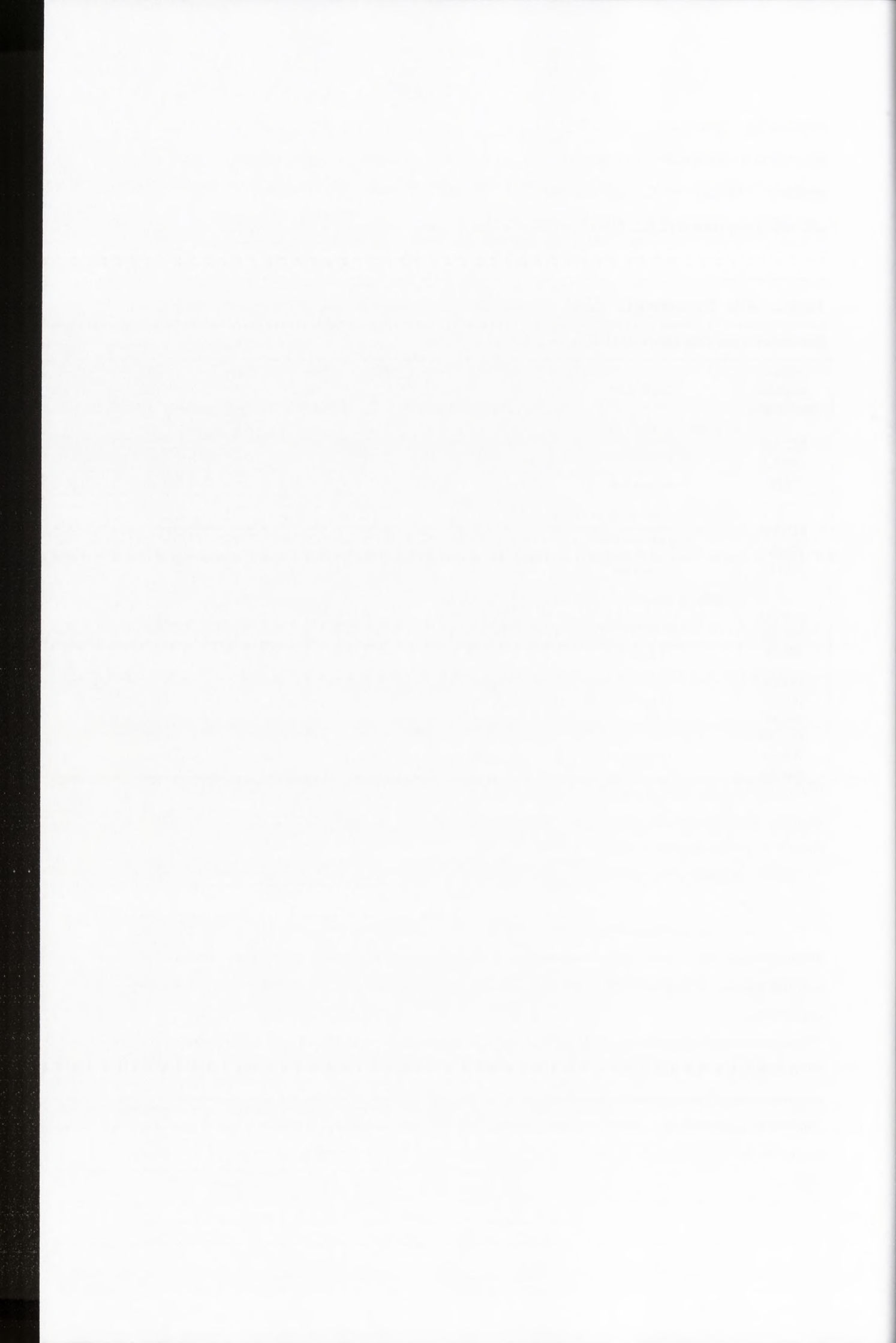
<sup>1)</sup> Ponieważ jedynie 50% plamek nekrotycznych na liściach *C. quinoa* było zainfekowanych podwójnie, częstość rekombinacji dla całego liścia została obliczona jako stosunek ilości zrekombinowanych klonów do połowy badanych klonów x 100%.

<sup>2)</sup> Częstość rekombinacji obliczono jako stosunek ilości zrekombinowanych klonów do ilości badanych klonów x 100%.

<sup>3)</sup>  $N$  – ilość wszystkich badanych klonów,  $N_1$ ,  $N_2$  – ilość niezrekombinowanych klonów jednego bądź drugiego typu,  $N_d$  – ilość zaobserwowanych zrekombinowanych klonów,  $N_r$  – ilość wszystkich zrekombinowanych klonów,  $oRF$  – obserwowana częstość rekombinacji,  $cRF$  – rzeczywista częstość rekombinacji.

<sup>4)</sup> Częstość rekombinacji dla rejonu M3/M4 RNA2 BMV w jęczmieniu jest sumą wyników uzyskanych po inokulacjach M2-RNA2-BMV / M34-RNA2-BMV i M34-RNA2-BMV / M6-RNA2-BMV. W eksperymencie z parą mutantów M2-RNA2-BMV / M34-RNA2-BMV przebadano 38 klonów cDNA odpowiadających rejonowi RNA2 pomiędzy mutacjami M3/M4, natomiast w eksperymencie z parą mutantów M34-RNA2-BMV / M6-RNA2-BMV, przebadano 24 klony cDNA, co w sumie daje 62 klony.





#### 4.1.6. Badanie częstości homologicznych przeskoków rekombinacyjnych zachodzących pomiędzy genomowymi cząsteczkami RNA BMV - podsumowanie

Obserwacja homologicznej rekombinacji RNA zachodzącej pomiędzy tymi samymi genomowymi cząsteczkami BMV typu dzikiego jest niemożliwa, bowiem powstałe rekombinanty nie różnią się od cząsteczek rodzicielskich. Z tego powodu do RNA1 i RNA2 BMV wprowadzono markery w postaci synonimicznych substytucji nukleotydowych, tworzących w cDNA odpowiadającym wirusowemu RNA unikalne miejsca restrykcyjne. W celu określenia częstości homologicznej rekombinacji RNA zachodzącej pomiędzy genomowymi segmentami RNA1 i RNA2 wirusa mozaiki stokłosy, jęczmień siewny oraz komosę ryżową infekowano parami mutantów wirusa, zawierającymi dwa różne markery w kodującym rejonie badanej cząsteczki genomowej. Stwierdzono, że część powstających podczas infekcji cząsteczek potomnych różniła się od cząsteczek typu rodzicielskiego lokalizacją markerów – były to rekombinanty homologiczne. Na podstawie analizy restrykcyjnej wirusowego cDNA otrzymanego na matrycy całkowitego RNA wyizolowanego z zakażonych roślin ustalono częstość, z jaką homologiczna rekombinacja RNA zachodziła pomiędzy dwoma różnymi wariantami RNA2. Osiągała ona następujące wartości:

- 26% (pojedyncze plamki nekrotyczne komosy), 22% (cały liść komosy) i 17% (jęczmień) w 571-nukleotydowym rejonie między markerami M2 (326 BamHI) i M3 (897 BamHI) w RNA2;

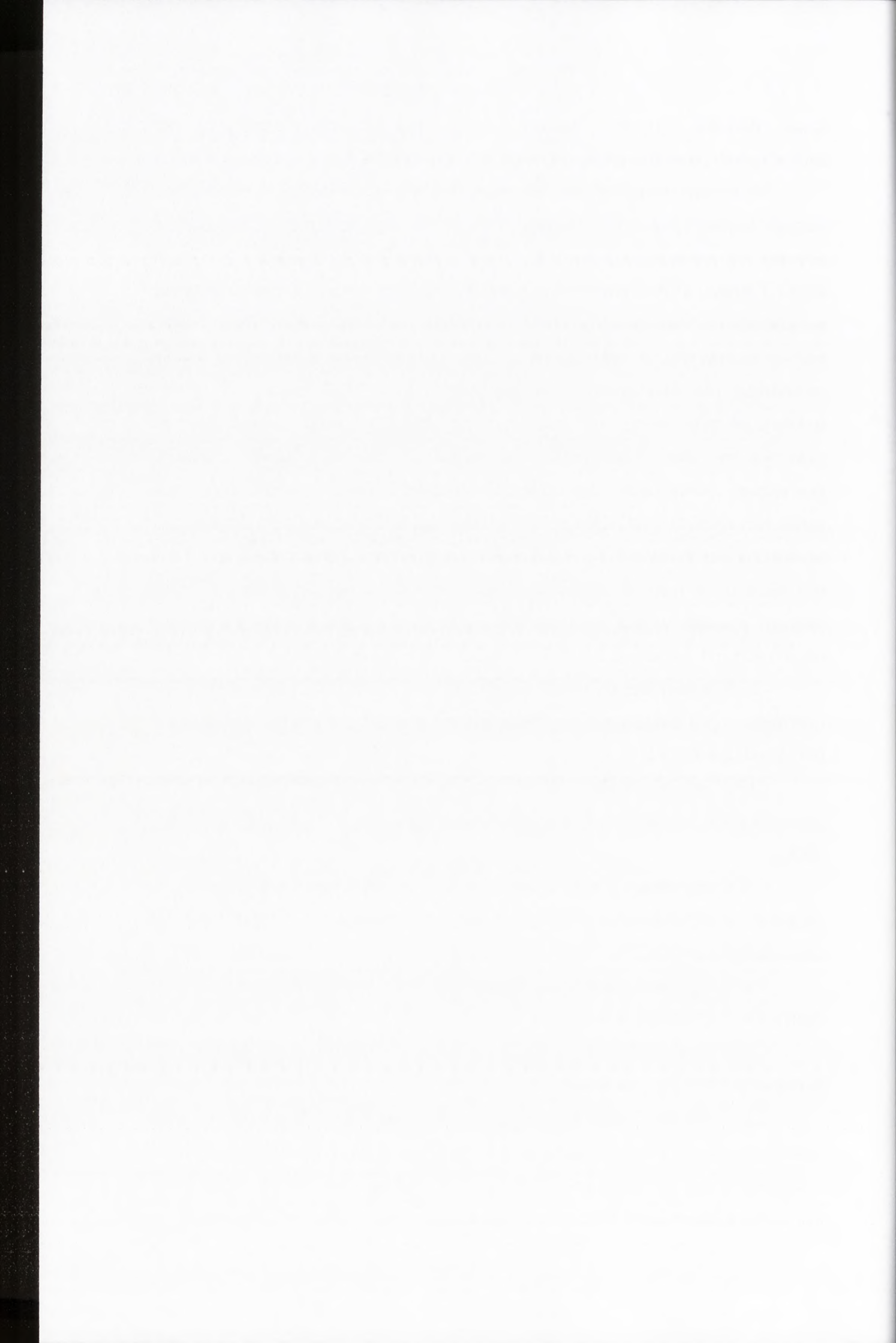
- 13% (pojedyncze plamki nekrotyczne komosy), 22% (cały liść komosy) i 22% (jęczmień) w 811-nukleotydowym rejonie między markerami M3 i M4 (1708 BstEII) w RNA2;

- 18% (pojedyncze plamki nekrotyczne komosy), 15% (cały liść komosy) i 14% (jęczmień) w 809-nukleotydowym rejonie między markerami M4 (1708 BstEII) i M6 (2517 BamHI) w RNA2;

- 11% (jęczmień) w 961-nukleotydowym rejonie między markerami O3 (511 BglII) i O6 (1472 BstBI) w RNA1;

- 27% (jęczmień) w 1561-nukleotydowym rejonie między markerami O6 (1472 BstBI) i O8 (2933 BglII) w RNA1.

Zaobserwowane rekombinanty powstały wskutek przeskoku wirusowej replikazy pomiędzy dwoma różnymi wariantami tej samej genomowej cząsteczki BMV i wyróżniały się na tle cząsteczek typu rodzicielskiego innym rozmieszczeniem markerów. Rekombinanty te stanowiły jednak około 50% wszystkich powstających w

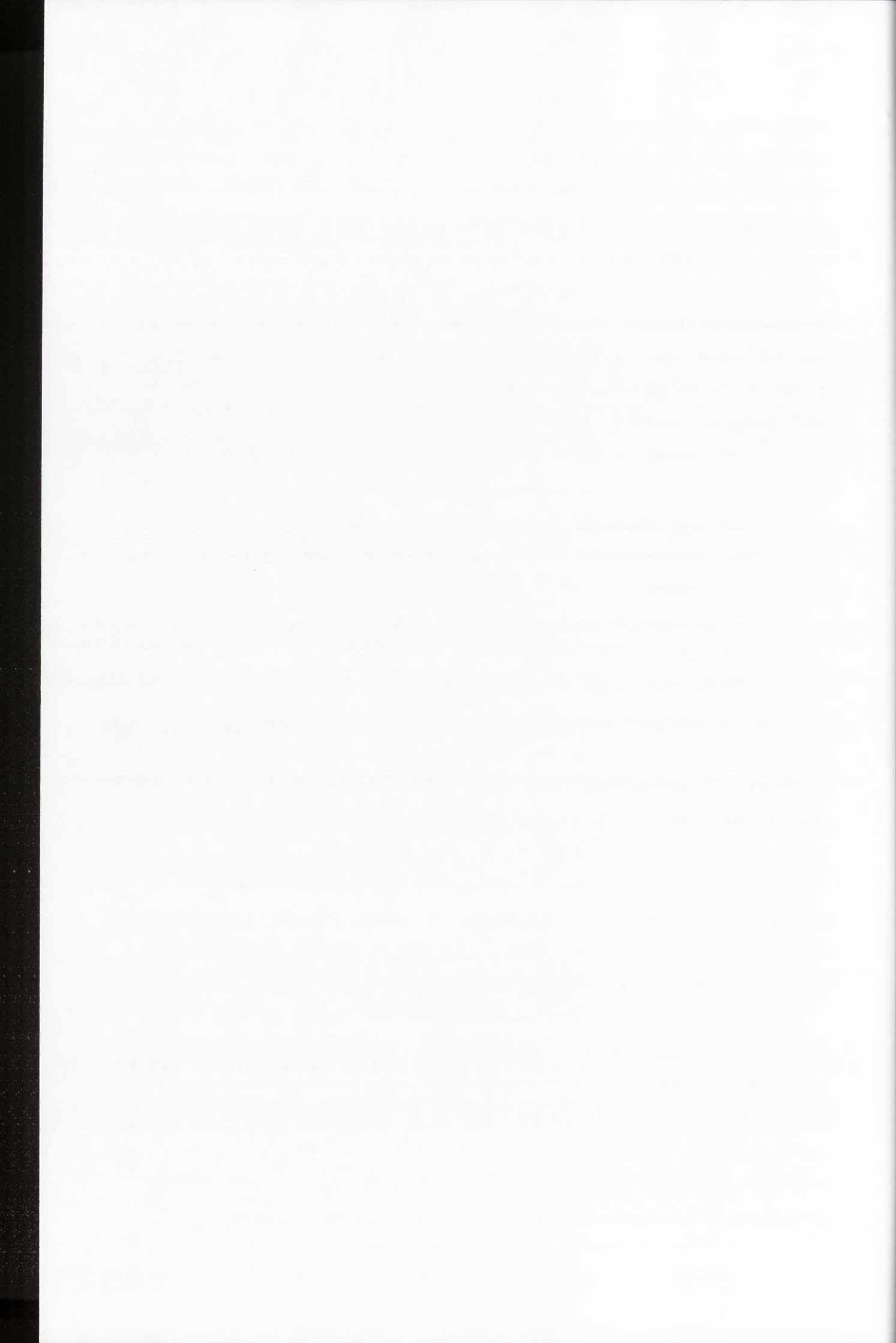


czasie infekcji rekombinantów. Wyodrębnienie rekombinantów powstałych skutkiem przeskoku RdRp pomiędzy tymi samymi wariantami genomowej cząsteczki nie było możliwe ze względu na brak różnic pomiędzy nimi i cząsteczkami typu rodzicielskiego. Aby uzupełnić otrzymane wyniki, zaproponowano metodę obliczeniową umożliwiającą poznanie minimalnej rzeczywistej częstości rekombinacji (zakładającej, iż wszystkie rekombinanty są tworzone w wyniku pojedynczego przeskoku rekombinacyjnego) z uwzględnieniem zdolności replikacyjnych cząsteczek rodzicielskich. Po oszacowaniu całkowitej liczby rekombinantów stwierdzono, że rzeczywista częstość rekombinacji w przeliczeniu na 100 nukleotydów osiągała w poszczególnych rejonach RNA2 i RNA1 BMV następujące wartości:

- 8,9% (pojedyncze plamki nekrotyczne komosy), 8,6% (cały liść komosy) i 6,3% (jęczmień) w 571-nukleotydowym rejonie 5' RNA2;
- 3,2% (pojedyncze plamki nekrotyczne komosy), 6,0% (cały liść komosy) i 5,5% (jęczmień) w 811-nukleotydowym środkowym rejonie RNA2;
- 4,4% (pojedyncze plamki nekrotyczne komosy), 3,8% (cały liść komosy) i 3,8% (jęczmień) w 809-nukleotydowym rejonie 3' RNA2;
- 2,8% (jęczmień) w 961-nukleotydowym rejonie 5' RNA1;
- 3,9% (jęczmień) w 1561-nukleotydowym rejonie 3' RNA1.

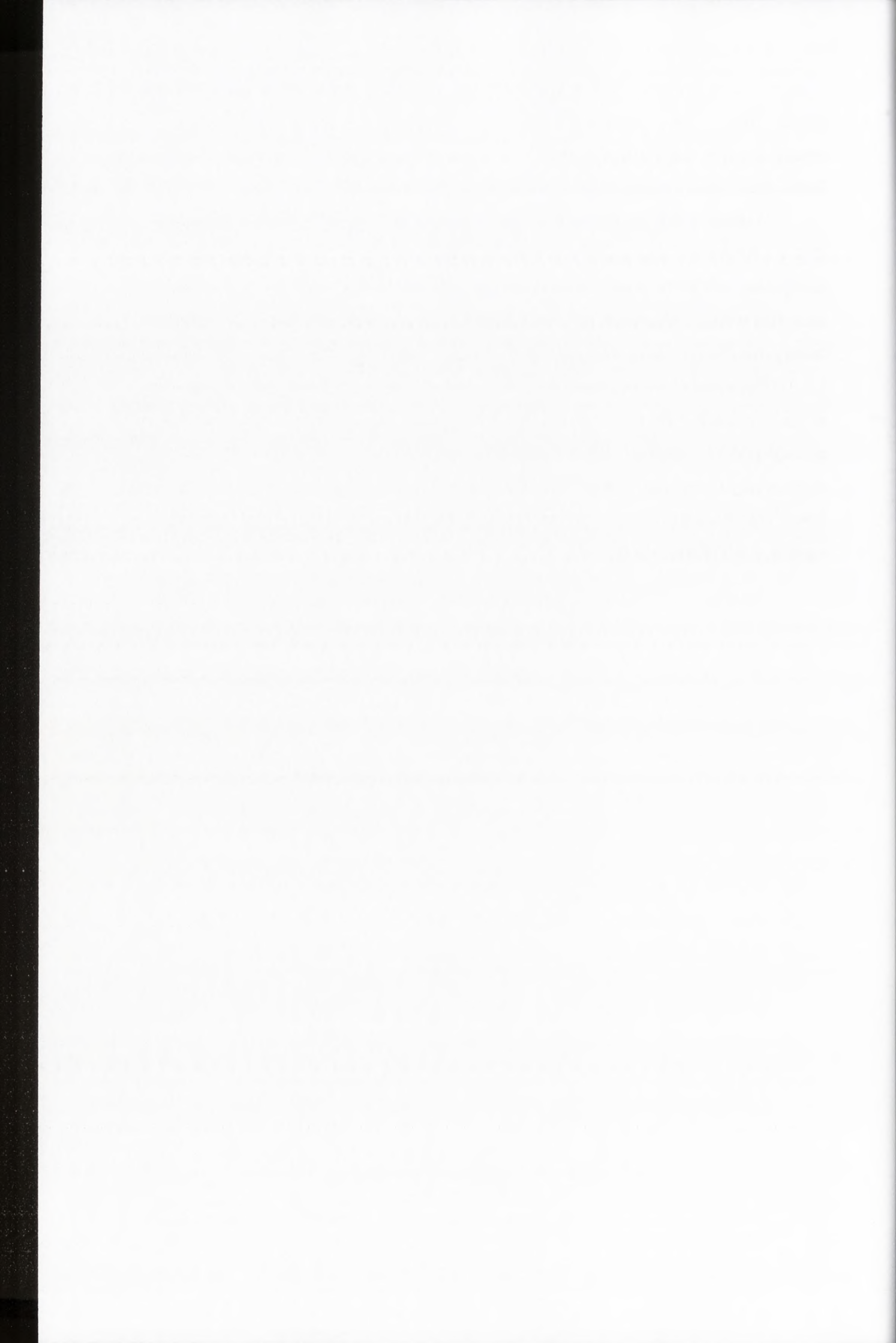
W celu stwierdzenia czy podczas replikacji mogło dojść do dwóch przeskoków rekombinacyjnych, analizie poddano dwa rejony RNA2 zawierające trzy mutacje markerowe (571-nukleotydowy rejon 5' RNA2 wyznaczany przez mutacje M2 i M3 oraz 811-nukleotydowy środkowy rejon RNA2 wyznaczany przez mutacje M3 i M4). Pośród 39 klonów otrzymanych z RNA wyizolowanego z dwóch plamek nekrotycznych powstałych na zakażonym mutantami M2-BMV i M34-BMV liściu *C. quinoa* zaobserwowano 2 podwójne rekombinanty. Ponadto wśród 36 klonów RNA2 otrzymanych z całego liścia komosy 3 były podwójnie zrekombinowane, natomiast 38 klonów otrzymanych z zakażonego jęczmienia zawierało 4 podwójne rekombinanty.

Czynniki takie jak rodzaj gospodarza oraz ilość cykli replikacyjnych nie wpływały na częstość homologicznych przeskoków rekombinacyjnych, ponieważ obserwowana częstość rekombinacji przyjmowała zbliżone wartości w gospodarzu systemicznym (jęczmień) w którym wirus replikuje się bez ograniczeń w całej roślinie, jak i w gospodarzu nadwrażliwym, w którym wirus replikuje się w plamkach nekrotycznych w sposób ograniczony. Porównując otrzymane rezultaty z danymi dotyczącymi RNA3 (Rozdział 1.6.), można stwierdzić, że w badanych rejonach RNA1 i



RNA2 BMV nie występują motywy wspierające homologiczne przeskoki rekombinacyjne, takie jak w rejonie międzygenowym RNA3 BMV (Bruyere i wsp., 2000), gdzie obserwowana częstość rekombinacji osiągała 71%.

Podczas badań stabilności mutacji markerowych w rejonach niekodujących RNA2 i RNA1 BMV zaobserwowano także inne, interesujące zjawisko, a mianowicie zastąpienie tych mutacji sekwencją typu dzikiego. Powrót do sekwencji typu dzikiego zachodził wskutek nieprecyzyjnej replikacji RNA przeprowadzanej przez RdRp BMV i faworyzowania powstałej substytucji przez presję selekcyjną (cząsteczki posiadające 3' i 5' UTRy typu dzikiego są lepiej przystosowane od cząsteczek zawierających mutacje w tych rejonach). Za tym mechanizmem przemawia fakt, iż ilość wprowadzanych mutacji podczas replikacji RNA z udziałem RdRp wynosi około  $10^{-5}$ /nukleotyd/cykl replikacyjny (Steinhauer i wsp., 1987). Dla porównania, polimerazy DNA zależne od DNA wprowadzają do nici potomnej błędy w ilości  $10^{-10}$  -  $10^{-12}$ /nukleotyd/cykl replikacyjny (Hunkel, 1992).

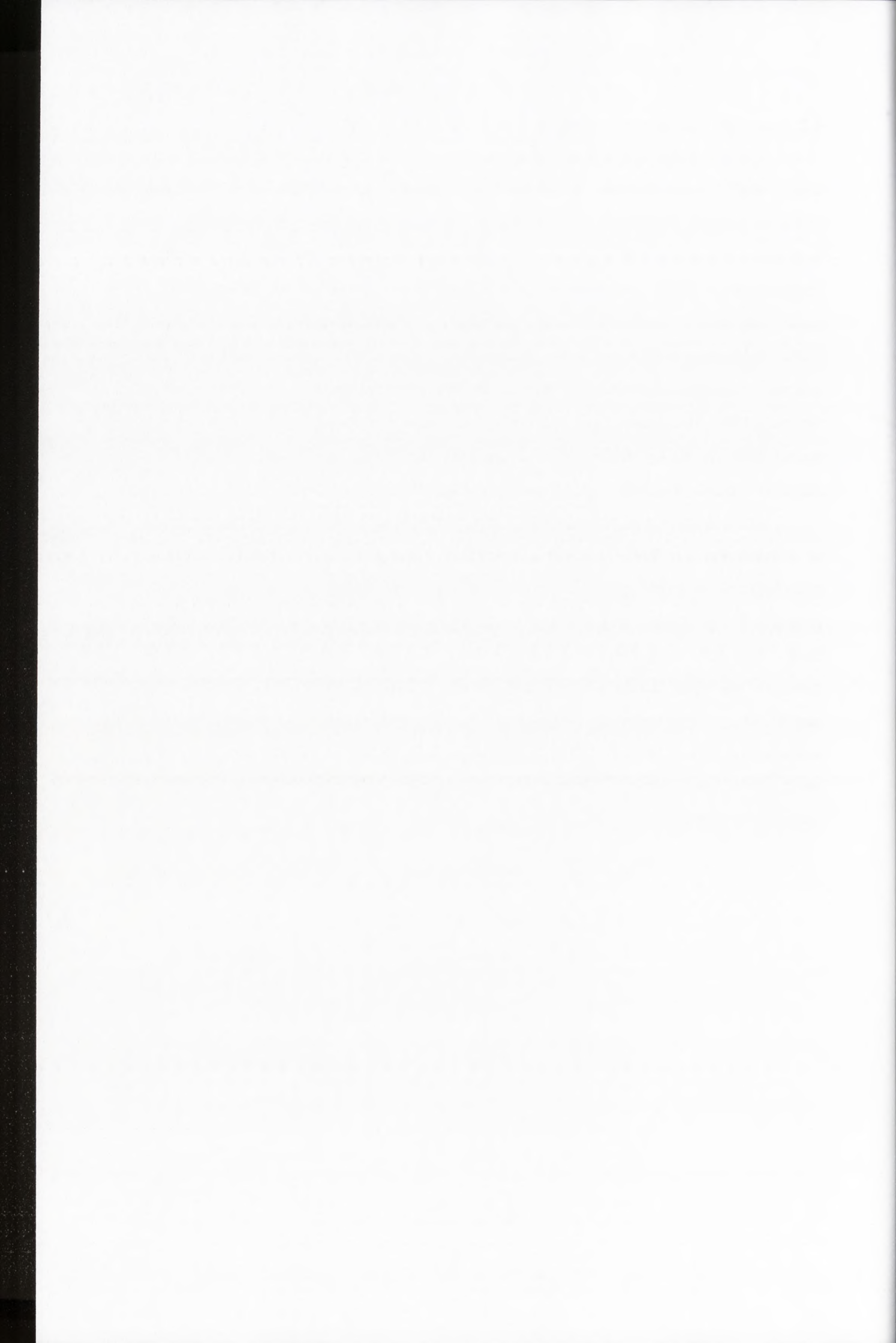


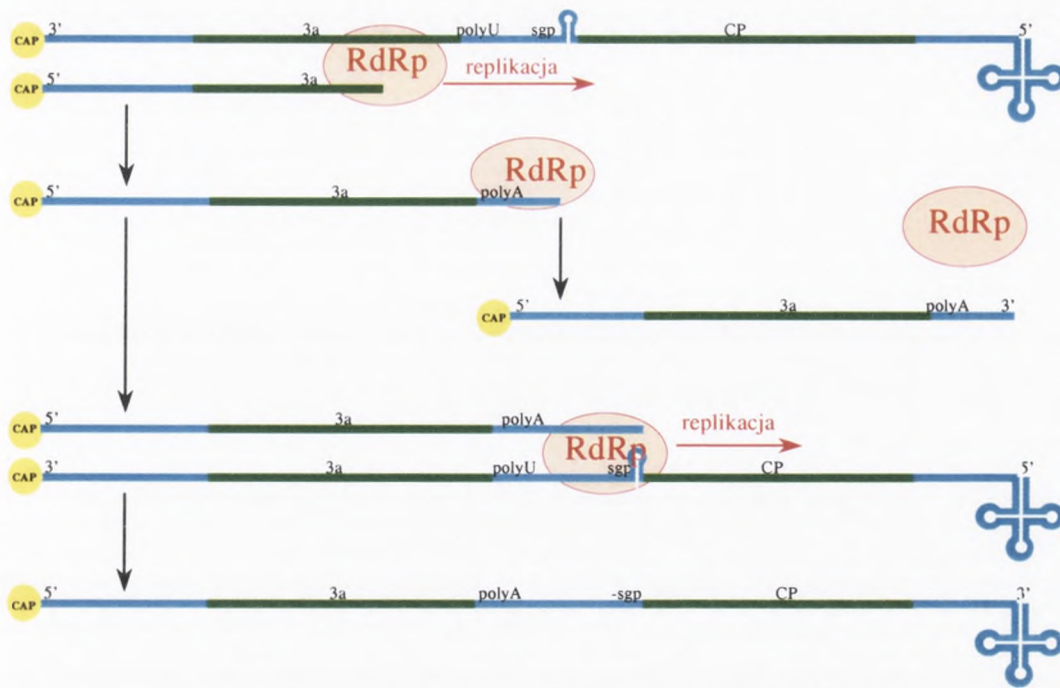
#### 4.2. Identyfikacja nowego, subgenomowego RNA BMV (RNA5)

Podczas badań aktywności rekombinacyjnej cząsteczki RNA3 BMV (Bruyere i wsp., 2000) zaobserwowano podwyższoną aktywność rekombinacyjną w obszarze intercistronowym RNA3. Zasugerowano, że przeskok rekombinacyjny w tym rejonie zachodzi podczas syntezy nici (+)RNA i polega na poślizgu i dysocjacji kompleksu replikacyjnego BMV spowodowanych obecnością w matrycy (-)RNA3 sekwencji polyU oraz struktury subgenomowego promotora uczestniczącego w syntezie sgRNA4 BMV. Sekwencje polyU czy poliA mogą powodować poślizg replikującego enzymu wskutek osłabienia oddziaływanie matrycy i nici potomnej (Pathak i Hu, 1997; Deng i Shuman, 1997; Hausmann i wsp., 1996). Subgenomowy promotor stanowi przestrzenną przeszkodę dla RdRp BMV, bowiem wydajność syntezy RNA3 w protoplastach znacznie wzrasta po usunięciu tej struktury (Grdzlishvili i wsp., 2005).

Jeżeli synteza zrekombinowanego RNA3 BMV zachodzi w sposób nieciągły, to w zainfekowanych BMV komórkach roślinnych powinna być obecna cząsteczka homologiczna do części genomowego RNA3' od jej pierwszego nukleotydu do rejonu polyA, w którym oddysocjuje kompleks replikacyjny (cząsteczka w dalszej części pracy będzie nazywana subgenomowym RNA5). Pełnej długości zrekombinowany (+)RNA3 powstaje natomiast dzięki wewnętrznej reinicjacji syntezy RNA przez RdRp na tej samej lub nowej cząsteczce (-)RNA3, ułatwionej prawdopodobnie przez obecność subgenomowego promotora (Bruyere i wsp., 2000) (Rysunek 4.11). Proponowany mechanizm nie dotyczy wszystkich potomnych RNA3, ponieważ przeskok rekombinacyjny nie jest warunkiem replikacji RNA3.







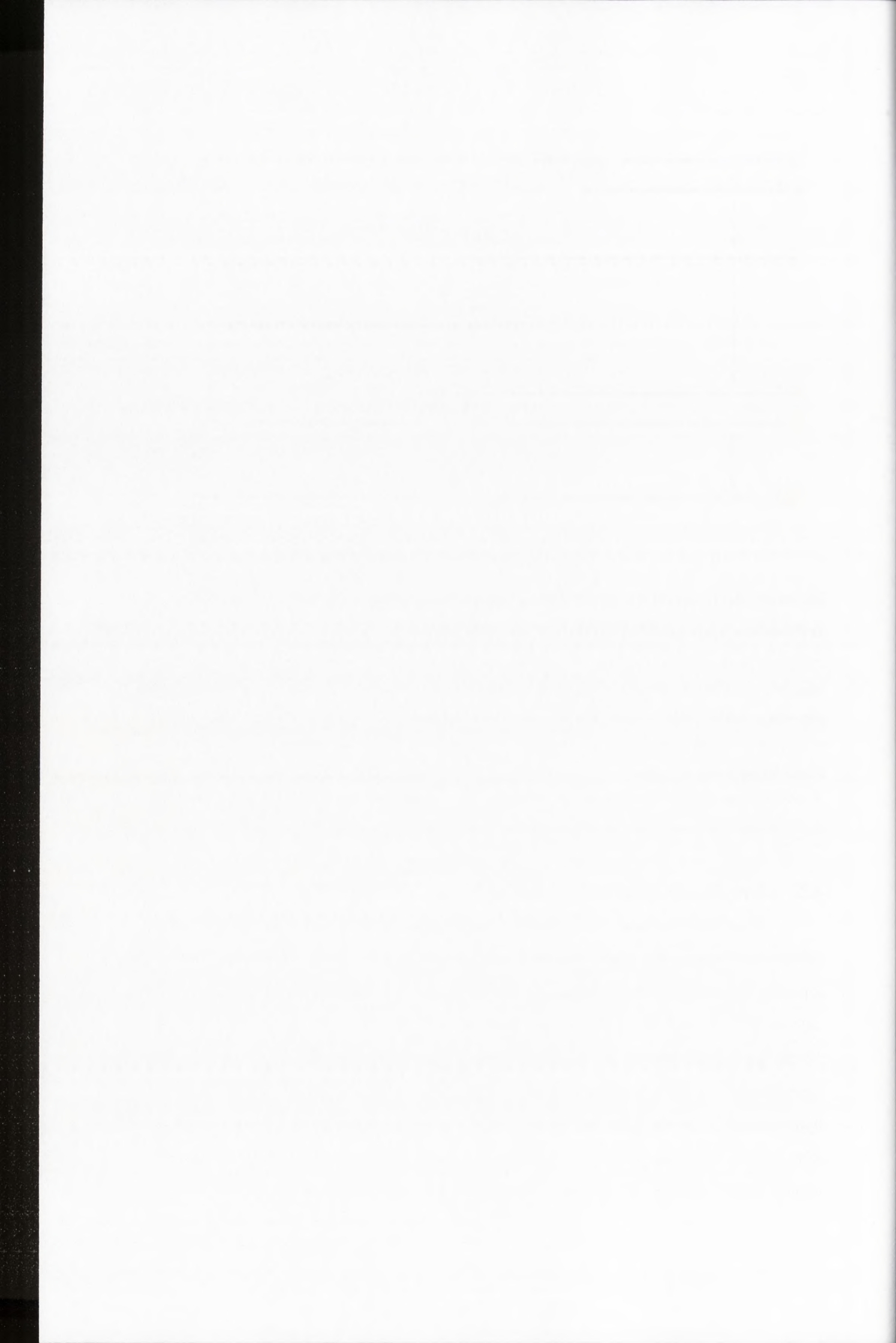
**Rysunek 4.11. Hipotetyczny mechanizm powstawania subgenomowego RNA5 i zrekombinowanego RNA3 u wirusa mozaiki stokłosy**

Podczas syntezy (+)RNA3 dochodzi do dysocjacji RdRp BMV, wskutek zatrzymania na sekwencji polyU matrycowego (-)RNA. W efekcie powstaje cząsteczka RNA5 homologiczna do części RNA3 od jej pierwszego nukleotydu do rejonu polyA. Synteza pełnej długości RNA3 BMV może być kontynuowana po przyłączeniu się kompleksu replikacyjnego związanego z RNA5 do subgenomowego promotora RNA4 tej samej lub innej matrycy.

