

**VIRÁLIS RNS SILENCING SZUPRESSZOROK
MŰKÖDÉSI MECHANIZMUSAI**

AKADÉMIAI DOKTORI ÉRTEKEZÉS

LAKATOS LÓRÁNT

SZTE ÁOK BŐGYÓGYÁSZATI ÉS ALLERGOLÓGIAI KLINIKA

2017

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
1. BEVEZETÉS	6
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
2.1. Az RNS silencing általános modellje	8
2.2. A kis RNS-ek típusai	9
2.3. Az Argonaute fehérjék	12
2.4. Az RNS silencing a <i>Caenorhabditis elegans</i> -ban	14
2.5. Az RNS silencing a <i>Drosophila melanogaster</i> -ben	16
2.6. Az RNS silencing az emberben	17
2.7. RNS silencing az <i>Arabidopsis thaliana</i> -ban	18
2.8. A WG/GW fehérjék	19
2.9. Vírusok	21
2.10. Az antivirális silencing	22
2.11. A virális silencing szupresszorok	24
3. CÉLKITŰZÉS	26
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	27
4.1. Molekuláris biológiai módszerek	27
4.1.1. Plazmidkonstrukciók	27
4.2. Tranziens génexpresszió <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -szel (agroinfiltrálás)	29
4.3. RNS izolálás növényi szövetből	29
4.4. RNS izolálás kromatográfiás frakciókból, natív fehérjekivonatokból és immunoprecipitátumból	29
4.5. Immunoprecipitáció	29
4.5.1. Antitestek rögzítése Protein A agarózhoz	30
4.5.2. Immunoprecipitáció	30
4.6. Northern hibridizáció	31
4.7. A <i>Drosophila</i> in vitro RNS silencing rendszer	31
4.7.1. A DsRNS indukálta RNS silencing	31
4.7.2. A siRNS indukálta RNS silencing	32
4.8. Gélkromatográfia	33
4.9. Rekombináns fehérjék termeltetése és tisztítása	33
4.9.1. GST és GST fúziós fehérjék	33
4.9.2. Az MBP fúziós fehérjék termeltetése és izolálása	33
4.9.3. A 6×His TEV HC-Pro termeltetése és tisztítása	34
4.10. RNS fehérje interakció kimutatása EMSA-val (Electrophoretic Mobility Shift Assay)	34
4.11. RNS immunoprecipitáció	35
4.12. Kvantitatív reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció (qRT-PCR)	36
5. EREDMÉNYEK	37
5.1. A p19 silencing szupresszor jellemzése a <i>Drosophila</i> in vitro rendszerben	37
5.1.1. A <i>Drosophila</i> RNS silencing rendszer működése	37
5.1.2. A p19 hatékonyan gátolja a dsRNS indukálta RNS silencinget	39
5.1.3. A CymRSV p19 nem gátolja a DICER aktivitást a <i>Drosophila</i> in vitro RNS silencing rendszerben	40
5.1.4. A CymRSV p19 siRNS-kötő képességnek in vitro vizsgálata	41
5.1.5. A CymRSV p19 a siRNS-ek megkötésével gátolja az RNS silencinget az in vitro <i>Drosophila</i> RNS silencing rendszerben	42
5.2. A CymRSV p19 a virális eredetű siRNS-eket köt in vivo	44
5.3. A CymRSV p19 a siRNS-ek megkötésével vonja ki a virális siRNS-eket az RNS silencing útvonalból	45
5.4. RNS silencing szupresszorok vizsgálata egységes in vitro és in vivo rendszerben	47

