

VIRÁLIS RNS SILENCING SZUPRESSZOROK MŰKÖDÉSI MECHHANIZMUSAI



DR. LAKATOS LÓRÁNT

**SZTE ÁOK BŐRGYÓGYÁSZATI ÉS ALLERGOLÓGIAI
KILNIKA**

2017

Összefoglaló

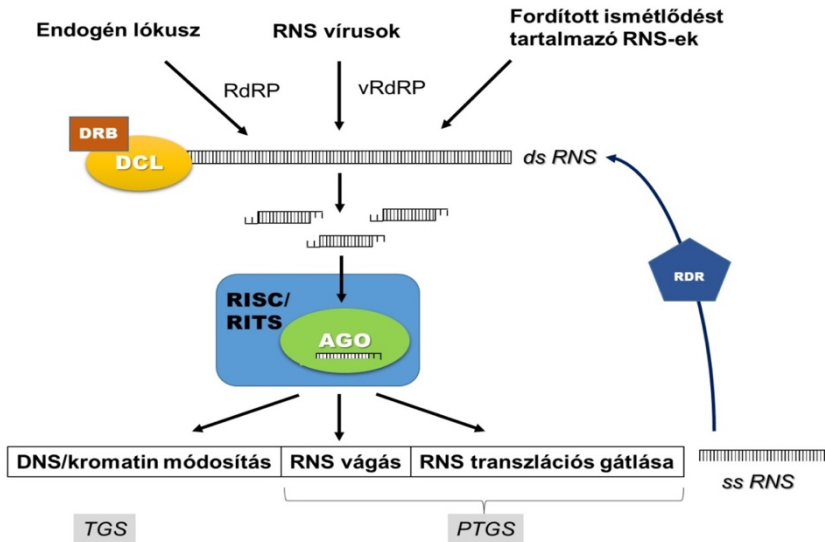
Lakatos Lóránt

TARTALOMJEGYZÉK.....	2
BEVEZETÉS.....	3
CÉLKITŰZÉSEK.....	6
EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS.....	7
TUDOMÁNYMETRIAI ADATOK	14
AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA	15
A DOLGOZAT TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA.....	17

BEVEZETÉS

Az immunrendszer feladata az élőlények épségének megőrzése, amit a szervezet steady-state állapotának fenntartásaként is lehet értelmezni. Működésének alapja a saját és idegen megkülönböztetése, aminek segítségével az immunrendszer a szervezet működésére veszélyes élőlényeket, molekulákat elszigeteli és/vagy megsemmisíti. A virális fertőzés az állati és a növényi szervezetekben egyaránt veleszületett és adaptív immunválaszt vált ki.

Az RNS silencing egy, a legtöbb eukariótára jellemző dupla szálú (ds) RNS-ek által indukált szekvenciaspecifikus, génexpressziót szabályozó rendszer, mely transzkripcionális (transzkripcionális géncsendesítés, TGS) vagy poszttranszkripcionális (poszttranszkripcionális géncsendesítés, PTGS) szinten hat. A folyamat alapvetően két fő szakaszra osztható. Az első, iniciációs szakaszban az exogén



1. ábra. Az RNS silencing általános modellje

Lakatos Lóránt

vagy endogén hosszú dsRNS-eket a silencing RNáz III típusú endonukleáz komponensei ismerik fel, majd 20-26 nukleotid (nt) hosszúságú rövid, ún. kis RNS-ekre vágják fel azokat (*dicing*). A kis RNS-ek ekkor dupla szálúak (ds), 5' végük foszforilált és mindkét végükön 2 nt hosszúságú 3' túlnyúló véggel rendelkeznek. A második, végrehajtó szakaszban a kis RNS-ek egyik szála az Argonaute (AGO) fehérjék egyikébe épül be, mely része egy nagy molekulatömegű silencing effektor komplexnek (*RNA Induced Silencing Complex*: RISC, vagy *RNA-induced Transcriptional Gene Silencing Complex*: RITS). Ezek a komplexek a beépült kis RNS szekvenciájával komplementer RNS- vagy DNS szakasz transzlációjának, vagy transzkripciójának gátlását indukálják (1. ábra).