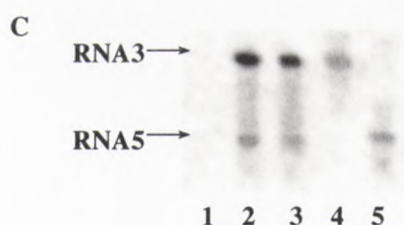
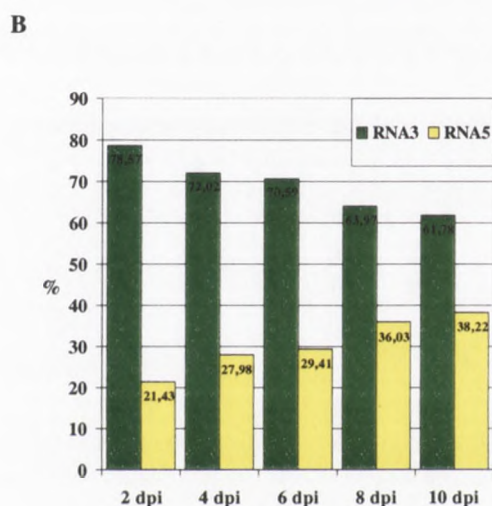
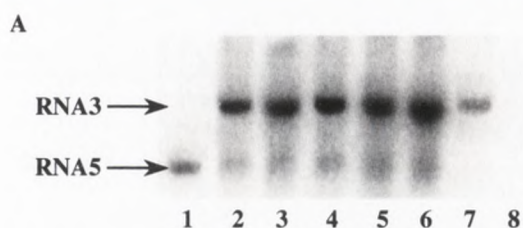
Kierunek syntezy cząsteczek potomnych oraz kompleks replikacyjny oznaczono kolorem czerwonym, niekodujące rejonu cząsteczek - niebieskim, kodujące - zielonym.

#### 4.2.1. Identyfikacja subgenomowego RNA5 metodą *northern blot*

Aby zweryfikować tezę mówiącą o istnieniu RNA5 BMV, jęczmień siewny infekowano preparatem BMV typu dzikiego, a następnie całkowity RNA wyizolowany z rośliny całkowity RNA poddano analizie *northern blot* (Metody, rozdział 3.2.2.1). W celu określenia akumulacji RNA5 w zakażonej roślinie, RNA izolowano w 2, 4, 6, 8 i 10 dni po zainfekowaniu. RNA rozdzielono elektroforetycznie w 1% natywnym żelu agarozowym i przeniesiono na membranę nylonową. Tak przygotowany RNA poddano hybrydyzacji z sondą RNA znakowaną CTP [ $\alpha$  32P] komplementarną do sekwencji RNA3 i poszukiwanego RNA5 obejmującej nukleotydy 962-1110. Aby potwierdzić identyczność końców 5' obydwu cząsteczek wirusowych, analizie poddano także



całkowity RNA wyizolowany z zakażonego jęczmienia siewnego jak i wirusowy RNA wyizolowany z oczyszczonego preparatu BMV, hybrydując go z sondą komplementarną do pierwszych 100 nukleotydów RNA3 i poszukiwanego RNA5 (Rysunek 4.12).



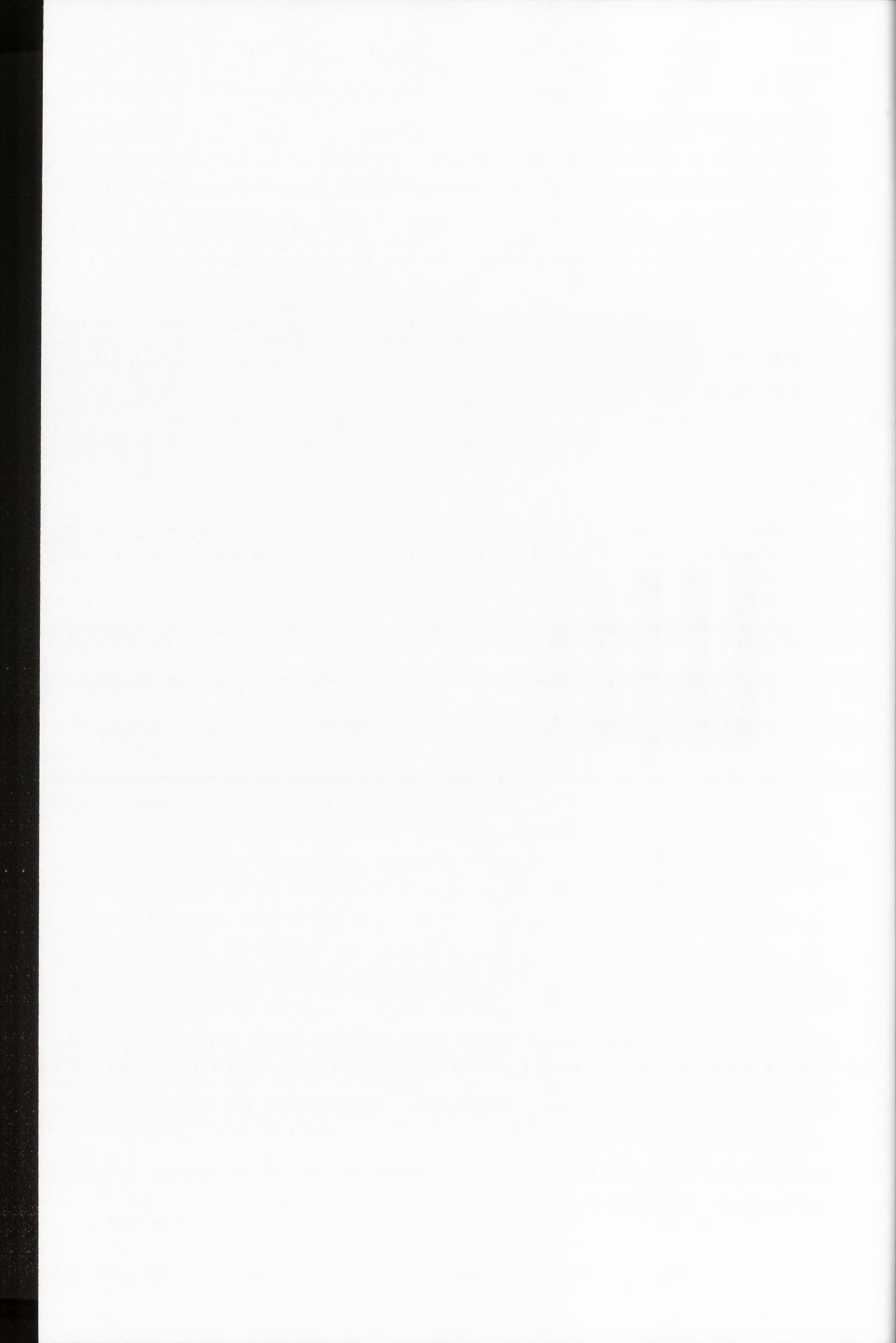
### Rysunek 4.12. Akumulacja RNA5 w jęczmieniu zakażonym BMV

**A** – autoradiogram analizy *northern blot* RNA wyizolowanego z jęczmienia zakażonego BMV, rozdzielonego w 1% natywnym żelu agarozowym. Używano sondy, hybrydującej do RNA3 i subgenomowego RNA5 pomiędzy nukleotydami 962-1110. Obraz odczytywano za pomocą skanera Phosphoimager. 1 – marker długości: transkrypt RNA5 1221nt, 2-6 – RNA wyizolowany z jęczmienia 2, 4, 6, 8 i 10 dpi, 7- marker długości: transkrypt RNA3 BMV, 8 – całkowity RNA wyizolowany z rośliny niezakażonej.

**B** – akumulacja RNA5 w zakażonej roślinie w 2, 4, 6, 8 i 10 dni po zainfekowaniu, oszacowana programem ImageQuant.

**C** – autoradiogram *northern blot* RNA BMV rozdzielonego w 1% natywnym żelu agarozowym. Używano sondy komplementarnej do sekwencji RNA3 i subgenomowego RNA5 między nukleotydami 1-100. 1- całkowity RNA z niezakażonej rośliny, 2 – RNA wyizolowany z preparatu wirusowego, 3 – całkowity RNA z zakażonej rośliny, 4 – transkrypt RNA3, 5 – transkrypt RNA5

Po przeanalizowaniu obrazu membrany z całkowitym RNA z wyizolowanym z zakażonego jęczmienia zhybrydowanym z sondą znakowaną radioaktywnie za pomocą skanera Phosphoimager stwierdzono obecność cząsteczki RNA, odpowiadającej długością i sekwencją końców 3' i 5' poszukiwanemu RNA5, zarówno pośród RNA izolowanego z roślin jak i z oczyszczonego preparatu wirusowego. Fakt ten potwierdza, że obserwowany około 1220-nukleotydowy RNA posiada sekwencję

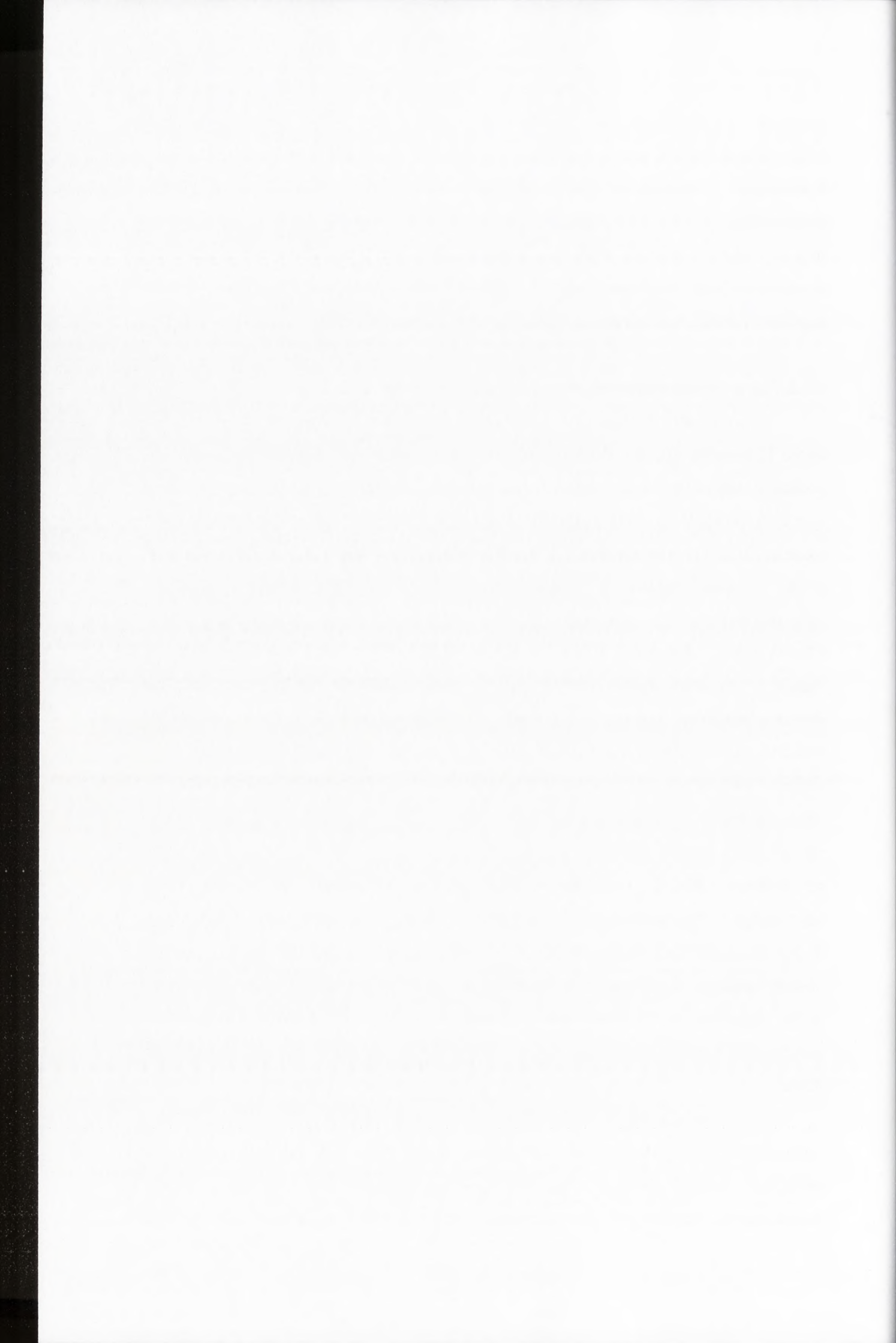


identyczną z 5'-końcową częścią genomowej cząsteczki RNA3 BMV od jej pierwszego nukleotydu do rejonu polyA, oraz że niewielka ilość tego RNA ulega enkapsydacji. Porównując intensywność promieniowana sondy zhybrydowanej z 1220-nukleotydowym RNA i z genomowym RNA3 w próbkach RNA pobranych z roślin w różnym stadium infekcji ustalono, iż ilość około 1220-nukleotydowego RNA w stosunku do ilości genomowego RNA3 rośnie w czasie infekcji. Przedstawione wyniki uzyskano z pięciu niezależnie przeprowadzonych eksperymentów.

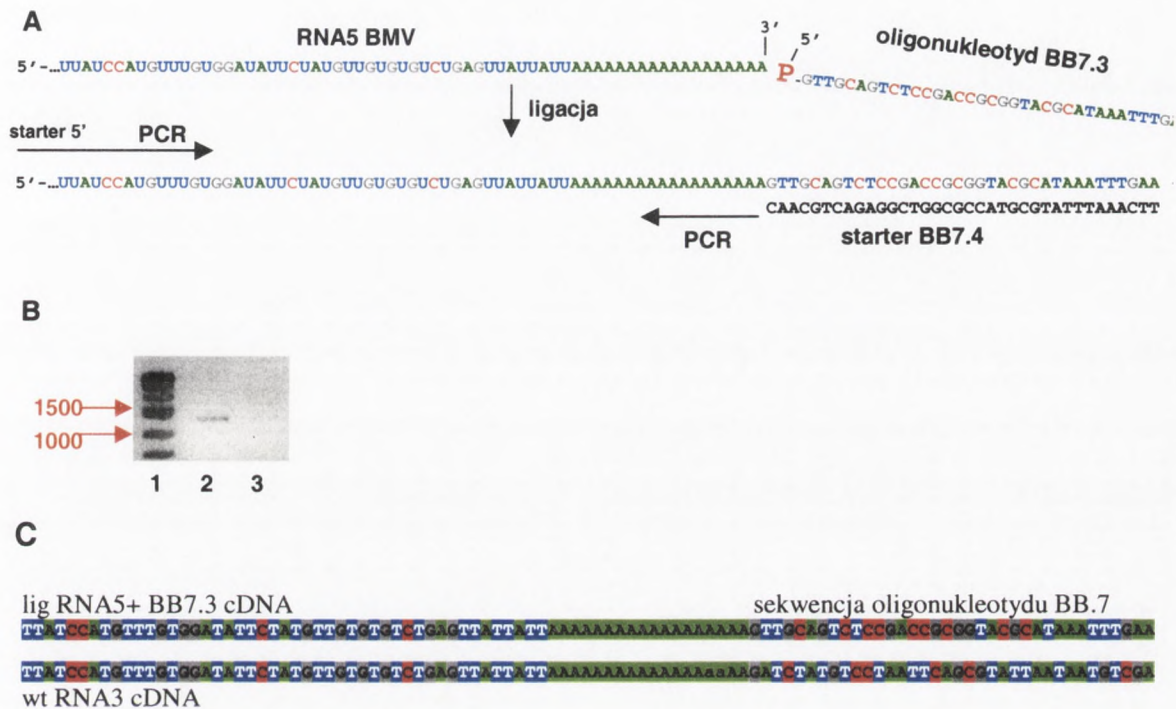
#### 4.2.2. Sekwencjonowanie subgenomowego RNA5 BMV

W celu potwierdzenia, iż obserwowany na autoradiogramach *northern blot* około 1220-nukleotydowy RNA jest poszukiwaną cząsteczką subgenomowego RNA5, podjęto próbę poznania jego sekwencji nukleotydowej. Strategia, jaką wykorzystano w tym celu, polegała na otrzymaniu cDNA tej cząsteczki i sekwencjonowaniu (Metody, rozdział 3.2.2.2). Aby uzyskać cDNA odpowiadający około 1220-nukleotydowemu RNA, wyekstrahowany z zakażonych roślin całkowity RNA rozdzielano elektroforetycznie w żelu agarozowym i wycinano prążek zawierający RNA, odpowiadający długością RNA5. Następnie RNA oczyszczano i przeprowadzono ligację z oligonukleotydem ssDNA (BB7.3). Oligonukleotyd BB7.3, otrzymany na drodze chemicznej syntezy, nie posiadał 5'-końcowego fosforanu, niezbędnego do przeprowadzenia ligacji RNA przez stosowaną ligazę RNA  $T_4$ . Fosforylację BB7.3 przeprowadzono przy pomocy kinazy polinukleotydowej  $T_4$ , przenoszącej na koniec 5' oligonukleotydu  $\gamma$ -fosforan pochodzący z ATP. Otrzymany wskutek ligacji hybryd ssDNA-RNA (RNA5-BB7.3) używano jako matrycy w reakcji odwrotnej transkrypcji ze starterem BB7.4, komplementarnym do oligonukleotydu BB7.3. Na bazie uzyskanego ssDNA prowadzono reakcję PCR ze starterem komplementarnym do końca 5' RNA5 (MP1T7) i starterem BB7.4. Uzyskany cDNA sekwencjonowano i w ten sposób ustalono, że jego sekwencja odpowiada pierwszym 1221 nukleotydom RNA3 BMV (Rysunek 4.13). Fakt ten potwierdził, iż podczas infekcji BMV wśród wirusowego RNA pojawiającego się w roślinie, obecne są cząsteczki subgenomowego RNA5.

W czasie wcześniejszych badań zaobserwowano niewielki polimorfizm długości międzygenowej sekwencji polyA BMV RNA3 (Ahlquist i wsp., 1984a). Zjawisko to może być efektem poślizgu kompleksu replikacyjnego BMV w różnych miejscach rejonu polyA, spowodowanych osłabieniem oddziaływania między matrycowym i



potomnym RNA w tym rejonie. Aby określić długość końca polyA RNA5, cDNA RNA5-BB7.3 klonowano w wektorze pDRIVE i sekwencjonowano (Metody, rozdział 3.2.2.2).



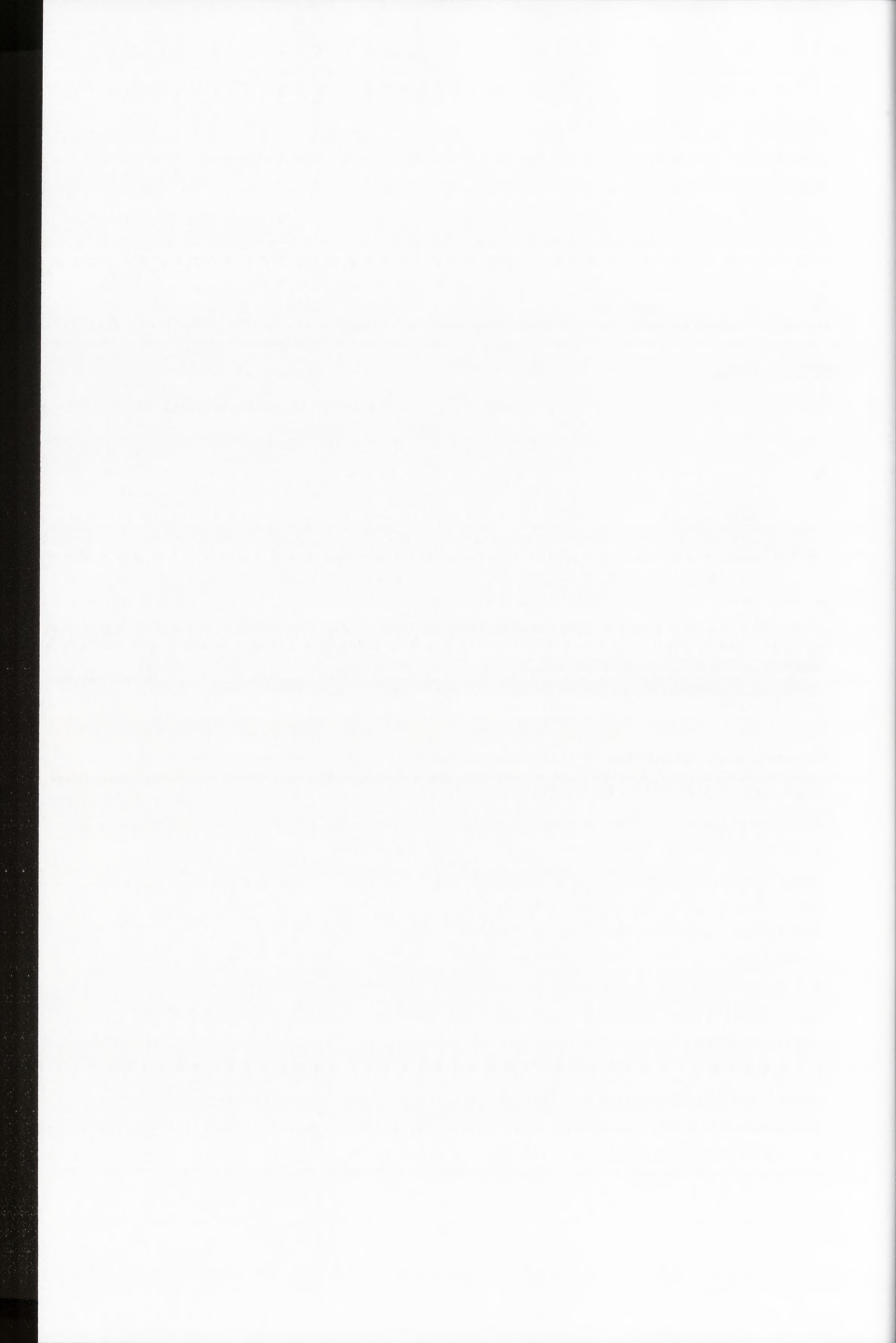
#### Rysunek 4.14. Identyfikacja genomowego RNA5 – ligacja cząsteczki RNA5 z oligonukleotydem DNA z fosforylowaną grupą 5'OH

**A** - schemat otrzymywania cDNA odpowiadającego subgenomowemu RNA5. Powstały w czasie infekcji w roślinach rozdzielano elektroforetycznie, RNA5 izolowano z żelu, po czym poddano go ligacji z 5'-fosforylowanym oligonukleotydem BB7.3. Hybryd ssDNA-RNA5 posłużył następnie jako matryca w reakcji odwrotnej transkrypcji ze starterem BB7.4, komplementarnym do oligonukleotydu BB7.3. ssDNA amplifikowano następnie metodą PCR ze starterami BB7.4 oraz MP1T7, komplementarnym do końca 5' ssDNA

**B** – obraz elektroforetycznego rozdzielania produktu RT-PCR na matrycy RNA5-BB7.3 w 1% żelu agarozowym. 1- wzorzec długości, 2 – produkt RT-PCR powstały na matrycy RNA5-BB7.3, 3- kontrola –RT-PCR na matrycy RNA3.

**C** – obecność RNA5 w komórkach roślin zakażonych BMV potwierdzono przez sekwencjonowanie cDNA RNA5-BB7.3. Sekwencja tego konstruktów od końca 5' do rejonu polyA jest identyczna z sekwencją wtRNA3 BMV, jednak za rejonem poly A obecna jest sekwencja oligonukleotydu BB7.3, która całkowicie różni się od cDNA wtRNA3 BMV.



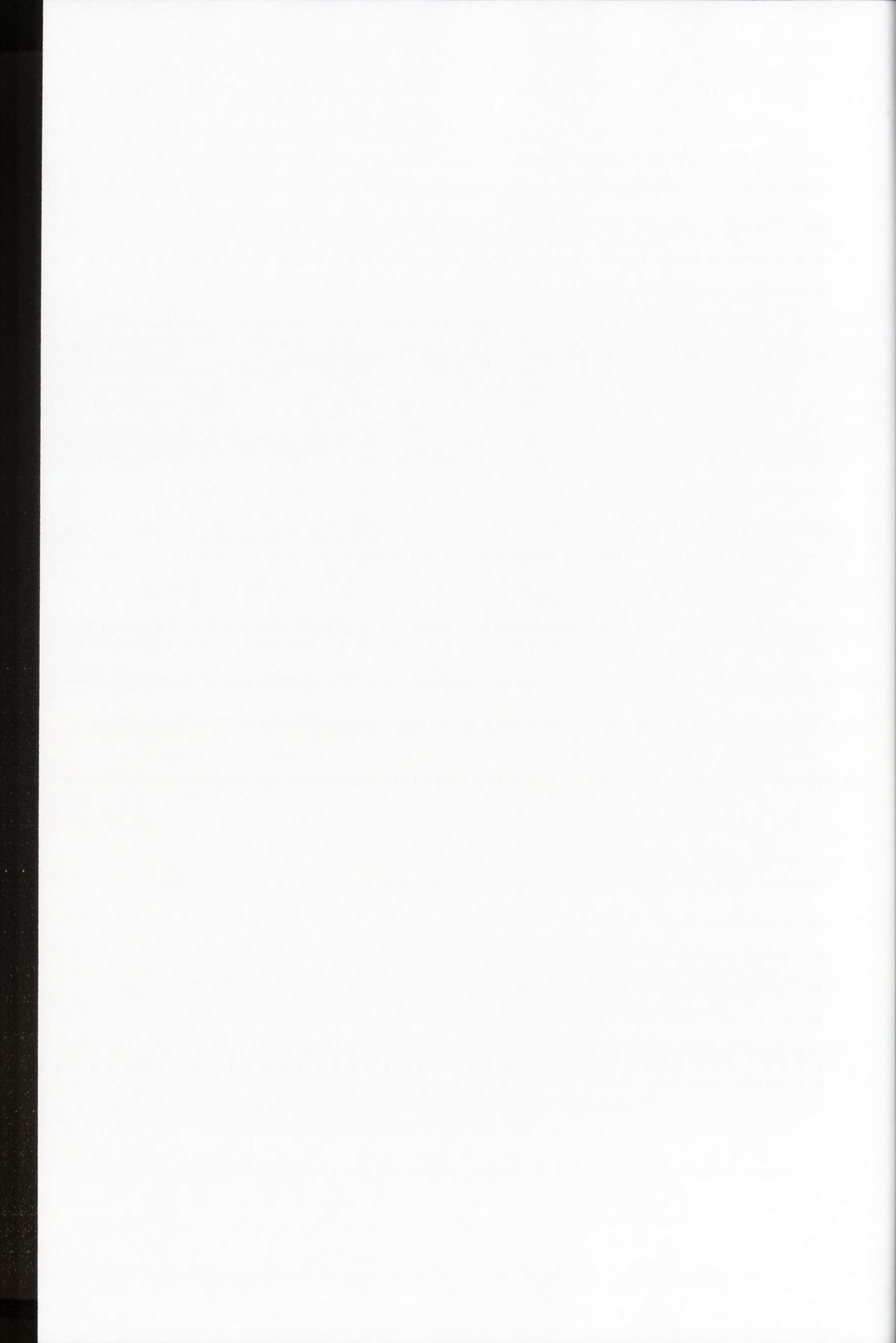


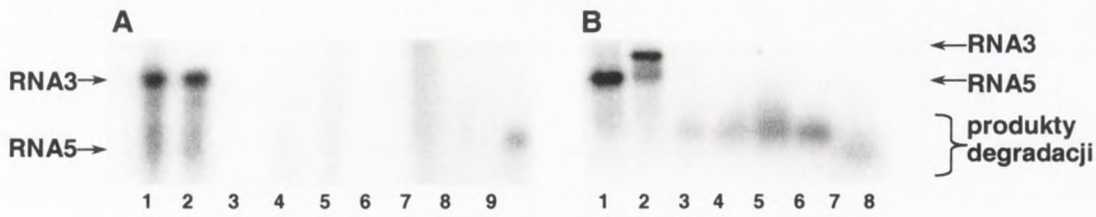
Na 10 zsekwencjonowanych klonów cDNA odpowiadających RNA5, 1 zawierał rejon polyA o długości 13 nukleotydów, 6 posiadało rejon polyA o długości 17 nukleotydów, 2 – o długości 18 nukleotydów i 1 – o długości 19 nukleotydów. Wynik ten potwierdza negatywny wpływ sekwencji polyA na stabilność kompleksu RdRp BMV, oraz wspiera przedstawioną w niniejszym rozdziale hipotezę wyjaśniającą mechanizm powstawanie subgenomowego RNA5.

#### 4.2.3. Analiza stabilności RNA3 BMV w ekstrakcie komórkowym

W rozdziałach 4.2.1 i 4.2.2. opisano dwa eksperymenty, w których wykazano obecność RNA5 w roślinach zainfekowanych wirusem mozaiki stokłosa. Obecność tej cząsteczki RNA nie świadczy jednak, iż zaproponowany mechanizm jej powstawania na drodze dysocjacji kompleksu replikacyjnego na sekwencji polyU (-)RNA3 jest prawdziwy. Inną drogą powstawania RNA5 mogłaby być specyficzna degradacja (+)RNA3 BMV w rejonie polyA przez enzymy komórkowe.

Aby rozwiązać wątpliwości dotyczące mechanizmu powstawania RNA5, przeprowadzono eksperyment polegający na określeniu stabilności cząsteczek RNA3 BMV w ekstrakcie komórkowym (Metody, rozdział 3.2.2.3). RNA3 otrzymany metodą transkrypcji *in vitro* na matrycy pB3TP7 zliniowanej *EcoRI* oraz genomowy RNA BMV wyizolowany z preparatu wirusa inkubowano w temperaturze pokojowej w czasie 1-60 minut w ekstrakcie komórkowym uzyskanym z zarodków jęczmienia. Transkrypty RNA3, przed inkubacją w ekstrakcie komórkowym były rozdzielane elektroforetycznie w żelu agarozowym, wycinane i oczyszczane. Działanie to miało na celu wykluczenie obecności RNA5 który mógł ewentualnie powstać w czasie transkrypcji *in vitro*. Wpływ inkubacji na RNA analizowano metodą *northern blot* z użyciem sondy komplementarnej do sekwencji genomowego RNA3 i subgenomowego RNA5 pomiędzy nukleotydami 962-1110. Po przeanalizowaniu wyników eksperymentu stwierdzono całkowitą degradację zarówno transkryptu RNA3 jak i genomowego RNA3 w ekstrakcie komórkowym, niezależnie od czasu inkubacji. Nie stwierdzono obecności RNA5 oznaczającej specyficzną degradację cząsteczek RNA3 w rejonie polyA (Rysunek 4.15).





**Rysunek 4.15. Analiza stabilności RNA3 BMV w ekstrakcie komórkowym z zarodków jęczmienia**

**A** – przykładowy autoradiogram *northern blot* analizy stabilności transkryptów RNA3 BMV w ekstrakcie komórkowym: 1 - marker długości: transkrypt RNA3, 2 - transkrypt RNA3 inkubowany 1 godzinę w temperaturze pokojowej w wodzie, 3 - 7 – transkrypty RNA3 inkubowane w temperaturze pokojowej w ekstrakcie komórkowym w ciągu 1, 5, 10, 30 i 60 minut, 8 – ekstrakt komórkowy inkubowany 1 godzinę w temperaturze pokojowej, 9 –marker długości: 1221-nt transkrypt RNA5.

**B** – przykładowy autoradiogram *northern blot* analizy stabilności transkryptów RNA3 w ekstrakcie komórkowym genomowych RNA3 wyizolowanych z preparatu BMV. 1 - marker długości: 1221-nt. transkrypt RNA5, 2 – genomowy RNA BMV inkubowany 1 godzinę w temperaturze pokojowej w wodzie, 3 - 7 – genomowy RNA BMV inkubowany w temperaturze pokojowej w ekstrakcie komórkowym w ciągu 1, 5, 10, 30 i 60 minut, 8 - ekstrakt komórkowy inkubowany 1 godzinę w temperaturze pokojowej.

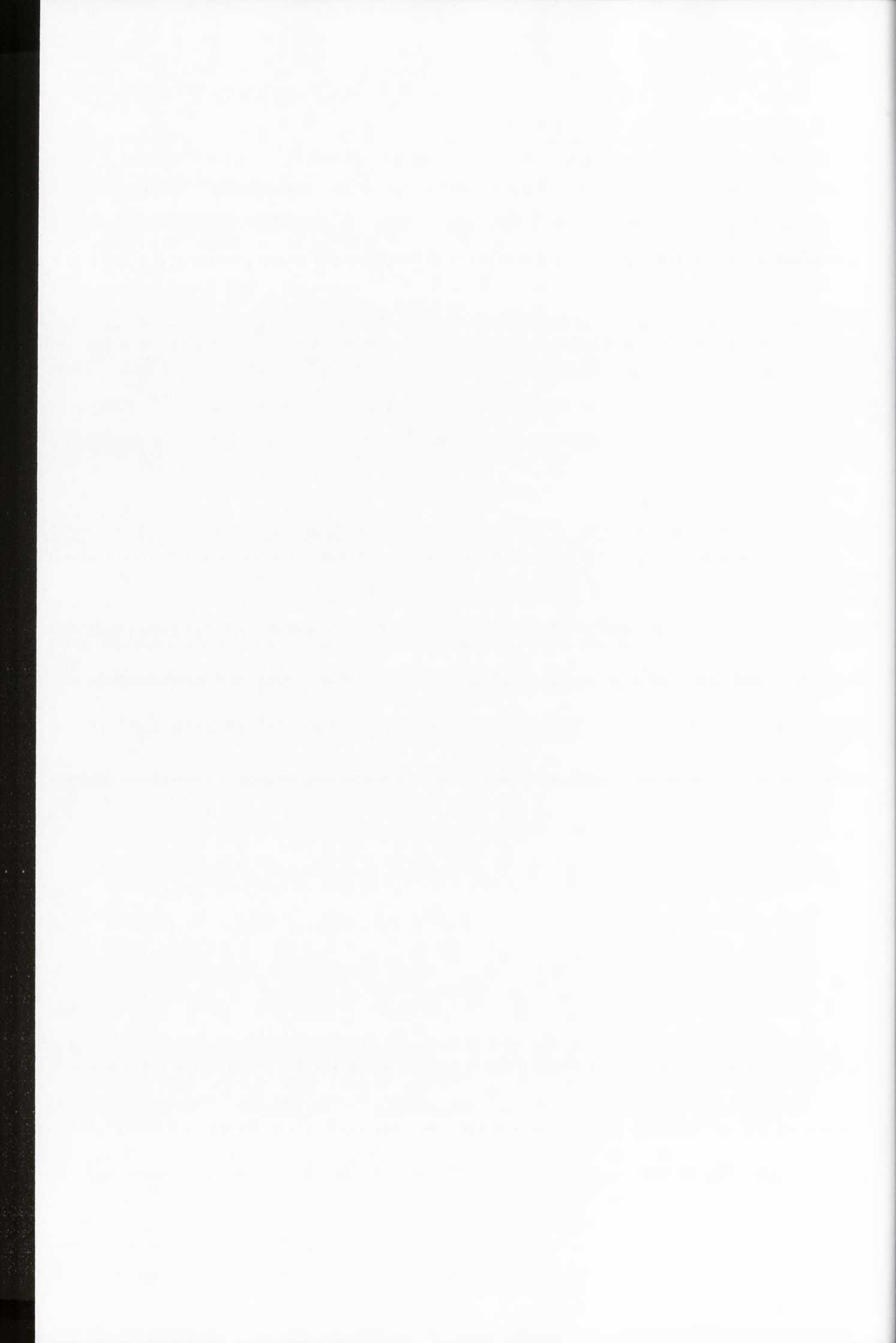
RNA rozdzielano w 1% natywnym żelu agarozowym i przenoszono na nylonowa membranę. Zastosowano sondę komplementarną do sekwencji RNA3 i RNA5 pomiędzy nukleotydami 962-1110. Położenie wirusowych RNA na autoradiogramie oznaczono strzałkami.