5.4.1. A p19, HC-Pro és a p21 egyaránt gátolja a RISC kialakulását in vitro	48
5.4.2. A p19, p21 és a HC-Pro a silencing iniciátor komplex kialakulásának gátlásával akadályozza meg a RISC felépülését.....	51
5.5. A TEV HC-Pro fehérje a 21 nt siRNS 3' végét köti.....	57
5.5.1. A HC-Pro in vivo jellemzése	58
5.5.2. A TEV HC-Pro duplaszálú si- és miRNS-eket köt in vivo.....	60
5.6. A duplaszálú siRNS-kötő RNS silencing szupresszorok gátolják a target RNS vágását in vivo ..	61
5.7. A duplaszálú siRNS-kötő RNS silencing szupresszorok nem gátolják a si- és a miRNS indukálta aktív RISC-eket in vivo	62
5.8. A ds kis RNS-kötő silencing szupresszorok hatása a kis RNS-ek metilációjára	66
5.9. A Sweet potato mild mottle virus P1 silencing szupresszora új típusú működési mechanizmussal rendelkezik.....	71
5.9.1. Az SPMMV silencing szupresszorának azonosítása	72
5.9.2. Az SPMMV P1 nem képes gátolni a mobilis silencing szignált	73
5.9.3. Az SPMMV P1 nem rendelkezik dsRNS-kötő tulajdonsággal.....	74
5.9.4. Az SPMMV P1 gátolja a si- és a miRNS indukálta RISC komplexeket.....	77
5.9.5. A virális P1 egy AGO1-kötő fehérje	80
5.9.6. A P1 N-terminális 383 aminosavas régiója tartalmazza az RNS silencingért felelős domént ...	82
5.9.7. Az SPMMV P1 egy virális WG/GW fehérje.....	83
5.9.8. A legrövidebb funkcionális SPMMV P1 fehérje azonosítása.....	86
5.10. Az SPMMV P1 működési mechanizmusa.....	87
5.10.1. A P1 fehérje specificitásának vizsgálata.....	87
5.10.2. A cink finger domén szerepe a P1 működésében	91
5.10.3. A P1 fehérjébe a silencing szupresszor és az AGO1 kötésért felelős régiók különböző doméneken találhatók	93
5.10.3. Az SPMMV P1 meggátolja az AGO1/kis RNS komplex target RNS kötését	94
5.10. Virális WG/GW fehérjék azonosítása és vizsgálata	96
5.11. Az SPFMV P1 fehérje funkcionális vizsgálata.....	97
6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	101
6.1. A Tombusvírusok silencing szupresszora a p19 fehérje.....	101
6.2. A heterológ in vitro rendszer alkalmas a p19 vizsgálatára	101
6.3. A p19 működési mechanizmusa in vivo	102
6.4. A p19, a p21, az NS3 és a HC-Pro megakadályozzák a siRNS-ek beépülését az RNS silencing iniciátor komplexébe.....	104
6.5. A siRNS kötés gyakori és hatékony silencing szupressziós mechanizmus	107
6.6. A kis RNS-kötő silencing szupresszorok RNS-kötő tulajdonságaiknak megfelelő módon gátolják a kis RNS-ek metilációját	108
6.7. Az SPMMV P1 egy egyedi tulajdonságokkal rendelkező silencing szupresszor.....	109
6.8. Az SPMMV P1 gátolja az aktív RISC-et.....	109
6.9. Az SPMMV P1 egy WG/GW domént tartalmazó AGO1-kötő fehérje.....	112
6.10. WG/GW domént tartalmazó virális RNS silencing szupresszorok és működési mechanizmusuk	113
6.11. A P1 cink finger doménje kulcsszerepet játszik a fehérje silencing szupresszor aktivitásában ..	115
6.12. A SPMMV P1 feltételezett működési mechanizmusa	116
6.13. A P1 fehérje szerepe az SPMMV patogenitásban.....	118
6.14. Elvesztette-e az SPFMV P1 a silencing szupresszor aktivitását?	118
6.15. Lehet-e az RNS silencing szupresszorokat "erősség" alapján rangsorolni?	119
6.16. A virális silencing szupresszorok többféle módon gátolják az RNS silencing-et	122
6.17. Az RNS silencing szupresszorok alkalmazása a biotechnológiában	123

7. AZ EREDMÉNYEK RÖVID ÖSSZEFOGLALÁSA	125
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	127
9. IRODALOMJEGYZÉK	128
10. FÜGGELÉK	145

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AGO	Argonaute fehérje
bp	bázispár
CIRV	<i>Carnation italian ringspot virus</i>
CymRSV	<i>Cymbidium ringspot virus</i>
DCL	<i>Dicer-like</i>
DI RNS	<i>defective interfering RNS</i>
dpi	az infiltrálás/inokulálás után eltelt napok száma
DRB	<i>ds RNA-binding protein</i>
ds	dupla szálú
ER	endoplazmatikus retikulum
GFP	zöld fluoreszcens fehérje
Gly (G)	glicin
HcPro	<i>helper-component proteinase</i>
His (H)	Hisztidin
IR	<i>inverted repeat</i>
miRNS	<i>micro RNS</i>
MVB	multivezikuláris test
nt	nukleotid
OD	optikai sűrűség
ORF	nyitott leolvasási keret
PoLV	<i>Pothos latent virus</i>
pre-miRNS	<i>precursor-miRNS</i>
pri-miRNS	<i>primary-miRNS</i>
PTGS	poszttranszkripcionális géncsendesítés
RdRp/RDR	RNS függő RNS polimeráz
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RITS	<i>RNA-induced transcriptional gene silencing complex</i>
RLC	<i>RISC loading complex</i>
sgRNS	szubgenomi RNS
siRNS	<i>small interfering RNS</i>
SPFMV	<i>Sweet potato feathery mottle virus</i>
SPMMV	<i>Sweet potato mild mottle virus</i>
ss	egyszálú
ta-siRNA	transz-ható siRNA
TBSV	<i>Tomato bushy stunt virus</i>
TEV	<i>Tobacco etch virus</i>
TGS	<i>Transzkripcionális géncsendesítés</i>
Trp (W)	triptofán
TRV	<i>Tobacco rattle virus</i>
Tyr (Y)	tirozin
UTR	nem transzlálódó régió
vsRNS	virális siRNS
VSR	<i>viral suppressor of RNA silencing</i>
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
CARD	<i>caspase recruitment domain</i>
PRK	<i>RNS indukált protein kináz</i>
Avr	Avirulencia
R gén	rezisztencia gén
NB-LLR	<i>Nucleotide binding leucine rich repeat</i>

1. BEVEZETÉS

A immunrendszer feladata az élőlények épségének megőrzése, amit a szervezet steady-state állapotának fenntartásaként is lehet értelmezni. Működésének alapja a saját és az 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 vált ki veleszületett és adaptív immunválaszt.

Az állati és a növényi veleszületett immunitás a vírusokat hasonló módon ismeri fel. A vírusok molekuláris jellegzetességeit (PAMP, pathogen associated molecular pattern) az ún. mintázat felismerő receptorok (PRR, pattern recognition receptor) ismerik fel. Az állati vírusok glikoproteinjeit az extracelluláris toll-szerű receptorok (TLR, toll-like receptor) ismerik fel. A sejten belül található TLR3 DNS-t, míg a TLR7 egyszálú RNS-t képes felismerni. A virális RNS-ek 5' végét ismerik fel a helikáz és a CARD domaint is tartalmazó RIG-1 és MDA-5 fehérjék, majd CARD doménjeiken keresztül indukálják az interferonok és a kemokinek expresszióját. A dsRNS indukálható protein kináz (PRK) duplaszálú RNS hatására gátolja a transzlációt és a fertőzött sejtekben apoptózist indukál.