Az antivirális silencing

A vírusok replikációja és transzkripciója során keletkező RNS-ek antiszensz orientációjuk miatt, vagy mert másodlagos szerkezetükben nyél-hurok struktúrák alakulnak ki ds régiókat tartalmaznak. Ez lehetővé teszi, hogy az RNS silencing antivirális funkciót is betöltsön. Növényekben az antivirális silencing a vírusok elleni védekezés legfontosabb pillére. Feltételezhető, hogy a relatíve nagyszámú DCL és AGO a virágos növényekben az RNS silencing vírusellenes funkcióját tükrözi. Az antivirális silencing növényekben nem sejt-autonóm. Az elsődleges vsiRNS-ek 10-15 sejtsornyi terjedésre képesek a plazmodezmákon keresztül, ez egy rövid távú szignált jelent. A szupresszor fehérjét nem kódoló vírusok, melyek nem képesek megakadályozni a kis RNS-ek terjedését, a szomszédos sejtekbe lépve már felépült antivirális RISC-ekkel találják szembe magukat, így a fertőzés gyorsan visszaszorul és a növény kigyógyul.

Növényekben elsősorban az AGO1, másodsorban pedig az AGO2 tölt be antivirális funkciót.

Lakatos Lóránt

Az antivirális silencing nagyon hatékony, ezért az erős szelekciós nyomás hatására az egyes víruscsoportok eltérő eredetű, de sokszor nagyon hasonló hatásmechanizmusú ún. silencing szupresszorokat kódolnak (*viral suppressor of RNA silencing*, VSR). Napjainkig több, mint 100 vírus szupresszorát azonosították, melyek számos - különböző stratégiát alkalmazva – más-más ponton gátolják az antivirális silencinget növényekben, állatokban és gombákban.

Az RNS silencing-et a virális silencing szupresszorok többféleképpen képesek gátolni. Gátolhatják az iniciáció lépését (kis RNS képzés), megköthetik, ezáltal semlegesíthetik a kis RNS-eket, megakadályozhatják a RISC kialakulását az Argonaute fehérje degradációjának indukálásával, vagy gátolhatják magát az aktív RISC-et is.

Lakatos Lóránt

CÉLKITÚZÉS

1. A *Cymbidium ringspot virus* p19 szupresszor vizsgálata
2. Egységes *in vitro* és *in vivo* rendszer kialakítása a virális silencing szupresszorok vizsgálatára
3. A ds kis RNS-kötő silencing szupresszorok hatása a kis RNS-ek metilációjára
4. A *Sweet potato mild mottle virus* P1 silencing szupresszor működési mechanizmusának felderítése
5. Az *Sweet potato feathery mottle virus* P1 fehérje vizsgálata, az első mesterséges silencing szupresszor létrehozása

EREDMÉNYEK és ÉRTÉKELÉS

Célkitűzések alapján elvégzett vizsgálataink főbb eredményei a következők:

1. A *Cymbidium ringspot virus* p19 szupresszorának vizsgálata

A *Drosophila* 2 órás embrió extraktumból készített ún. transzlációs extraktum mind dsRNS-sel, mind siRNS-sel programozható és szekvenciaspecifikus RNS silencing kiváltására alkalmas. Elsőként alkalmazva a heterológ *Drosophila in vitro* rendszert bebizonyítottuk, hogy a *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV) p19 fehérjéje hatékonyan gátolja a dsRNS és a siRNS indukálta RNS silencing-et, azonban az egyszálú siRNS-sel indukált silencing gátlására nem alkalmas. Továbbá megállapítottuk, hogy a p19 koncentráció függő módon gátolja a siRNS indukálta RNS silencing-et.

A p19 *in vitro* siRNS-kötő tulajdonsága alapján azt a hipotézist állítottuk fel, hogy a p19 virális silencing szupresszor (VSR) aktivitása *in vivo* siRNS kötésen alapul. Elsőként alkalmazva az immunoprecipitáción alapuló *in vivo* megközelítést megállapítottuk, hogy a CymRSV-vel fertőzött növényekben a virális kis RNS-ek szinte kizárólag p19 fehérjével kötött állapotban találhatóak. *In vivo* eredményeinkkel megerősítettük azt, hogy a p19 koncentráció függő módon gátolja a siRNS indukálta RNS silencing-et. Munkánk eredményeként elsőként tettünk javaslatot egy virális RNS silencing szupresszor működési mechanizmusára. A vírust aktívan replikáló szövetekben a p19 szinte az összes virális siRNS-t megkötésével akadályozza meg a virális siRNS-ekkel felépülő RISC-ek és az antivirális válasz kialakulását is (Lakatos et al., 2004).

