

Válasz Prof. Dr. Fehér Attila opponensi véleményére

Köszönöm Bírálom elismerő szavait dolgozatomban bemutatott eredményeimről és eddigi munkásságomról. Köszönöm kritikai észrevételeit is, amelyeket elfogadok.

Bírálom konkrét kérdéseire adott válaszaim:

A 23. oldalon azt írja, hogy a DCL-ek szükségesek lehetnek a vírus replikáció fenntartásához, de nem fejt ki, hogy hogyan.

Az eddig vizsgált legtöbb növényben, köztük az *Arabidopsis thaliana*-ban négy DICER-szerű enzimet azonosítottak. A DCL1 a ds miRNS-ek kialakításáért felelős, a DCL3 a heterokromatikus régiók csendesítésében résztvevő kb. 24 nukleotid hosszúságú siRNS-ek éréséhez szükséges. A DCL2 és DCL4 enzimek az egyszálú DNS és az egyszálú RNS vírusok elleni védekezésben játszanak fontos szerepet.

A rizsben azonban hat DICER-szerű enzim kódoló lókuszt találtak, ezekből kettő az antivirális válaszban szerepet játszó DCL2-höz mutat magas szintű homológiát. A két DCL2 lókusztól képződő mRNS nukleotid sorrendje is több, mint 98%-ban megegyezik

Az idézett publikációban a rizs DCL2 hatását vizsgálták az *Oryza sativa* endornavírus replikációjára. Az *Oryza sativa* endornavírus egy gyűrű alakú plazmid-szerű dsRNS vírus, ami viszonylag alacsony szinten replikálódik a rizs növényben. Transzgenikus növényekben a DCL2 expressziót RNS silencing-gel csökkentették le.

Meglepve tapasztalták, hogy a DCL2 hiánya nem az *Oryza sativa* endornavírus szintjének megemelkedését eredményezte, hanem pont ellenkezőleg, a vírus szintjének drasztikus csökkenésével járt.

Ebből arra következtettek, hogy a DCL2 a vírus replikációjához szükséges lehet. Az is elképzelhető, hogy a DCL2 indirekt módon csökkenti a gyűrű alakú dsRNS vírusok elleni RNS silencing hatékonyságát, ezért lett magasabb az *Oryza sativa* endornavírus szintje a vad típusú rizs növényben a géncsendesített transzgenikus vonalakhoz képest.

Az E8 ábrán bemutatottak szerint a P19, p21 és Hc-Pro szupresszorok között nagyságrendi különbségek vannak az in vitro target RNS vágásra gyakorolt hatásban. Ismert-e ennek a magyarázata, meglehet-e ez a különbség in planta is és ha igen, van-e összefüggése a vírusok fertőzőképességével?

A polipeptidek harmadlagos szerkezete a transzlációhoz kapcsolódva spontán vagy más fehérjék pl. chaperonok közreműködésével (folding) alakul ki. A rekombináns DNS technológián alapuló fehérjetermelés során elfordulhat, hogy a rekombináns gén olyan nagy mennyiségben termelődik, hogy túlterheli a sejtek folding kapacitását. Ezért a rekombináns fehérje nagy része oldhatatlanná válhat és kicsapódik, vagy oldható marad, de nem rendelkezik az aktivitáshoz szükséges térszerkezettel.

In vitro kísérleteimhez a silencing szupresszor fehérjét rekombináns technológiával állítottuk elő.

A p19 és p21 fehérjét *E. coli*-ban, a Tobacco etch virus HC-Pro fehérjét TEV fertőzött dohány növényekből állítottuk elő. Mindhárom fehérjét viszonylag nagy mennyiségben tudtuk előállítani, majd előkísérleteink alapján határoztuk meg a hatásos koncentráció tartományt a preparátum fehérjekoncentrációja alapján. Elképzelhető, hogy az általunk előállított rekombináns fehérjék esetében alacsony volt a megfelelő módon feltekeredett fehérjék aránya a fehérjepreparátumban.

Továbbá nagy különbség lehet a szupresszor fehérjéknek a kis RNS-ekhez való affinitásában is. A CIRV p19-siRNS komplex disszociációs állandója $K_d=0.2$ nM. Munkám során GST (glutathion-S transzferáz) fúziós fehérjét (is) vizsgáltam. A GST fúziós fehérjék esetében nem lehet meghatározni a fúziós fehérje-siRNS komplexben a fehérje és a siRNS moláris arányát, ezért csak látszólagos disszociációs konstans (K_a) mértünk. Ha ennek ellenére összehasonlítjuk a CIRV p19 K_d és a GST-p21 K_a értékét, akkor kb. két nagyságrendnyi különbséget tapasztaltunk. Ezért a másik lehetséges magyarázat az lehet, hogy a fúziós fehérjék alacsonyabb gyengébb siRNS-kötő képességgel rendelkeznek.