#### 4.2.4. Identyfikacja subgenomowego RNA5 - podsumowanie

W niniejszym rozdziale przedstawiono hipotetyczny mechanizm powstawania nieznanego do tej pory subgenomowego RNA u wirusa mozaiki stokłosy, nazwanego RNA5, oraz nieciągłej syntezy RNA3, inspirowany wcześniejszymi obserwacjami podwyższonej aktywności rekombinacyjnej w rejonie międzygenowym RNA3 BMV. Obecność RNA5 w zainfekowanych BMV komórkach roślinnych potwierdzono dwiema różnymi metodami – metodą *northern blot* oraz sekwencjonowaniem. Stwierdzono jednocześnie, iż ilość RNA5 w stosunku do RNA3 w zakażonych roślinach wzrasta w czasie infekcji. Wykazano też, iż niewielka ilość tego subgenomowego RNA (w porównaniu do pozostałych cząsteczek wirusowych) jest obecna w wirionach BMV. Sekwencja nukleotydowa RNA5 jest identyczna z częścią 5' RNA3, od pierwszego nukleotydu do rejonu polyA, przy czym rejon polyA wykazuje polimorfizm długości w zakresie 13-19A, prawdopodobnie ze względu na poślizg RdRp



w obrębie tej sekwencji. Starano się wykluczyć, iż RNA5 jest efektem specyficznej degradacji RNA3 w rejonie polyA przez RNazy komórkowe. W tym celu wykonano analizę stabilności RNA3 w ekstrakcie komórkowym. Eksperyment ten nie rozwiązał jednak wątpliwości odnośnie mechanizmu powstawania RNA5, ponieważ podczas inkubacji dochodziło do całkowitej degradacji badanej cząsteczki.



### 4.3. Badania homologicznej rekombinacji RNA z wykorzystaniem HIV-1 RT wobec matryc zawierających rekombinacyjnie aktywne rejony R HIV-1 i BMV

Rekombinacja RNA jest wśród wirusów o genomie zbudowanym z RNA zjawiskiem bardzo powszechnym. Pomimo wielu doniesień opisujących ten proces u poszczególnych wirusów RNA czy retrowirusów, niewiele wiadomo o jego mechanizmie i tym, czy elementy biorące w nim udział są takie same u wszystkich wirusów, czy też każdy wirus wymaga specyficznych czynników warunkujących zajście przeskoku rekombinacyjnego. Jedną z dróg umożliwiających wyjaśnienie tego zagadnienia jest porównywanie aktywności rekombinacyjnej wirusowych replikaz wobec sekwencji pochodzących od niespokrewnionych wirusów z ich aktywnością rekombinacyjną wobec własnych sekwencji.

Jeden z pierwszych tego typu eksperymentów przeprowadzono z użyciem odwrotnej transkryptazy HIV-1 i dwóch komplementarnych sekwencji pochodzących z genomu BMV (Figlerowicz & Bibińo, 2000). Zostały one zidentyfikowane w trakcie wcześniejszych badań rekombinacji u BMV. Stwierdzono iż formują one heterodupleks promujący rekombinację niehomologiczną. Sekwencje te, kiedy zostały użyte jako matryce w reakcji wydłużania startera z HIV-1 RT, indukowały przeskoki rekombinacyjne z dużą wydajnością. Zaobserwowano, że jeżeli heterodupleks zawierał krótkie homologiczne sekwencje w obydwu matrycach uczestniczących w przeskoku, zarówno podczas replikacji BMV, jak i podczas reakcji wydłużania startera przeprowadzanej przez HIV-1 RT, przeskoki rekombinacyjne zachodziły w sposób miejscowo-specyficzny, (dokładny opis w rozdziale 1.6). Po porównaniu sekwencji rekombinantów zsyntetyzowanych przez obydwie enzymy stwierdzono odmienną lokalizację miejsc przeskoczków niehomologicznych. Zasugerowano wtedy, że wynik ten związany jest z różnicami funkcjonalnymi istniejącymi pomiędzy RdRp BMV i HIV-1 RT. Prawdopodobnie BMV RdRp jest zdolna do efektywniejszego rozplatania rejonu dwuniciowego dzięki obecności domeny helikazowej, której brak u HIV-1 RT.

Kolejną próbę wyjaśnienia mechanizmu rekombinacji RNA podjęto z użyciem innego rekombinacyjnie aktywnego fragmentu genomu BMV – 69-nukleotydowej sekwencji bogatej w adenylany i urydylany (Rozdział 1.6, Shapka i Nagy, 2004). Sekwencja ta umieszczona w DI RNA towarzyszącym infekcji TBSV, bardzo wydajnie wspierała rekombinację homologiczną prowadzoną przez RdRp CNV w protoplastach *N. benthamiana* zainfekowanych pomocniczym wirusem CNV, który należy do tej samej co TBSV rodziny *Tombusviridae*. Podobnie jak we wcześniej opisanym



The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that proper record-keeping is essential for the success of any business and for the protection of the interests of all parties involved. The text outlines the various methods and systems that can be used to ensure the accuracy and reliability of financial data.

In addition, the document provides a detailed overview of the different types of financial statements that are commonly used in business. It explains the purpose and content of each statement, including the balance sheet, income statement, and cash flow statement. The text also discusses the importance of reconciling these statements and ensuring that they are consistent and accurate.

Furthermore, the document addresses the issue of internal controls and the role of management in ensuring the integrity of financial reporting. It highlights the need for a strong internal control system and the importance of regular audits and reviews. The text also discusses the consequences of financial misstatements and the potential impact on the reputation and financial health of a company.

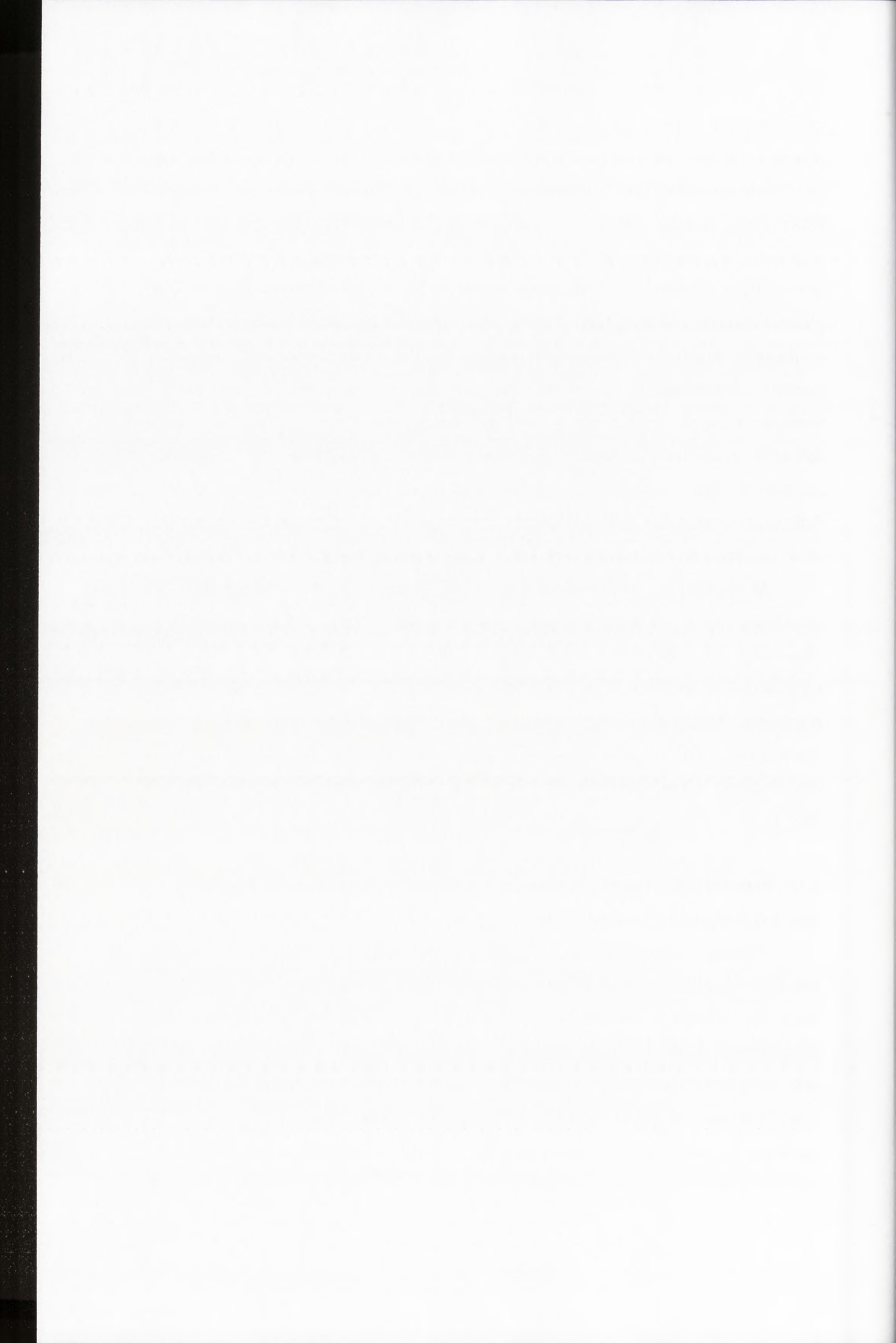
In conclusion, the document stresses the importance of transparency and accountability in financial reporting. It encourages businesses to adopt best practices and to seek professional advice when needed to ensure compliance with applicable laws and regulations.

eksperymentach z HIV-1 RT, również i w tym wypadku umiejscowienie przeskoków w potomnym RNA było odmienne u bromowirusa i tombuswirusa. Zaobserwowano też, że tylko jedna kopia sekwencji bogatej w pary AU w donorze wywoływała przeskoki RdRp CNV, podczas gdy do zajścia przeskoku u BMV konieczne była obecność sekwencji w cząsteczce donorowej i akceptorowej. Przeskoki rekombinacyjne u bromowirusa w większości były homologiczne, natomiast u tombuswirusa zachodziły głównie przeskoki homologiczne nieprecyzyjne. Autorzy opisanych badań sugerują, że rozpoczęcie przeskoku rekombinacyjnego u obydwu wirusów przebiega tak samo, poprzez zatrzymanie syntezy RNA spowodowane słabym parowaniem pomiędzy tworzoną nicią potomną i matrycą donorową wewnątrz kompleksu replikacyjnego. Jednakże inne umiejscowienie przeskoków rekombinacyjnych w cząsteczkach potomnych TBSV i BMV wskazuje na różne mechanizmy zmiany matrycy obydwu RdRp, spowodowane prawdopodobnie przez różne oddziaływanie enzymów z sekwencją matrycy i różne funkcje oddziaływań pomiędzy nicią potomną i matrycą.

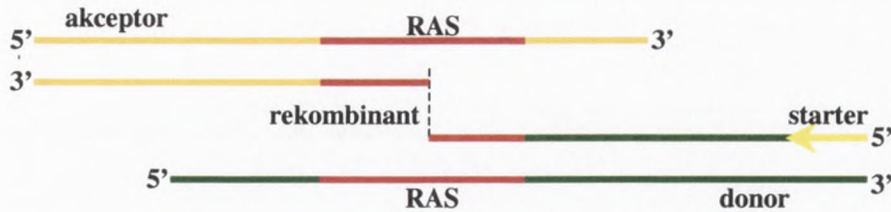
W niniejszym rozdziale opisano szereg eksperymentów mających na celu określenie, czy w strukturze RNA istnieją uniwersalne motywy indukujące przeskoki rekombinacyjne enzymów replikacyjnych, czy też każdy wirusowy kompleks replikacyjny w sposób specyficzny rozpoznaje rejon RNA w którym może dojść do przeskoku. Polegały one na porównaniu aktywności rekombinacyjnej odwrotnej transkryptazy HIV-1 podczas reakcji wydłużania startera na matrycach RNA zawierających sekwencje rekombinacyjnie aktywne pochodzące z genomów BMV i HIV-1.

#### **4.3.1. Badania homologicznych przeskoków rekombinacyjnych odwrotnej transkryptazy HIV-1 zachodzących w rejonie R BMV**

Badania homologicznych przeskoków rekombinacyjnych odwrotnej transkryptazy HIV-1 zachodzących w rejonie R BMV prowadzono z użyciem systemu eksperymentalnego *in vitro*. System ten składa się z dwóch matryc RNA, donorowej i akceptorowej, które zawierają wspólną rekombinacyjnie aktywną sekwencję (RAS) oraz z odwrotnej transkryptazy HIV-1 i startera komplementarnego do końca 3' matrycy donorowej (Rysunek 4.16). Podczas reakcji wydłużania startera, HIV-1 RT rozpoczyna syntezę ssDNA na matrycy donorowej, a po osiągnięciu RAS może dokonać przeskoku rekombinacyjnego na matrycę akceptorową. Powstałe dłuższe



zrekombinowane produkty są łatwe do odróżnienia od krótkich produktów niezrekombinowanych podczas rozdziłu elektroforetycznego.

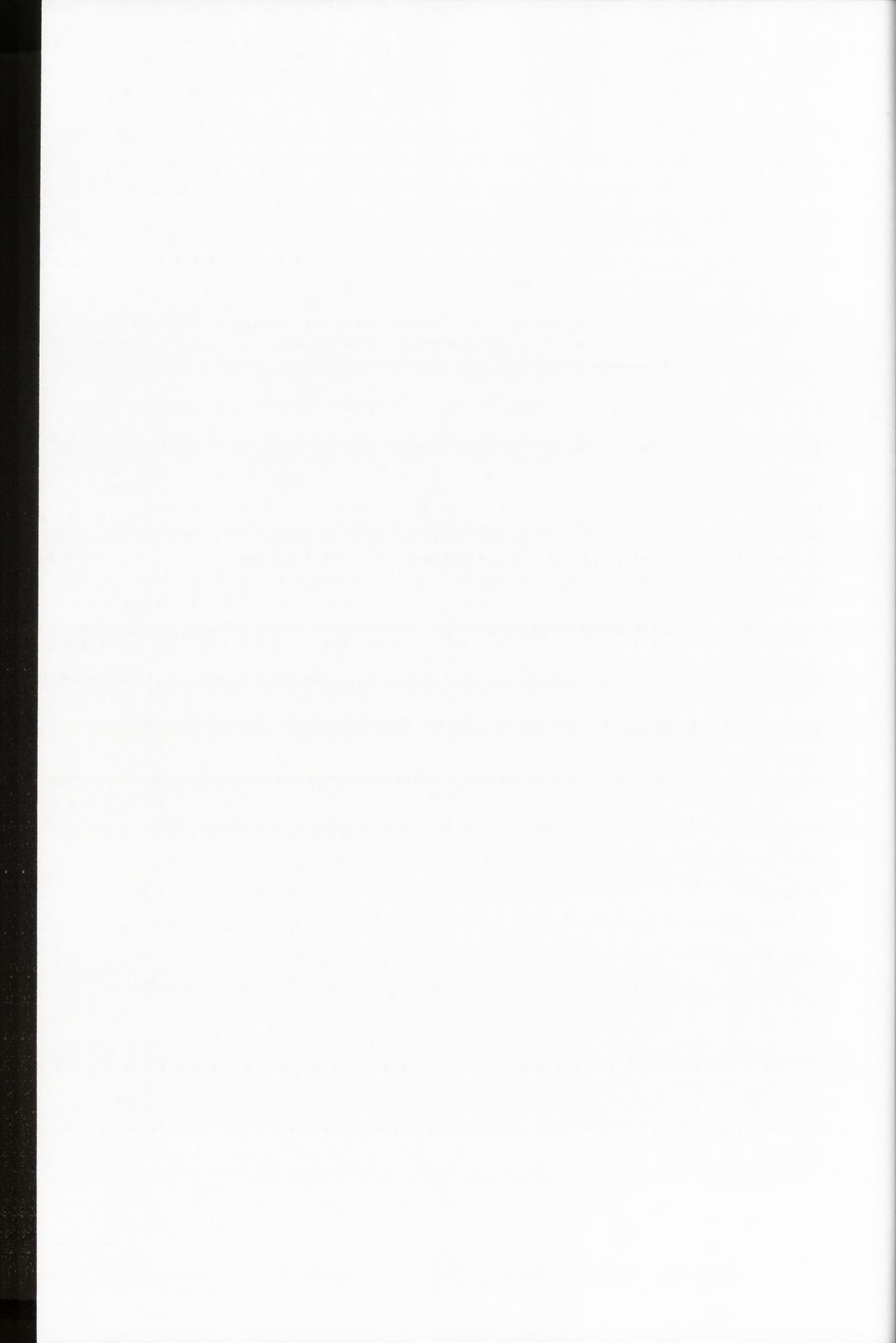


#### Rysunek 4.16. Schemat rekombinacyjnego systemu *in vitro*

System rekombinacyjny *in vitro* składa się z dwóch cząsteczek matrycowych: donorowej i akceptorowej. Do cząsteczek donora i akceptora wprowadzono rekombinacyjnie aktywne sekwencje pochodzące z genomów HIV-1 i BMV (RAS). Powstające podczas odwrotnej transkrypcji z udziałem HIV RT rekombinanty są wyraźnie dłuższe od cząsteczek matrycowych, co ułatwia ich identyfikację.

Podczas badań homologicznej rekombinacji RNA *in vitro* z użyciem HIV-1 RT wykorzystano zidentyfikowaną wcześniej, 60-nukleotydową sekwencję aktywną rekombinacyjnie, pochodzącą z 3' UTR genomowych cząsteczek RNA2 i RNA3 BMV (rejon R BMV, Rozdział 1.6). Sekwencja ta zawiera dwie struktury drugorzędowe typu spinki do włosów H i G (Lahser i wsp., 1993).

Aby przeprowadzić reakcję wydłużania startera z HIV-1 RT, przygotowano dwie matryce RNA: 225-nukleotydowy donora BMVRd (odpowiadający sekwencji od 2640 do 2865 nukleotydu RNA2 BMV) z rejonem R (sekwencja od 2647 do 2706 nukleotydu RNA2 BMV) oraz 216-nukleotydowy akceptor BMVRa (sekwencja od 1763 do 1961 nukleotydu RNA3 BMV) również z rejonem R (sekwencji od 1900 do 1960 nukleotydu RNA3 BMV). Sekwencje rejonów R pochodzących z homologicznych końców 3' RNA2 i RNA3 nie są identyczne, różnią się one trzema pojedynczymi nukleotydami. Nukleotydy te zostały wykorzystane jako markery umożliwiające identyfikację miejsc przeskoków rekombinacyjnych, dzieląc badany rejon R na cztery części: po 14, 9, 25 i 10 nukleotydów (Rysunek 4.17). RNA donorowy i akceptorowy otrzymano na drodze transkrypcji *in vitro* na matrycach cDNA, otrzymanych metodą PCR.

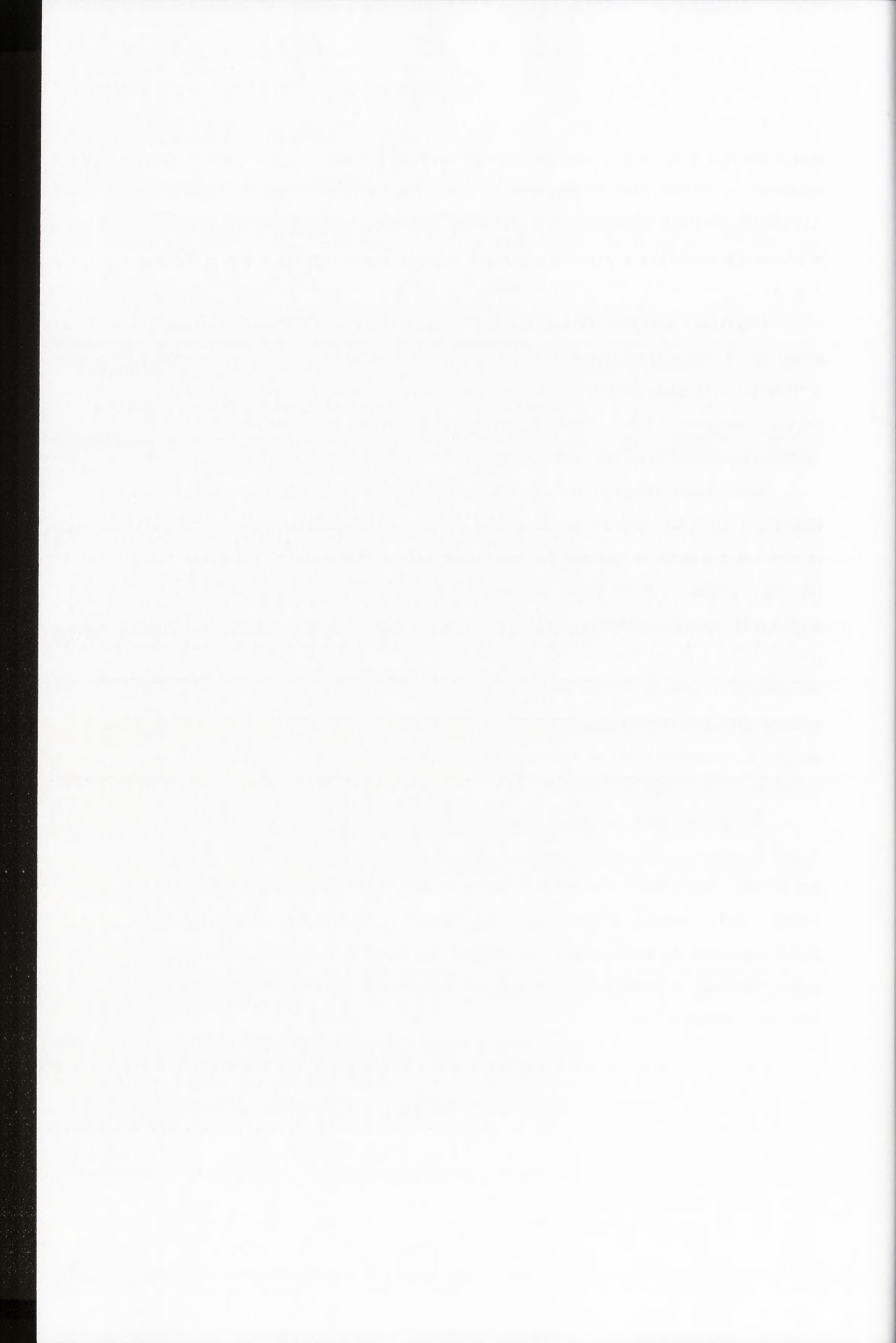


Produkty PCR służące jako matryce do transkrypcji donorowego i akceptorowego RNA otrzymano wskutek amplifikacji PCR odpowiednich fragmentów zawierających cDNA BMV następujących plazmidów: pBMVRd ze starterami T7 i BMV3REC dla RNA donora BMVRd oraz pBMVRa ze starterami T7 i MB3RNA3 dla RNA akceptora BMVRa (dokładny opis otrzymania RNA znajduje się w rozdziale 3.2.3.a).

Uzyskane matryce RNA (donorowy BMVRd i akceptorowy BMVRa) stosowano w reakcji wydłużania startera z odwrotną transkryptazą HIV-1, w obecności  $\alpha^{32}\text{P}$  dCTP oraz startera BMV-3REC, komplementarnego do końca 3' donora BMVRd (Metody, rozdział 3.2.3.c). Produkty reakcji wydłużania startera przez HIV-1 RT rozdzielano elektroforetycznie w 8% denaturującym żelu poliakrylamidowym.

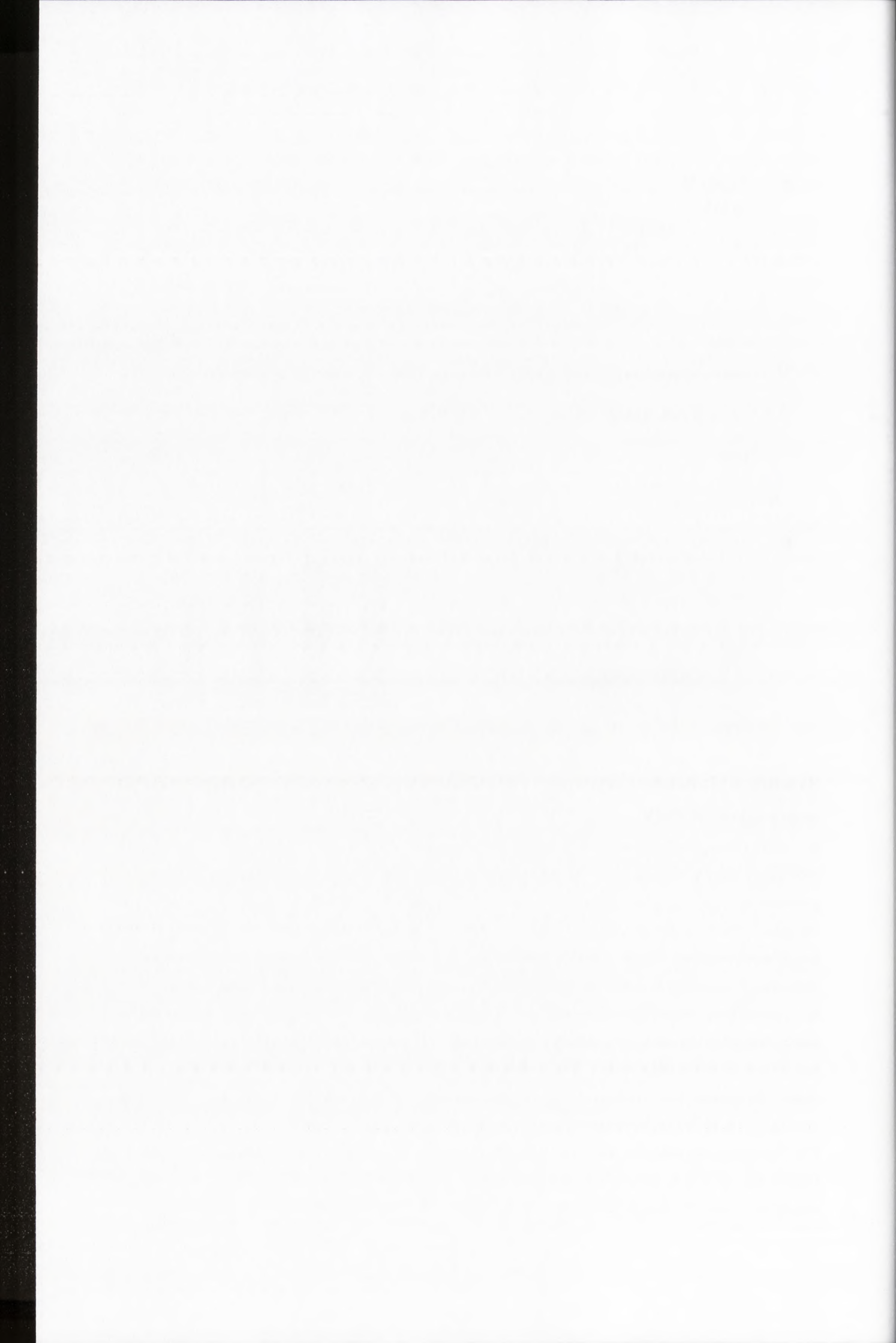
Analiza autoradiograficzna żeli wykazała, że rejon R BMV obecny w matrycach BMVRd i BMVRa wspiera homologiczne przeskoki rekombinacyjne. Wydajność procesu oszacowano za pomocą skanera materiałów znakowanych radioizotopowo (Phosphorimager, Typhoon 8600), wyznaczając jaką część powstałych podczas reakcji wydłużania startera cząsteczek ssDNA stanowi produkt pełnej długości, a jaką rekombinanty. Przedstawione na wykresie wyniki są wartościami średnimi, obliczonymi w oparciu o kilka niezależnych eksperymentów (Rys. 4.17). Wydajność syntezy zrekombinowanych cząsteczek RNA wzrastała wraz ze wzrostem ilości akceptora w stosunku do donora, jednak całkowita wydajność reakcji malała ze wzrostem ilości akceptora (Rysunek 4.12).

Zrekombinowane produkty reakcji wydłużania startera (ssDNA o długości 364nt) eluowano z żelu i na ich podstawie przeprowadzano reakcję PCR ze starterami BMV5REC i BMV3REC oskrzydłającymi ich końce 5' i 3' miejscami restrykcyjnymi *EcoRI* i *PstI*. Uzyskany cDNA oraz pUC19 trawiono restrykcyjnie *EcoRI* i *PstI* i cDNA ligowano do odpowiednio trawionego wektora pUC19. Otrzymane plazmidy transformowano do komórek *E. coli*, klonowano, izolowano i sekwencjonowano (Metody, rozdział 3.2.3).









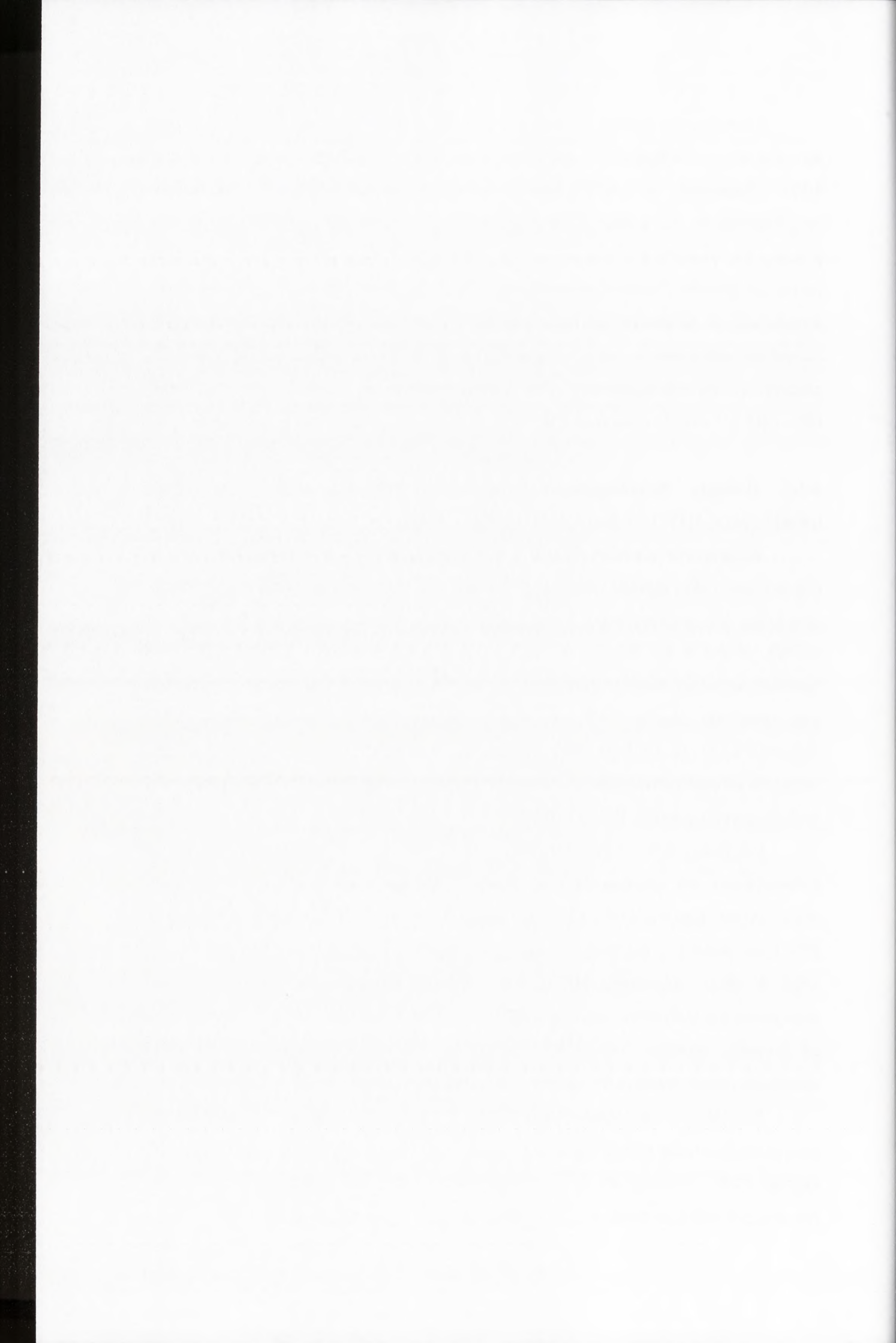
Na podstawie analizy sekwencji cDNA rekombinantów ustalono, że przeskoki rekombinacyjne zachodziły z różną częstością wzdłuż badanego rejonu R (Rysunek 4.17). Najwięcej, aż 57% rekombinantów, powstało wskutek przeskoków homologicznych na końcu 5' donora za ostatnim nukleotydem rejonu R. Do przeskoków rekombinacyjnych w tym miejscu doszło najprawdopodobniej ze względu na fakt iż spośród 7 nukleotydów z końca 5' donora, 4 są homologiczne z sekwencją występującą w akceptorze po rejonie R. 27% i 17% przeskoków rekombinacyjnych zachodziło odpowiednio we fragmencie III i IV badanego rejonu R, natomiast nie zaobserwowano rekombinantów powstałych wskutek przeskoku rekombinacyjnego HIV-1 RT w I czy II części rejonu R.

#### **4.3.2. Badania homologicznych przeskoków rekombinacyjnych odwrotnej transkryptazy HIV-1 zachodzących w rejonie R HIV-1**

W genomowych RNA HIV-1 znajduje się rejon R, który odgrywa decydującą rolę w czasie cyklu replikacyjnego HIV-1. Dzięki tej sekwencji dochodzi do pierwszego przeskoku rekombinacyjnego, umożliwiającego przepisanie genomowego RNA na dsDNA. Rejon R ma długość 97 nukleotydów, jest położony w 3' i 5' LTR (*long terminal repeats*) i formuje drugorzędową strukturę, w skład której wchodzi struktura typu spinki do włosów TAR oraz część struktury typu spinki do włosów polyA (Rysunek 4.18). Ze względu na swoją funkcję, sekwencja ta została wybrana do badań mających na celu porównanie aktywności rekombinacyjnej HIV-1 RT wobec sekwencji pochodzących z genomu HIV-1 i BMV.

Fragmenty RNA z genomu HIV-1 zawierające rejon 97-nukleotydowy rejon R wykorzystano do utworzenia donorowej i akceptorowej matrycy RNA. 137-nukleotydowy donator (HIVR1/137) odpowiadał sekwencji od 1-137 nukleotydu genomu HIV-1 natomiast 122-nukleotydowy akceptor (HIVR9520/9635) zawierał sekwencję od 9520 do 9635 nukleotydu HIV-1. Do sekwencji akceptora wprowadzono cztery substytucje nukleotydowe (w pozycji 17 C→U, 37 C→U, 54 A→G i 75 A→C, licząc od początku sekwencji rejonu R) dzielące rejon R na pięć części, co umożliwiło określenie miejsc przeskoków rekombinacyjnych (Rysunek 4.18).