2. Egységes *in vitro* és *in vivo* rendszer kialakítása a virális silencing szupresszorok vizsgálatára

Munkánk során megvizsgáltuk a *Carnation italian ringspot virus* (CIRV) p19, a *Tobacco etch virus* (TEV) HC-Pro, a *Beet yellows virus* (BYV) p21 és a *Rice hoja blanca virus* NS3 fehérjéinek hatását a siRNS indukálta RNS silencing-re.

Az általunk kialakított *in vitro* rendszerben a vizsgálandó VSR fehérjét bakteriális vagy növényi rendszerben termeltettük, izoláltuk, majd aktivitását a *Drosophila in vitro* rendszerben vizsgáltuk meg. A kísérletek során két beállítást használtunk, az ún. direkt kompetitív körülmény a RISC kialakulását, az ún. indirekt kompetitív kísérleti megközelítés az aktív RISC-et modellezi. A direkt kompetitív rendszerben a siRNS-t, a szupresszor fehérjét és a target RNS-t egy időben adtuk az fehérjekivonathoz, míg az indirekt rendszerben a siRNS hozzáadásával indukáltuk az RNS silencing-et, majd 20 perc után adtuk hozzá a szupresszor fehérjét és a target RNS-t. A VSR fehérjét növekvő koncentrációban alkalmaztuk. Ebben a rendszerben a VSR aktivitás fordítottan arányos az elhasított target RNS mennyiségével. Eredményeink azt mutatták, hogy az általunk vizsgált VSR-ek hatékonyan gátolták a target RNS vágást a direkt kompetitív kísérletben, míg az indirekt kompetitív rendszerben nem detektáltunk VSR aktivitást. Tudva azt, hogy a CIRV p19 egy siRNS kötő fehérje eredményeinkből arra következtettünk, hogy a HC-Pro, P21, NS3 fehérjék is siRNS kötő aktivitással rendelkeznek.

A *Drosophila* RNS silencing rendszerben a köztes RNS silencing komplexek és a RISC kialakulása EMSA vizsgálattal nyomon követhető. Eredményeink szerint a p19 a HC-Pro, a p21 és az NS3 fehérjék dózisfüggő módon gátolták mind a három silencing komplex kialakulását a direkt kompetitív rendszerben, ezzel szemben az indirekt kompetitív rendszerben a VSR koncentráció növekedésével csak a ds siRNS-DICER2-R2D2 komplex koncentrációja csökkent, a RISC és az RLC koncentrációja nem változott. Eredményeink azt mutatják, hogy a ds siRNS-kötő képességgel

Lakatos Lóránt

rendelkező VSR-ek az RNS silencing iniciációjában szerepet játszó ds siRNS-kötő komplex kialakulását gátolják. Amennyiben a bizonyosan egyszálú siRNS-t tartalmazó RISC már kialakult, a vizsgált VSR-ek már nem képesek beleavatkozni az RNS silencing folyamatába.

In vitro vizsgálatainkat szeretnénk volna *in vivo* eredményekkel is alátámasztani, ezért létrehoztunk két *in vivo* rendszert, amivel vizsgálni lehet a silencing szupresszorok hatását a si- és a miRNS indukálta aktív RISC-ekre.

Virális siRNS-eket *in planta* tartalmazó RISC-eket úgy állítottunk elő, hogy a *N. benthamiana* növényeket Cym19stop vírussal fertőztük. A miRNS indukálta aktív RISC-ek vizsgálatához azt vettük alapul, hogy a miR-171 a *N. benthamiana* kifejlődött leveleiben már nem íródik át, nem alakít ki *de novo* RISC komplexeket. Ezért kifejlett leveleiben található RISC-ek kizárólag aktív RISC-nek tekinthetőek. Az aktivitás méréséhez olyan GFP alapú riporter géneket használtunk, amelyek 3' vége egy 200 bp-os CymRSV régiót, vagy a miR-171 felismerőhelyét tartalmazta. Eredményeink azt mutatták, hogy a CIRV P19, TEV HC-Pro és BYV p21 fehérjék kis RNS-kötő tulajdonsággal bírnak *in vivo*. Kis RNS-kötő tulajdonságuk lehetővé teszi a RISC felépülésének gátlását, ami a virális RNS szekvenciaspecifikus degradációjának gátlásához vezet. A ds kis RNS-kötő silencing szupresszorok nem képesek az egyszálú kis RNS-t tartalmazó aktív RISC komplexek gátlására (Lakatos et al., 2006) (Hemmes et al., 2007).