Véleményem szerint az *in vitro* rendszer, ebben az esetben egy heterológ *in vitro* rendszer nem alkalmas a silencing szupresszorok direkt összehasonlítására. Egy szupresszor fehérjét vizsgálva azt a következtetést lehetett levonni, hogy hasonló módon és koncentrációban gátolja meg a RISC kialakulását és a target RNS vágását.

Azonban a mi munkánk publikálása után megjelentek olyan eredmények, amelyek már *in planta* vizsgálatokat is tartalmaztak. A Zucchini yellow mosaic virus egy kevésbé virulens törzsében a HC-Pro fehérje egy aminosavban különbözik a súlyos tüneteket okozó törzs megfelelő régiójától. Amikor a virulens törzs HC-Pro-t kódoló cisztronjának Phe-Arg-Asn-Lys régiójában (FRNK) az arginint a kevésbé virulens törzsben lévő izoleucinra cserélték (FINK) akkor a mutáns vírus virulenciája nagymértékben lecsökkent. Ugyanakkor *in vitro* vizsgálatokkal kimutatták, hogy a mutáns HC-Pro fehérje esetében nem detektáltak siRNS kötő aktivitást. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy szoros összefüggés van a ZYMV

virulenciája és a HC-Pro siRNS kötő képessége, azaz aktivitása között, ezért a silencing szupresszorok virulencia faktoroknak tekinthetők.

A E8 I ábra alapján kijelenthető-e egyértelműen, hogy a Hc-Pro fehérje nem gátolja az indirekt kísérleti beállításban a target RNS vágást? A hasítási termék 17%-ról kb. 12%-ra csökken és a szórások nem tűnnek átfedőnek. Történt-e statisztikai analízis, ami ezt alátámasztja? Lehet-e ekkora eltérésnek jelentősége?

Ahogy a Bírálóm is jelezte, az indirekt kísérleti beállításban a HC-Pro koncentrációjának emelésével hasított termék mennyisége jelentősen, kb. 30%-kal, csökkent, ami megkérdőjelezheti a kísérletből levont következtetést.

A lehetséges hibákat többféleképpen igyekeztem elkerülni.

-A kísérletek végrehajtásához szükséges jelölt, jelöletlen siRNS-eket, az 5' végén radioaktívan megjelölt egyszálú target RNS-t standard módon állítottuk elő, majd meghatároztuk a koncentrációjukat.

-A fehérje extraktumok nem specifikus RN-áz aktivitásából eredő hibát is igyekeztük elkerülni. Egy target RNS szál egységnyi jelölést tartalmazott, ezért a hasítási termék 5' vége és a nem hasított target RNS összege reprezentálta az egyes reakciókban lévő összes RNS mennyiségét. A hasított termék százalékban kifejezett értékét az összes radioaktív jelölést tartalmazó RNS mennyiségére vonatkoztatva adtam meg.

- Egy kísérletsorozathoz ugyanazt a preparátumot használtuk, beleértve ebbe a preparátum aktivitásának tesztelését is. Ennek megfelelően a kísérletek ismételéséhez más-más időben készített embrió extraktumot használtunk. Véleményem szerint a RISC aktivitás dúsítása kisebb szórást eredményezett volna, ám részletes statisztikai vizsgálatokat nem végeztünk.

Ezért kizárólag ennek a kísérletnek az eredményéből egyértelműen nem lehet azt a következtetés levonni, hogy a HC-Pro fehérje nem rendelkezik aktív RISC-et gátló aktivitással. Ugyanezt a direkt és indirekt megközelítést használtuk szintén a dolgozatban szereplő *in vivo* kísérleteinkben is, és az *in vitro* és *in vivo* kísérleteinkből származó eredményeink alapján levont következtetést, miszerint a HC-Pro nem rendelkezik aktív RISC-et gátló aktivitással, bizonyítottnak fogadtam el.

Az E9 ábra alapján kijelenti, hogy a DICER-R2D2 komplexhez nem kötődik a jelölt target RNS analóg. De az autoradiogrammon (3. oszlop) látszik abban a tartományban egy viszonylag erős jel. Mi lehet ez?