A specifikus antivirális immunitást a sejtes immunitás biztosítja. Az antigén prezentáló sejtek hatására a naiv CD8⁺ T sejtekből citotoxikus T limfociták, majd memóriasejtek alakulnak ki. A major histocompatibility complex (MHC) által bemutatott antigén elindítja a specifikus B-sejtek proliferációját és az immunoglobulin termelésüket. Ez a komplex válasz hatékony víruseliminációt eredményezhet.

A növényi vírusok sejtfelszíni receptorokon történő felismerése egyelőre nem bizonyított, azonban több példát is találtak a sejten belüli PRR-ek működésére. A sejten belüli antivirális választ az ún. avirulencia (Avr) molekulák indítják be. A virális fehérjét, mint pl. replikáz vagy kapszid gének transzlációs termékeit a rezisztencia (R) gének ismerik fel. NB-LRR (nucleotide binding leucine rich repeat) fehérjét, Ser-Thr receptor-szerű kinázokat, valamint receptor-szerű egyéb fehérjét azonosítottak eddig a felismerési folyamatokban. A felismerési folyamat ezután hiperszenzitív reakciót, nekrozist vagy szisztemikus szerzett rezisztenciát indukál.

Az állati szervezetekben kialakult adaptív immunitásnak a növényekben az ún. RNS silencing (csendesítés) felel meg. Ez a védekezési mechanizmus a virális nukleinsavakat ismeri fel, majd adott hosszúságú kisebb egységekre darabolja fel. Ezt követően a 21-25 nt hosszúságú kis RNS-ek beépülnek az RNS silencing végrehajtó komplexébe (RISC). Az így kialakult RISC-kis RNS komplex elegendő információt hordoz ahhoz, hogy képes legyen kötni a virális

genomi vagy a target mRNS-t, majd annak vágásával vagy transzlációjának megakadályozásával gátolja a vírus replikációját.

Az állati és a növényi szervezetekben lévő antivirális rendszerek hatékonyan képesek gátolni a vírusok szaporodását. Ezért a vírusokban egymástól függetlenül olyan rendszerek alakultak ki, amelyekkel megakadályozzák gazdaszervezet antivirális válaszát.

Az állati vírusok a gazda veleszületett immunrendszerének szinte minden lépését képesek gátolni. A sejten belüli receptorok működését vagy közvetlenül, vagy az általuk elindított jelátviteli útvonal különböző lépéseinél gátolják, ezáltal csökkentik, vagy megakadályozzák az interferonok és a kemokinek expresszióját. A PKR transzfoszforilációját foszfátázok aktivitásának serkentésével gátolják, vagy olyan virális, részben duplaszálú RNS-ek expressziójával, amelyek domináns negatív módon akadályozzák a PKR működését.

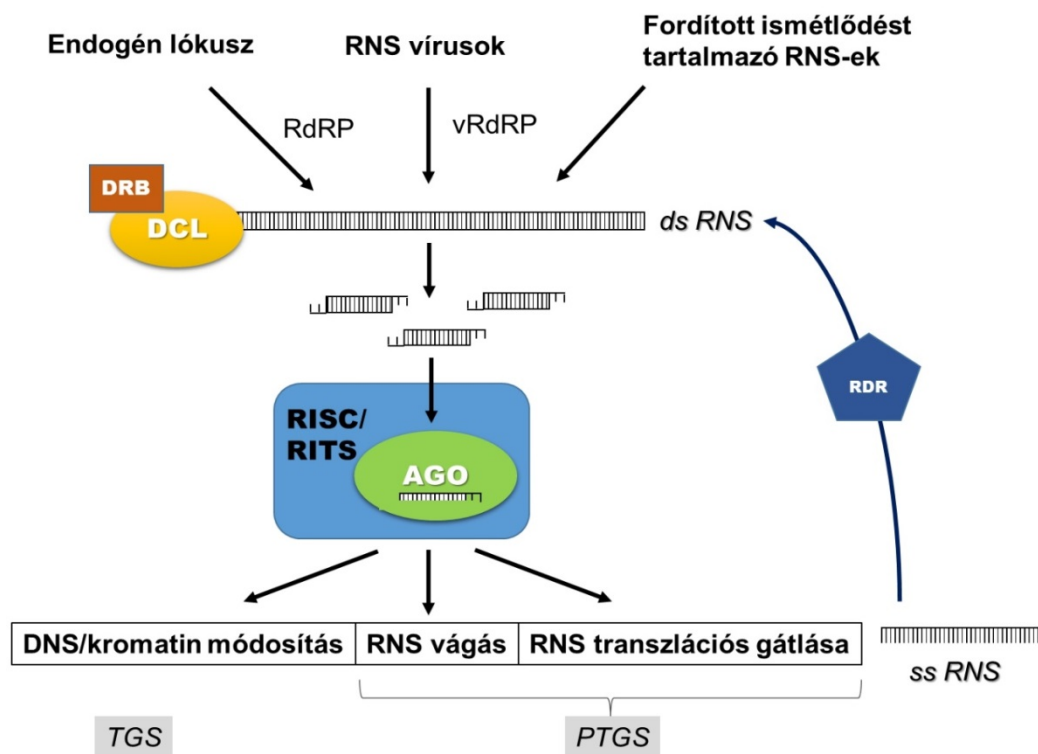
Az adaptív immunrendszer gátlása is többféleképpen következhet be. Pl. a virális RNS polimerázok pontatlan működésének következtében megváltozik a virális fehérje egy bizonyos epitóp szekvenciája, ami késleltetett vagy jóval gyengébb immunválaszt vált ki. Más vírusok az antigén prezentálást (MHC-I) képesek gátolni, mellyel a citotoxikus T-limfocita válasz kialakulását akadályozzák meg.