3. A ds kis RNS-kötő silencing szupresszorok hatása a kis RNS-ek metilációjára

Az *A. thaliana* hen1 (Hua ENhancer) mutáns növények fenotípusa rendkívül nagy hasonlóságot mutatott a miRNS silencing-ben résztvevő génekben mutáns növényekével. A HEN1 gén egy RNS metil-transzferáz gént kódol, ami a kis RNS-ek 3'-végének metilációját végzi. HEN1 függő metiláció hiányában a kis RNS-ek poliuridilálódnak és lebomlanak. Azt a kérdést tettük fel, vajon a citoplazmában replikálódó

CIRV és TEV fertőzés során a ds siRNS kötő CIRV p19 és a TEV HC-Pro hogyan befolyásolja a virális siRNS-esek és a miRNS-ek metilációját.

A fertőzött növények analízise után megállítottuk, hogy a virális kis RNS-ek 100 %-ban metiláltak, és a citoplazmában találhatóak. A TEV siRNS-ek metilációját a kis RNS-ek 3'-végét kötő HC-Pro megakadályozza, de a CIRV19stop-ból származó metilált virális siRNS-ek kimutatásával egy citoplazmában lévő metiltranszferáz aktivitást mutattunk ki indirekt módon. A CIRV19stoppal fertőzött növényekben az általunk vizsgált miRNS-ek akár a sejtmagban, akár a citoplazmában lokalizálódtak és teljes mértékben metilálódnak bizonyultak. Ezek a kísérleteink nem tudtak válasz adni arra, hogy a sejtmagban lévő miRNS-ek metilációja hol következett be. Ugyanakkor a TEV HC-Pro-val kapcsolatos eredményeink arra engednek következtetni, hogy a miRNS-ek egy része és a virális siRNS-ek a citoplazmában metilálódnak (Lózsa et al., 2008)

4. A *Sweet potato mild mottle virus* P1 silencing szupresszor működési mechanizmusának felderítése

A potyvírusok családjába (*Potyviridae*) és az *Ipomovirus* nemzetségbe tartozó *Sweet potato mild mottle virus* SPMMV silencing szupresszoraként a P1 fehérjét azonosítottuk. Eredményeink szerint az SPMMV P1 nem az RNS silencing iniciációs lépésénél hat, ezért megvizsgáltuk azt, hogy képes-e a végrehajtó lépést gátolni. Korábbi munkánk során kidolgoztuk egy *in vivo* módszert, aminek segítségével megvizsgálható, hogy egy adott RNS silencing szupresszor gátolja-e az aktív RISC komplexet (végrehajtó lépés). Eredményeink azt mutatták, hogy a P1 fehérje hatékonyan gátolta a virális siRNS-sel és a miRNS-sel aktív RISC komplexeket egyaránt. Továbbá igazoltuk, hogy az SPMMV P1 A RISC komplex központi molekulájához az ún. Argonaute 1 (AGO1) fehérjéhez kapcsolódva fejt ki gátló hatását. A silencing szupresszióért felelős domént a P1 fehérje N-terminális 210 aminosav hosszúságú régiójára térképeztük.

További munkánk során három ún. WG/GW doménhez hasonló aminosav szekvencia motívumot azonosítottunk az SPMMV P1 fehérje N-terminális régiójában. Mutációs analízissel bebizonyítottuk, hogy a három WG/GW domén közül legalább kettő szükséges az AGO1 kötéshez és a silencing szupresszor aktivitáshoz. A WG/GW domént, mint az AGO kötéshez elengedhetetlenül szükséges szekvencia motívumot, a *S. pombe* TAS3 és a humán GW182 fehérjékben azonosították először. A TAS3 a sejtmagi heterokromatin silencing, a GW182 pedig a citoplazmás lokalizációjú miRNS indukálta RNS silencing esszenciális fehérjéje. Ezen kívül több növény WG/GW fehérjét is azonosítottak. Érdekes módon az addig ismert WG/GW fehérjék közül a SPMMV P1 volt az első, ami negatív hatással volt az RNS silencing működésére.