-Az E9. ábrán is használt módszert Erik Sontheimer laboratóriumában fejlesztették ki és alkalmazták a *Drosophila* silencing komplexek bemutatásához. Radioaktívan jelölt siRNS

hatására a *Drosophila* extraktumban három siRNS-t tartalmazó fehérjekomplex alakul ki. A legkisebb méretű komplex duplaszálú siRNS-t, a DCR2 és R2D2 fehérjéket tartalmazza. A legnagyobb méretű a RISC komplex, amelyben a DCR2, R2D2, MOV10, FMR fehérjék mellett az Argonaute 2 fehérjét is azonosították. A *Drosophila* RISC-ből kizárólag egyszálú siRNS-t tudtak kimutatni. A DCR2-R2D2 és a RISC komplexek között található RLC (RISC Loading Complex) komplex nem volt elég stabil ahhoz, hogy részletes analízisnek vessék alá. Azonban az RLC komplexről meg tudták állapítani, hogy ez egy a DCR2-R2D2 és a RISC komplexek között egyfajta átmeneti RNS-fehérje komplex, ami már biztosan tartalmaz egyszálú siRNS-t is. Az E9. ábrán azt szerettem volna bemutatni, hogy a legnagyobb méretű komplex megfelel-e a RISC-nek. Ehhez egyszálú, 2'-orto-metil nukleozidokból álló 35 bázis hosszúságú ún. target analóg RNS-t használtunk radioaktívan jelölve. Az volt az elképzelésünk, hogy az egyszálú siRNS-t tartalmazó RISC-hez kötődő target analóg RNS egyértelműen kijelöli a RISC pozícióját. A várakozásnak megfelelően a RISC komplex magasságában detektáltunk egy markáns jelet, azonban megjelent egy „extra” jel is a DCR2-R2D2 és az RLC komplexek között.

Erre két lehetséges magyarázatot találtam:

-Bár a RISC komplex egy viszonylag stabil RNS-fehérje komplexnek tekinthető, de a gélelektroforézis szétválasztás során destabilizálódhat és kisebb egységekre eshet szét. Véleményem szerint a kisebb méretű komplex egy parciális RISC komplex is lehet, amely a target RNS analóg mellett a siRNS-sel töltött Argonaute fehérjét is tartalmazza.

-A *Drosophila melanogaster* embrió extraktumban három siRNS-t tartalmazó komplex detektálható. Ezek közül a RISC és az RLC komplexek tartalmaznak egyszálú siRNS-t. Elképzelhető az is, hogy a 2'-orto-metil target RNS analóggal nem csak a RISC-et, hanem az RLC komplexet is detektáltuk. Az autoradiogramm alapján a target RNS analóggal detektált második komplex nem egyértelműen feleltethető meg az RLC komplexnek. Ennek lehetséges magyarázata az, hogy az RLC komplexhez kapcsolódó target RNS analóg olyan mértékű negatív töltés többletet jelentett, ami a komplex nagyobb vándorlási sebességét eredményezte.

Az 53. oldalon tárgyalja a Hc-Pro szupresszor siRNS-kötő képességét. Nem egyértelmű számomra a heparin hatása ebben a kísérletben. Miért jelenti ez azt, hogy a Hc-Pro fehérjekivonatban megváltozott siRNS-kötő tulajdonsága nem lehet kapcsolatban az RNS silencinggel? A Hc-Pro fehérje kivonatokban megfigyelt nagyobb komplexe multimerizációt jelent (vö. 105. oldal)? A fehérjegazdag környezet lehet bármilyen fehérje pl. BSA által is biztosított? Milyen módon befolyásolhatja ez a Hc-Pro aktív frakciójának arányát?

Munkánk során megvizsgáltuk a HC-Pro fehérje hatását a *Drosophila* RNS silencing komplexek kialakulására. A siRNS-t tartalmazó RNS-fehérje komplexeket natív gélelektroforézissel választottuk el. A kísérlet során a HC-Pro koncentrációjának növelésével a DCR2-R2D2 komplex közvetlen környezetében egy markáns jelet detektáltunk. Eredményeink alapján nem lehetett egyértelműen eldönteni, hogy az újonnan keletkezett RNS-fehérje komplex kizárólag HC-Pro fehérjét vagy a *Drosophila* DCR2-R2D2 fehérjét is tartalmaz. A dsRNS kötő fehérjék aktivitása heparin alkalmazásával hatékonyan gátolható.

Ennek megfelelően, a heparin meggátolta az RNS silencing komplexek kialakulását, azonban nem volt hatással az eddig nem azonosított komplex kialakulására. Eredményeink arra utalnak, hogy az DCR2-R2D2 komplex közvetlen környezetében megjelent RNS fehérje komplex nagy valószínűséggel a HC-Pro fehérjét tartalmazza. Megpróbáltam az „új” fehérjekomplexben a HC-Pro fehérjét azonosítani ellenanyag alkalmazásával, de nem jártam sikerrel. Azonban felmerülhet az a kérdés, hogy a heparin miért nincs hatással a ds siRNS-HC-Pro kötés kialakulására.

A dsRNS kötő fehérjék a helikális szerkezetű dsRNS kis- és nagyárcának felületén található negatív töltéssel rendelkező cukor-foszfát gerinchez kapcsolódnak. A heparin negatív felületi töltése miatt a dsRNS kötés kompetitív inhibitora, azonban a HC-Pro a siRNS-ek 3' végén lévő két-két túlnyúló nukleotidhoz kapcsolódik.