Donorowy i akceptorowy RNA HIV-1, użyty w reakcji wydłużania startera, otrzymano na drodze reakcji transkrypcji *in vitro* na matrycach cDNA syntetyzowanych metodą PCR. Produkty PCR, zawierające cDNA HIV-1 otrzymano, amplifikując plazmid pHIVRSd ze starterami T7 i HIVD3 dla RNA donora HIVR1/137 oraz plazmid

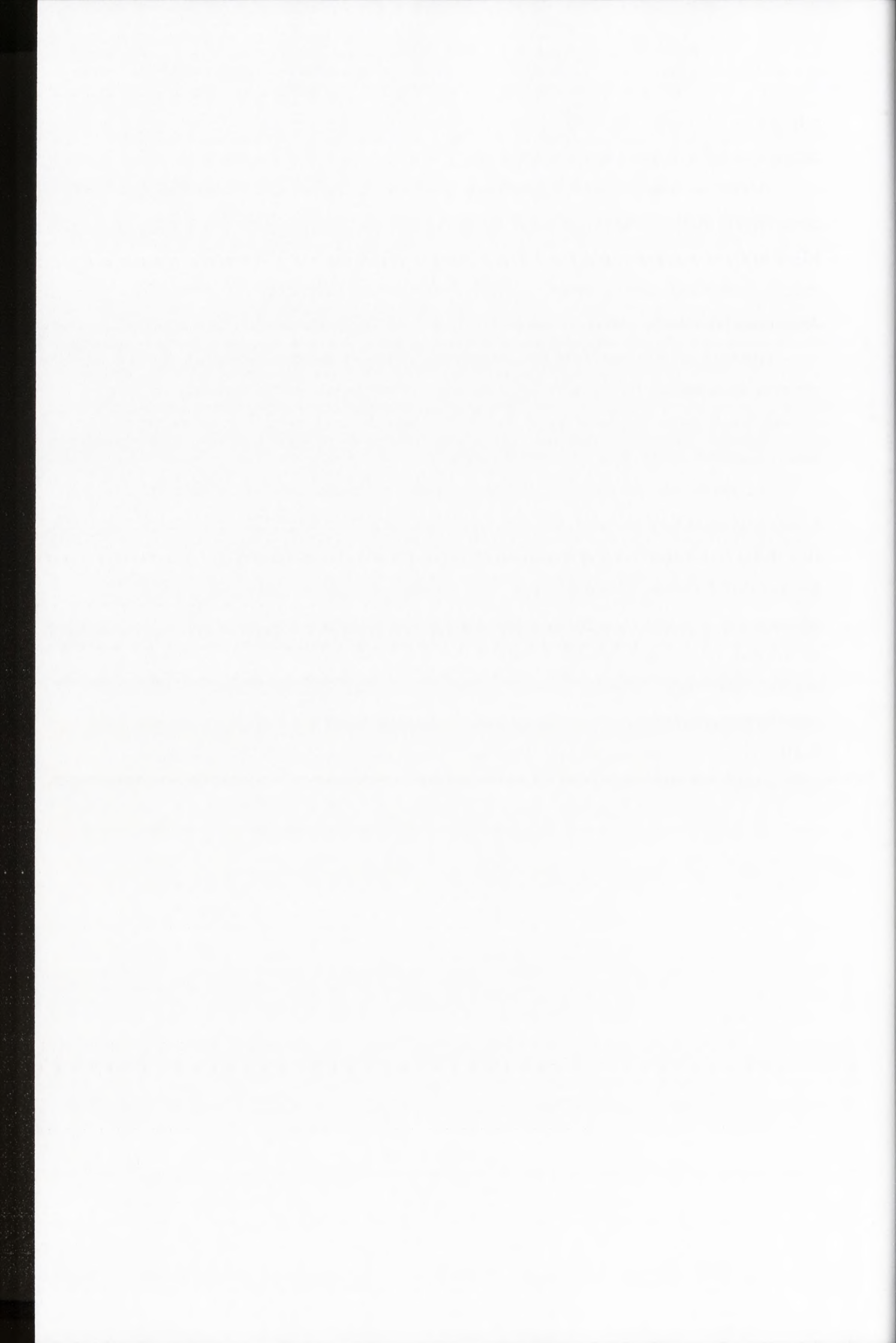


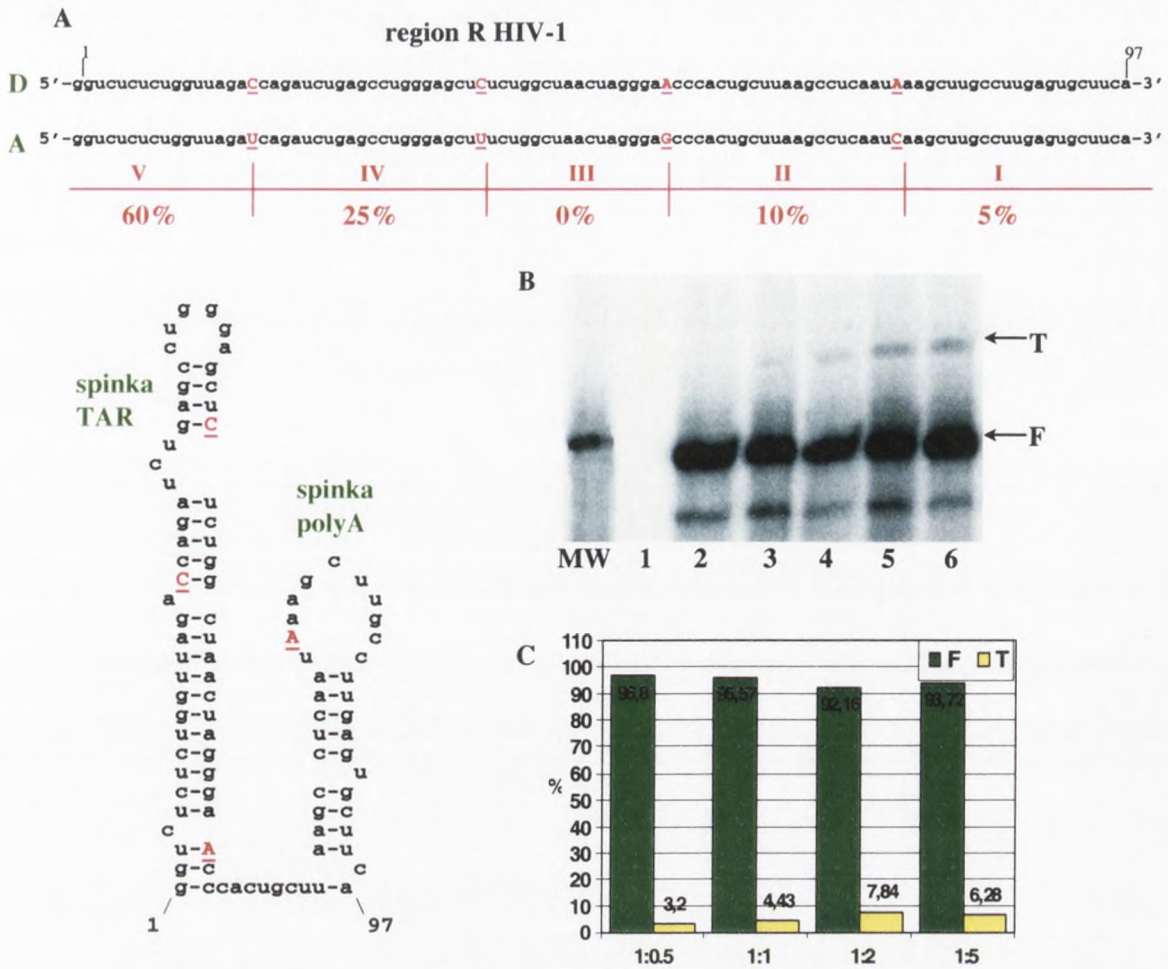
pHIVRS ze starterami T7 i HIVA3 dla RNA akceptora HIVR9520/9635 (dokładny opis otrzymania RNA znajduje się w rozdziale 3.2.3.a).

Uzyskane matryce RNA stosowano w reakcji wydłużania startera z odwrotną transkryptazą HIV-1, w obecności  $\alpha^{32}\text{P}$  dCTP (Metody, rozdział 3.2.3.c) oraz startera HIV-3REC, komplementarnego do końca 3' donorowego RNA HIVR1/137. Produkty reakcji wydłużania startera przez HIV-1 RT rozdzielano elektroforetycznie w 8% denaturującym żelu poliakrylamidowym.

Analiza autoradiograficzna żeli potwierdziła, że rejon R HIV-1 jest sekwencją aktywną rekombinacyjnie, choć wydajność rekombinacji wynosiła co najwyżej 7%. Największą wydajność rekombinacji HIV-1 RT osiągała przy dwukrotnie większej ilości cząsteczek akceptora w stosunku do donora (Rysunek 4.18).

Zrekombinowane produkty reakcji wydłużania startera (ssDNA o długości 178nt) eluowano z żelu i na ich podstawie przeprowadzano reakcję PCR ze starterami HIV5REC i HIV3REC oskrzydłającymi ich końce 5' i 3' miejscami restrykcyjnymi *EcoRI* i *PstI*. Uzyskany cDNA oraz pUC19 trawiono restrykcyjnie *EcoRI* i *PstI* i cDNA ligowano do wektora. Otrzymane plazmidy transformowano do komórek *E. coli*, klonowano, izolowano i sekwencjonowano (Metody, rozdział 3.2.3.c). Na podstawie analizy sekwencji cDNA rekombinantów ustalono, że 60% przeskoków rekombinacyjnych miała miejsce za ostatnią mutacją markerową (81 nukleotyd rejonu R HIV-1), 25% za przedostatnią, natomiast w trzech pierwszych częściach osiągnęła odpowiednio 5%, 10% i 0%.



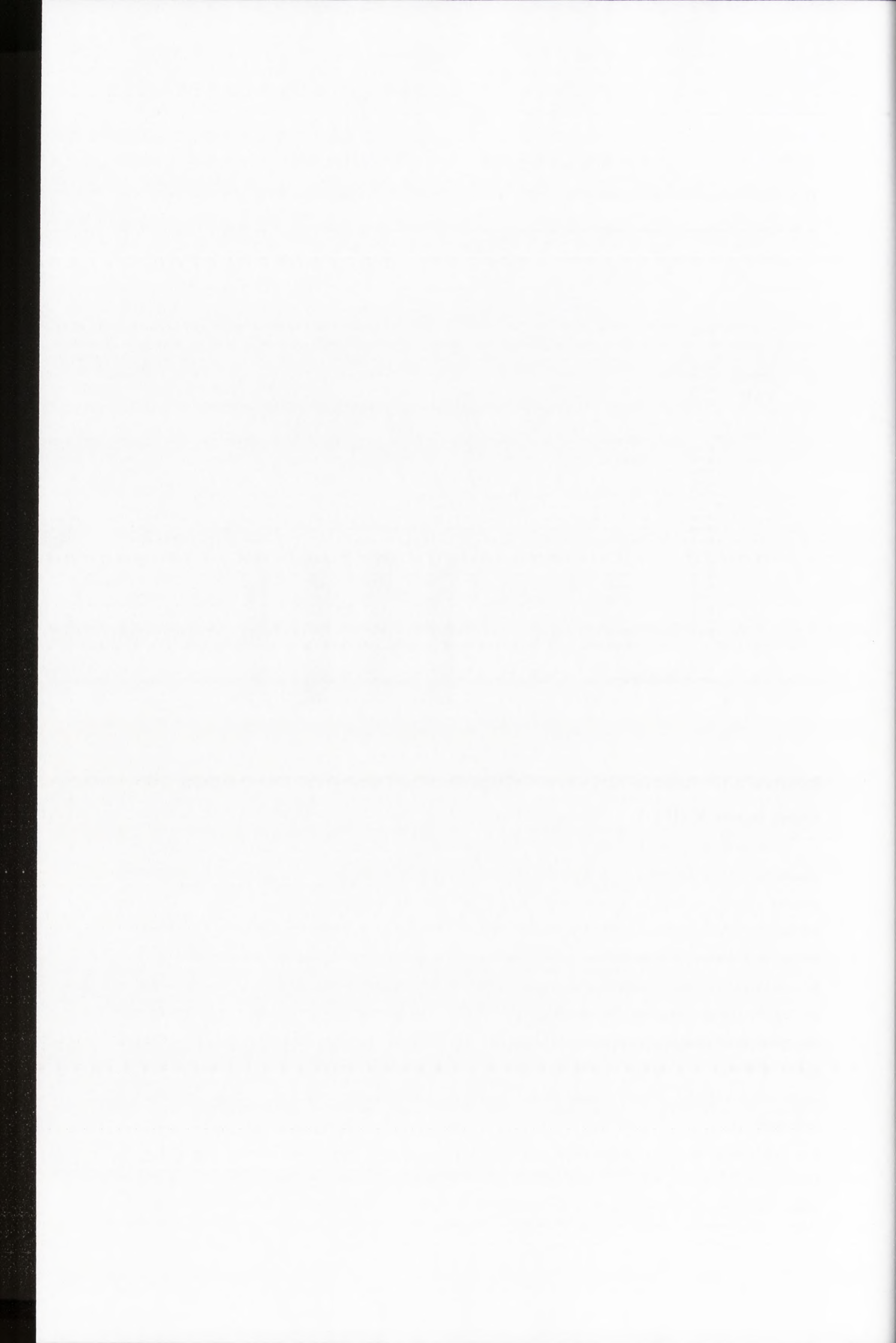


### Rysunek 4.18. Badanie aktywności rekombinacyjnej odwrotnej transkryptazy HIV-1 wobec rejonu R HIV-1

**A** - struktura drugorzędowa rejonu R w HIV1 oraz sekwencja rejonu R HIV1 zawartego w donorze (D) i akceptorze (A) w kierunku 5'→ 3'. Analizie poddano sekwencje około 20 rekombinantów powstałych podczas reakcji wydłużania startera przez HIV-1 RT i na tej podstawie ustalono rozkład przeskoków rekombinacyjnych w poszczególnych częściach rejonu R (I-V), który na schemacie wyrażono w procentach i oznaczono kolorem czerwonym. Nukleotydy odróżniające obie cząsteczki oznaczono na czerwono.

**B** - przykładowy obraz rozdziału elektroforetycznego w 8% denaturującym żelu PAA produktów reakcji wydłużania startera przeprowadzonej przez HIV-1 RT na matrycach HIVR1/137 (donor) i HIVR9520/9635 (akceptor) zawierających rejon R ze starterem HIV-REC. 1- reakcja z samym akceptorem, 2 - reakcja z samym donorem 3-6 - reakcja z rosnącą zawartością akceptora w stosunku do donora: (odpowiednio 1d:0,5a, 1d:1a, 1d:2a i 1d:5a), MW - marker masy. Produkty pełnej długości oznaczono jako F, rekombinanty oznaczono jako T.

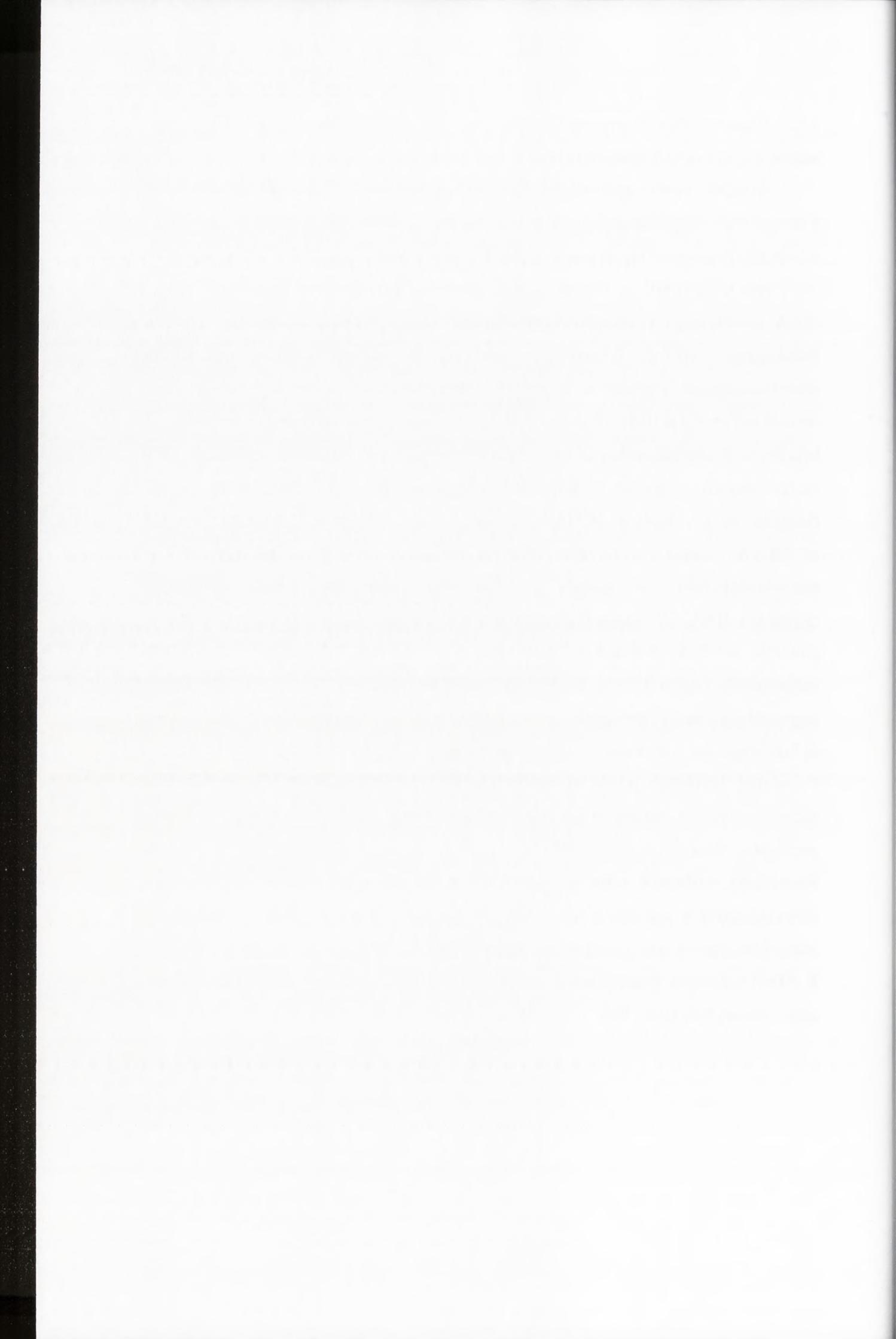
**C** - Wydajność rekombinacji mierzona aparatem Phosphorimager i oszacowana programem ImagQuant. Oznaczenia 1:0.5, 1:1, 1:2 i 1:5 odpowiadają poszczególnym reakcjom wydłużania startera z rosnącym stosunkiem donora do akceptora. Produkty pełnej długości oznaczono jako F, rekombinanty - T.



#### 4.3.3. Badania homologicznej rekombinacji RNA z wykorzystaniem HIV-1 RT wobec matryc zawierających rejony R HIV-1 i BMV -podsumowanie

Podczas badań aktywności rekombinacyjnej HIV-1 RT wykorzystano dwie dobrze znane rekombinacyjnie aktywne sekwencje RNA pochodzące z genomów odległych filogenetycznie wirusów: rejon R pochodzący z RNA2 i RNA3 bromowirusa BMV oraz rejon R HIV-1. Podczas reakcji wydłużania startera w obecności par matryc (RNA donorowego i akceptorowego) posiadających wspólne rejony R, odwrotna transkryptaza HIV-1 dokonywała precyzyjnych homologicznych przeskoków rekombinacyjnych zarówno w obrębie 97-nukleotydowego rejonu R HIV-1 jak i w obrębie sekwencji R BMV (Rysunki 4.17 i 4.18). Wydajność tworzenia rekombinantów była wyższa podczas reakcji z matrycami BMV, w czasie której powstawało do 32% rekombinantów, natomiast podczas reakcji z matrycami HIV-1 powstawało do 7% rekombinantów. Analiza cDNA otrzymanego na podstawie zrekombinowanych produktów reakcji wydłużania startera wykazała, że większość przeskoków rekombinacyjnych miała miejsce w 5'-końcowym fragmencie obydwu donorowych cząsteczek RNA. W przypadku rejonu R BMV najwięcej, aż 57% rekombinantów, powstało wskutek przeskoków homologicznych na końcu 5' donora za ostatnim nukleotydem rejonu R. Do przeskoków rekombinacyjnych w tym miejscu doszło najprawdopodobniej ze względu na fakt iż spośród 7 nukleotydów z końca 5' donora, 4 są homologiczne z sekwencją występującą w akceptorze po rejonie R. W części trzeciej i czwartej badanego rejonu R zachodziło odpowiednio 27% i 17% przeskoków rekombinacyjnych, natomiast nie zaobserwowano rekombinantów powstałych wskutek przeskoku rekombinacyjnego HIV-1 RT w pierwszej i drugiej części rejonu R. Największą wydajność rekombinacji HIV-1 RT osiągała przy dwukrotnie większej ilości akceptora w stosunku do donora. W przypadku rejonu R HIV-1, 60% przeskoków rekombinacyjnych miało miejsce za ostatnią mutacją markerową (81 nukleotyd rejonu R HIV-1), 25% za przedostatnią, natomiast w trzech pierwszych częściach osiągnęła odpowiednio 5%, 10% i 0%.



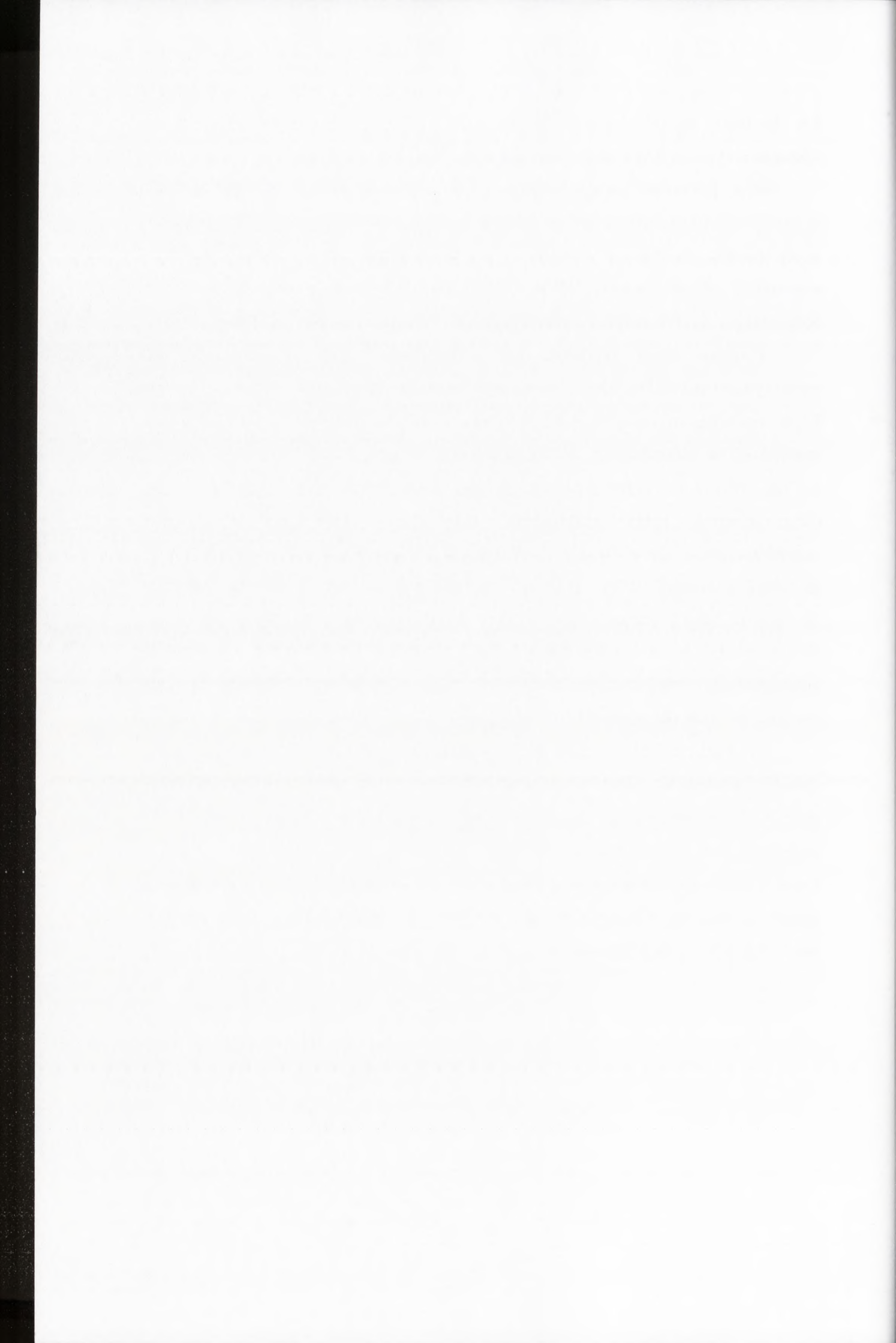


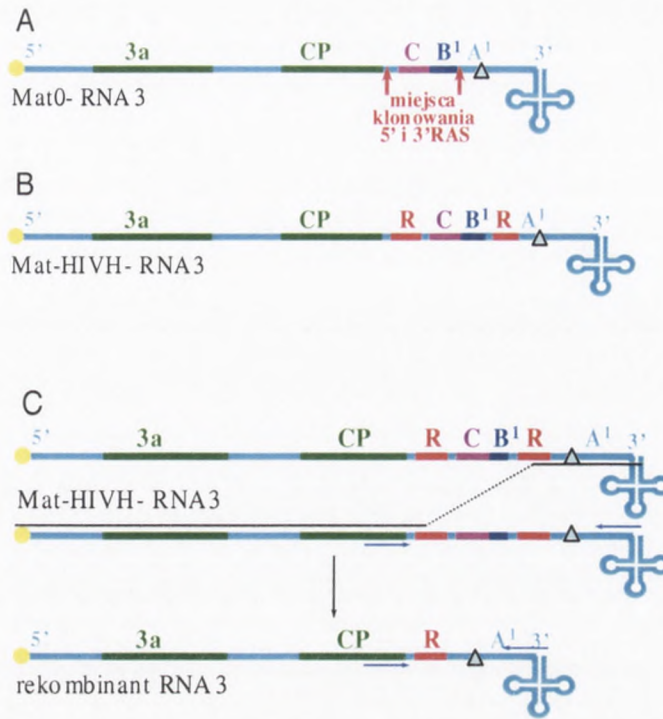
#### 4.4. Badania homologicznej rekombinacji RNA z wykorzystaniem systemu rekombinacyjnego BMV zawierającego rejon R HIV-1

Aby pozyskać więcej informacji na temat aktywności rekombinacyjnej wirusowych replikaz wobec obcych rekombinacyjnie aktywnych sekwencji RNA oraz lepiej poznać mechanizm przeskołu homologicznego, przeprowadzono analizę aktywności rekombinacyjnej RdRp BMV wobec rejonu R HIV-1. W tym celu posłużono się wcześniej opisanym systemem doświadczalnym BMV (Rozdział 1.3.2).

Podczas badań homologicznej rekombinacji RNA w tym systemie wykorzystano pochodną RNA3 skonstruowaną na bazie wektora rekombinacyjnego RNA3 opisanego w rozdziale 1.3.2. Wektor ten, zwany Mat0-RNA3, posiada szereg modyfikacji w niekodującym 3'UTR: od strony 3' zawiera on 295 nukleotydów z 3'UTR RNA1, po czym następuje miejsce klonowania RAS 3' z sekwencjami rozpoznawanymi przez endonukleazy *KpnI*, *MluI*, *BamHI*, *EcoRV* (RAS-*recombinationally active sequence*), odcinek zawierający duplikację konserwatywnej sekwencji z końca 3'RNA3 (139 nt), fragment RNA CCMV (198 nt), i miejsce klonowania 5'RAS, leżące w pobliżu genu białka płaszczka i zawierające sekwencję rozpoznawaną przez endonukleazę *SpeI*. Dodatkowo, w pobliżu końca 3' umiejscowiona jest mutacja markerowa  $\Delta Xho$ , stanowiąca usunięte miejsce restrykcyjne *XhoI* (Rysunek 4.19).

W miejscach klonowania RAS wektora Mat0-RNA3 można umieścić dwie dowolne sekwencje cDNA i, po zainokulowaniu roślin przy pomocy wtRNA1, wtRNA2 oraz otrzymanego na drodze transkrypcji *in vitro* konstrukt Mat-RNA3, badać przeskoły rekombinacyjne zachodzące pomiędzy nimi w ramach RNA3 (Alejska i wsp, 2005a). Zrekombinowane i macierzyste cząsteczki będą różniły się długością, ponieważ wskutek przeskołu rekombinacyjnego z rekombinanta zostanie usunięta sekwencja RNA leżąca pomiędzy 3' i 5' RAS.





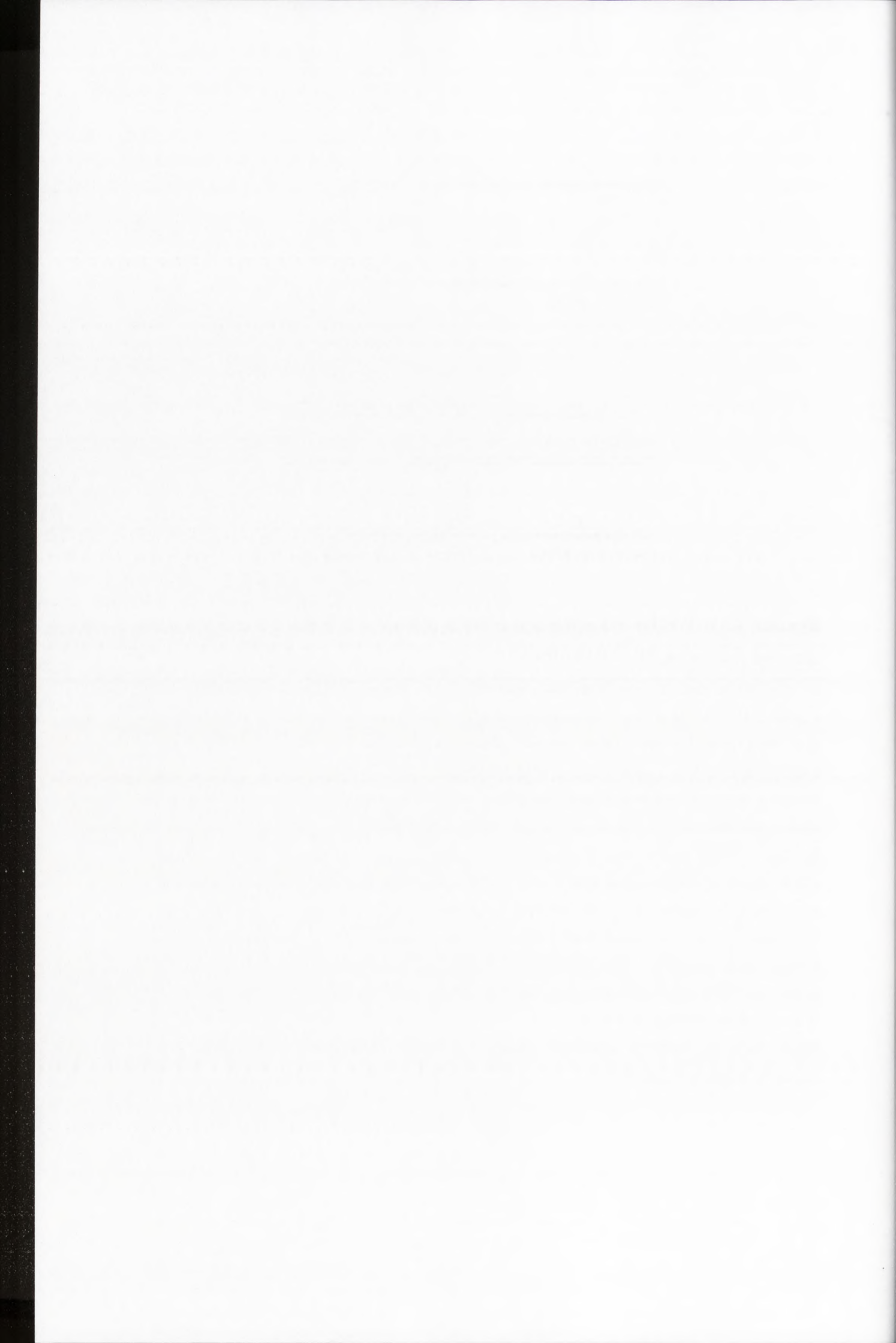
### Rysunek 4.19. Wektor rekombinacyjny Mat0-RNA3 oraz jego rekombinacyjnie aktywna pochodna, Mat-HIVH-RNA3

**A** – Mat0-RNA3 posiada szereg modyfikacji w cDNA 3'UTR: od strony 3' zawiera on 295 nukleotydów z cDNA 3'UTR RNA1 (A<sup>1</sup>), po czym następuje miejsce klonowania 3'RAS z miejscami restrykcyjnymi *KpnI*, *MluI*, *BamHI*, *EcoRV*, 139-nt odcinek z duplikacją konserwatywnej sekwencji cDNA z końca 3'RNA3 (B<sup>1</sup>) i 198-nt fragment cDNA RNA CCMV (C), i miejsce klonowania 5'RAS zawierające sekwencję rozpoznawaną przez endonukleazę *SpeI*. W pobliżu końca 3' umiejscowiona jest mutacja markerowa ΔXho (usunięte miejsce restrykcyjne *XhoI*- szary trójkąt).

**B** – Mat-HIVH-RNA3. Do miejsc 3' i 5' RAS wektora Mat0-RNA3 wprowadzono dwie kopie sekwencji cDNA rejonu R HIV-1 w orientacji sens, umożliwiające badanie homologicznych przeskoków rekombinacyjnych zachodzących w czasie infekcji w roślinie.

**C** – homologiczna rekombinacja RNA pomiędzy dwoma rejonami R HIV-1 obecnymi w MatHIVH-RNA3 podczas infekcji mutantem MatHIVH-BMV. 3'UTR rekombinanta jest o około 400 nukleotydów krótszy od 3'UTR cząsteczki macierzystej MathIVH-RNA3, co można zidentyfikować metodą RT-PCR ze starterami oskrzydłającymi 3'UTR.

Rejony kodujące cząsteczek oznaczono kolorem zielonym, a niekodujące - niebieskim, startery oznaczono granatowymi strzałkami.