A receptoron keresztül történő vírusfelismerés esetében a vírusok aktívan nem vesznek részt a folyamatban, amennyiben az Avr-nek megvan a megfelelő R génje, akkor rezisztencia (inkompatibilis kapcsolat) áll fenn. Azonban, ha a gazda nem rendelkezik megfelelő R génnek, kompatibilis kapcsolat alakul ki, mely eredményeként a vírus akadálytalanul szaporodhat a növényben. A növényi vírusokban olyan fehérjék, ún. RNS silencing szupresszorok evolválódtak, amelyek a növényi adaptív immunitást hatékonyan gátolják. Az eddig megismert RNS silencing szupresszorok az RNS silencing minden egyes lépését képesek gátolni. Dolgozatomban különböző RNS vírusok RNS silencing szupresszorainak azonosításával, jellemzésével és működési mechanizmusával kapcsolatos eredményeimet szeretném bemutatni.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Az RNS silencing általános modellje

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 vagy endogén hosszú dsRNS-eket a RNáz III típusú endonukleáz komponensei ismerik fel, majd 20-26 nukleotid (nt) hosszúságú rövid, ún. kis RNS-ekre hasítják fel azokat (*dicing*). A folyamat eredményeként, olyan kis dsRNS-ek jönnek létre, melyeknek 5' végük foszforilált és mindkét végükön 2 nt hosszúságú 3' túlnyúló véggel rendelkeznek. A végrehajtó szakaszban a kis RNS-ek egyik szála beépül az Argonaute (AGO) fehérjék egyikébe, mely része egy nagy molekulatömegű silencing effektor komplexnek (*RNA Induced Silencing Complex*: RISC, vagy *RNA-induced Transcriptional Gene Silencing Complex*: RITS). Ezek a komplexek aztán a beépült kis RNS szekvenciájával komplementer RNS- vagy DNS szakasz transzlációjának, vagy transzkripciójának gátlását indukálják (I1. ábra).



I1. ábra Az RNS silencing általános modellje

A silencing útvonal további fontos komponensei a dsRNS-kötő fehérjék (DRB-k), illetve az RNS függő RNS polimerázok (RdRP). Az előbbieket az RNáz III típusú enzimek

specifitását diverzifikálják, míg az RdRP-k az ssRNS-ek dsRNS-é történő alakításával a silencing fenntartásáért és erősítéséért felelnek az egyes organizmusokban.

2.2. A kis RNS-ek típusai

A rövid, nem kódoló RNS-ek által megvalósított génszabályozás valószínűleg már az állatok, gombák és növények közös ősében is létezett. A mechanizmus sikerét mutatja, hogy a kis RNS-ek jelenleg óriási diverzitást mutatnak a különböző eukariótákban biogenezisüket és hatásmechanizmusukat illetően, és az új technológiák alkalmazásával egyre többet ismerünk meg közülük (Ghildiyal & Zamore, 2009).

Az endogén kis RNS-ek legfontosabb csoportját a miRNS-ek (*micro RNA*) alkotják, melyek a gombákból hiányoznak, de állatokban és növényekben egyaránt alapvető szabályozó funkciót töltenek be a növekedésben, fejlődésben, hormonális szabályozásban és a stresszválasz kialakításában. A miRNS útvonal kiesését semmilyen folyamat nem tudja kompenzálni, ezért a Dicer/DCL1, és egyes DRB null mutációk letálisak (Bernstein, Kim et al., 2003) (Garcia, 2008).