A Tobacco etch virus HC-Pro expresszáltatásához és izolálásához használt cDNS klónt és tisztítási protokollt Juan José Lopez-Moya bocsájtotta rendelkezésünkre, amit HC-Pro fehérje szerkezeti vizsgálata céljából fejlesztettek ki. Analitikai ultracentrifugálással és krio-elektronmikroszkópos vizsgálatokkal a HC-Pro dimer, tetramer és oktamer formáit is azonosították.

A HC-Pro siRNS kötő képességének vizsgálata során, amikor nem használtunk stabilizáló extraktumot, a HC-Pro koncentrációjának emelésével a komplex mérete megemelkedett. Ez a jelenség magyarázható a dimerek tetramerré alakulásával, de a tetramerek disszociációjával is. Natív gélelektroforézissel véleményem szerint nem lehet egy RNS-fehérje komplex méretét meghatározni, ezért gélszűrőssel is próbálkoztam, de a komplex még így sem volt elég stabil. Az *Arabidopsis thaliana*-ból izolált extraktum mellett a BSA hatását is megvizsgáltam, azonban a BSA hatása gyengébb volt.

Véleményem szerint a fehérjegazdag környezet a HC-Pro feltekeredését (harmadlagos szerkezet) vagy alegységeinek asszociációját segítette elő és/vagy disszociációját (negyedleges szerkezet) akadályozta meg.

Hogyan magyarázza a Hc-Pro és a p19 eltérő hatását a siRNS metilációra (E18 ábra)? Mi lehet a magyarázata és jelentősége annak, hogy a TEV eredetű siRNS-ek 100%-ban metilálatlanok, a CIRV siRNS-ek 80%-ban metiláltak a fertőzött növényben?

A kis RNS-ek metilációja a ds RNS érése után, de az AGO fehérjébe való beépülésük előtt következik be. A HEN1 enzim a ds kis RNS 3' végén lévő utolsó nukleotidot metilálja. Metiláció hiányában a kis RNS-ek uridilálódnak és lebomlanak. Ezért a HEN1 metiláz a kis RNS félélet idejének szabályzásában játszik fontos szerepet.

A TEV és a CIRV két olyan modell vírus, amelyek a virális siRNS-ek megkötésével blokkolják a gazdanövény antivirális védelmi rendszerét. Óriási különbség van a TEV-vel és a CIRV-vel fertőzött növények metilációs állapotában, mely legalább két okra vezethető vissza:

-A CIRV a mitokondrium külső membránjában replikálódik, míg a TEV az endoplazmás retikulumban, de a CIRV-vel szemben, a TEV replikációjának helyszíne közvetlen kapcsolatban van a citoplazmával. Elméletileg a kompartmentalizáció következtében a CIRV genomi RNS-ről képződött siRNS-ek először metilálódnak és csak utána kerülnek kapcsolatba a p19 fehérjével. Szintén a kompartmentalizáció játszat szerepet abban, hogy a CIRV fertőzött növényekben nemcsak a virális siRNS-ek, hanem a miRNS-ek is kb. 80%-ban vannak metilálva.

-A CIRV p19 és a TEV HC-Pro különböző módon köti a siRNS-eket. A p19-siRNS háromdimenziós térszerkezetének ismeretében megállapították, hogy a p19 a siRNS 5' végén lévő foszfát csoporttal lép kapcsolatba. Ezért az is elképzelhető, hogy a HEN1 metiláz azoknak a kis RNS-eknek a metilációjára is képes, amelyek már a p19 fehérjével kapcsolatba léptek. Ezzel szemben, a TEV HC-Pro a siRNS-ek 3' végein lévő utolsó két nukleotidhoz kötődik és elfedi a siRNS utolsó nukleotidját, a HEN1 metiláz felismerőhelyét. Valószínűleg ez a magyarázata annak, hogy a TEV fertőzött növényekben lévő si- és miRNS-ek nem metiláltak.

A Hc-Pro egy proteináz. Van-e ilyen aktivitása és egyéb szerepe a silencing mellett? A SPMMV P1 fehérjéjének is proteináz doménje van. Ez véletlen, vagy van valamilyen jelentősége annak, hogy proteinázok váltak silencing szupresszorrá?

A vírusok a gazdasejt biokémiai apparátusát használják sikeres működésük érdekében. Mai tudásunk szerint a vírusok által irányított biokémiai útvonalak száma nagyobb, mint a vírusok által kódolt fehérjék száma. Az evolúció során feltehetőleg ezért alakultak ki több funkcióval rendelkező virális fehérjék. Az RNS vírusok genommérete az 5000-25000 bázisos tartományba esik, ami maximum 20 fehérje megjelenését eredményezi. A HC-Pro is egy multifunkcionális fehérje, proteináz és silencing szupresszor aktivitással rendelkezik, valamint a TEV

köpenyfehérjéjéhez és a rovar szájszervéhez kötődve fontos szerepet játszik a rovarátvitelben is.