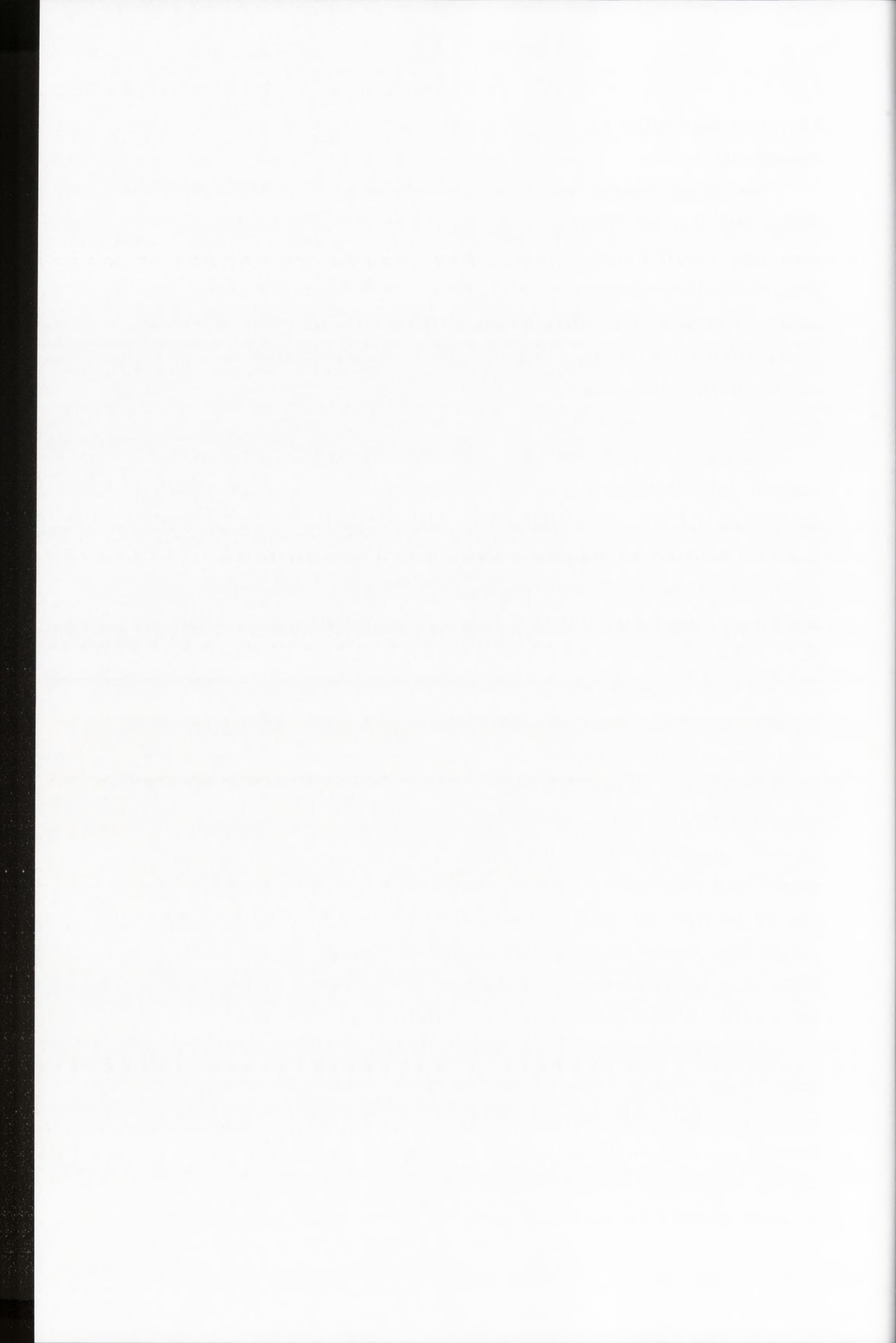


#### 4.4.1. Otrzymanie infekcyjnej cząsteczki Mat-HIVH-BMV zawierającej dwie kopie rejonu R HIV-1

Aby badać homologiczne przeskoki rekombinacyjne zachodzące podczas infekcji BMV w ramach rejonu R HIV-1, należało otrzymać pochodną RNA3 BMV, zawierającą w 3'UTR dwie kopie rejonu R HIV-1. W tym celu, do miejsc 3' i 5' RAS wektora Mat0-RNA3 należało wprowadzić dwie kopie sekwencji R HIV-1 w orientacji „sens”, otrzymując w ten sposób cząsteczkę Mat-HIVH-RNA3 (Rysunki 4.19. i 4. 20). Podczas infekcji roślin mutantem Mat-HIVH-BMV (złożonym z wtRNA1, wtRNA2 oraz Mat-HIVH-RNA3), w obrębie sekwencji 3' i 5' R HIV-1 zaistnieje możliwość przeskoku homologicznego RdRp BMV replikującej cząsteczki RNA3.

Pierwszym etapem otrzymania Mat-HIVH-RNA3 było skonstruowanie plazmidu pMat-HIVH-RNA3 (Metody, rozdział 3.2.4.1). Plazmid ten uzyskano poprzez ligację cDNA rejonu HIV-1 R do miejsc RAS plazmidu pMat0-RNA3 (pochodna plazmidu pB3TP7). Odpowiednie cDNA HIV-1 uzyskano metodą PCR, wykorzystując plazmidy pHIVRSd (zawierające cDNA 97-nukleotydowego rejonu R HIV-1 typu dzikiego) oraz pHIVRSa (zawierający cDNA 97-nukleotydowego rejonu R HIV-1 z czterema markerowymi mutacjami w pozycji 17 C→U, 37 C→U, 54 A→G i 75 A→C, licząc od początku sekwencji rejonu R). Podczas PCR wykorzystano startery, dodające na końcach produktów miejsca restrykcyjne umożliwiające późniejsze klonowanie do plazmidu pMat0-RNA3. W przypadku reakcji PCR na plazmidzie pHIVRSa używano startery HIVA5Spe i HIVA3Spe z miejscem restrykcyjnym rozpoznawanym przez endonukleazę *SpeI*. W przypadku PCR na plazmidzie pHIVRSd używano starterów HIVD5Mlu i HIVD3Eco z miejscami rozpoznawanymi przez enzymy *MluI* oraz *EcoRV*. Odpowiedni produkt PCR oraz plazmid pMat0-RNA3 trawiono enzymem *SpeI*, ligowano, a następnie otrzymany plazmid oraz odpowiedni produkt PCR trawiono *MluI* i *EcoRV* i ligowano, otrzymując plazmid pMat-HIVH-RNA3, który następnie klonowano w komórkach *E. coli*. Obecność insertów cDNA rejonu R HIV-1 w uzyskanym plazmidzie potwierdzano sekwencjonowaniem.

Kolejnym etapem eksperymentu było otrzymanie wirusowego RNA i inokulacja roślin (Metody, rozdział 3.2.4.2). W tym celu plazmid pMat-HIVH-RNA3 trawiono *EcoRI*, aby uzyskać odpowiednią matrycę do otrzymania wirusowego RNA metodą transkrypcji *in vitro*. Otrzymany RNA, wraz z transkryptami wt RNA1 i wtRNA2, używano do inokulacji roślin (*Chenopodium quinoa*). Zainfekowane rośliny hodowano w szklarni przez 10 dni, po czym obserwowano objawy infekcji i porównywano z

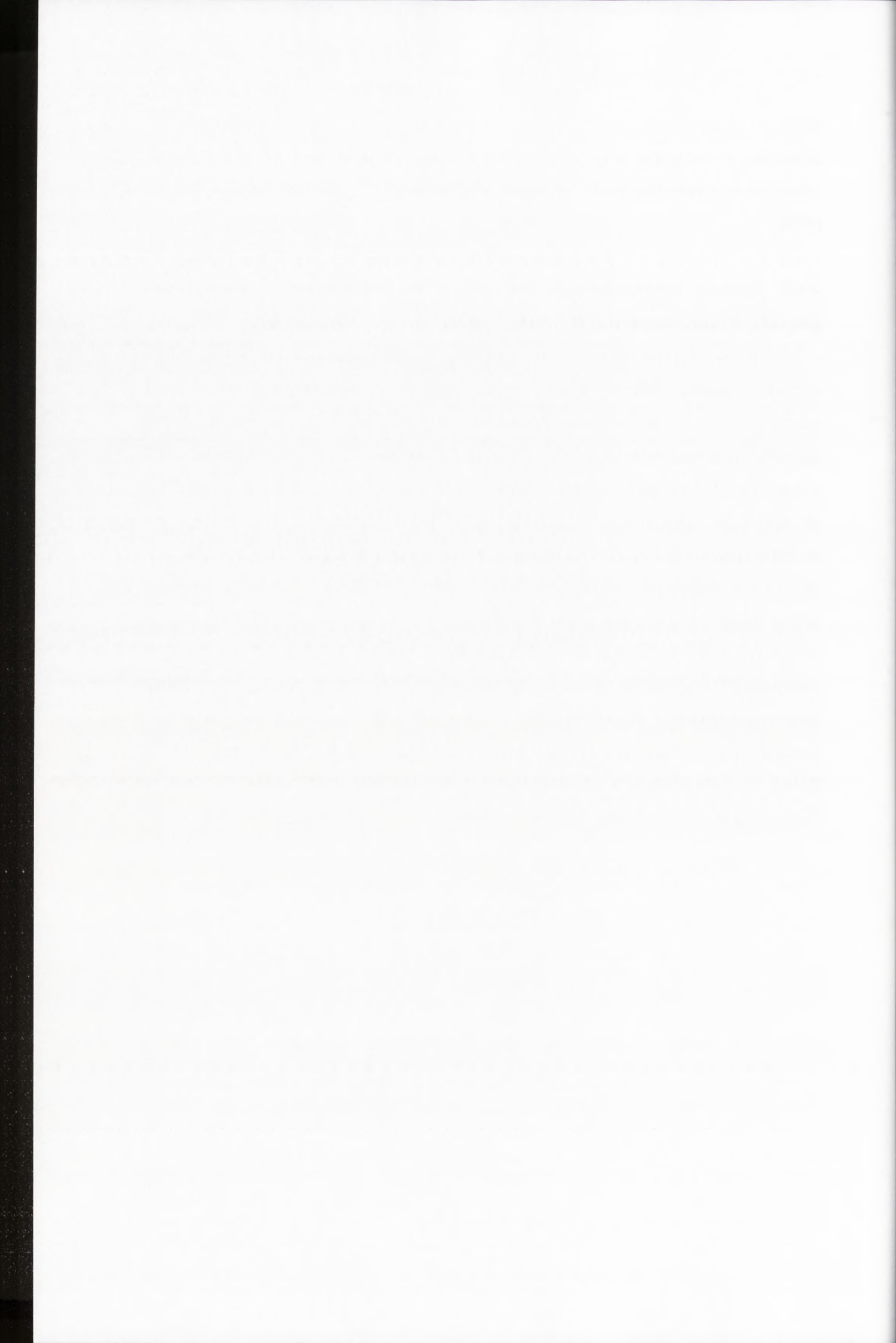


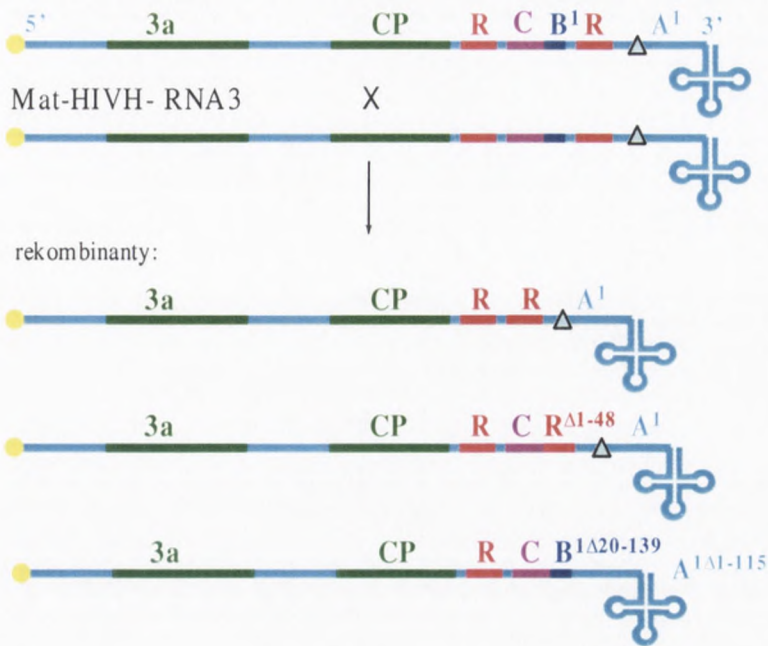
roślinami kontrolnymi, zainfekowanymi typem dzikim BMV (schemat eksperymentu pokazano na Rysunku 4.2). Nie stwierdzono istotnych różnic w ilości plamek nekrotycznych powstałych na liściach *Chenopodium quinoa* podczas obydwu rodzajów infekcji.

#### **4.4.2. Badanie homologicznych przeskoków rekombinacyjnych zachodzących pomiędzy cząsteczkami Mat-HIVH-BMV podczas infekcji w roślinach**

Każda z plamek nekrotycznych na liściach *Chenopodium quinoa*, powstałych po infekcji mutantem MatHIVH-BMV, zawierała potencjalne rekombinanty. Aby je zidentyfikować, z 40 plamek izolowano całkowity RNA i metodą odwrotnej transkrypcji ze starterem 1<sup>st</sup>, komplementarnym do końców 3' wszystkich genomowych cząsteczek BMV) uzyskiwano ssDNA. ssDNA stosowano jako matrycę w reakcji PCR ze starterami oskrzydłającymi 3'UTR RNA3 BMV (1<sup>st</sup> i 2<sup>nd</sup>) i tym sposobem otrzymywano wirusowy cDNA. Powstały wskutek rekombinacji RNA3 powinien być krótszy niż macierzysta cząsteczka MatHIVH-RNA3 (cDNA rekombinanta ~ 400 pz, cDNA niezrekombinowany ~ 800 pz). Analiza cDNA metodą elektroforezy w 1,5% natywnym żelu agarozowym pozwoliła określić iż jedynie 14 plamek nekrotycznych zawierało RNA wirusa na wykrywalnym poziomie, z czego 10 plamek zawierało wirusa typu rodzicielskiego (MatHIVH-BMV). Obecność rekombinantów stwierdzono w czterech spośród badanych plamek, jednak długość cDNA odpowiadającego 3'UTR RNA3 nie była zgodna z oczekiwaniami. cDNA rekombinantów RNA3 zmieszano, klonowano do wektora pDRIVE i poddano sekwencjonowaniu ze starterem 1<sup>st</sup>.





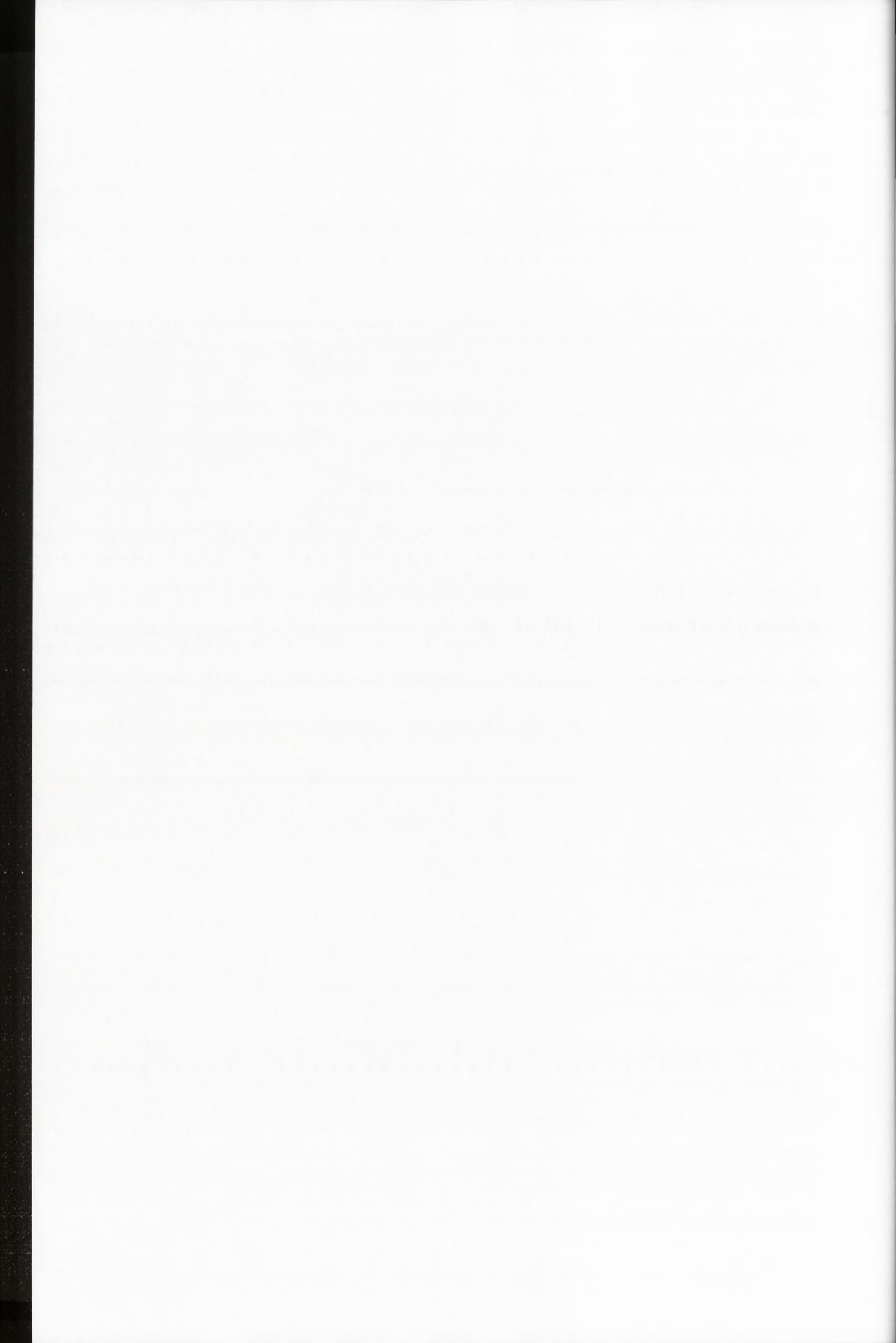


**Rysunek 4.20. Schemat budowy trzech rodzajów rekombinantów powstałych podczas infekcji mutantem MatHIVH-BMV w *C. quinoa***

We wszystkich rekombinantach obecny był rejon 5'R HIV-1. W przypadku pierwszego rodzaju rekombinanta stwierdzono, że za rejonem 5'R HIV-1 leżał rejon 3'R HIV-1 oddzielony 19-nukleotydową sekwencją zawierającą miejsce restrykcyjne *KpnI*, pochodzące z 3'RAS. Za rejonem 3'R HIV-1 znajdowała się niezmienną sekwencją końcową (295 ostatnich nukleotydów z 3' UTR RNA1 BMV). W tych rekombinantach brakowało natomiast około 300-nukleotydów pomiędzy rejonami R HIV-1, obejmujących sekwencję CCMV i duplikację sekwencji BMV z końca 3'. Drugi rodzaj rekombinanta zawierał sekwencję CCMV za 5' rejonem R HIV-1, bezpośrednio po której następowała sekwencja ostatnich 49-ciu nukleotydów 3' rejonu R HIV-1 i dalej niezmienną sekwencją końca RNA1. U ostatniego typu rekombinanta za rejonem 5' HIV-1 obecna była sekwencja CCMV, za którą były 4 nukleotydy o sekwencji AATT, a następnie pierwsze 19 nukleotydów zduplikowanej sekwencji RNA3. Za fragmentem sekwencji RNA3 leżała sekwencja RNA1 z delecją pierwszych 115.

Rejony kodujące czasteczek oznaczono kolorem zielonym, a niekodujące - niebieskim, delecje poszczególnych fragmentów w 3'UTR oznaczono symbolem  $\Delta$  oraz numerami brakujących nukleotydów.

Po przeanalizowaniu sekwencji rekombinantów ustalono, iż przeskoków rekombinacyjnych nie zachodziło według przewidywanego schematu. Odnotowano 3 typy rekombinantów. We wszystkich obecny był rejon 5'R HIV-1, który zawierał wszystkie cztery markerowe mutacje. W przypadku pierwszego typu rekombinanta stwierdzono, że za rejonem 5'R HIV-1 leżał rejon 3'R HIV-1 oddzielony 19-nukleotydową sekwencją zawierającą miejsce restrykcyjne *KpnI*, pochodzące z 3'RAS. Za rejonem



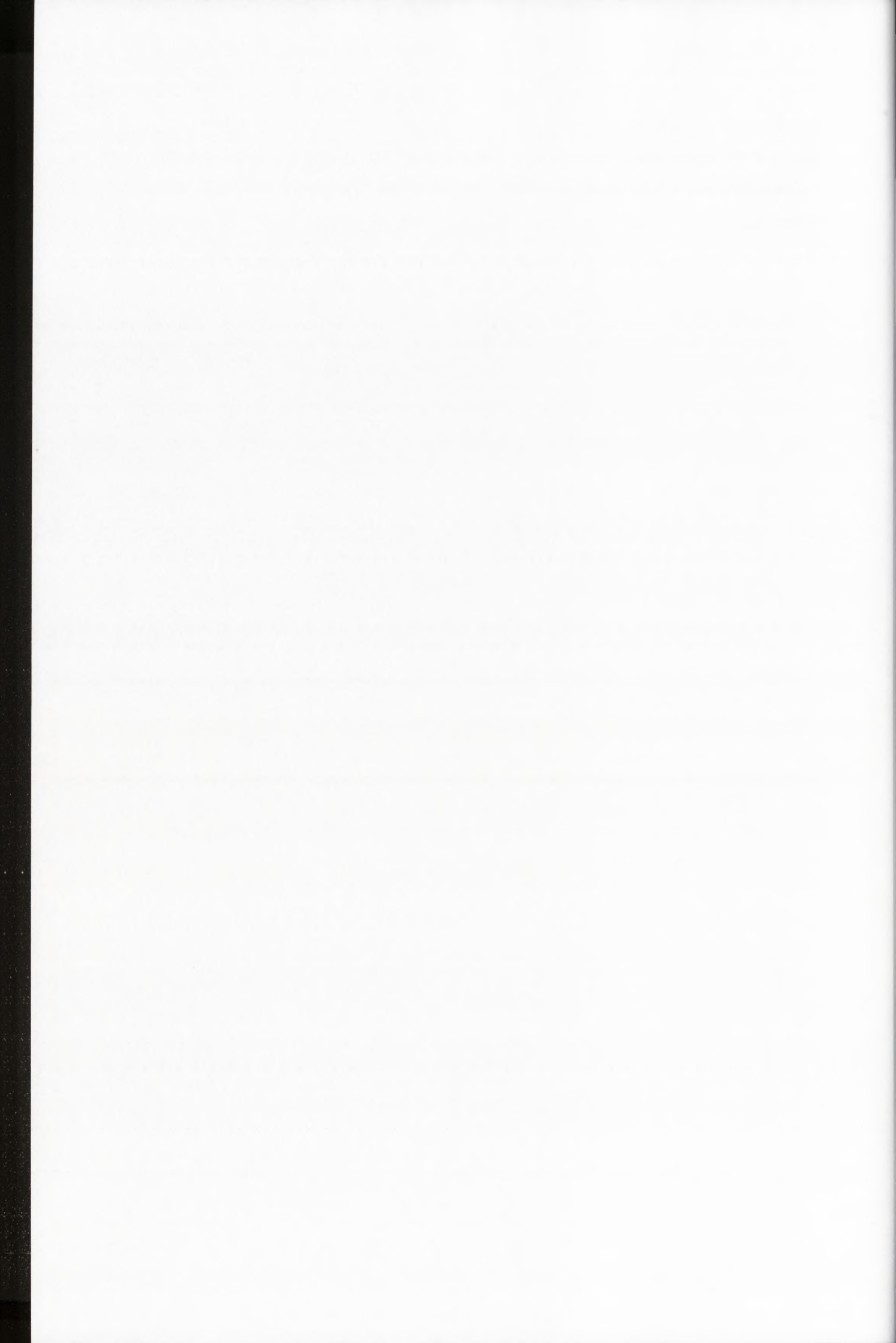
3'R HIV-1 znajdowała się niezmienną sekwencją końcową (295 ostatnich nukleotydów z 3' UTR RNA1 BMV). W tych rekombinantach brakowało natomiast około 300-nukleotydów pomiędzy rejonami R HIV-1, obejmujących sekwencję CCMV i duplikację sekwencji BMV z końca 3'. W drugim typie rekombinanta za 5' rejonem R HIV-1 leżała sekwencja CCMV, bezpośrednio po której następowała sekwencja ostatnich 49-ciu nukleotydów 3' rejonu R HIV-1 i dalej niezmienną sekwencją końca RNA1. U ostatniego typu rekombinanta za rejonem 5' HIV-1 obecna była sekwencja CCMV, za którą obecnych było pierwszych 19 nukleotydów zduplikowanej sekwencji RNA3. Za fragmentem sekwencji RNA3 leżała sekwencja RNA1 z delecją pierwszych 115 nukleotydów. Schemat rekombinantów przedstawiono na rysunku 4.20. Żaden z trzech typów powstałych w czasie infekcji mutantem MatHIVH-BMV rekombinantów nie był efektem zaplanowanej homologicznej rekombinacji pomiędzy dwoma rejonami R HIV-1 zawartymi w 3'UTR cząsteczki MatHIVH-RNA3. Rekombinanty zostały wygenerowane przez niehomologiczne przeskoki rekombinacyjne zachodzące pomiędzy różnymi sekwencjami z 3'UTR MatHIVH-RNA3.

#### **4.4.3. Badania homologicznej rekombinacji RNA z wykorzystaniem systemu rekombinacyjnego BMV zawierającego rejon R HIV-1 – podsumowanie**

W niniejszym rozdziale opisano badania aktywności rekombinacyjnej RdRp BMV wobec sekwencji rejonu R HIV-1. W tym celu utworzono pochodną wektora rekombinacyjnego Mat0-RNA3, zawierającą w miejscach klonowania 5' i 3' RAS dwie kopie rejonu R HIV-1. Cząsteczkę tę nazwano MatHIVH-RNA3. Takie umiejscowienie sekwencji HIV-1 stwarzało możliwość homologicznego przeskoku pomiędzy tymi sekwencjami w ramach tej samej lub dwóch odrębnych cząsteczek RNA3. Infekcyjność mutantu MatHIVH-BMV nie odbiegała od infekcyjności typu dzikiego. Analiza cDNA otrzymanego z RNA3 wyizolowanego 40 plamek nekrotycznych powstałych po infekcji mutantem MatHIVH-RNA3-BMV wykazała, iż wirus obecny był tylko w 14 z nich, pozostałe natomiast były puste, natomiast rekombinanty obecne były tylko w 4 plamkach, reszta plamek zawierała cząsteczki RNA3 typu rodzicielskiego. Po zsekwencjonowaniu wirusowego cDNA powstałego na matrycach RNA3 pochodzących z czterech plamek nekrotycznych zawierających rekombinanty stwierdzono jednak, że rekombinacja nie zaszła według oczekiwanego schematu. W pokoleniu potomnym wirusa zaobserwowano obecność trzech typów niehomologicznych rekombinantów zawierających po jednej delecji części 3'UTR. W pierwszym typie rekombinanta była



to sekwencja obejmująca rejony C i B, w drugim typie usunięty był cały rejon B oraz pierwsze 48 nukleotydów rejonu 3'R HIV-1, natomiast trzeci typ nie zawierał ostatnich 119 nukleotydów rejonu B, całego rejonu 3'R HIV-1 oraz pierwszych 115 nukleotydów rejonu A.



#### 4.5. Podsumowanie wyników

Niniejszą pracę poświęcono lepszemu poznaniu udziału homologicznej rekombinacji RNA w kształtowaniu genomowych cząsteczek modelowego wirusa (+) RNA, wirusa mozaiki stokłosa. Stwierdzono, że proces ten jest stosunkowo częstym wydarzeniem w czasie cyklu życiowego BMV. Badając rozmieszczenie markerowych mutacji w potomnym pokoleniu genomowych cząsteczek RNA1 i RNA2 powstałych podczas koinfekcji roślin dwoma różnymi wariantami BMV zaobserwowano, że w kodujących rejonach cząsteczek genomowych RNA1 i RNA2 pojedyncze homologiczne przeskoki rekombinacyjne zachodzą z minimalną częstością osiągającą wartość od 2,8 do 8,9% na 100 nukleotydów. Odnotowano także powstawanie podwójnych rekombinantów BMV. Stwierdzono jednocześnie, że gatunek gospodarza oraz ilość cykli replikacyjnych nie mają wpływu na częstość homologicznych przeskoków rekombinacyjnych. W kodujących rejonach RNA1 i RNA2 BMV nie wykryto motywów wspierające homologiczne przeskoki rekombinacyjne, takich jak w rejonie międzygenowym RNA3 BMV (Bruyere i wsp., 2000), gdzie obserwowana częstość rekombinacji osiągała znacznie wyższą wartość. Zaobserwowano także że substytucje nukleotydowe w 3' i 5' UTRach RNA1 i RNA2 BMV podczas infekcji są zastępowane sekwencją typu dzikiego, wskutek błędów replikacji RNA, a wirusy z takimi mutacjami są wypierane z populacji przez presję selekcyjną. Obserwacja ta potwierdza konserwatywny charakter tych rejonów genomowych cząsteczek wirusa. Porównanie częstości rekombinacji RNA w kodujących rejonach cząsteczek BMV oraz w międzygenowym rejonie RNA3 dało podstawę do zaproponowania mechanizmu nieciągłej syntezy RNA3 i powstawania nieznanego do tej pory subgenomowego RNA5 BMV, który został zidentyfikowany zarówno w zakażonych tkankach roślinnych jak i w RNA wyekstrahowanym z wirionów BMV.

Drugim zagadnieniem poruszonym w niniejszej pracy było lepsze poznanie mechanizmu homologicznego przeskoku rekombinacyjnego i określenie, czy istnieją uniwersalne elementy w strukturze RNA indukujące przeskoki rekombinacyjne wirusowych enzymów replikacyjnych. W tej części badań posłużono się systemem *in vitro*, bazującym na odwrotnej transkryptazie wirusa HIV-1 oraz systemem rekombinacyjnym BMV *in vivo*. Testując w obydwu systemach rekombinacyjnie aktywne rejony R wirusów HIV-1 i BMV stwierdzono, że obydwie badane sekwencje wspierają homologiczne przeskoki HIV-1 RT i że ich częstotliwość wzrasta wraz z odległością od końca 3' matrycy. Co zaskakujące, całkowita wydajność rekombinacji w





przypadku HIV-1 RT była kilkakrotnie wyższa podczas reakcji wydłużania startera na matrycach RNA zawierających rejon R BMV niż na matrycach RNA zawierających rejon R HIV-1, natomiast rejon R HIV-1 umieszczony w wektorze rekombinacyjnym RNA3 BMV nie wspierał homologicznej rekombinacji podczas infekcji BMV w roślinach.



## 5. Dyskusja

### 5.1. Badanie częstości homologicznych przeskoków rekombinacyjnych, zachodzących pomiędzy genomowymi cząsteczkami RNA BMV

W niniejszej pracy opisano szereg eksperymentów mających na celu poznanie mechanizmu homologicznej rekombinacji RNA oraz udziału tego procesu w kształtowaniu genomów wirusowych. Eksperymenty prowadzono z użyciem modelowego wirusa roślinnego - wirusa mozaiki stokłosa (BMV). Wyniki wcześniejszych badań aktywności rekombinacyjnej genomowego RNA3 BMV wskazywały, że homologiczne przeskoki rekombinacyjne zachodzą wzdłuż całej cząsteczki RNA3 BMV z niską częstością, natomiast w rejonie między genami białek 3a i CP znajduje się miejsce o podwyższonej aktywności rekombinacyjnej (Bruyere i wsp., 2000; Wierzchosławski i wsp., 2003). Aby określić częstość, z jaką zachodzi homologiczna rekombinacja pomiędzy genomowymi cząsteczkami RNA1 i RNA2, otrzymano szereg mutantów wirusowych zawierających markery, tworzące w odpowiadającym wirusowemu RNA cDNA unikalne miejsca restrykcyjne, rozmieszczone w około 1000-nukleotydowych odstępach (mutanty M-RNA2-BMV i O-RNA1-BMV). Markerowe miejsca restrykcyjne powstały w wyniku substytucji nukleotydowych wprowadzonych do rejonów niekodujących i kodujących RNA, bez zmiany sekwencji aminokwasowej białek BMV. Infekcyjność mutantów w porównaniu do typu dzikiego BMV oraz stabilność wprowadzonych markerów podczas replikacji wirusa w gospodarzu potwierdzono poprzez porównanie objawów chorobowych zakażonych roślin oraz sekwencjonowanie potomnych cząsteczek RNA BMV.

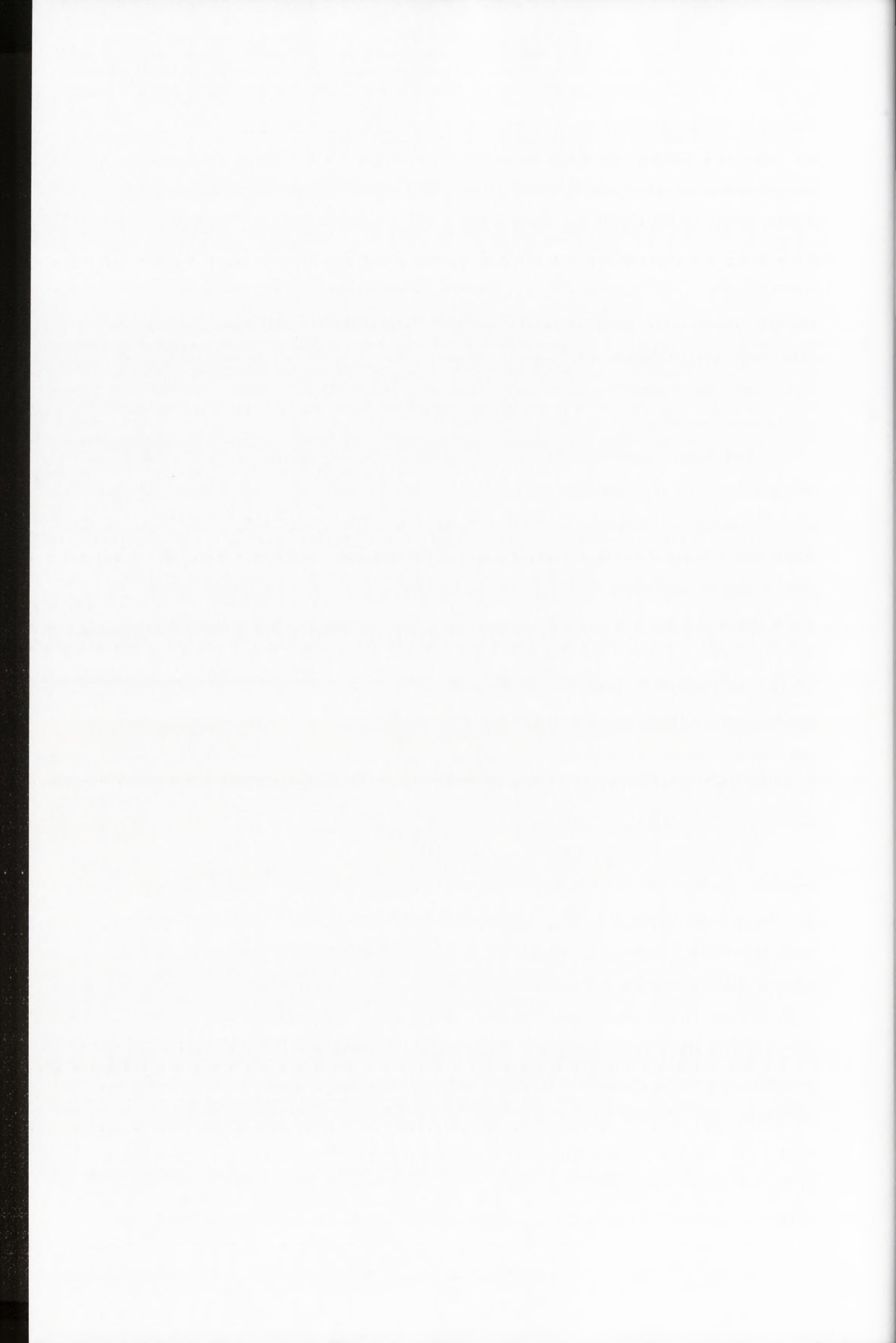
Podczas badań stabilności markerów w rejonach niekodujących RNA2 i RNA1 BMV zaobserwowano bardzo interesujące zjawisko, a mianowicie powrót do sekwencji typu dzikiego na skutek błędów replikacji RNA. Cząsteczki RNA, których sekwencja uległa rewersji, były następnie faworyzowane przez presję selekcyjną i wyparły z pokolenia potomnego wirusa cząsteczki typu macierzystego o zmutowanych UTRach. Za tym mechanizmem przemawia fakt, iż ilość mutacji wprowadzanych przez RdRp podczas replikacji RNA wynosi około  $10^{-5}$ /nukleotyd/cykl replikacyjny (Steinhauer i wsp., 1987). Dla porównania, polimerazy DNA zależne od DNA popełniają omyłki w znacznie rzadziej, około  $10^{-10}$  -  $10^{-12}$ /nukleotyd/cykl replikacyjny (Glickman i wsp., 1994). Innym możliwym mechanizmem, prowadzącym do rewersji sekwencji UTRów



do typu dzikiego, mogłaby być homologiczna rekombinacja zmutowanych UTRów z UTRami typu dzikiego pozostałych genomowych cząsteczek BMV. Ta możliwość została jednak wykluczona, bowiem sekwencja UTRów genomowych cząsteczek RNA1, RNA2 i RNA3 BMV nie jest w 100% identyczna, natomiast UTRy potomnych RNA uległy rewersji dokładnie do typu dzikiego. Rekombinacja pomiędzy rejonami niekodującymi 3' i 5' genomowych cząsteczek BMV może również być utrudniona ze względu na fakt, iż przyjmują one skomplikowaną strukturę drugorzędową czy trzeciorzędową (Ahlquist, 1985; Chen i wsp., 2001). W dalszej części dyskusji wykazano, że stabilne struktury przestrzenne znacznie zmniejszają częstość zachodzenia homologicznej rekombinacji RNA.