Megállapítottuk, hogy az SPMMV P1 WG/GW doménje felelős a silencing szupresszor aktivitásért és az AGO1 kötésért. Ezzel szemben eredményeink azt mutatják, hogy a silencing szupresszor funkcióval nem rendelkező cink finger mutáns P1 képes az AGO1 fehérjét megkötni. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az SPMMV P1 fehérjében az aktivitásért és az AGO1 kötésért felelős régiók nem ugyanazon a domének doménen helyezkednek el. Így a cink finger domén a P1 fehérje effektor doménjének tekinthető.

Továbbá megállapítottuk, hogy a P1 az AGO2-t nem, de AGO1 működését hatékonyan gátolja. Vad típusú és mutáns AGO1 és P1 fehérjéket alkalmazva RNS immunoprecipitációval kimutattuk, hogy a P1 fehérje az AGO1-hez kapcsolódva megakadályozza a target RNS kapcsolódását. Eredményeink egy új típusú silencing szupressziós mechanizmust mutatnak be. Az állatokhoz hasonló módon a miRNS indukálta transzlációs gátlás a növényekben is fontos szerepet tölt be az egyedfejlődés szabályozásában. A növényekben az Altered Meristem Program 1 (AMP1) fehérje az endoplazmatikus retikulumban található és AGO1-kötő tulajdonsággal rendelkezik. Az *amp1* mutáns *A. thaliana* növényben több mRNS, közöttük az AGO1 transzlációjának mértéke is megnövekszik, kizárólag az endoplazmatikus retikulumban lokalizált

Lakatos Lóránt

riboszómákon. Ez alapján azt feltételezzük, hogy a miRNS-AGO1-AMP1 komplex miRNS függő módon megköti tartja a target mRNS-t, ami emiatt alacsonyabb mértékben transzlálódik endoplazmatikus retikulumban lévő riboszómákon. Amennyiben az SPMMV P1 silencing szupressziós mechanizmusa a target RNS kizárásán alapul, akkor feltehetően a P1 a transzláció repressziót gátlására is képes.

Mechanisztikus szempontból a target RNS kizárása megtörténhet úgy, hogy a P1 AGO1-hez való kötődése során elfedi a az AGO1-ben lévő miRNS-t, de az is elképzelhető, hogy a P1 kötődése során oly módon változtatja meg az AGO1 konformációját, hogy a miRNS-mRNS kapcsolat nem alakulhat ki. Véleményünk szerint ennek a kérdésnek a megválaszolására az AGO1-kisRNS-P1 komplex háromdimenziós szerkezetének meghatározása adhatna pontos választ.

Az SPMMV, mint ahogy a neve is mutatja, enyhe tüneteket okoz batátán. A fertőzött batáta levelein klorotikus foltok jelennek meg, amelyek 2-4 hétig figyelhetők meg, majd a növény fiatalabb levelei tünetmentessé válnak és az SPMMV titere is a detektálhatóság szintje alá csökken, és a növény kigyógyul a fertőzésből. Az SPMMV P1-gyel kapcsolatos eredményeink alapján azt feltételezhetjük, hogy a vírusfertőzés során a vírusról keletkezett siRNS-t tartalmazó *de novo* RISC komplexek működését a virális genomról transzlálódó P1 gátolja. A P1 azonban nem tud különbséget tenni a si- és a miRNS-t tartalmazó RISC között, így az AGO1/miR403 komplex a gátlása alól felszabadul az AGO2 mRNS transzlációja is. Ennek megfelelően, az AGO1 gátlása AGO2 aktivitást eredményez, ami hatékonyan gátolja az SPMMV replikációját, ami a vírusfertőzésből való kigyógyuláshoz vezet.