A dolgozatban nem szereplő eredményeim szerint a *N. benthamiana*-ban és az *E. coli*-ban termelt SPMMV P1 fehérjéje is rendelkezik proteináz aktivitással. Többféle hasítási terméket detektáltam, és azt is sikerült állapítani, hogy a kb. 25, 40 és 55 kDa-os polipeptidek a P1 N-terminális végének különböző hosszúságú változatait reprezentálják. Tulajdonképpen ez a megfigyelés adta azt az ötletet, hogy különböző hosszúságú P1 változatok RNS silencing gátló aktivitását megvizsgáljam.

A Potyvirideae családba tartozó vírusok kb. 10000 nukleotid hosszúságú genomi RNS-éről átlagban egy 3000 aminosavból álló poliprotein transzlálódik, amelyről 10 érett fehérje keletkezhet. Az érett fehérjék elméletileg ekvimoláris koncentrációban lehetnek jelen. A genomi poliprotein N-terminális régiójában lévő P1 és az azt követő HC-Pro proteináz aktivitásuk által vágódnak le és nyerik el biológiai aktivitásukat, a poliprotein további hasítását a NIa proteináz végzi. Az érett strukturális és nem-strukturális fehérjék kialakulásának dinamikája jelenleg nem ismert. Azonban a HC-Pro saját és a P1 proteináz aktivitása a NIa fehérjétől függetlenül biztosíthatja az antivirális válasz blokkolásához és a vírus átvitelhez szükséges és elégséges HC-Pro koncentrációt. De az SPMMV esetében ennél is egyszerűbb a helyzet, a P1 silencing szupresszor fehérje saját proteináz aktivitása által alakul aktív silencing szupresszor fehérjévé.

Mi indokolta az E29 ábrán bemutatott kromatográfiás kísérletet, amikor az E30 ábrán bemutatott kísérlettel a közvetlen kölcsönhatást is kilehetett mutatni a fehérjék között?

Annak ellenére, hogy a különböző fajokból származó AGO fehérjék szekvenciaspecifikus endonukleáz aktivitását sikerült bebizonyítani *in vitro*, az irodalmi adatok arra mutatnak rá, hogy a több alegységből álló RISC komplex felelős az RNS silencing aktivitáshoz *in vivo*.

Például a *Drosophila melanogaster* embrióból és az emberi szövettényészetből izolált RISC egy 800 kDa-nál nagyobb molekulatömegű RNS-fehérje komplex. Mindkét fajból azonosították az AGO szekvenciaspecifikus endonukleáz mellett a DICER enzimet, valamint dsRNS kötő és helikáz aktivitással rendelkező fehérjéket is.

Az AGO1 fehérje a *Nicotiana benthamiana*-ban is egy 800 kDa-nál nagyobb fehérjekomplexben van jelen. Bár a többi alegységről egyelőre nem rendelkezünk információkkal, a 800 kDa méretű komplexet fogadják el RISC komplex-ként. Ahogy opponensem is megjegyezte, az AGO1 és P1 közötti kölcsönhatást immunoprecipitációval kimutattuk. Ezért szerettük volna megtudni, és bemutatni, hogy a P1 fehérje a növényi RISC

komplexhez is kapcsolódik-e. A gélszűrés alkalmazása lehetőséget biztosított arra, hogy a P1-el kölcsönhatásba lépő komplex méretét meghatározhassuk.

Az in planta kísérletekben 35S promóterrel tranziensen kifejeztetett virális géneket használt. Ez feltehetően igen magas fehérjeszinteket jelentett a növényi sejtekben. Mennyire lehet az így kapott eredményeket a valós vírusfertőzés körülményeire extrapolálni?

Könnyű kivitelezhetősége és viszonylagos egyszerűsége miatt a tranziens fehérje kifejeztetés egy széleskörben elterjedt módszer. Bírálónak igaza van, a tranziens módon kifejeztetett fehérjék magas szintet érnek el a növényi sejtekben. Véleményem szerint a tranziens kifejeztetés nem modellezi az *in vivo* állapotokat. Jó példa erre a Sweet potato mild mottle vírus. Az SPMMV gyenge tüneteket okoz a batátán, virulensebb vírusokhoz hasonlítva nagyságrendekkel alacsonyabb vírus titert mértek a fertőzött növényekben. Ennek ellenére tranziens rendszerben a P1 silencing szupresszor aktivitása összemérhető a nála sokkal virulensebb növényi vírusokból származó szupresszor fehérjék aktivitásával. Ugyan nem vizsgálták eddig, de nagy valószínűséggel jóval alacsonyabb a P1 mennyisége a vírusfertőzött növényben, mint amit a tranziens megközelítést alkalmazva el lehetett érni.