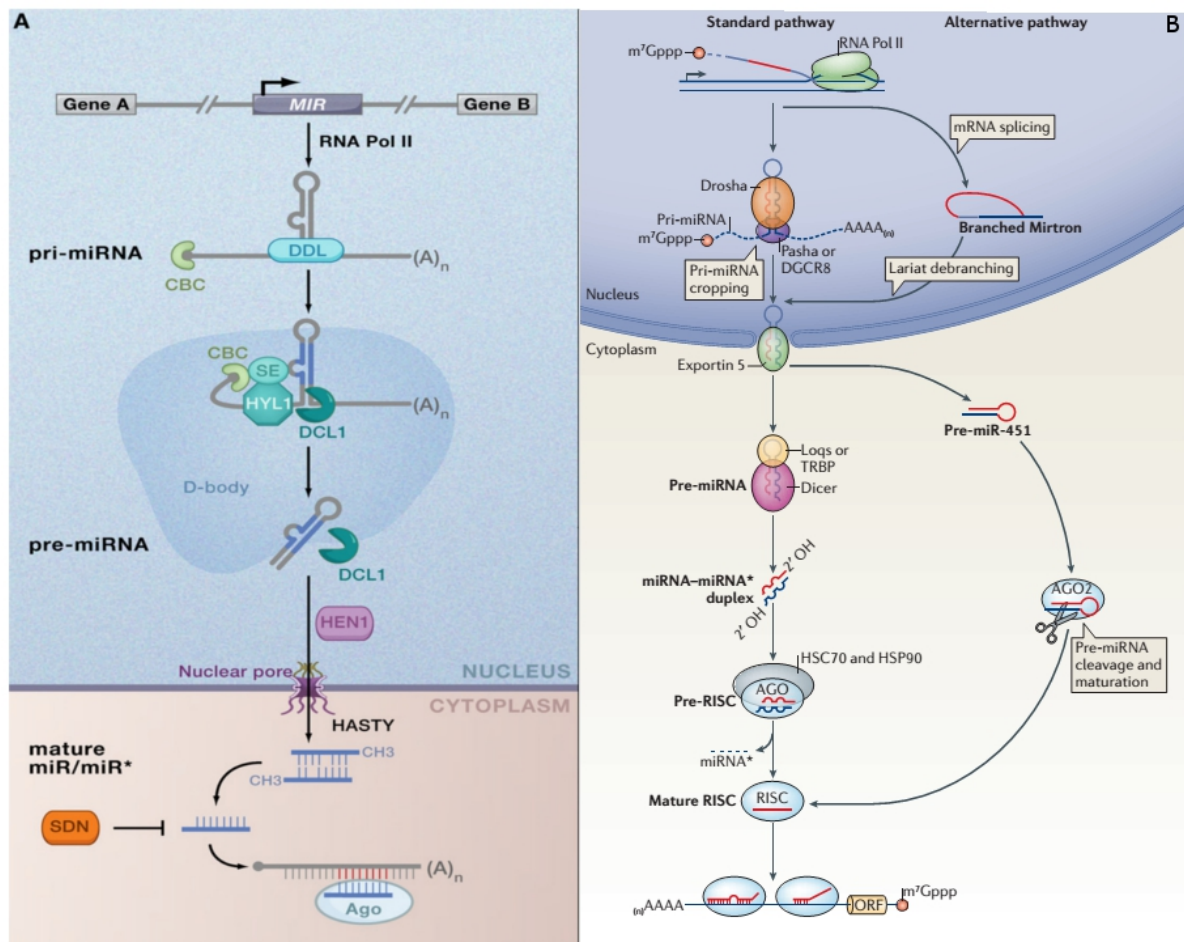
A MIR génekről a DNS függő RNS polimeráz II által átírt transzkriptumokon, a pri-miRNS-eken (*primary transcript miRNA*), szekvenciájukból adódóan egy vagy több rövid nyél-hurok szerkezet alakul ki. Az így keletkező dsRNS szakaszokat felismerő RNáz III enzim (állatokban a Drosha vagy növényekben a DCL1) a sejtmagban - egy DRB-ket és egyéb fehérjéket is tartalmazó komplex részeként - levágja a pri-miRNS-ből a nyél-hurok részt, kialakítva ezzel az ún. pre-miRNS-t (*precursor miRNA*). A Drosha a 10 nt-nál hosszabb hurkokat tartalmazó struktúrákat preferálja. A nyél-hurok határvonaltól számítva kb. 2 hélix fordulattal az 5' irányba vág, tehát eltávolítja a sapka és a poliA farkat hordozó ssRNS részt és egy 3' 2 nt hosszú túlnyúló véget képez (Zeng, Yi et al., 2005). A vágás precizitásához a Pasha DRB fehérje elengedhetetlen, mely felismeri a dsRNS-ssRNS határvonalat, és ahhoz viszonyítva 11 nt távolságra pozicionálja a Drosha katalitikus központját (Han, Lee et al., 2006).

A következő lépésben a pre-miRNS-ből vágódik ki az érett ds miRNS. Állatokban a citoplazmában érik a pri-miRNS pre-miRNS-sé, majd a Dicer nevű RNáz III enzim vágja miRNS-é. A Dicer kb. 22 nt-ot mér a pre-miRNS 5' szabad vége felől a hurok irányába, és a vágás után szintén egy 3' 2 nt túlnyúló véget képez (Park, Heo et al., 2011). A reakciót, annak specificitását és a Dicer toborzását szintén DRB segíti (Chendrimada, Gregory et al., 2005) (Fukunaga, Han et al., 2012).

A növények sejtmagjában, az ún. D-testben (*dicing body*) megy végbe a teljes miRNS biogenezis, és mindkét érési lépést a DCL1 katalizálja. A mikroprocesszor komplex részei még a HYL1 és SE fehérjék, melyek a DCL1 aktivitást gyorsítják és biztosítják a vágás pontosságát (Dong, Han et al., 2008).

Az érett ds miRNS-ek hossza általában 21-22 nt (Vaucheret, 2009). Szerkezetükre jellemző, hogy lötyögő, vagy nem párosodott bázisokat (*bulge*) tartalmaznak (I2. ábra). Bizonyos esetekben ugyanarról pri-miRNS-ről többféle miRNS is képződhet (isomiR), mert az RNS szekvenciája és a szerkezete befolyásolja a Drosha és a Dicer vágóhelyét, ezáltal egy prekurzorról egy miRNS populáció képződhet (Starega-Roslan, Witkos et al., 2015).

Állatokban a pre-miRNS az Exportin 5 (XPO5) fehérje által kerül a sejtmagból a citoplazmába. Növényekben a magban kialakult ds miRNS-t a HASTY exportálja.



I2. ábra A miRNS-ek érése A) növényekben (Voinnet 2009) és B) állatokban (Ameres et al. 2013)

Az effektor AGO-ba csak a miRNS egyik szála épül be, ez a szűk értelemben vett miRNS. A nem funkcionális kiegészítő, ún. csillag (*star*), vagy * szál a szabaddá válása után rögtön lebomlik. Az AGO-ba beépülő szál kiválasztása termodinamikailag meghatározott (Schwarz, Hutvagner et al., 2003). A miRNS-ek hatásukat transz fejtik ki, olyan mRNS-eken, melyeknek kódoló, vagy 3' nem transzlálódó régiójában (UTR) a miRNS-el, vagy annak egy részével komplementer szekvencia található.