Akumulacja cząsteczek genomowych RNA2 i RNA1 których 3' i 5' UTRy uległy rewersji do typu dzikiego potwierdza, iż właściwa sekwencja tych rejonów jest szczególnie istotna dla aktywności wirusa. W ich obrębie znajduje się wiele elementów, odgrywających istotne role w różnych etapach cyklu replikacyjnego wirusa. Są to między innymi: promotory dla polimerazy BMV na nici (+) i (-) RNA (Chapman i wsp., 1999; Dreher i wsp., 1989), motywy w 3'UTR biorące udział w adenylacji końca 3' RNA (polimeraza rozpoczyna syntezę nici potomnej od 2-go nukleotydu (C), natomiast reszty A na końcach 3' dodawane jest potranskrypcyjnie przez nukleotydylotransferazę tRNA, Dreher, 1988, Rao i wsp., 1989), motyw „box B” w 5'UTR konieczny do kierowania wirusowego RNA przez białko 1a do retikulum endoplazmatycznego, gdzie zachodzi replikacja wirusa (Chen i wsp., 2001), oraz sygnał pakowania obecny w niekodującym 3'UTR (Choi i wsp., 2003).

Po wyselekcjonowaniu tych mutantów BMV, których markery umieszczone w rejonach kodujących RNA2 i RNA1 nie wpływały na infekcyjność wirusa, przystąpiono do badań procesu homologicznej rekombinacji RNA. Przeprowadzono serię koinokulacji komosy (gospodarz, w którym BMV replikuje ograniczoną ilość razy, a infekcja objawia się powstawaniem plamek nekrotycznych) oraz jęczmienia (gospodarz, w którym wirus replikuje się bez ograniczeń w całej roślinie) przy pomocy par mutantów BMV zawierających markery w różnych miejscach tej samej cząsteczki genomowego RNA. Zastosowanie dwóch różnych gospodarzy stwarzało możliwość określenia, czy gatunek rośliny oraz ilość cykli replikacyjnych wywierają istotny wpływ na częstość homologicznej rekombinacji RNA. Analizując rozmieszczenie markerów w pokoleniu potomnym wirusa ustalono, że homologiczna rekombinacja RNA między różnymi wariantami tej samej genomowej cząsteczki RNA zachodzi z



częstością osiągającą wartości w zakresie 11-27% zarówno w jęczmieniu jak i w komosie. W celu ustalenia czy podczas replikacji dochodzi do dwóch przeskoków rekombinacyjnych, analizie poddano dwa rejony RNA2 zawierające trzy mutacje markerowe. Pośród 39 klonów otrzymanych z RNA wyizolowanego z plamki nekrotycznej powstałej na zakażonym mutantami M2-RNA2-BMV i M34-RNA2-BMV liściu *C. quinoa* zaobserwowano 2 podwójne rekombinanty, wśród 36 klonów RNA2 otrzymanych z całego liścia komosy 3 były podwójnie zrekombinowane, natomiast 38 klonów otrzymanych z zakażonego jęczmienia zawierało 4 podwójne rekombinanty.

W czasie koinfekcji dwoma mutantami wirusowymi noszącymi markery w różnych miejscach tej samej genomowej cząsteczki można zaobserwować homologiczne rekombinanty powstałe w efekcie przeskoku wirusowej RdRp pomiędzy dwoma różnymi wariantami tego samego RNA, ponieważ tylko takie rekombinanty odróżniają się od cząsteczek rodzicielskich. Jednak rekombinacja homologiczna może zachodzić nie tylko pomiędzy różnymi wariantami tej samej cząsteczki, ale także pomiędzy tymi samymi wariantami, a obserwowane rekombinanty stanowią tylko część całkowitej ilości rekombinantów. Z tego względu zaproponowano nową metodę obliczania częstości tego procesu, w której uwzględnione zostały wszystkie rekombinanty oraz wzajemna proporcja obydwu typów cząsteczek rodzicielskiego w pokoleniu potomnym, pozwalającą poznać minimalną częstość, z jaką zachodzi rekombinacja homologiczna, bowiem uwzględnia ona jedynie pojedyncze przeskoki rekombinacyjne. Bazując na zaproponowanej metodzie, ustalono, że rzeczywista częstość rekombinacji w badanych cząsteczkach BMV osiągała wartości od 2,8% do 8,9% na 100 nukleotydów. Wyższe od obserwowanego dla BMV, tempo rekombinacji charakteryzuje odwrotną transkryptazę HIV-1. Dla genomu HIV-1 o długości 10kz, obserwowano 9-30 przeskoków odwrotnej transkryptazy podczas jednego cyklu replikacyjnego wirusa, częstość rekombinacji na 100nt wynosi więc około 9-30 % (Levy i wsp., 2004, Rhodes i wsp., 2005). Różnica ta może wynikać nie tylko z różnej aktywności rekombinacyjnej RdRp BMV i HIV-1 RT, lecz może być także związana jest z warunkami w jakich odbywa się replikacja tych dwóch wirusów. BMV replikuje się w zamkniętych sferulach utworzonych przez cząsteczki białka 1a w świetle retikulum endoplazmatycznego (Schwartz i wsp., 2002). W takich warunkach kontakt pomiędzy poszczególnymi cząsteczkami wirusowego RNA jest utrudniony i uzależniony od labilności błony retikulum. W wirionie HIV-1 natomiast zawarte są



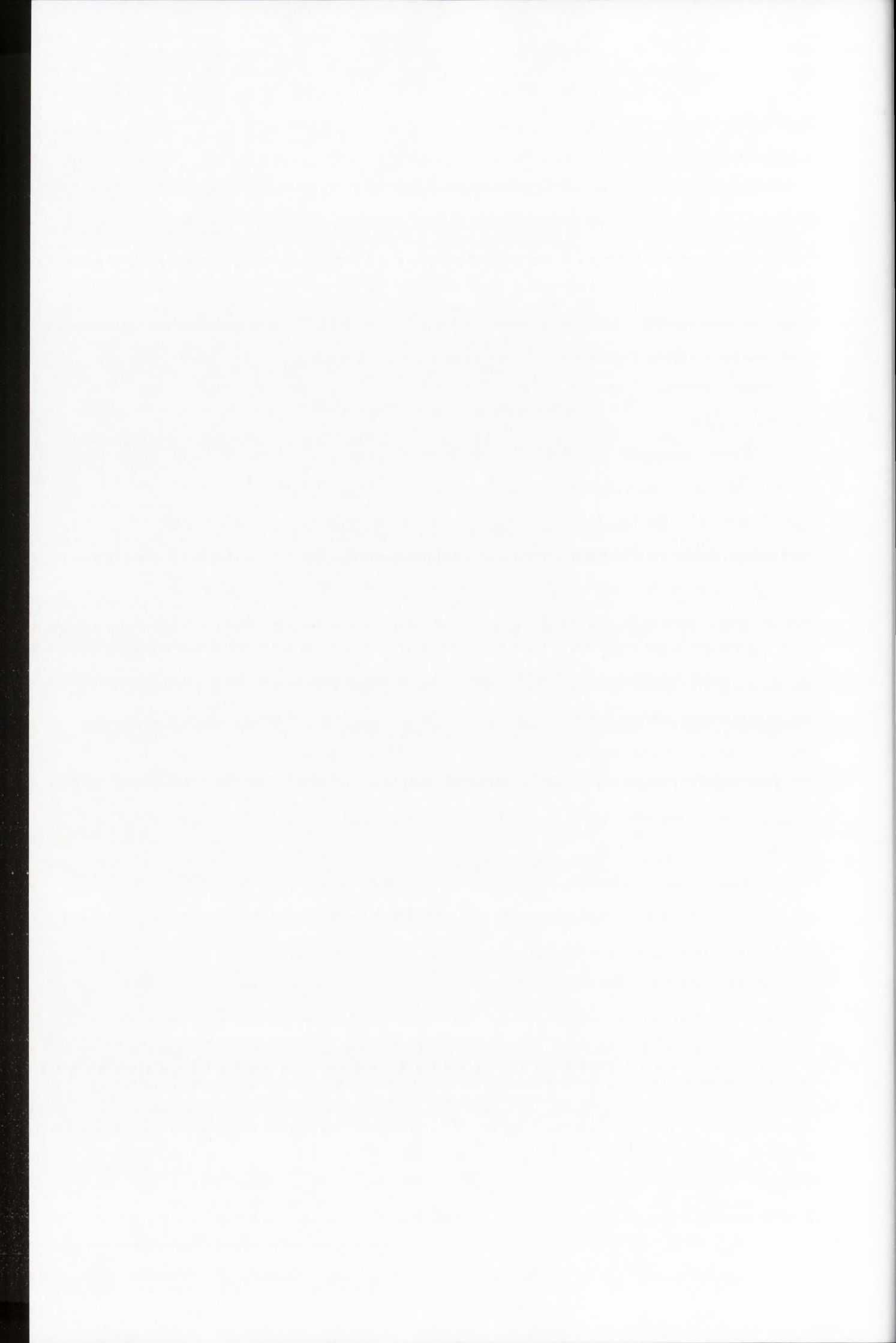


dwie kopie genomowego RNA (Merqueti wsp., 1991), co stwarza dogodne warunki do zajścia rekombinacji podczas odwrotnej transkrypcji.

Otrzymane wyniki dowodzą, iż większość potomnych cząsteczek genomowych RNA1 i RNA2 jest syntetyzowana w oparciu o co najmniej dwie matryce, a homologiczna rekombinacja RNA jest procesem zachodzącym z bardzo dużą częstością. Jednocześnie stwierdzono, że częstość rekombinacji nie zależy od ilości cykli replikacyjnych, bowiem zarówno w gospodarzu nadwrażliwym jak i systemicznym proces przebiegał z podobną częstością. W RNA1 i RNA2 BMV nie znaleziono żadnych rejonów charakteryzujących się wzmożoną aktywnością rekombinacyjną.

Wyniki otrzymane podczas badań rekombinacji między cząsteczkami RNA1 lub RNA2 BMV są porównywalne z częstością rekombinacji obserwowaną w kodującym rejonie RNA3. Obserwowana częstość rekombinacji pomiędzy dwoma różnymi wariantami RNA3 w 547-nukleotydowym fragmencie tej cząsteczki zawierającej gen białka płaszczka osiągała wartości 10-22% (Wierzchosławski i wsp., 2003). Natomiast w rejonie międzygenowym zaobserwowano silny wzrost częstości aż do 71% (Bruyere i wsp., 2000). Zaproponowano mechanizm wyjaśniający to zjawisko obecnością w tym rejonie (-) RNA3 około 20-nukleotydowej sekwencji polyU oraz promotora do syntezy subgenomowego RNA4. Sekwencje polyU czy poliA mogą powodować poślizg RdRp wskutek osłabienia oddziaływanie matrycy i nici potomnej (Pathak i Hu, 1997; Deng i Shuman, 1997; Hausmann i wsp., 1996). Struktura promotora stanowi natomiast przestrzenną przeszkodę dla RdRp BMV podczas syntezy pełnej długości (+)RNA3 (Grzelishvili i wsp., 2005).

Wspomaganie przeskoków rekombinacyjnych przez różne struktury RNA nie jest zjawiskiem zarezerwowanym wyłącznie dla BMV. Zaobserwowano je między innymi u karmowirusa kędzierzawki rzepy (TCV – *turnip crinkle virus*). W trakcie infekcji wirusowi temu towarzyszą liczne satelitarne RNA, z których spora część jest produktami rekombinacji zachodzącej pomiędzy jego genomowymi RNA i innymi satelitarnymi RNA. Po zanalizowaniu tych rekombinantów stwierdzono, że miejsca przeskoków zlokalizowane są w rejonie (-)RNA wykazującym znaczne podobieństwo do obecnego w genomowym RNA TCV promotora transkrypcji, tzw. motywu I (Cascone i wsp., 1990, 1993; Zhang i wsp., 1991) lub w obrębie innej struktury drugorzędowej, tzw. motywu III (Nagy i Simon, 1998a i b). Podczas badań transkrypcji *in vitro* prowadzonej z wykorzystaniem RdRp wirusa TCV oraz tombuswirusa nekrozy



ogórka (CNV – *cucumber necrosis virus*) wykazano, że matryce zawierające minimalny promotor (tzw. cpR11) oraz enhancer replikacji (tzw. region III-) z końca 3' (-)RNA tombuswirusa krzaczastej karłowatości pomidora (TBSV – *tomato bushy stunt virus*) również bardzo wydajnie wspierały przeskoki rekombinacyjne. Ponadto matryce bogate w nukleotydy adeninowe i uracylowe również wspierały przeskoki rekombinacyjne polimeraz TCV i CNV, aczkolwiek nie tak silnie jak wyżej wymienione motywy promotorowe i enhancerowe (Cheng i wsp., 2003). W roślinach koinfekowanych dwoma wirusami z rodzaju *Cucumovirus*, CMV i TAV, powstawały rekombinanty RNA3 i subgenomowego RNA 4 CMV, posiadające 3'-końcową część genomowej cząsteczki RNA1 TAV, a przeskok rekombinacyjny zachodził pomiędzy 3'-końcowymi rejonami (-) RNA3 obydwu wirusów, w których w donorze (CMV) obecna była podwójna struktura spinkowa, natomiast w akceptorze obecna była struktura przypominająca subgenomowy promotor CMV (Suzuki i wsp., 2003). Indukowanie przeskoków rekombinacyjnych przez silne struktury spinkowe w cząsteczce donorowej zaobserwowano także podczas badań defektywnych interferujących RNA u tombuswirusów powstających podczas infekcji w roślinie (White i wsp., 1995). Rekombinacja u nodawirusów również zachodzi ze znaczącym udziałem struktur promotorowych czy enhancerowych (Ball, 1997). W czasie cyklu replikacyjnego wirusa *Flock House* (FHV) syntetyzowane są liczne defektywne RNA (D RNA), będące kopiami cząsteczek genomowych z dużymi delecjami, powstałymi wskutek rekombinacji RNA. D RNA pochodzące od genomowej cząsteczki RNA2 zawierają delecje 5' lub 3' końcowej części RNA2, jednak zawsze zachowują centralnie umieszczony enhancer niezbędny do replikacji. Podczas badań zjawiska rekombinacji w systemie CNV zaobserwowano, że wspierająca rekombinację 69-nukleotydowa sekwencja bogata w nukleotydy adeninowe i uracylowe z BMV indukuje rekombinację podczas tworzenia DI RNA (Shapka i Nagy, 2004). Wymienione liczne przykłady pokazują, że struktury promotorowe, rejony polyA czy polyU oraz inne drugorzędowe struktury RNA stanowią dla wirusowych kompleksów replikacyjnych swego rodzaju enhancery przeskoku rekombinacyjnego i funkcjonują nie tylko u BMV lecz u wielu innych wirusów RNA.

Analizując dane dotyczące rekombinacji homologicznej wszystkich trzech cząsteczek BMV można wnioskować, że kompleks RdRp BMV posiada pewną stałą, umiarkowaną zdolność do wykonywania homologicznych przeskoków rekombinacyjnych w obrębie dwóch takich samych sekwencji. Jednak pewne elementy

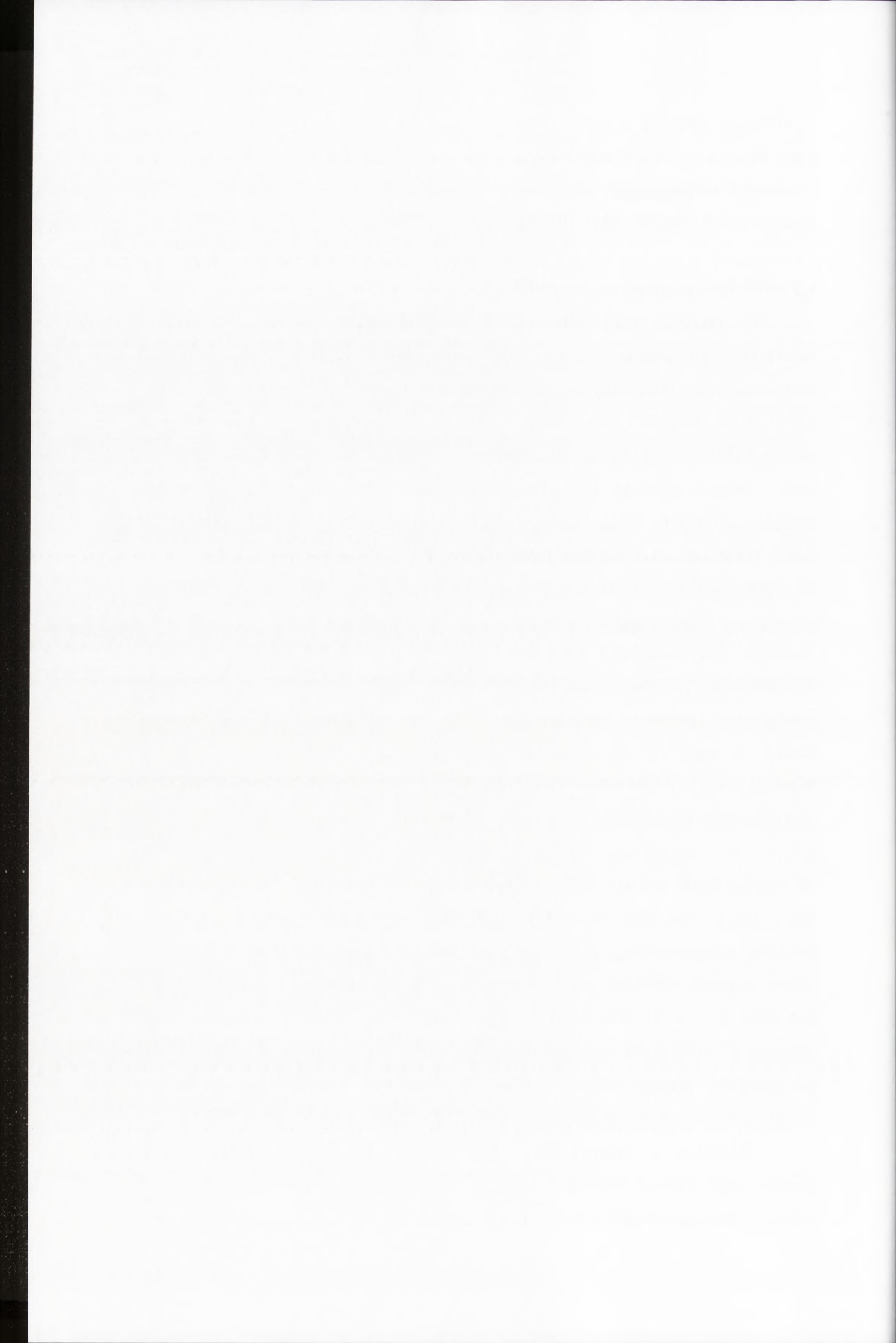


w strukturze RNA są w stanie zwiększać częstotliwość przeskoków dokonywanych przez wirusowy kompleks replikacyjny. Należą do nich wymienione wyżej rejon polyU i promotor subgenomowy, jak również sekwencje polyAU oraz rejon R z 3'UTR genomowych cząsteczek BMV (Rozdział 1.5).

## 5.2 Identyfikacja subgenomowego RNA5

W niniejszej pracy podjęto próbę dokładniejszego określenia mechanizmu funkcjonującego podczas przeskoku rekombinacyjnego z udziałem sekwencji polyU i subgenomowego promotora zlokalizowanego pomiędzy dwiema ramkami odczytu RNA3 BMV (Bruyere i wsp., 2000). Sekwencje polyU czy poliA mogą powodować poślizg RdRp wskutek osłabienia oddziaływanie matrycy i nici potomnej (Pathak i Hu, 1997; Deng i Shuman, 1997; Hausmann i wsp., 1996, Nagy i Bujarski, 1996). Struktura promotora może natomiast stanowić przestrzenną przeszkodę dla RdRp BMV. Wykazano, że obecność subgenomowego promotora wywiera hamujący wpływ na replikację RNA3, który wynika najprawdopodobniej z konkurencji wirusowych kompleksów replikacyjnych o matrycę (-)RNA3 (Grdelishvili i wsp., 2005). Po usunięciu subgenomowego promotora, ilość powstającego RNA3 znacznie rosła. Subgenomowy promotor może również stwarzać dogodne miejsce do ponownego przyłączenia kompleksu replikacyjnego i kontynuacji syntezy zrekombinowanego RNA3 na innej lub tej samej matrycy (-)RNA3. Poznanie lokalizacji miejsc homologicznych przeskoków rekombinacyjnych również potwierdza prawdziwość zaproponowanego mechanizmu, bowiem są one rozmieszczone w obrębie sekwencji polyA oraz początkowej części struktury spinki subgenomowego promotora (Wierzchosławski i wsp., 2004). Najprawdopodobniej więc kompleks replikacyjny BMV ulega dysocjacji na sekwencji polyU, wspomaganej przez drugorzędową strukturę subgenomowego promotora. Późniejsza reasocjacja RdRp do innej lub tej samej matrycy (-)RNA3 jest wspomagana przez hybrydyzację sekwencji polyA potomnej nici z rejonem polyU matrycy oraz przez obecność subgenomowego promotora. Mechanizm ten nie odnosi się do wszystkich cząsteczek RNA3 powstających podczas infekcji, ponieważ przeskok rekombinacyjny w rejonie międzygenowym nie jest warunkiem syntezy RNA3 (Grdelishvili i wsp., 2005).

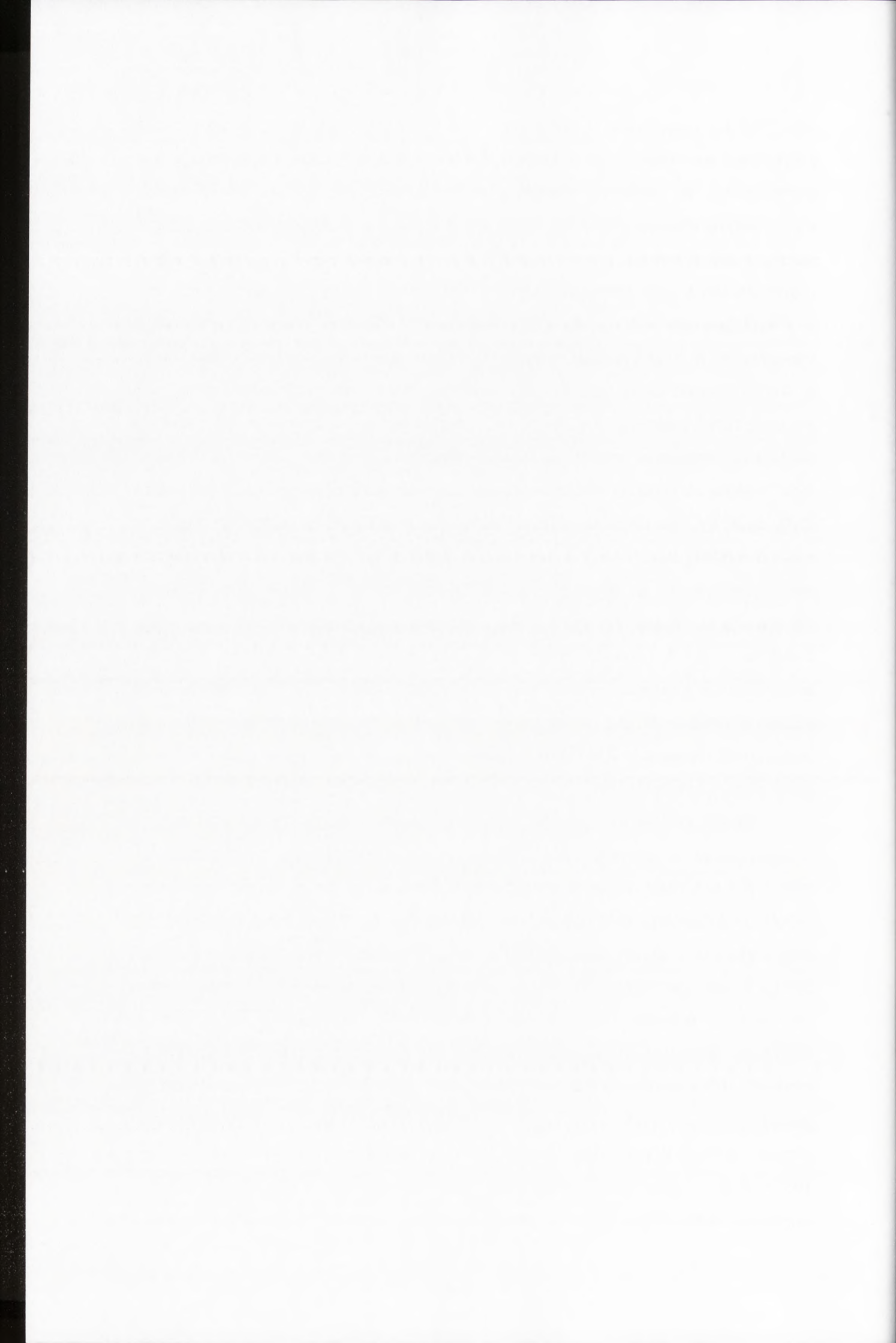
Zakładając, że synteza (+)RNA3 BMV może zachodzić w sposób nieciągły i że podczas tego procesu dochodzić może do dysocjacji kompleksu replikacyjnego w obrębie międzygenowego rejonu (-)RNA3 (Bruyere i wsp., 2000, Wierzchosławski i



wsp., 2004), postawiono tezę mówiącą, że w zainfekowanych BMV komórkach roślinnych jest obecny subgenomowy RNA5, będący efektem tej dysocjacji, homologiczny do części genomowego (+)RNA3 od jej pierwszego nukleotydu do rejonu polyA. Obecność RNA5 w roślinach zakażonych BMV potwierdzono dwiema niezależnymi metodami – *northern blot* i sekwencjonowaniem cDNA. Wykazano, że cząsteczka RNA, odpowiadająca długością i sekwencją około 1220 nukleotodom końca 5' RNA3 powstaje podczas infekcji w stosunkowo mniejszych ilościach niż pozostałe wirusowe RNA. RNA5 posiada na końcu 5' strukturę kap oraz ogon polyA na końcu 3', w odróżnieniu od reszty genomowych cząsteczek BMV, których koniec 3' przyjmuje strukturę tRNA-podobną. Te cechy RNA5 upodabniają go do jednego z początkowych produktów pośrednich szlaku degradacji komórkowych mRNA (Beelman i Parker, 1995). Słaba akumulacja RNA5 w porównaniu do pozostałych genomowych RNA BMV może być spowodowana działaniem komórkowych nukleaz odpowiedzialnych za rozkład mRNA. Ilość RNA5 w stosunku do ilości RNA3 w zakażonych komórkach roślinnych wzrasta w ciągu pierwszych 10 dni infekcji z około 20% do 40%. Obserwacja ta wydaje się być zgodna z przypuszczalną funkcją RNA5. Ponieważ koduje on białko 3a odpowiedzialne za rozprzestrzenianie infekcji w roślinie, jego ilość w zakażonych komórkach rośnie wraz z rozwojem infekcji. Z drugiej strony, niski poziom akumulacji RNA5 i związanego z nim białka 3a w roślinie w porównaniu do pozostałych cząsteczek RNA BMV uniemożliwia zbyt gwałtowny rozwój infekcji, który mógłby być bardzo niekorzystny zarówno dla gospodarza jak i dla wirusa.

Niewielkie ilości subgenomowego RNA5 zostały zidentyfikowane pośród RNA wyizolowanego z preparatu BMV, co wskazuje na enkapsydację tej cząsteczki. Możliwość ta wydaje się prawdopodobna ze względu na fakt, iż w obrębie genu białka 3a, obecnego zarówno w RNA3 jak i RNA5, znajduje się 187-nukleotydowa sekwencja oddziałująca z białkiem płaszczka BMV będąca sygnałem pakowania (Choi i wsp., 2003). Cząsteczki RNA5 nie mogą jednak samodzielnie zapoczątkować procesu opłaszczania, ponieważ nie posiadają sygnału 3'TLS. Sygnał ten obecny jest w 3'UTRach genomowych cząsteczek oraz subgenomowego RNA4 BMV i stanowi go struktura tRNA-podobna. Przypuszczalnie więc, pakowanie RNA5 zależne jest od pozostałych cząsteczek RNA BMV, podobnie jak to się dzieje w przypadku subgenomowego RNA4, który ulega wspólnej enkapsydacji z RNA3 (Miller i wsp., 1985; Choi i wsp., 2003). Niewielkie ilości RNA5 w stosunku do pozostałych cząsteczek RNA BMV obecnych wewnątrz wirionów sugerują, że proces ten może





mieć charakter przypadkowy i że obecność RNA5 wewnątrz wirionów nie jest dla wirusa istotna, podobnie jak to ma miejsce w przypadku sgRNA4.

Identyfikacja cząsteczki subgenomowego RNA5 nie stanowi o prawdziwości zaproponowanego mechanizmu jego powstawania. Alternatywną drogą tworzenia tej cząsteczki mogłaby być miejscowo-specyficzna degradacja (+)RNA3 w rejonie polyA. Niestety, przeprowadzona analiza stabilności genomowego RNA3 nie przyniosła odpowiedzi na pytanie, który z dwóch mechanizmów jest prawdziwy. RNA3 inkubowany w ekstrakcie roślinnym ulegał całkowitej degradacji, spowodowanej najprawdopodobniej obecnością komórkowych RNaz. Na korzyść zaproponowanego mechanizmu nieciągłej syntezy RNA3 i powstawania subgenomowego RNA5 poprzez dysocjację kompleksu replikacyjnego w rejonie polyU matrycowego (-)RNA3 silnie przemawia fakt, że podczas badań transkrypcji *in vitro*, prowadzonych z wykorzystaniem RdRp BMV na matrycy (-)RNA3 stwierdzono odpadanie kompleksu replikacyjnego w rejonie międzygenowym RNA3 oraz powstawanie dwóch produktów reakcji: RNA5 oraz pełnej długości RNA3 (dane niepublikowane). Jeśli mechanizm ten funkcjonuje *in vitro*, przypuszczenie, że funkcjonuje on także podczas infekcji w roślinie jest w pełni uzasadnione. Kilkunukleotydowe różnice długości sekwencji polyA odcinka międzygenowego RNA3 (Ahlquist i wsp., 1984a) oraz ogona RNA5 również wskazują, że podczas syntezy na matrycy (-)RNA3 RdRp napotyka w rejonie międzygenowym przeszkodę zaburzającą jej funkcjonowanie. Wykazano także, że transkrypty RNA5 umożliwiają bardzo wydajną translację białka 3a *in vitro*. Ilość powstającego białka jest większa niż podczas translacji z genomowego RNA3 (dane niepublikowane).

Proponowany mechanizm powstawania subgenomowego RNA5 BMV poprzez przedwczesną terminację replikacji w obrębie sekwencji polyU nie był wcześniej obserwowany. Przedwczesna terminacja spowodowana obecnością drugorzędowych struktur RNA w nici (-) występuje u wirusa Sindibis (Wielgosz i Huang, 1997), natomiast u dianthowirusów (Sit i wsp, 1998), luteowirusów (Miller i wsp, 2002) i nodawirusów (Eckerle i Ball, 2002) struktury drugorzędowe obecne w nici (+) powodują przedwczesną terminację subgenomowego (-)RNA. Istnieje jednak wiele wirusów RNA, posiadających wewnątrzcząsteczkowe sekwencje bogate w adenozyne czy urydyne, chociażby w obrębie rodzin *Bromoviridae*, *Hordeiviridae* czy *Togaviridae* i możliwe, że także u nich poprzez terminację replikacji w obrębie tych rejonów

Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page. The text is too light to transcribe accurately.

powstaje subgenomowy RNA. Sekwencje polyA/U mogą być również wykorzystane jako sygnały terminacji transkrypcji w wektorach pochodzenia wirusowego.

RNA5 może służyć wirusowej replikacji jako starter do syntezy pełnej długości RNA3, hybrydujący z matrycą (-)RNA3. W reinicjacji replikacji RNA3 może uczestniczyć subgenomowy promotor RNA4. Zjawisko takie, nazwane mechanizmem PAAE (*primer alignment and extension*), zostało zaobserwowane podczas replikacji RNA prowadzonej przez polimerazy wirusa polio i faga Q $\beta$  (Pierangeli i wsp., 1999, Chetverin i wsp., 2005). Enzymy te podejmowały syntezę RNA, wykorzystując jako startery i matryce cząsteczki RNA o odwrotnej polarności, których końce 3' i 5' były komplementarne. Wydajność tego typu syntezy rosła ze wzrostem długości komplementarnych sekwencji obydwu cząsteczek RNA. Udział struktur promotorowych w przeskokach rekombinacyjnych opisany został w poprzednim rozdziale.

Wyniki otrzymane podczas badań RNA5 oraz dane dotyczące udziału w rekombinacji innych promotorów wirusowych sugerują, że poza ogólnie znaną funkcją, struktury promotorowe uczestniczą także w procesie rekombinacji RNA, przyczyniając się do kształtowania wirusowych genomów. Obserwacje te jeszcze raz wskazują, że rekombinacja RNA u wirusów o genomie RNA może być zjawiskiem o wiele bardziej powszechnym niż do tej pory uważano.