Az E 36. ábrán az AGO1 DAH és a P1 fehérje együttes csendesítő hatásának magas szintjére adott magyarázat nem egyértelmű. Nem az, vagy az is, lenne várható, hogy az AGO1 DAH fehérje kivonja (kitirálja) a P1-et az endogén AGO1-vel való kölcsönhatásból?

Az SPMMV a kevésbé virulens vírusok csoportjába tartozik. Az SPMMV legalább két fajt képes megfertőzni, mindkét esetben gyenge tünetek jelentkeznek, majd a növény kigyógyul a fertőzésből. Ebben a kísérletben azt vizsgáltuk meg, hogy az antivirális védekezés első vonalába tartozó AGO1 és -2 fehérjék hogyan segítik elő az SPMMV eliminálását. Kísérleti rendszerként az ún. ta-siRNS (trans-acting) útvonal néhány elemét használtuk fel. A Tas1c egy nem kódoló mRNS, amit az AGO1/miR173 komplex hasít el. A hasítási termékek az RDR6 (RNS függő RNS polimeráz) két szálú RNS-sé alakítja, majd a DCL4 hatására keletkeznek a ta-siRNS-ek, amelyek számos mRNS expresszióját szabályozzák. Eredményeink azt mutatták, hogy az SPMMV P1 gátolja az AGO1 aktivitását. Bírálóm kérdése az E36. ábra A panel 10. oszlopában bemutatott egyik kontrol kísérletre vonatkozik. Az AGO1-DAH mutánsban a katalitikus helyet alkotó Asp-Asp-His (DDH) aminosavak közül a hisztidint alaninra cserélték (DAH), ezért az AGO1-DAH nem mutat endonukleáz aktivitást, de az AGO1-DAH/miR173 komplex a target RNS-hez hozzákapcsolódik. Az ábra 8. oszlopában bemutattuk, hogy a P1 az endogén és az exogén (agroinfiltrálással bejuttatott) AGO1 aktivitását is gátolja. Az ábra 9. oszlop eredménye azt mutatja, hogy az endogén AGO1 aktivitást az AGO1-DAH is gátolja,

valószínűleg megköti (kititrálja), de nem vágja el a Tas1c target RNS-t. A P1 és az AGO1-DAH bejuttatásával (E36. ábra A panel, 10. oszlop) a 8. és 9. oszlopban bemutatott eredményhez képest nem additív, hanem valószínűleg szinergista hatást értünk el. Bírálom javaslatát elfogadom. A tranziensen kifejezett AGO1-DAH kititrálhatja a P1 fehérjét a rendszerből, és ebben az esetben talán még additív hatást nem eredményezett volna a P1 és az AGO1-DAH jelenléte.

Az általunk használt kísérleti rendszerben az elhasított Tas1c-ből két további lépésben keletkeznek a ta-siRNS-ek. Tehát a ta-siRNS-ek mennyisége fordított arányban van a Tas1c hasításával. A ta-siRNS-ek mennyiségének megállapításával biztosan pontosabb választ adhatnék Bírálom kérdésére.

Véleményem szerint az általam képviselt elméletet legalább részben alátámasztja az E36. ábra B panelje. Alapesetben a *Nicotiana benthamiana* levelében az AGO2 aktivitás alacsony, mivel az AGO1 a mir403-en keresztül jelentősen csökkenti az AGO2 mRNS mennyiségét (E36. ábra A panel, 8. oszlop). Azonban a P1 hatására az az AGO1/mir403 gátlás megszűnik és megemelkedik az endogén AGO2 aktivitás (E36. ábra A panel, 9. oszlop). Az E36. ábra A panel, 13. oszlopában a P1 hatására megemelkedett az endogén AGO2 aktivitás, de, véleményem szerint az AGO2-DAD (Asp-Asp-Asp, DDD helyett Asp-Ala-Asp, DAD) mutáns „stabilizálja” a Tas1c A388T mRNS-t. Annak ellenére „stabilizálódik” a Tas1c A388T mRNS, hogy az aktív P1 koncentrációját, mind az endogén AGO2, mind az exogén AGO2-DAD is kititrálhatja, mert saját eredményeim szerint a P1 kapcsolódhat az AGO2-hez és bár ezt nem vizsgáltuk, de valószínűleg az AGO2-DAD mutánsához is.