A miRNS-ek hatása megvalósulhat a cél mRNS vágásában, az AGO *slicer* aktivitása révén, vagy az mRNS transzlációs gátlásában. Az mRNS vágásához közel tökéletes szekvenciakomplementaritás szükséges a miRNS-el, ami különösen szigorú a vágóhely környezetében (Schwab, Palatnik et al., 2005), de a megfelelő hatékonysághoz a 3' *mismatch*-ek is szükségesek (Liu, Wang et al., 2014). Az mRNS vágása eddigi ismereteink szerint növényekben általánosabb jelenség, ennek megfelelően a növényi miRNS-ek szekvenciakomplementaritása nagyobb fokú, és kiterjedtebb a miRNS mentén a szabályozott mRNS-hez viszonyítva (Brodersen, Sakvarelidze-Achard et al., 2008). Az állati rendszerekben az evolúciósan valószínűleg ősi transzlációs gátlás a jellemzőbb. A két mechanizmus közötti alapvető elvi különbség az, hogy az mRNS vágás után lebomlik, ezzel szemben a transzlációs gátlás esetében tárolódik, és potenciálisan később újra mobilizálható, mely egy újabb lépést adhat a génexpresszió finomszabályozásához. Ugyanakkor megjegyzendő, hogy egyre több az arra vonatkozó bizonyíték, hogy a miRNS-ek kijelölhetnek lebontásra transzkriptumokat anélkül is, hogy előzőleg azok vágását indukálnák (Giraldez, Mishima et al., 2006).

Az elvágott mRNS 5' vége az exoszóma által gyorsan lebomlik a sejtben, míg a 3' vég némileg stabilabb, bontását a XRN4 végzi a citoplazmás P-testben (*processing body*). A 3' vég relatív stabilitása teszi lehetővé az ún. degradóma (*degradome*) szekvenálást, melynek során a sapka nélküli RNS-ek 5' RACE-el történő felszaporítása után azonosítható a kis RNS-ek által elvágott cél mRNS-ek populációja.

A kis RNS-ek másik nagy csoportját a siRNS-ek alkotják. Endogén vagy exogén dsRNS-ekből keletkeznek, például genomi fordított ismétlődésekről (IR), természetes antiszensz transzkriptumokról, vírusokról, vagy az RdRP-k működésének eredményeként keletkező dsRNS-ekből. Hatásukat cisz- és transz módon is kifejthetik. Előbbi esetben annak az RNS populációnak a degradációját, vagy DNS szakaszának a metilációját irányítják, melyből közvetlenül, vagy - az RdRP-k hatásának köszönhetően - közvetve keletkeztek (auto-silencing). Ez történik például a genomban található ismétlődő szekvenciák, vagy transzpozabilis elemek TGS-e esetében (Kasschau, Fahlgren et al., 2007). Transz hatásmechanizmus esetében a gátlást a siRNS a forrás-szekvenciájától eltérő szekvencián fejt

ki. Ilyenek például a növényekben megtalálható *trans*-siRNS-ek (*trans acting siRNA*), melyek a TAS génekről keletkezve egy miRNS-t, DRB-t és RdRP-t is igénylő folyamat által érnek, és többek között transzkripció faktorok transzlációját regulálják (Hunter, Willmann et al., 2006).

A kis RNS-ek harmadik, és egyben evolúciósan legfiatalabb nagy csoportját a piRNS-ek alkotják. Nevük a *Piwi-interacting* RNS-ből származik, valódi szövetes állati szervezetekben (*Metazoa*) fordulnak elő, és szerepük a csíravonal genetikai anyagának védelme a transzpozábilis elemek ellen. Képződésükhöz nem kell Dicer, más endonukleázok vágják ki őket (pl. Zucchini) és az AGO fehérjék közé tartozó PIWI fehérjékbe töltődnek. Hatásukat kétféleképp fejthetik ki, egy genetikai és egy adaptív útvonalon keresztül. Az első esetben a genom piRNS klasztereiről elsődleges piRNS-ek keletkeznek és TGS szinten csendesítik a transzpozábilis elemeket. A második esetben a hatás PTGS szinten valósul meg az aktivizálódott transzpozábilis elemeken az elsődleges piRNS-ek által generált másodlagos piRNS-ek és a PIWI fehérjék részvételével (Czech & Hannon, 2016).

Fontos lépés a kis RNS-ek érése során azok 3' végi 2'-O-metiláció általi stabilizációja. Növényekben az összes különböző eredetű kis RNS, állatokban a piRNS-ek, *Drosophila*-ban pedig a piRNS-ek és a siRNS-ek metilálódnak egy kis RNS specifikus sejtmagi metiltranszferáz, a HEN1, és annak ortológjai által (Tkaczuk, Obarska et al., 2006). A metiláció hiányában ezek a kis RNS-ek degradálódnak és az általuk megvalósított génszabályozás sérül.

2.3. Az Argonaute fehérjék

Az RNS silencing effektorai a PIWI szupercsaládba tartozó, erősen konzervált, kb. 100 kDa-os AGO fehérjék. Ezek a fehérjék prokariótákban, eukariótákban és archeákban egyaránt megtalálhatóak és nagymértékű funkcionális és szerkezeti hasonlóságot mutatnak. Az első kristályszerkezeteket technikai okok miatt prokariótákból és archeákból ismerhettük meg (Song, Smith et al., 2004) (Yuan, Pei et al., 2005) és csak jóval később sikerült az eukarióta AGO-k szerkezetét is feltárni (Elkayam, Kuhn et al., 2012) (Schirle & MacRae, 2012).