5. Az *Sweet potato feathery mottle virus* P1 fehérje vizsgálata, az első mesterséges silencing szupresszor létrehozása

A *Potyviridae* családba tartozó SPMMV (*Ipomovirus* nemzetség) és az SPFMV (*Potyvirus* nemzetség) hasonló méretű P1 fehérjét kódol, ami valószínűleg egy

Lakatos Lóránt

korábbi rekombinációs esemény következménye. Eredményeink szerint az SPFMV P1 nem rendelkezik silencing szupresszor aktivitással (Szabo et al., 2012), amit annak tulajdonítottunk, hogy az SPFMV P1 az SPMNV P1-hez képest csak egy, az AGO1 kötés és a silencing szupresszor aktivitás szempontjából esszenciális WG/GW domént tartalmaz. Elképzelésünket az is alátámasztotta, hogy az SPFMV enyhe tüneteket okoz különböző *Ipomoea* fajokon. Mivel a P1 fehérjék N-terminálisa viszonylag magas homológiát mutat, az SPFMV P1-ből hiányzó WG/GW domének beiktatásával egy silencing szupresszor aktivitással rendelkező mesterséges P1 fehérjét hoztunk létre, amely az SPMNV P1-hez hasonlóan AGO1-kötő képességgel rendelkezik (Szabó et al., 2012).

Lakatos Lóránt

TUDOMÁNYMETRIAI ADATOK

Teljes tudományos cikk nemzetközi folyóiratban	21
Teljes tudományos cikk hazai idegennyelvű folyóiratban.....	2
Összes hivatkozás	1805
Független hivatkozás.....	1620
Összesített impakt faktor.....	125,8
Hirsch index	14
Az értekezés alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktora:.....	65,63

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

1. Kénesi E, Carbonell AC, Lózsza R, Vértessy B, Lakatos L (2017): A viral suppressor of RNA silencing inhibits ARGONAUTE 1 function by precluding target RNA binding to pre-assembled RISC Nucl Acid Res doi: 10.1093/nar/gkx379.
2. Szabó E, Kemény L, Lakatos L (2014): Deletion series in the P1 protein of the Sweet potato mild mottle virus identifies the shortest fully functional RNA silencing suppressor domain Acta Biologica Szegediensis Volume 58(2)
3. Szabó EZ, Manczinger M, Göblös A, Kemény L, Lakatos L. (2012) Switching on RNA silencing suppressor activity by restoring the Argonaute binding to a viral protein J Virol. 86(15):8324-7.
4. Ana Giner*, Lorant Lakatos*†, Meritxell Garcia-Chapa, Juan López-Moya†, Jozsef Burgyan† (2010) Viral Protein Inhibits RISC Activity by Argonaute Binding through Conserved WG/GW Motifs. Plos Pathogens, 6(7):e1000996
(* első szerzők, † levelező szerzők)
5. Lózsza R, Csorba T, Lakatos L, Burgyan J (2008) Inhibition of 3' modification of small RNAs in virus-infected plants require spatial and temporal co-expression of small RNAs and viral silencing- suppressor proteins. Nucleic Acids Res. 36(12):4099-107
6. Hemmes H, Lakatos L, Goldbach R, Burgyán J, Prins M* (2007): The NS3 protein of Rice hoja blanca tenuivirus suppresses RNA silencing in both plant and insect hosts by efficiently binding both siRNAs and miRNAs. RNA. 17(3):1079-89
7. Lakatos L, Csorba T, Pantaleo V, Chapman EJ, Carrington JC, Liu YP, Dolja VV, Fernández Calvino L, López-Moya JJ, Burgyán J (2006): Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. EMBO J. 25(12):2768-80.

Lakatos Lóránt

8. Lakatos L, Szittyá G, Silhavy D, Burgyán J.(2004): Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. EMBO J. 23(4):876-84.

A DOLGOZAT TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

Lourdes Fernández-Calvino, Lluvia Martínez-Priego, Edit Z. Szabo, Irene Guzmán-Benito, Inmaculada González, Tomás Canto, Lóránt Lakatos, César Llave (2016) Tobacco rattle virus 16K silencing suppressor binds AGO4 and inhibits formation of RNA silencing complexes *J. Gen Virol*, 97 (1). pp. 246-257

Lakatos L, Burgyán J, (2008) Analysis of siRNA-suppressor of gene silencing interactions. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 02/2008; 451:331-7.

Mérai Z, Kerényi Z, Kertész S, Magna M, Lakatos L, Silhavy D (2006): Double-stranded RNA binding could be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing *J. Virol* 80(12): 5747-56

Molnar A, Csorba T, Varallyai E, Lacomme C, Lakatos L, Burgyán J (2005): Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs. *J. Virol* 79(12):7812-8.