Szintén ezen az ábrán mutatja be, hogy a P1 AGO1-aktivitást gátló hatása mellett az AGO2 transzkripciója és aktivitása megnövekszik. Elképzelhető magyarázat lehet-e, hogy a növény a gátolt AGO1 aktivitás kompenzálásaként emeli meg az AGO2 transzkripciót és aktivitást? Hogyan tudott az endogén és a bevitt AGO2 gének expressziója között különbséget tenni?

Véleményem szerint a P1 hatására az endogén AGO2 poszt-transzkripcionális regulációja változik. Alapesetben az AGO1 a miR403 miRNS-en keresztül alacsonyan tarja a AGO2 mRNS szintjét. P1 jelenlétében az AGO1 aktivitás csökken, ennek következtében az AGO1 által szabályozott mRNS-ek, így az AGO2 mRNS szintje is megemelkedik. Opponensemmel egyetértek: a növény a P1 fehérje hatására (a P1 bejuttatásával modelleztük az SPMNV fertőzést) bekövetkező AGO1 aktivitás csökkenését próbálja meg az AGO2 mRNS és aktivitás növelésével kompenzálni. Ezért tartják az AGO2 fehérjét is az AGO1 mellet a növényi antivirális védekezés első vonalának.

Az AGO2 mRNS szintjének relatív emelkedését kvantitatív PCR-rel bizonyítottuk be. Az endogén és a bejuttatott AGO2 mRNS között nem tudtunk különbséget tenni, azonban eredményeinkből jól látszik, hogy P1 hatására az endogén AGO2 mRNS a kontrollhoz képest kb. 11-szeresére növekszik. Az AGO2 mRNS tranziens kifejezése során az endogén és exogén AGO2 mRNS szintjét is mértük. Azonban ehhez a mintához képest is a P1 hatására 5-szörös mRNS mennyiséget detektáltunk, ami az általunk levont következtetést erősíti meg.

Még szintén az E36 ábrával kapcsolatban azt írja, hogy az AGO2 és P1 együttes expresszáltatása megnöveli az AGO2 aktivitást, ami az ábra alapján (B rész 9,10,11 oszlopok) kétséges, hogy szignifikáns különbség-e.

Opponensemnek igaza van, a P1 és az AGO2 együttes expresszáltatása nem szignifikáns mértékben növeli meg az AGO2 aktivitást. A különbség ugyan kicsi, de a kísérlet többször megismételve konzekvensen ezt az eredményt adta.

Az E40 ábra kapcsán: ha az AGO1 DAH fehérje stabilizálja a target RNS-t, akkor nem kellene a 14 oszlopban transzkriptet látni?

A kísérlet célja a P1 fehérje pontos működési mechanizmusának megismerése volt. Arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a P1 fehérje megakadályozza-e a target RNS kapcsolódását miRNS-t tartalmazó AGO1 fehérjéhez. A kérdés megválaszolásához megvizsgáltuk azt, hogy a vad típusú és mutáns P1 és AGO1 fehérjékből létrehozott különböző RNS-fehérje komplexek tartalmazzák-e a target RNS-t. A különböző P1-AGO-kis RNS komplexeket a P1 fehérjén keresztül izoláltuk immunoprecipitációval. Bírálómnak igaza van, az AGO1-DAH fehérje jelenléte stabilizálja a target RNS-t. Az immunoprecipitáció input és az eluált frakcióiban RT-PCR-rel mutattuk ki a target RNS jelenlétét. Véleményem szerint az általunk használt szemi-kvantitatív PCR módszer nem mutatta ki az AGO1-DAH korábban tapasztalt hatását. Az eluált frakcióban azonban nem detektáltuk a target RNS-t, mert az a kísérleti kombináció nem tartalmazott P1 fehérjét.

A 96. oldalon azt írja, hogy „a P1-C88A/C130A mutáns megköti az AGO1 DAH fehérjét, azonban ez a komplex nem tartalmazza a target RNS-t” ... De az E40 ábra 16. oszlop és az ezt megelőző mondat alapján tartalmazza. Ez tehát csak elírás?

Köszönöm Opponensemnek, hogy felhívta erre az elírásra a figyelmemet.

Van arra elképzelés, hogy mi a SPMMV vírus P1 fehérje N-terminális extenziójának az eredete? A 86. oldalon említ egy 383 aminosavas fehérjét, ami a P1 N-terminális részét tartalmazza. Ez lehet az eredeti szupresszor, ami a nagyobb 759 aminosavas fehérjére került rekombinációval

vagy éppen fordítva, arról vált le? Vannak ezzel az N-terminális szakasszal homológ fehérjék bármilyen organizmusban az említett SPFMV P1 fehérjén kívül?