Az eukarióta AGO-kra jellemző domének az N (N-terminális) domén, a PAZ (PIWI - Argonaute - Zwiller) domén és a MID (*middle*) domén, melyek globulárisak és amelyeket linker régiók kötnek össze. Az N- és a PAZ domén, valamint a PIWI és a MID domén egy-egy karéjt alkotnak a térszerkezetben. Az N domén szerepet játszik az mRNS vágásában, a ds kis RNS kitekerésében, a vágási termékek, valamint a kis RNS kiegészítő szálának disszociáltatásában (Kwak & Tomari, 2012). A PAZ domén az ss kis RNS 3' végi cukor-foszfát gerincét köti, így a kötés szekvenciafüggetlen. A PIWI domén RNáz H aktivitású katalitikus helyet tartalmaz, benne gyakran egy, az eukarióta AGO-kra jellemző, DDH motívummal. Ez a domén végzi az

mRNS vágását és itt található a WG/GW fehérjék kötő-felülete is. A MID domén egy bázikus zsebet alakít ki a PIWI doménnel, és ez köti a kis RNS 5' végi foszfát csoportját, valamint ez a domén felelős az 5' végi nukleotid-specifitásért is (Swarts, Makarova et al., 2014).

Az AGO-k nagy molekulatömegű komplexek tagjaként működnek, vagy átmenetileg részei azoknak. Ezekről a komplexekről, és azok komponenseiről a mai napig viszonylag keveset tudunk. A TGS-t végző RITS komplexet *Schizosaccharomyces pombe*-ben jellemezték eddig a legjobban. Azonosított tagjai az AGO1-en kívül a Tas3 WG/GW fehérje, a Chp1 kromodomén fehérje, és az Sgf73 SAGA-komplex alegység (Swarts et al., 2014). A RITS nem maga végzi az epigenetikai módosítást, hanem toborozza a hiszton metilációt végző CLRC-t (*Clr4 complex*). *Arabidopsis*-ban az RNS függő DNS módosítást (RdDM) AGO4/6/9 tartalmú komplexek indukálják és preferenciálisan 24 nt hosszú kis RNS-eket kötnek (Mi, Cai et al., 2008).

Bár az AGO-k képesek önmagukban is töltődni *in vitro*, ez azonban gyenge hatásfokú (Gregory, Chendrimada et al., 2005). *In vivo* a RISC felépülését és a kis RNS-el való töltődését a Hsp70/Hsp90, és egyéb chaperon rendszerek ATP-függő módon katalizálják (Iki, Yoshikawa et al., 2010) (Miyoshi, Takeuchi et al., 2010). Ezen kívül megvédik az AGO-t a proteaszóma általi degradációtól (Johnston, Geoffroy et al., 2010). *In vitro* vizsgálatok alapján további partner a növényekben a ciklofilin 40 fehérje, mely csak a RISC felépülésében vesz részt, az effektor funkcióhoz nem szükséges (Iki, Yoshikawa et al., 2012).

Az RISC aktiválásához szükséges az AGO által megkötött kis RNS egyszálúsítása, ami ATP-független folyamat. A miRNS-ek esetében csak az egyik szál funkcionális, ezért biztosítani kell, hogy a megfelelő szál maradjon az aktív RISC-ben. Az lesz a vezető szál, melynek 5' vége a ds kis RNS termodinamikailag instabilabb végén található (Schwarz et al. 2003). A vágó aktivitással rendelkező AGO-k esetében az RISC aktiválás a * szál elvágása által történik (Matranga, Tomari et al., 2005). A vágó aktivitás hiányában a kis RNS-ben található *bulge*-ok segítik a RISC töltődést és az RNS szálak szétválasztását is (Yoda et al. 2010). Korábban úgy gondolták, hogy a miRNS kitekeréséhez ATP szükséges. A legújabb modell szerint viszont az ATP az AGO kinyitásához kell, mely utána úgy működik, mint egy kinyújtott gumiszalag, vagy felhúzott egércsapda: a merev kis RNS megkötése után a szerkezet elenged, és ez elegendő energiát szolgáltat a kis RNS egyszálúsításához (Iwasaki, Kobayashi et al., 2010). Végül az ss kis RNS beül a MID-PIWI karéj által kialakított bázikus csatornába, és a PAZ domén megköti a 3' véget.

Az aktivált RISC egyrésztől indukálhat transzlációs gátlást. Ehhez általában elegendő a tökéletes szekvenciakomplementaritás a kis RNS 2-8 nt közötti, A-hélix konformációjú ún.

seed régiója és az mRNS között (Lewis, Burge et al., 2005). A folyamatban szerepet játszanak a AGO-kötő WG/GW fehérjék (ld. később). Másrésről nagyfokú szekvenciakomplementaritás, és *slicer* aktivitással rendelkező AGO esetén a RISC vágja az mRNS-t. Ez a vágás általában a kis RNS 10 és 11 nt-ja között történik. Az elvágott mRNS elengedése és a RISC újrahasonosulása ATP felhasználásával történik (Haley & Zamore, 2004).