### **5.3. Badania homologicznej rekombinacji RNA z wykorzystaniem HIV-1 RT wobec matryc zawierających rekombinacyjnie aktywne rejony R HIV-1 i BMV**

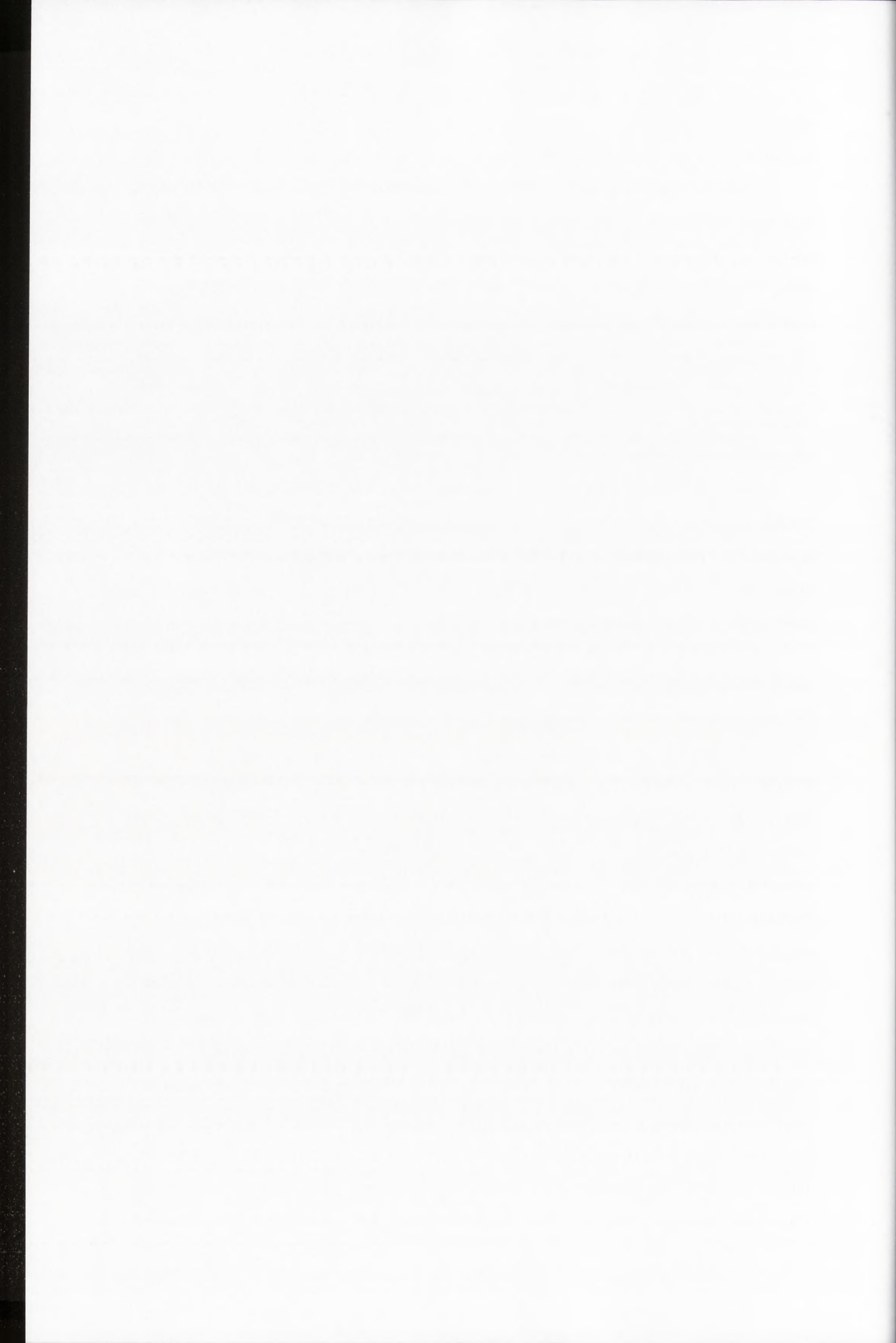
Podczas rozważań na temat rekombinacji RNA nasuwa się następujące pytanie: czy sekwencje rekombinacyjnie aktywne występujące u poszczególnych wirusów są uniwersalne i mogą wywoływać przeskoki rekombinacyjne replikaz innych, niespokrewnionych wirusów? W niniejszej pracy przedstawiono próbę odpowiedzi na to pytanie. Wykorzystano w tym celu doświadczalny system *in vitro* do badań rekombinacji, złożony z pary matryc RNA (akceptora i donora), odwrotnej transkryptazy HIV-1 oraz startera komplementarnego do końca 3' cząsteczki donorowej. W matrycach RNA zawarte były homologiczne sekwencje rekombinacyjnie aktywne, umożliwiające odwrotnej transkryptazie dokonywanie przeskoków rekombinacyjnych podczas reakcji wydłużania startera i zsyntetyzowanie rekombinanta, który różnił się długością od cząsteczek matrycowych. Przeprowadzono dwie serie eksperymentów *in vitro* z wykorzystaniem par matryc zawierających znane



rekombinacyjnie aktywne homologiczne sekwencje RNA: 60-nukleotydomowe rejony R z 3'UTR RNA2 i RNA3 BMV oraz 97-nukleotydomowe rejony R z 5' i 3'UTR HIV-1.

Podczas reakcji wydłużania startera odwrotna transkryptaza HIV-1 dokonywała homologicznych przeskoków rekombinacyjnych zarówno w obrębie sekwencji R HIV-1 jak i BMV. Wydajność tworzenia rekombinantów była jednak znacznie wyższa podczas reakcji z matrycami BMV, w czasie której powstawało do 32% zrekombinowanych cząsteczek, natomiast podczas reakcji z matrycami HIV-1 rekombinanty stanowiły do 7% wszystkich produktów. Większość przeskoków rekombinacyjnych miała miejsce w 5'-końcowym fragmencie obydwu donorowych cząsteczek RNA, a wszystkie zidentyfikowane rekombinanty powstały wskutek precyzyjnych homologicznych przeskoków rekombinacyjnych.

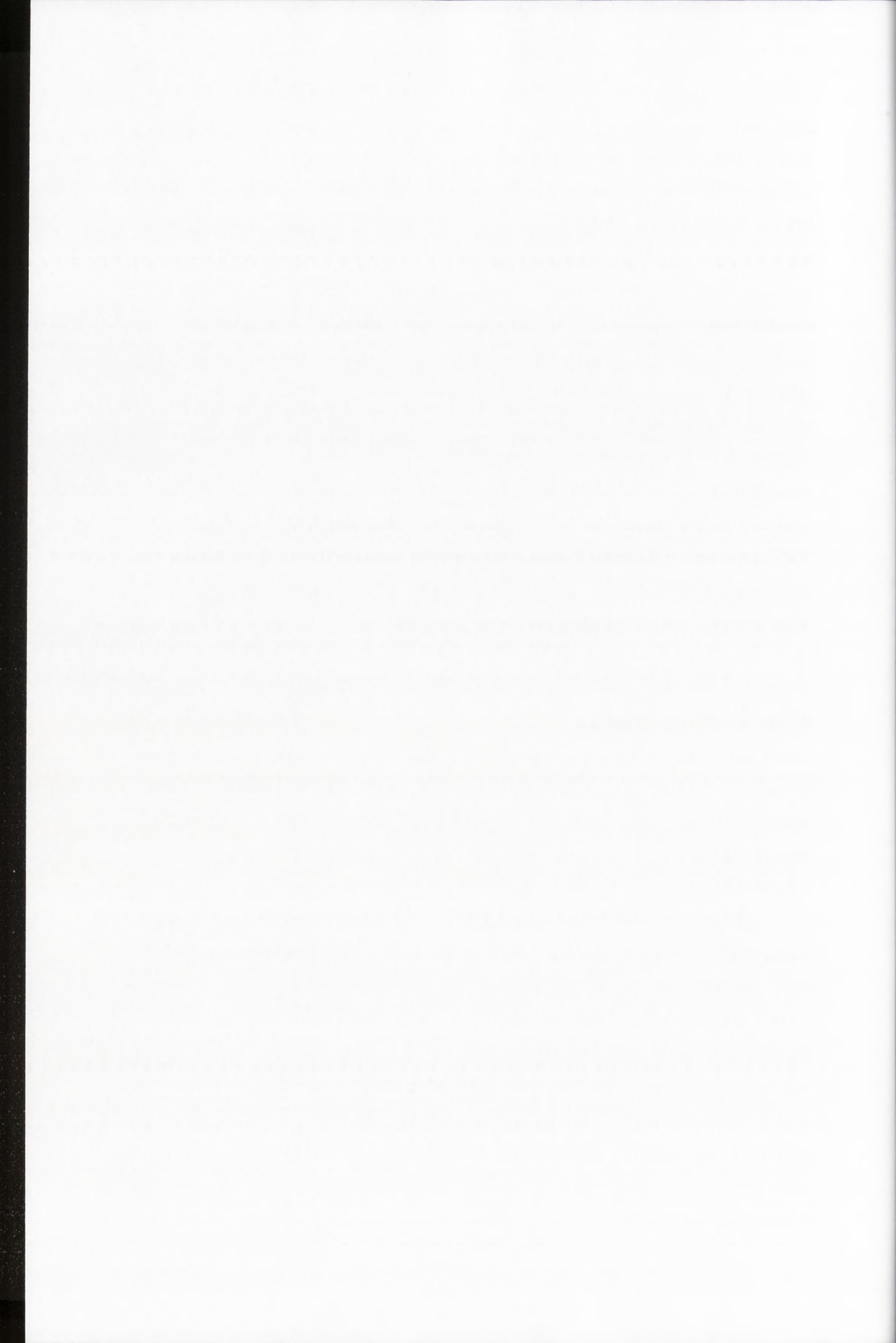
Fakt, iż w przypadku obydwu badanych sekwencji dochodziło do precyzyjnej homologicznej rekombinacji, jak i wcześniejsze doniesienia dowodzą, że elementem kluczowym dla zajścia przeskoku jest homologia pomiędzy rekombinującymi cząsteczkami umożliwiającą tworzenie komplementarnych par pomiędzy RNA potomnym i akceptorowym, natomiast pochodzenie sekwencji RNA nie jest dla wirusowej polimerazy istotne. Różnice w wydajności syntetyzowania rekombinantów mogą być związane z ze stabilnością występujących w RNA struktur drugorzędowych. W obydwu badanych sekwencjach występują struktury drugorzędowe: w rejonie R HIV-1 są to struktury typu spinki do włosów: TAR i część polyA, natomiast w rejonie R BMV występują dwie struktury typu spinki do włosów (G i H). Podczas badań wpływu struktury drugorzędowej RNA na proces rekombinacji u BMV (Olsthoorn i wsp., 2002) zaproponowano, że stabilna struktura typu spinki do włosów na poziomie akceptora może znacznie zmniejszyć wydajność rekombinacji, stanowiąc przestrzenną blokadę utrudniającą parowanie potomnego RNA z akceptorowym. Zaobserwowano wtedy, iż umieszczenie pomiędzy strukturami typu spinki do włosów G i H rejonu R BMV dodatkowej stabilnej struktury typu spinki bardzo obniżało wydajność rekombinacji. Struktura drugorzędowa rejonu R HIV-1 w akceptorowej matrycy jest znacznie stabilniejsza (w 37°C stabilność TAR:  $dG = -23,8$  kcal/mol, a stabilność polyA:  $dG = -10,1$  kcal/mol) niż struktura rejonu R BMV (w 37°C stabilność struktury G:  $dG = -1,9$  kcal/mol a stabilność struktury H:  $dG = -7,0$  kcal/mol) (obliczenia wykonano programem MFOLD w warunkach 1M NaCl). Możliwe zatem jest, że w przypadku HIV-1 RT struktura typu spinki do włosów w akceptorze może hamować przeskoki rekombinacyjne, ponieważ wydajność rekombinacji tego enzymu wobec rejonu R HIV-1



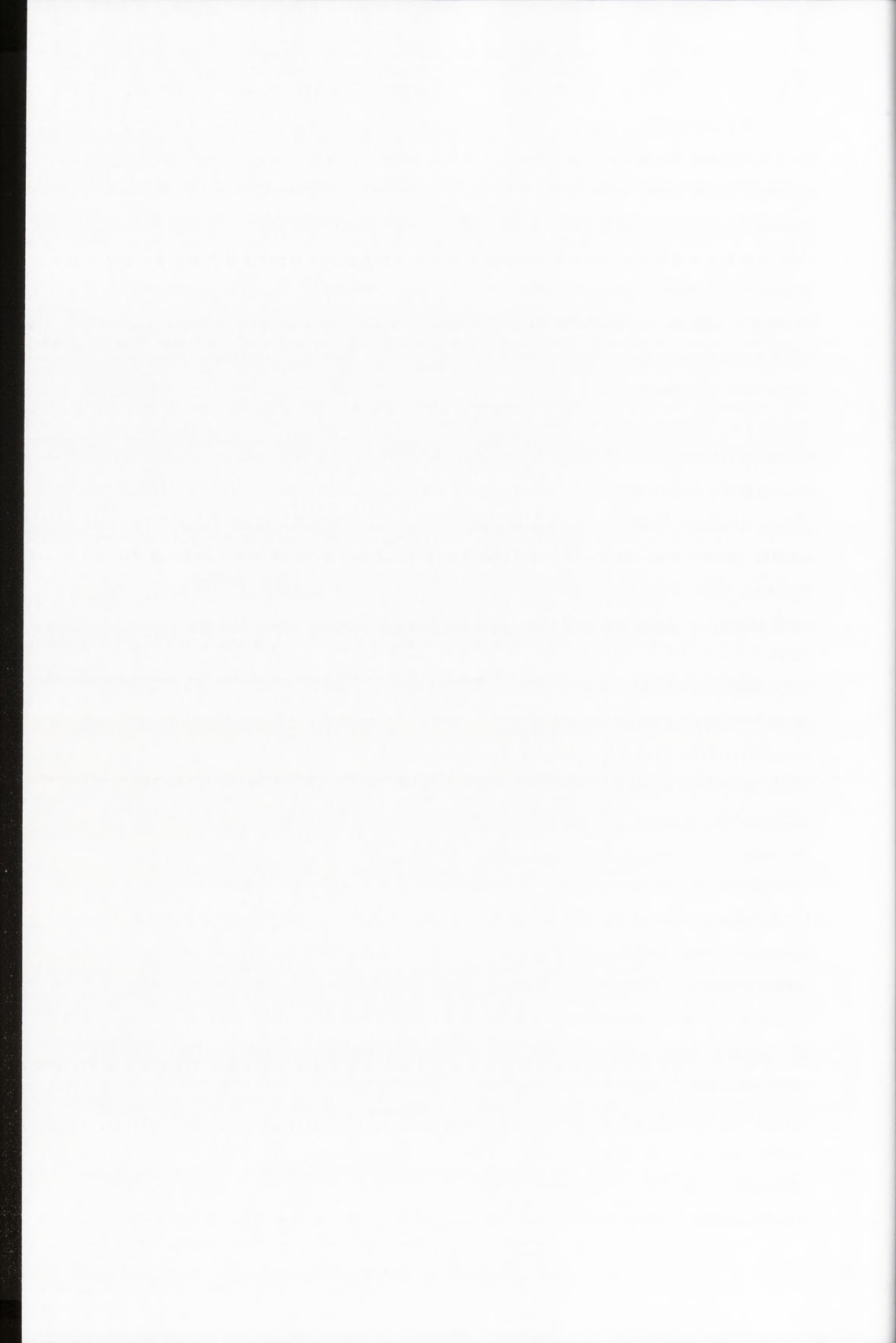
była znacznie niższa niż w przypadku sekwencji R z BMV. Podobne wyniki otrzymano podczas badań aktywności rekombinacyjnej sekwencji pochodzących z genomowych czasteczek RNA wirusa HCV, umieszczonych w wektorze rekombinacyjnym Mat0-RNA3 (Alejska i wsp., 2005a). Kiedy w wektorze rekombinacyjnym obecne były dwie kopie rejonu X HCV, charakteryzującego się bardzo stabilną strukturą drugorzędową i trzeciorzędową (Tanaka i wsp., 2004; Blighr i Rice, 1997), nie obserwowano rekombinantów, powstających wskutek przeskoku homologicznego RdRp BMV w obrębie tych rejonów. Kiedy jednak w wektorze umieszczono dwie kopie sekwencji HVR HCV, która nie jest zdolna do formowania stabilnej struktury przestrzennej, rekombinanty syntetyzowane wskutek homologicznego przeskoku RdRp w obrębie rejonów HVR powstawały ze stosunkowo wysoką częstością. W czasie badań prowadzonych przez zespół Berkhout'a, również zaobserwowano negatywny wpływ struktury typu spinki do włosów na wydajność procesu rekombinacji (Berkhout i wsp. 2001). Autorzy tych badań sugerują, przeskoki rekombinacyjne HIV-1 w obrębie pomiędzy rejonami 5' i 3' R obecnymi w genomowym RNA HIV-1 mogą być wspierane przez oddziaływania typu *kissing-loop* występujące pomiędzy strukturą typu spinki anty-TAR (-) s-s DNA (cząsteczka potomna) i strukturą typu spinki TAR obecną w rejonie R zlokalizowanym na końcu 3' genomu HIV-1 (akceptor). Wprowadzenie do donora substytucji, które znosiły parowanie nukleotydów pomiędzy strukturą typu spinki anty-TAR ssDNA nici potomnej i strukturą typu spinki TAR akceptora powodowało drastyczny spadek wydajności tworzenia rekombinantów. Natomiast stabilniejsza niż typu dzikiego struktura typu spinki poly(A) na poziomie akceptorowego RNA również wpływała negatywnie na wydajność tworzenia rekombinantów przez HIV-1 RT.

Słabsza aktywność rekombinacyjna odwrotnej transkryptazy HIV-1 wobec rejonu R HIV-1 podczas reakcji *in vitro* może także być związana z warunkami reakcji, które zasadniczo różnią się od środowiska, w jakim enzym ten przeprowadza syntezę ssDNA podczas infekcji. Brak startera tRNA<sup>lys</sup> oraz czynników komórkowych, które mogą współtworzyć kompleks replikacyjny HIV-1 a także kontekst RNA, w jakim została umieszczona sekwencja R w matrycach donorowej i akceptorowej mogą w istotny sposób wpływać na wydajność procesu rekombinacji. Podczas reakcji wydłużania startera z HIV-1 RT i matrycami zawierającymi cały liderowy rejon HIV-1 osiągnięto większą wydajność rekombinacji (do 20%) niż w przypadku samego rejonu R (dane niepublikowane).





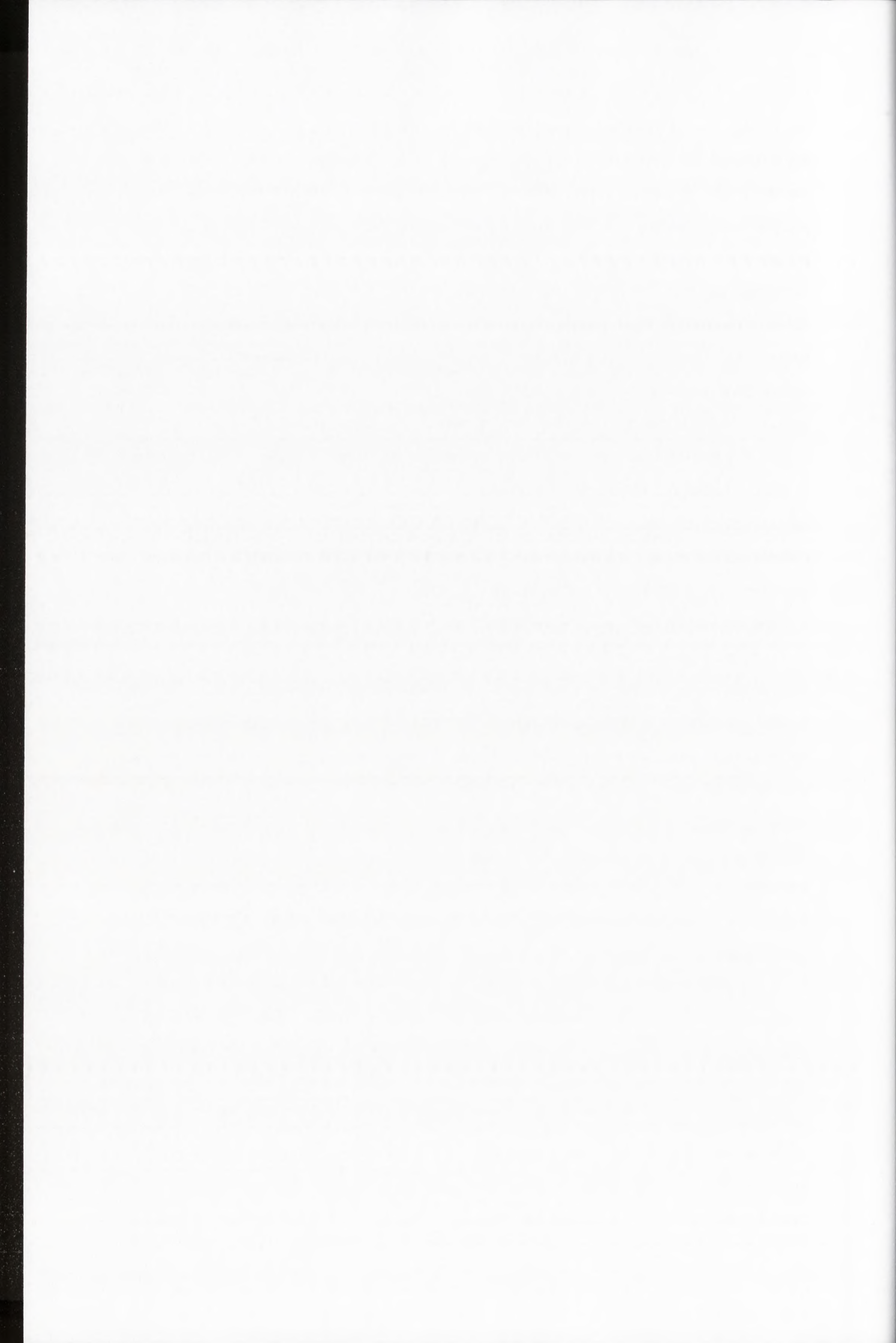
Rozmieszczenie przeskoków rekombinacyjnych wykonywanych przez HIV-1 RT w rejonie R BMV jest nieco inne od rozmieszczenia miejsc przeskoków dokonywanych przez BMV RdRp w tym rejonie (Nagy i Bujarski, 1995). Podczas infekcji *C. quinoa* przeprowadzonej za pomocą BMV w których zamiast RNA3 typu dzikiego użyto wektora rekombinacyjnego zawierającego w 3'UTR rejon R BMV, przeskoki zachodziły głównie w środkowej i końcowej części homologicznego rejonu. Istnieje jednak podobieństwo pomiędzy homologicznymi przeskokami rekombinacyjnymi przeprowadzane przez HIV-1 RT oraz RdRp BMV - słaba aktywność rekombinacyjna w początkowej 3'-końcowej części rejonu homologicznego matrycy i wzmożona w części środkowej i 5' końcowej oraz dokonywanie precyzyjnych homologicznych przeskoków. Podobne spostrzeżenia poczyniono w trakcie badań rekombinacji homologicznej u wirusa HIV-1 wobec fragmentu genu *nef* (Wu i wsp., 1995). Shapka i Nagy zaproponowali wyjaśnienie mechanizmu tego zjawiska, które zostało przez nich zaobserwowane podczas badań aktywności rekombinacyjnej replikazy CNV wobec 69-nukleotydowej sekwencji bogatej w adenylany i urydylany pochodzącej z BMV (Shapka i Nagy, 2004). Sekwencja ta, umieszczona w defektywnym RNA towarzyszącym infekcji TBSV, bardzo wydajnie wspierała homologiczną rekombinację pomiędzy DI RNA w protoplastach *N. benthamiana* zainfekowanych pomocniczym tombuswirusem CNV. Umieszczenie przeskoków w potomnym RNA było jednak odmienne u bromowirusa i tombuswirusa. Ponadto, jedna kopia sekwencji bogatej w pary AU w donorowym DI RNA wywoływała przeskoki RdRp CNV, podczas gdy do zajścia przeskoku u BMV konieczne była obecność sekwencji w cząsteczce donorowej i akceptorowej (Nagy i Bujarski, 1997). Przeskoki rekombinacyjne u bromowirusa w większości były homologiczne, natomiast u tombuswirusa zachodziły głównie przeskoki homologiczne nieprecyzyjne. Autorzy opisanych badań postulują, iż przesunięcie homologicznych przeskoków do końcowej części sekwencji wspólnej dla donora i akceptora oraz stopień precyzji przeskoku świadczy o tym, że bromowirusowe i retrowirusowe kompleksy replikacyjne wymagają do zajścia przeskoku jak najpełniejszego parowania pomiędzy potomną i akceptorową cząsteczką RNA. Natomiast w przypadku innych wirusowych polimeraz, jak CNV RdRp, etap hybrydyzacji potomnego i akceptorowego RNA nie jest istotny, gdyż enzym zdolny jest do kontynuacji syntezy RNA na nowej matrycy bez hybrydyzacji z cząsteczką potomną. Dodatkowo, różne oddziaływania wirusowych kompleksów replikacyjnych z obecnymi w RNA strukturami drugorzędowymi także mogą wpływać



na różne rozmieszczenie miejsc przeskoków rekombinacyjnych. Podczas badań rekombinacji niehomologicznej, prowadzonych *in vitro* z użyciem odwrotnej transkryptazy HIV-1 i matryc RNA zawierających dwie komplementarne sekwencje pochodzące z genomu BMV, również zaobserwowano zmianę położenia miejsc przeskoków rekombinacyjnych w stosunku do położenia miejsc przeskoków niehomologicznych w obrębie tej samej sekwencji u BMV (Figlerowicz & Bibiłło, 2000). Obserwację tę tłumaczono różnicami funkcjonalnymi istniejącymi pomiędzy RdRp BMV i HIV-1 RT, związanymi z różną zdolnością enzymów do rozplatania rejonu dwuniciowego wynikającą z aktywności helikazowej RdRp BMV (Ahlquist i wsp, 1985; Ahola i wsp, 1999; O'Reilly i wsp 1998; Kong i wsp, 1999).

Wyniki odbiegające od opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej otrzymano w trakcie badań rekombinacji odwrotnej transkryptazy HIV-1 z użyciem matryc RNA odpowiadających sekwencjom z 3' i 5' LTR HIV-1 zawierającym rejon R (1/368 donor i 9486/9632 akceptor, liczby podane w nazwach odpowiadają położeniu sekwencji w genomowym RNA). Zaobserwowano wtedy, iż większość przeskoków rekombinacyjnych HIV-1 RT w obrębie rejonu R miała miejsce przed 73 nukleotydem nici potomnej (przed 23 nukleotydem sekwencji HIV-1 donora) (Berkhout i wsp, 2001). Prawdopodobnie różnice w rozmieszczeniu przeskoków rekombinacyjnych podczas reakcji odwrotnej transkrypcji z użyciem matryc zawierających sam rejon R lub rejon R w kontekście całej sekwencji LTR wynikają z faktu, iż otaczający RNA, choć sam bezpośrednio nie uczestniczy w rekombinacji, może na nią wpływać poprzez oddziaływanie z kompleksem replikacyjnym. Wydajność procesu rekombinacji HIV-1 RT wobec matryc zawierających większe fragmenty HIV-1 LTR z rejonem R jest kilkakrotnie wyższa w porównaniu do wydajności przeskoków rekombinacyjnych na matrycach zawierających sam rejon R (dane niepublikowane), co wspiera hipotezę dotyczącą regulatorowego udziału sekwencji LTR w procesie rekombinacji.

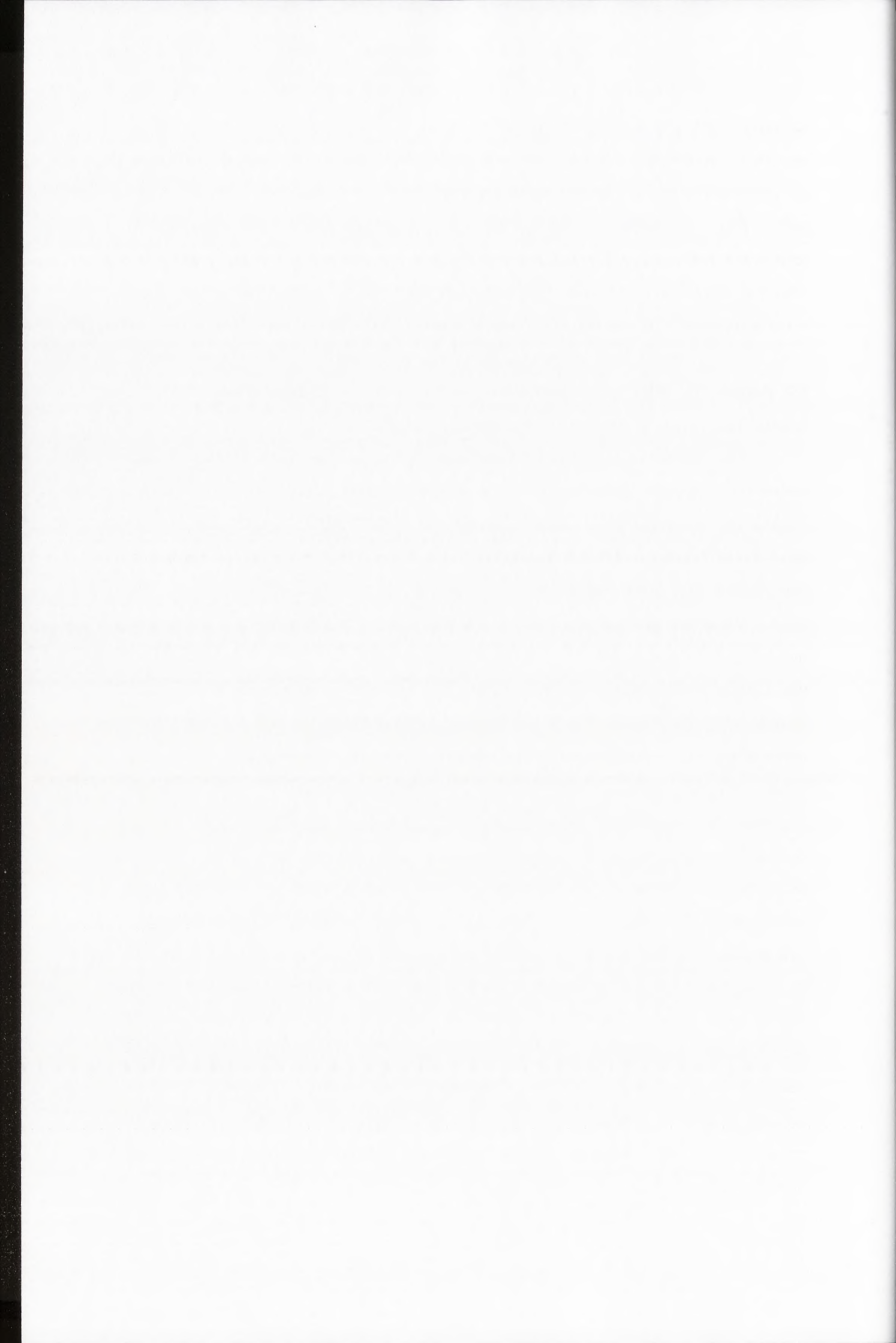
Wyniki otrzymane podczas badań w systemie rekombinacyjnym *in vitro* z wykorzystaniem odwrotnej transkryptazy HIV-1 oraz matryc RNA zawierających rekombinacyjnie aktywne sekwencje HIV-1 i BMV wskazują, iż przeskoki rekombinacyjne zachodzą niezależnie od pochodzenia sekwencji RNA. Czynnikiem warunkującym proces homologicznej rekombinacji jest tworzenie wiązań wodorowych pomiędzy komplementarnymi parami zasad nici potomnej i akceptorowej w przypadku zarówno HIV-1 RT jak i BMV RdRp, o czym świadczy większa liczba przeskoków dokonywanych w 5' końcowym rejonie homologicznej sekwencji, tworzenie



rekombinantów precyzyjnych jak również negatywny wpływ na rekombinację stabilnej struktury typu spinki do włosów na poziomie akceptora, blokującej tworzenie komplementarnych par pomiędzy RNA akceptorowym i nicią potomną (Olsthoorn i wsp., 2002; Berkhout i wsp., 2001). Różna lokalizacja miejsc przeskoków rekombinacyjnych wynika prawdopodobnie ze swoistego oddziaływania enzymu z matrycą a także z sekwencjami oskrzydłającymi fragment RNA uczestniczący aktualnie w rekombinacji.

#### **5.4. Badania homologicznej rekombinacji RNA z wykorzystaniem systemu rekombinacyjnego BMV zawierającego rejon R HIV-1**

Aby porównać aktywność rekombinacyjną replikaz wirusów BMV i HIV-1 wobec rejonu R HIV-1, przeprowadzono eksperyment *in vivo*, polegający na wywołaniu infekcji w *C. quinoa* przy pomocy mutantu MatHIVH-BMV. Mutant ten, zamiast genomowej cząsteczki RNA3 typu dzikiego, posiadał zmodyfikowaną jej pochodną, zawierającą dwie kopie rejonu R HIV-1 oraz szereg dalszych modyfikacji w 3'UTR RNA3. Włączenie do badanej cząsteczki BMV dwóch kopii sekwencji HIV-1 stwarzało możliwość zajścia rekombinacji homologicznej pomiędzy rejonem R5' i rejonem R3' i tym samym utworzenie rekombinanta RNA3, który różniłby się długością od cząsteczki rodzicielskiej. Po stwierdzeniu, iż infekcyjność mutantu MatHIVH-BMV w zakażonych nim roślinach *C. quinoa* nie odbiegała od normy, przeprowadzono analizę potomnego RNA3 powstałego podczas infekcji. Jedynie 14 spośród 40 przeanalizowanych plamek lokalnych powstałych na liściach komosy ryżowej po inokulacji MatHIVH-BMV zawierało wirusa, z czego w czterech obecne były rekombinanty. Rekombinacja pomiędzy cząsteczkami MatHIVH-RNA3 nie zaszła według przewidzianego scenariusza. Zidentyfikowano trzy typy niehomologicznych rekombinantów, zawierających delecje w rejonie 3'UTR RNA3. W pierwszym typie rekombinanta była to delecja rejonu C i B, w drugim typie usunięty był cały rejon B oraz pierwsze 48 nukleotydów rejonu 3'R HIV-1, natomiast trzeci typ rekombinanta nie zawierał ostatnich 119 nukleotydów rejonu B, całego rejonu 3'R HIV-1 oraz pierwszych 115 nukleotydów rejonu A. Zaobserwowane rekombinanty powstały wskutek niehomologicznego przeskoku rekombinacyjnego, pomimo iż wcześniej wykazano, że homologiczne rekombinacja u BMV zachodzi około 10 razy częściej niż niehomologiczna (Nagy i Bujarski, 1992).