A Potyviridaeae család Potyvirus nemzetségbe több mint 150 vírusfaj tartozik. Ezek közül a Sweet potato virus C (SPVC), a Sweet potato virus 2 (SPV2), a Sweet potato virus G- (SPVG) és az SPFMV (Sweet potato feathery mottle virus) fajokban találtak a Potyviridaeae család Ipomovirus nemzetségbe tartozó SPMMV P1-hez hasonló méretű fehérjét kódoló régiót. Filogenetikai vizsgálatok eredménye azt mutatta, hogy az SPMMV P1 szupresszor aktivitással rendelkező régiója (5' vég) a Potyvirus nemzetségbe tartozó fajok hasonló szakaszával, míg a proteáz domént kódoló régió inkább az Ipomovirus nemzetségbe tartozó fajok megfelelő régióival áll közelebbi rokonságban. Valószínűleg SPVC, SPV2, SPVG és SPFMV fajok közös őse és az SPMMV egyik elődje közötti rekombinációs esemény hatására alakult ki a két különböző nemzetségbe tartozó vírus P1 fehérjében az N-terminális extenzió.

Az előbb említett két nemzetségbe sorolt fajokon kívül sem más vírusokban, sem az eukariótákban nem találtak eddig a P1 N-terminális régiójához hasonló fehérjét, így az eredetükről sem rendelkezünk egyelőre információval.

Az SPMMV P1 fehérjével kapcsolatos munkánk korai szakaszában ismertük fel, hogy a fehérje N-terminális régiója három, már bizonyos eukarióta modellélőlényből is ismert glicin-triptofán (WG/GW) aminosavakat tartalmazó domént tartalmaz.

A WG/GW fehérjék két nagy csoportra oszthatók:

- Több modulból álló fehérjék, amelyekben egy jól behatárolható szakaszon, a fehérje N- vagy C-terminális régiójában, akár 30-40 WG/GW domén is megtalálható. Ezek a molekulák az AGO fehérjéhez kapcsolódva fontos elemei a transzkripcionális és poszt-transzkripcionális RNS silencing-nek.

- A magasabbrendű növényekben lévő 1-3 WG/GW domént tartalmazó fehérjék a növényi miRNS alapú génszabályozásban játszanak fontos szerepet.

Azóta már vírusokban is azonosítottak olyan silencing szupresszor fehérjéket, amelyekben a WG/GW domén elengedhetetlen az aktivitás szempontjából.

Végezetül, az eredmények lehetséges biotechnológiai alkalmazásaként a transzgén expresszió stabilizálását említi növényekben. A vírus kórokozókkal szembeni védekezéshez hozzájárulhat-e a silencing szupresszorok kutatása?

Ez a tudományterület kb. 20 évvel ezelőtt alakult ki, és az azóta eltelt időszakban rendkívül sok ismeret halmozódott fel. Megtudtuk, hogy az egyszálú RNS szekvenciaspecifikus degradációja részt vesz az élőlények biológiai folyamatainak szabályozásában. Fontos szerepet játszik a

transzkripcionális és poszt-transzkripcionális szinten a sejtszintű génszabályozásban és megismertük az antivirális védekezésben betöltött szerepét is. Feltérképezték az RNS silencing útvonalakat és azonosították az abban részt vevő géneket. Megállapították, hogy a különböző RNS silencing útvonalak hasonló szerkezetű és aktivitású fehérjék alkotják. Például, az *Arabidopsis thaliana*-ban négy, a kis RNS-t kialakításában részt vevő DICER enzimet találtak. A DCL1 a miRNS indukálta génszabályozásban játszik fontos szerepet, a DCL2 és DCL4 fehérjék a virális siRNS-ek kialakításában játszanak fontos szerepet, míg a DCL3 a sejtmagban lévő transzkripcionális silencing működéséhez biztosítja a 24-26 nukleotid hosszúságú siRNS-eket. Hasonló a helyzet az *Arabidopsis thaliana*-ban lévő tíz AGO fehérje esetében is. Ennek ellenére a különböző RNS silencing útvonalak át is fedhetnek. Jó példa erre a ta-siRNS-ek (trans-acting) által közvetített génszabályozási útvonal, amelyben a miRNS indukálta és az antivirális silencing útvonal bizonyos elemei együtt szerepelnek. Ezzel párhuzamosan növekedtek ismereteink a virális silencing szupresszorokról. Egyre több virális silencing szupresszort azonosítottak és jellemeztek és ezek az eredmények azt mutatták, hogy ezek a virális fehérjék az eddig ismert silencing útvonalak szinte minden lépésébe képesek beleavatkozni. A RNS silencing alapú génszabályozási útvonalak át is fedhetnek, pl. egy enzim több útvonalban is szerepet játszik, vagy a különböző eredetű kis RNS molekulák hasonló szerkezettel rendelkeznek, ezért a növényi vírusok az antivirális védekezés mellett más RNS silencing útvonalakat is blokkolhatnak.

Szeged, 2019. 01. 21.

Tisztelettel:

Lakatos Lóránt