Wynik ten, choć zaskakujący, jest zbieżny z wynikiem otrzymanym podczas badań *in vitro* aktywności HIV-1 RT wobec rejonów R HIV-1 i BMV. Rejon R HIV-1 w znacznie mniejszym stopniu wspierał rekombinację odwrotnej transkryptazy HIV-1, niż rejon R BMV (rekombinacja dla rejonu R HIV-1 zachodziła z 7% wydajnością, podczas gdy dla rejonu R BMV - z 32% wydajnością). Najprawdopodobniej struktury typu spinki do włosów obecne w rejonie R HIV-1 akceptorowego RNA3, które są stabilniejsze niż struktury typu spinki do włosów obecne w rejonie R BMV, stanowią blokadę przestrzenną dla RdRp w oddziaływaniach pomiędzy rekombinującymi cząsteczkami BMV i uniemożliwiają przeskok kompleksu replikacyjnego w obrębie tego rejonu. Należy też pamiętać, iż temperatura, w jakiej przeprowadzany był eksperyment (około 20°C), to znaczy podczas infekcji w roślinie, jest znacznie niższa od temperatury stosowanej podczas reakcji wydłużania startera (45°C), co mogło w znaczący sposób wpływać na zwiększenie stabilności struktur drugorzędowych RNA (dla struktury TAR w 45°C  $dG = -21,3$  kcal/mol, podczas gdy w 20°C  $dG = -36,5$  kcal/mol, natomiast dla struktury polyA w 45°C  $dG = -5,3$  kcal/mol, podczas gdy w 20°C  $dG = -11,3$  kcal/mol). Podobne zjawisko zaobserwowano w trakcie opisanych wyżej badań wpływu drugorzędowych struktur RNA na proces homologicznej rekombinacji u BMV (Olsthoorn i wsp., 2002) oraz u HIV-1 (Huthoff i wsp., 2003; Berkhout i wsp., 2001, 2002). Również rejon X pochodzący z wirusa HCV, formujący stabilną strukturę przestrzenną wprowadzony do miejsc RAS wektora Mat0-RNA3 nie pozwalał na zajście homologicznego przeskoku rekombinacyjnego (Alejska i wsp., 2005a) Wprowadzenie do cząsteczki MatHIVH-BMV substytucji destabilizujących struktury typu spinki do włosów obecne w rejonie R HIV-1 rzuciłoby więcej światła na ten problem.

Otrzymane wyniki wskazują, że rejon R HIV-1, w porównaniu z rejonem R BMV, jest o wiele słabszym motywem wspierającym rekombinację, zarówno w przypadku HIV-1 RT jak i BMV RdRp. Potwierdzają jednocześnie tezę mówiącą o blokowaniu procesu homologicznej rekombinacji przez stabilną strukturę typu spinki do włosów obecną w akceptorowym RNA i uniemożliwiającą jego hybrydyzację do nici potomnej RNA. Obserwacja ta może mieć istotny aspekt aplikacyjny – obniżanie częstości homologicznej rekombinacji RNA przez zwiększanie stabilności drugorzędowych struktur występujących w rejonach rekombinacyjnie aktywnych wirusa (np. przez odpowiednio zaprojektowane białka) może zapobiegać szybkiemu

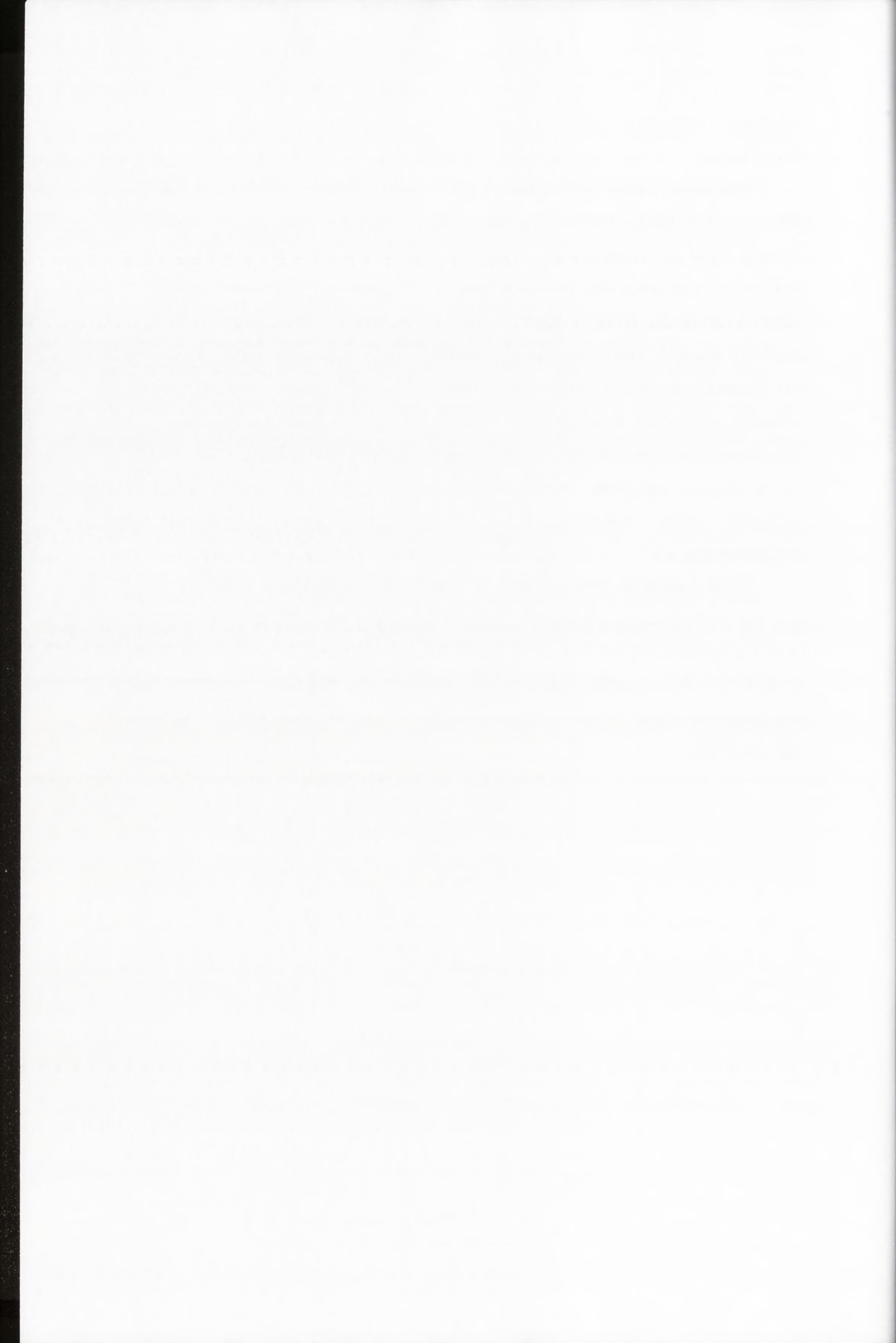




wyłanianiu wariantów wirusa opornych na leki stosowane podczas terapii antywirusowej.

Powstanie niehomologicznych rekombinantów podczas infekcji MatHIVH-BMV można tłumaczyć tendencją wirusa do odtwarzania cząsteczek o sekwencji typu dzikiego, które są faworyzowane przez presję selekcyjną, ze względu na ich lepsze zdolności przystosowawcze. Tendencja ta występowała także podczas wcześniejszych badań rekombinacji RNA u BMV z wykorzystaniem wektora rekombinacyjnego. Ponieważ rejony R HIV-1 obecne w cząsteczce rodzicielskiej MatHIVH-RNA3 nie były zdolne do wspierania homologicznej rekombinacji RNA, jedyną drogą powrotu do sekwencji optymalnej była rekombinacja niehomologiczna. Trudno jest określić czy była to rekombinacja indukowana przez powstanie heterodupleksu, ponieważ rejony 3'UTR dwóch cząsteczek MatHIVH-RNA3, ustawione w przeciwnej orientacji względem siebie wykazują w miejscach przeskoków niewielki stopień komplementarności.

Słabe zdolności przystosowawcze mutantu MatHIVH-BMV mogą również stanowić wytłumaczenie obecności „pustych” plamek nekrotycznych powstałych na liściach zainfekowanej tym mutantem komosy ryżowej. Najprawdopodobniej nie doszło w nich do wytworzenia lepiej przystosowanego rekombinanta, a wirus typu rodzicielskiego został zlikwidowany przez mechanizmy obronne rośliny, takie jak zjawisko RNAi.

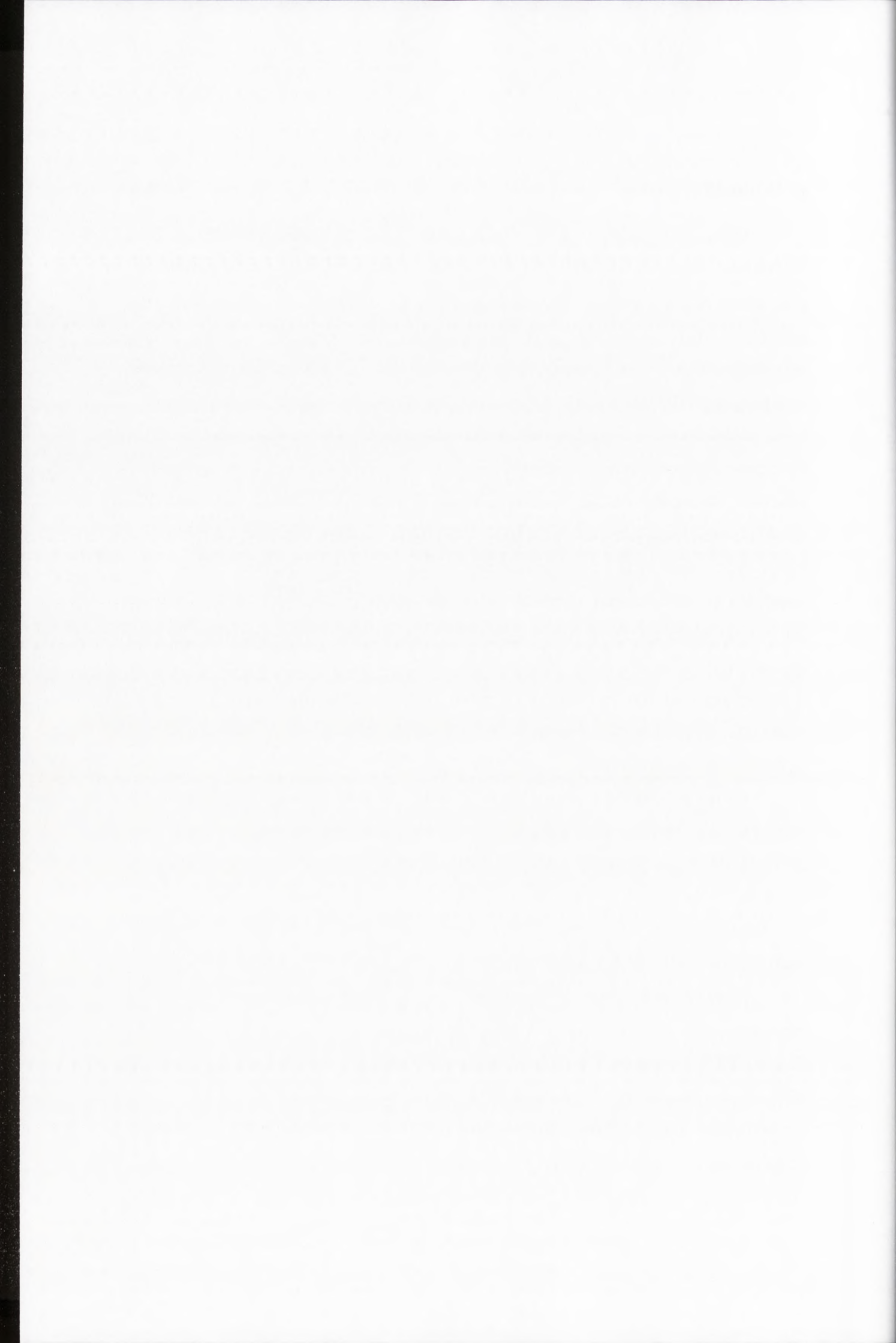


## 6. Wnioski końcowe

Biorąc pod uwagę wszystkie otrzymane w trakcie opisanych badań wyniki, można stwierdzić, że rekombinacja jest nieodłącznym elementem replikacji BMV, i praktycznie każda genomowa cząsteczka tego wirusa syntetyzowana jest w oparciu o co najmniej dwie matryce. Przeprowadzanie homologicznych przeskoków rekombinacyjnych jest najprawdopodobniej jedną z aktywności kompleksu replikacyjnego BMV i zachodzi ze stałą częstością (około 3-9% na 100 nukleotydów), która jednak może być modulowana przez elementy struktury drugorzędowej RNA. Elementy te mogą zarówno wspierać homologiczne przeskoki RNA (subgenomowy promotor, sekwencje bogate w adeninę i uracyl) jak i je hamować (struktura typu spinki do włosów na poziomie akceptora). Funkcja, jaką mógłby odgrywać ten proces w cyklu życiowym wirusa, polega na umożliwieniu wymiany materiału genetycznego pomiędzy poszczególnymi wariantami genomu. Dzięki temu wirus zdolny jest do utrzymania niezmienniej sekwencji genomu i tym samym do uniknięcia efektu tzw. zapadki Mullera, czyli gromadzenia się niekorzystnych mutacji w populacji wirusowej. Rekombinacja homologiczna może nie tylko usuwać mutacje z genomu wirusowego, może także prowadzić do ich kumulowania i zróżnicowania genomu, pod warunkiem iż są one neutralne lub korzystne.

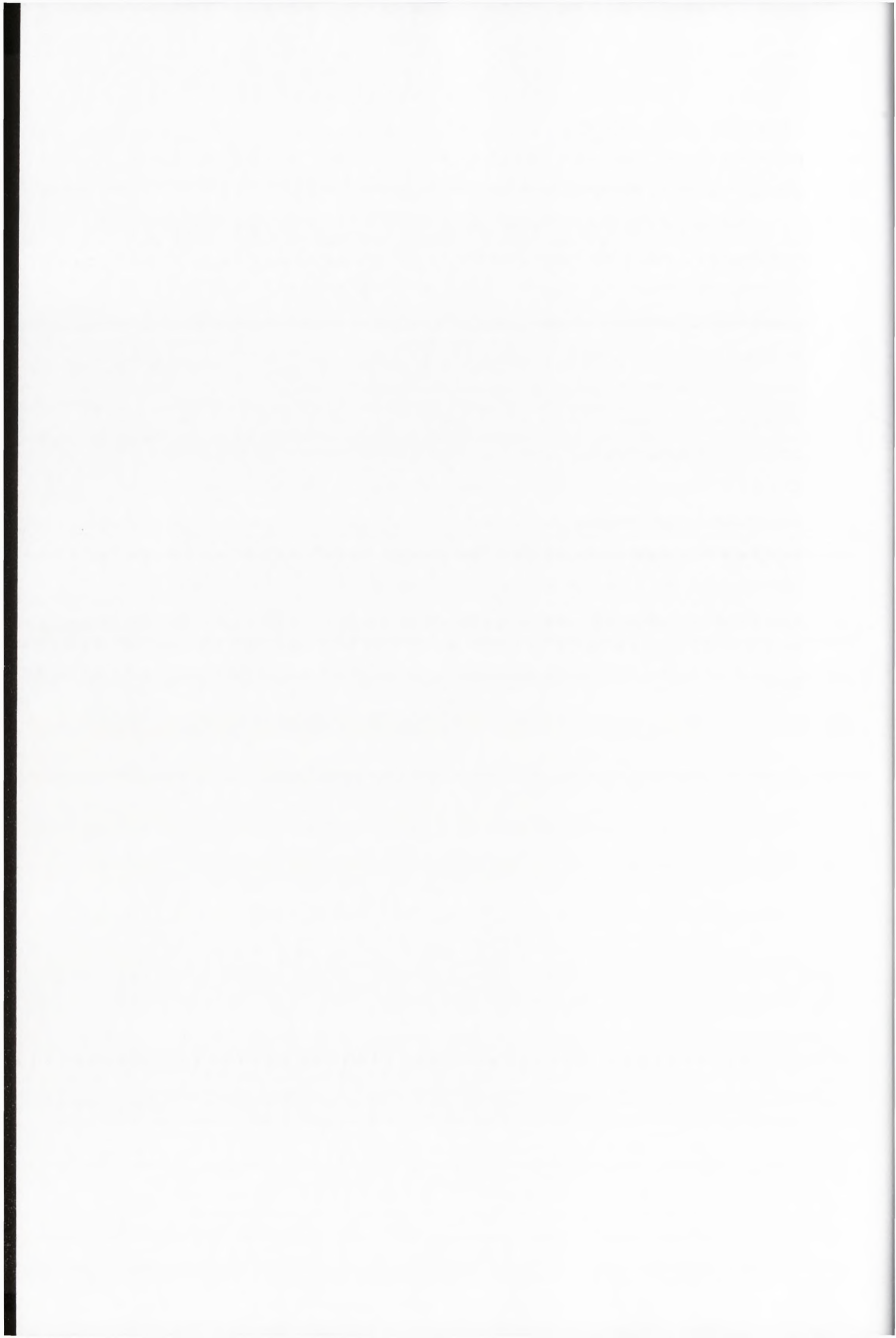
Innym procesem, mogącym wpływać na kształt genomu wirusowego i ewolucję wirusa jest wprowadzanie mutacji punktowych. Działanie tego procesu obserwowano w 5' i 3'UTR genomowych cząsteczek BMV, z których usunięte zostały markerowe mutacje i w ten sposób nastąpił powrót do sekwencji typu dzikiego. Tendencja wirusa do utrzymania stałej sekwencji UTR związana jest z obecnością licznych sygnałów ważnych dla cyklu replikacyjnego wirusa.

Podwyższona częstości rekombinacji w rejonie międzygenowym RNA3 zapoczątkowała rozważania na temat mechanizmu powstawania genomowej cząsteczki RNA3 BMV. Zaproponowano, że wskutek obecności w rejonie międzygenowym (-)RNA3 sekwencji polyU oraz subgenomowego promotora, podczas syntezy RNA może dochodzić do dysocjacji kompleksu replikacyjnego i powstania nie znanej wcześniej subgenomowej cząsteczki RNA5, którą zidentyfikowano w zakażonych roślinach. Natomiast synteza pełnej długości RNA3 może być kontynuowana, gdy kompleks



replikacyjny BMV związany z RNA5 podejmie dalszą syntezę z subgenomowego promotora tej samej bądź innej cząsteczki (-)RNA3. Pełnej długości RNA3 BMV może więc powstawać na dwa sposoby: wskutek ciągłej lub nieciągłej syntezy.

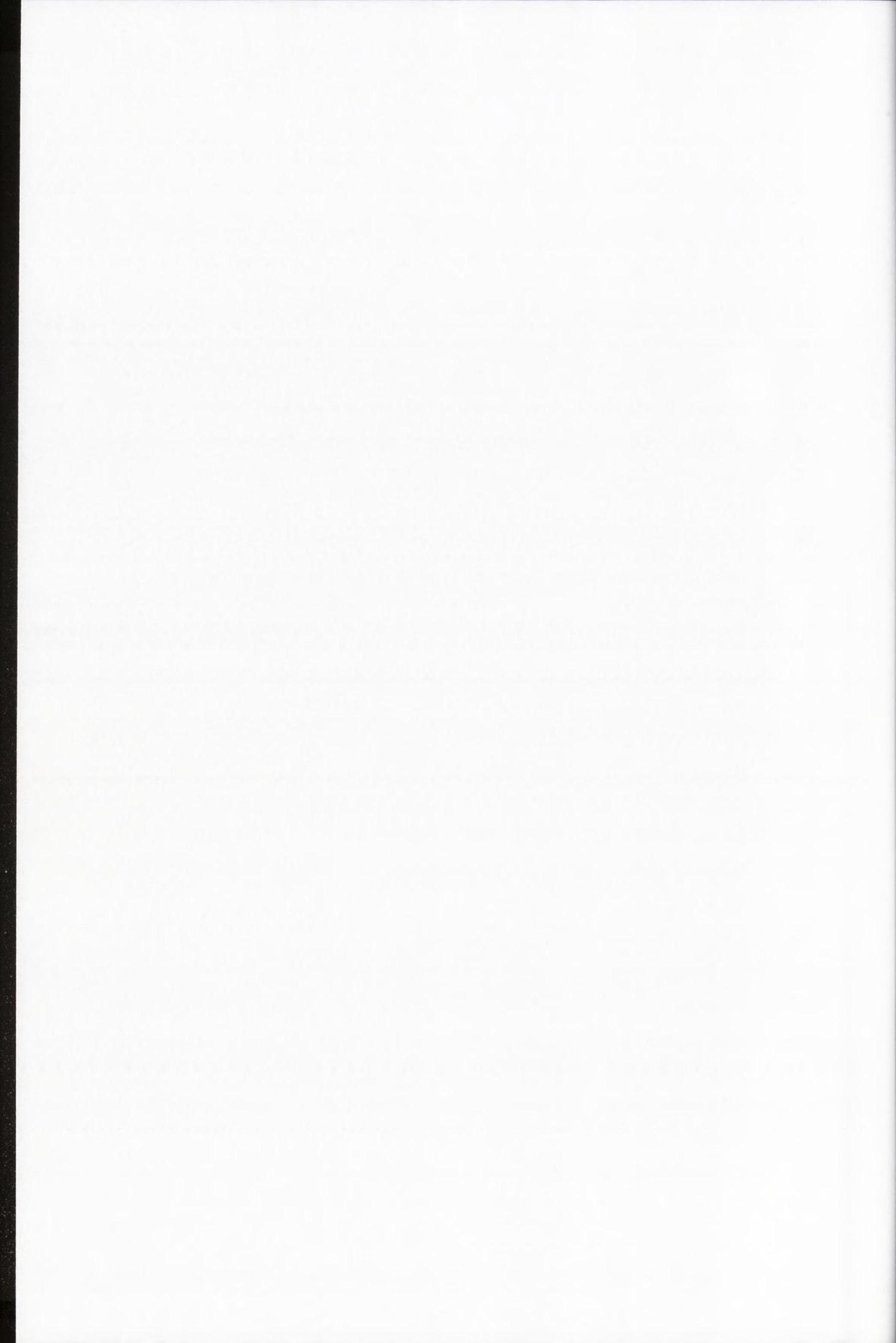
Sekwencja aktywna rekombinacyjnie z 3'UTR RNA2 BMV (rejon R) wspierała homologiczne przeskoki rekombinacyjne odwrotnej transkryptazy HIV-1. To spostrzeżenie łącznie z innymi doniesieniami literaturowymi, wskazują na uniwersalność sekwencji wspierających rekombinację pomiędzy różnymi, nawet niespokrewnionymi wirusami. Należy jednak pamiętać, iż każda wirusowa replikaza oddziałuje z sekwencją RNA w sposób specyficzny, co odzwierciedlone jest w różnym rozmieszczeniu miejsc przeskoków rekombinacyjnych. Parowanie pomiędzy cząsteczkami potomnego i akceptorowego RNA prawdopodobnie jest dla BMV RdRp i HIV-1 RT bardzo ważnym elementem homologicznego przeskoku rekombinacyjnego. Zaburzenie tego parowania przez stabilną strukturę typu spinki do włosów w cząsteczce akceptorowej negatywnie wpływa na częstość homologicznych przeskoków rekombinacyjnych, co prawdopodobnie jest przyczyną słabej aktywności rekombinacyjnej HIV-1 RT oraz braku tej aktywności w przypadku BMV RdRp w obrębie 97-nt rejonu R HIV1 umieszczonego w wektorze rekombinacyjnym RNA3 BMV.



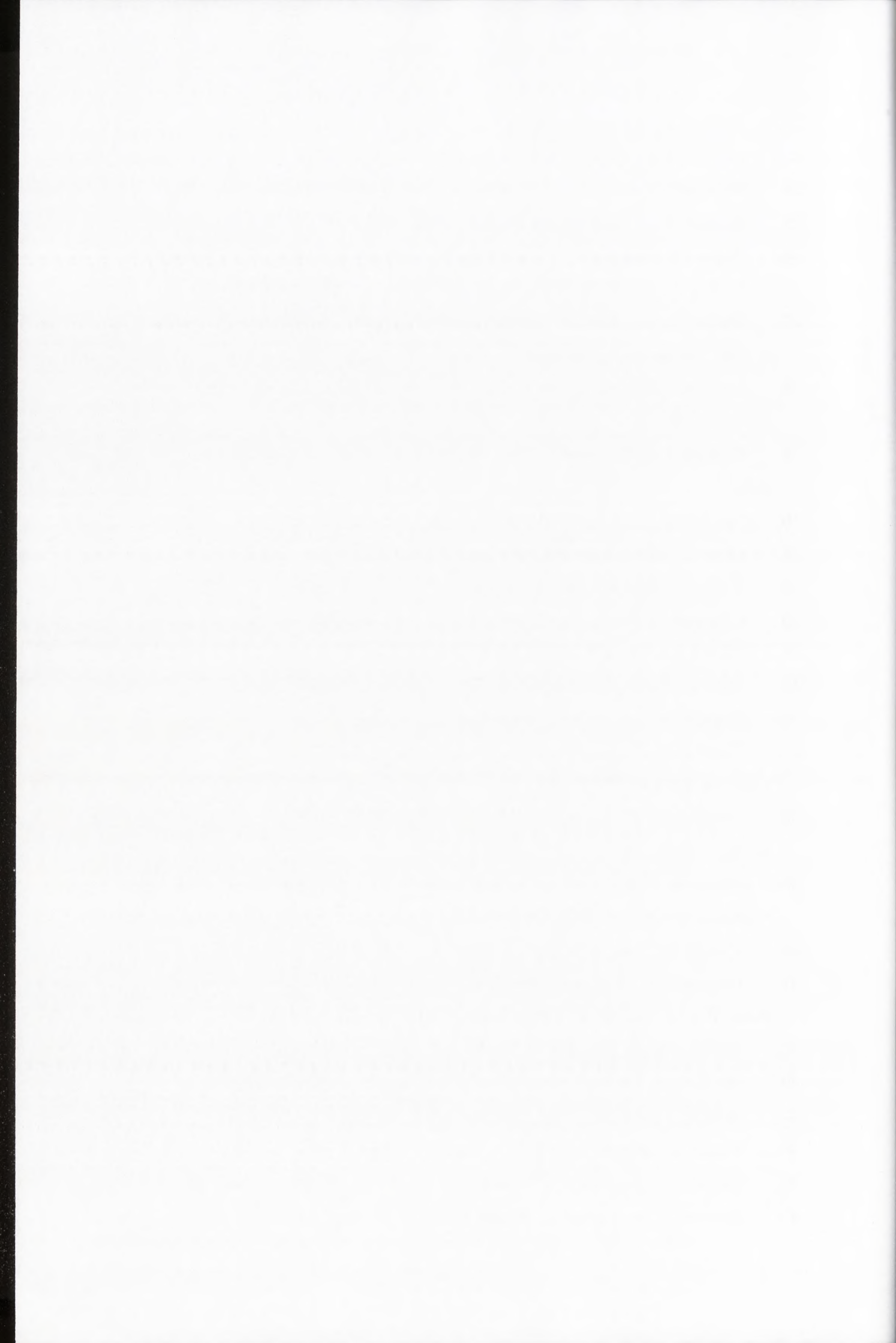
## 7. Bibliografia

1. Aaziz R. i Tepfer M. 1999. *J. Gen. Virol.* 80: 1339 – 1346.
2. Ahlquist P. 1985. *Curr. Opin. in Genet. Dev.* 2: 71 – 76.
3. Ahlquist P., Dasgupta R. i Kaesberg P. 1984a. *J. Mol. Biol.* 172: 369 – 383.
4. Ahlquist P., French R., Janda M. i Loesch-Fries L. S. 1984b, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 7066 – 7070.
5. Ahlquist P. i Janda M. 1984c. *Mol. Cell. Biol.* 4: 2876 – 2882,
6. Ahlquist P., Luckov V. i Kaesberg P. 1981. *J. Mol. Biol.* 153: 23 – 38.
7. Ahlquist P., Strauss E.G., Rice C. M., Haseloff J. i Zimmern D. 1985. *J. Virol.* 53: 536 – 542.
8. Ahola T. i Ahlquist P. 1999. *J. Virol.* 73: 10061 – 10069.
9. Alain B., Rascle J. B., de Rockuigny H., Roques B. i Darlix J. L. 1998. *J. Mol. Biol.* 277: 225 – 235.
10. Alejska M., Figlerowicz M., Malinowska N., Urbanowicz A. i Figlerowicz M. 2005a. *Nucl. Acids Res.* 33: e103; doi:10.1093/nar/gni105 (opublikowane *online*).
11. Alejska M., Malinowska N., Urbanowicz A. i Figlerowicz M. 2005b. *Acta Bioch. Pol.* 1072, oddane do druku.
12. Ball L. A. 1997. *Sem. Virol.* 8: 95 – 100.
13. Bancroft J. B., Hills G. J. i Markham R. 1967. *Virology* 31: 354 – 379.
14. Beelman C. A i Parker R. 1995. *Cell* 81: 179 - 183.
15. Berkhout B., Ooms M., Beerens N., Huthoff H., Southern E. i Verhoef K. 2002. *J. Biol. Chem.* 277: 19967 – 19975.
16. Berkhout B., Vastenhouw N. L., Klasens B. I. F. i Huthoff H. 2001. *RNA* 7: 1097 – 1114.
17. Bibiřto A. i Eickbush T. H. 2002. *J. Mol. Biol.* 316: 459 - 473.
18. Blight K. J. I Rice C. M. 1997. *J. Virol.* 71: 7345 – 7352.
19. Borja M., Rubio T., Scholthof H. B. i Jackson A. O. 1999. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12: 153-162.
20. Bruyere A., Wantroba M., Flasiński S., Dzianott A. i Bujarski J. J. 2000. *J. Virol.* 74: 4214–4219.
21. Bujarski J. J. i Dzianott A. M. 1991. *J. Virol* 65: 4153 – 4157.





22. Bujarski J. J. i Kaesberg P. 1986. *Nature* 321: 528 – 531.
23. Bujarski J. J. i Nagy P. D. 1994. *Arch. Virol.* 9: 231 – 238.
24. Bujarski J. J., Nagy P. D. i Flasiński S. 1994. *Adv. Vir. Res.* 43: 275 – 302.
25. Bujarski J. J. i Nagy P. D. 1996. *Sem. Vir.* 7: 363 – 372.
26. Buzdin A., Gogvadze E., Kovalskaya E., Volchkov P., Ustyugova S., Illarionova A., Fushan A., Vinogradova T. i Sverdlov E. *Nuc. Ac. Res.* 31: 4385 - 4390.
27. Buzdin A., Ustyugova S., Govardze E., Vinogradova T., Lebedev Y. i Sverdlov E. 2002. *Genomics* 80: 402 - 406.
28. Carrington J. C., Kasschau K. D., Mahajan S. K. i Schaad M. C. 1996. *Plant Cell* 8: 1669 – 1681.
29. Cascone P. J., Carpenter C. D., Li X. H. i Simon A. E. 1990. *EMBO J.* 9: 1709 – 1715.
30. Cascone P. J., Haydar T. F. i Simon A. E. 1993. *Science* 9: 1709 – 1715.
31. Chao L. 1990. *Nature* 348: 454-455.
32. Chao L. 1997. *Gene* 205: 301 – 308.
33. Chapman M. R. i Kao C. C. 1999. *J. Mol. Biol.* 286: 709 – 720.
34. Chen J. i Ahlquist P. 2000. *J. Virol.* 74: 4310 – 4318.
35. Chen J., Noueir A. i Ahlquist P. 2001. *J. Virol.* 75: 3207 – 3219.
36. Cheng C. i Nagy P. D. 2003. *J. Virol.* 77: 12033 – 12047.
37. Cheslock S. R., Anderson J. A., Hwang C. K., Pathak V. K. i Hu W. S. 2000. *J. Virol.* 74: 9571 – 9579.
38. Chetverin A. B., Chetverina H. V., Demidenko A. A. i Ugarov V. I. 1997. *Cell* 88: 503 – 513.
39. Chetverin A. B., Kopein D. S., Chetverina H. V., Demidenko A. A. i Ugerov V. I. 2005. *J. Biol. Chem.* 280: 8748 – 8755.
40. Choi Y. G. i Rao. A. L. 2003. *J. Virol.* 77: 9750 – 9757.
41. Chrucher M J., Lamont C., Hamy F., Dingwall C., Green S. M., Lowe A. D., Butler P. J. G., Gait M. J. i Karn J. 1993. *J. Mol. Biol.* 230: 90 - 93.
42. Coffin J. M. 1979. *J. Gen. Virol.* 32: 337 – 362.
43. den Boon J., Chen J. i Ahlquist P. 2001. *J. Virol.* 75: 12370 – 12381.
44. Deng L. i Shuman S. 1997. *Biochemistry* 36: 15892 – 15899.
45. Dinant S., Janda M., Kroner P. i Ahlquist P. 1993. *J. Virol.* 67: 7181 – 7189.
46. Dolja V. V., Karasev A. V. i Koonin E. V. 1994. *Ann. Rev. Phyt.* 32: 261 – 285.
47. Domingo E. 1992. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2: 61-63.



48. Domingo E. i Holland J. J. 1997. *Ann. Rev. Microbiol.* 51: 151-178.
49. Drake J. W. i Holland J. J. 1999. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 13910 – 13913.
50. Dreher T. W i Hall T. C. 1988. *J. Mol. Biol.* 201: 41-55.
51. Dreher T. W., Rao A. L. i Hall. T. C. 1989. *J. Mol. Biol.* 206: 425 – 438.
52. Dressler D. i Potter H. 1982. *Ann. Rev. Biochem.* 51: 727 – 761.
53. Eckerle L. D. I Ball L. A. 2002. *Virology* 296: 165-176.
54. Eigen M. i Schuster P. 1977. *Naturwissenschaften.* 64: 541 - 565.
55. Eigen M., McCaskill J. i Schuster P. 1988. *J. Phys. Chem.* 92: 6881 - 6891.
56. Figlerowicz M., Nagy P. D. i Bujarski J. J. 1997. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 2073 – 2078.
57. Figlerowicz M., Nagy P. D., Tang N., Kao C. C. i Bujarski J. J. 1998. *J. Virol.* 72: 9192 - 9200.
58. Figlerowicz M. 2000. *Nucl. Ac. Res.* 28: 1714 -1723, 2000.
59. French R. i Ahlquist P. 1988. *J. Virol.* 62: 2411 – 2420.
60. Fujita M., Mise K., Kajiura Y., Dohi K. i Furusawa I. 1998. *J. Gen. Virol.* 79: 1273 – 1280.
61. Fujita M., Mise K., Kajiura Y., Dohi K. i Furusawa I. 1996. 6. *Virology.* 223: 283 –291.
62. Gait M. J. i Karn J. 1993. *Trends Biochem. Sci.* 18: 255 - 260
63. Gal S., Pisan B., Hohn T., Grimsey N. i Hohn B. 1992. *Virology*, 187: 525-533.
64. Gallei A., Pankraz A., Thiel H. J. i Becher P. 2004. *J. Virol.* 78: 6271-81.
65. Glickman B. W., Saddi V. A. i Curry J. 1994. *Mutat. Res.*, 304: 19-32.
66. Gmyl A. P., Horshenko S. A., Belousov E. V. i Khitrina E. V. 2003. *RNA* 9: 1221 – 1231.
67. Götte M., Li X. i Wainberg M. A. 1999. *Arch. Bioch and Bioph.* 365: 199 – 210.
68. Grdzlishvili V. Z., Garcia-Ruiz Hernan, Watanabe T. I Ahlquist P. 2005. *J. Virol.* 79: 1438 – 1451.
69. Greene A. E. i Allison R. F. 1994. *Science* 263: 1423-1425.
70. Greene A. E. i Allison R. F. 1996. *Virology* 225: 231-234.
71. Hardy S. F., German T. L., Loesch-Fries L. S. i Hall T. C. 1979. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4956 – 4960.
72. Hausmann S., Jacques J. P. i Kolakofsky D. 1996. *RNA* 2: 1033 – 1045.