2.4. Az RNS silencing a *Caenorhabditis elegans*-ban

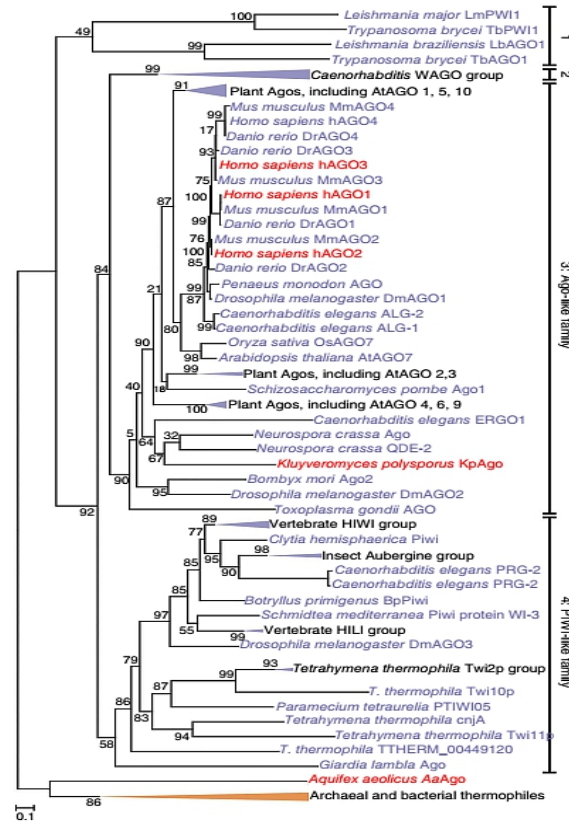
Az antiszensz orientációjú RNS-ek bejuttatása egy rendszerbe gátolja a szensz RNS-ek expresszióját, már régóta ismert volt az „antiszensz gátlás” gyűjtőfogalom néven (Ecker & Davis, 1986), melynek működési mechanizmusáról több elmélet is létezett, például hogy az antiszensz RNS-ek hibridizálnak a szensz RNS-ekkel és a gátlást ezáltal fejtik ki.

Fire és mtsai 1998-ben elsőként írták le *C. elegans*-ban, hogy az állatba beinjektált dsRNS-ek a velük szekvenciahomológiát mutató gének expresszióját csökkentik. Eredményeik meglepőek voltak, mivel a bejuttatott ssRNS hatása messze elmaradt a dsRNS-ek hatásától, ami arra utalt, hogy a jelenség hátterében nem RNS-RNS hibridizáció rejlik. Megállapították azt is, hogy a bejuttatott ds RNS-ek kis száma miatt a kiváltott hatás nem sztöchiometrikus, és feltételezték, hogy biológiai funkciója van (Fire, Xu et al., 1998). Az RNS interferencia felfedezéséért Fire 2006-ban kollégájával, Melloval együtt Fiziológiai és Orvostudományi Nobel díjat kaptak.

Az első miRNS felfedezése is *C. elegans*-ban történt: Lee és mtsai 1993-ban azonosították és klónozták a *lin-4* gént, melynek hiánya fejlődési rendellenességeket okoz. Kiderült, hogy a gén nem kódol fehérjét, és két rövid transzkriptum érik róla, egy 61, és egy 22 nt hosszú. A *lin-4* gén szekvencia-komplementaritást mutatott a *lin-14* gén 3' UTR-jében lévő 7-szeres tandem ismétlődéssel. A szerzők megállapították, hogy a *lin-4* valószínűleg antiszensz gátlás által regulálja a *lin-14* gén expresszióját.

A kis RNS-ek szabályozó szerepe különösen fontos a csíravonalban és az ivaros folyamatokhoz kapcsolódóan (Ruby, Jan et al., 2006). A miRNS útvonalon kívül három endogén siRNS útvonalat találunk *C. elegans*-ban: az egyik az ún. elsődleges endo-siRNS, vagy 26G siRNS útvonal, az ebben résztvevő siRNS általában 26 nt hosszúak. A másodlagos 22G endo-siRNS-ek útvonala az előzőhöz kapcsolt, az ebben résztvevő siRNS-ek zöme 22 nt hosszú és 5' trifoszforilált. Mindkét endo-siRNS osztályra az 5' végi guanozin jellemző. A harmadik fő útvonal a 21 nt hosszú, 5' végükön uridint tartalmazó piRNS-ek által regulált folyamatok.

Az RdRP-k aktivitása nélkülözhetetlen az endo-siRNS-ek biogenezéséhez. A 26G siRNS-ek az RRF-3 RdRP közreműködésével keletkeznek, majd ezek a siRNS-ek az EGO1 Argonautába töltődnek, és toborozzák a RRF-1 RdRP-t, amely a 22G siRNS-ek prekursorát írja majd át (Vasale, Gu et al., 2010). Az EGO1 RdRP csírávonal specifikus, és funkciója részben átfed a RRF-1-el.



13. ábra Az AGO fehérjék filogenetikai fája (Swarts et al. 2014)

További lényeges aspektus, hogy az RdRP aktivitásnak köszönhetően a silencing nem sejt-autonóm *C. elegans*-ban, ellentétben pl. az emlősökkel vagy *Drosophila*-val. Ez azt jelenti, hogy a silencinget kiváltó dsRNS helyétől a kis RNS-ek az RdRP-k által megsokszorozva szétterjedhetnek a szervezetben és valószínűleg amplifikálódnak minden újonnan elért sejtben (Jose & Hunter, 2007). A jel a SID1 (*systemic RNAi defective 1*) csatornákon keresztül szisztemizálódik (Feinberg & Hunter, 2003).

C. elegans-ban egy Dicer, és 27 AGO fehérjét találunk, utóbbiak több, egymással távoli rokonságban lévő klaszterba tartoznak (Yigit, Batista et al., 2006) (13. ábra). A 22G útvonal effektorai főleg a WAGO (*worm-specific AGO*) fehérjék, a piRNS útvonal effektora a PRG-1, míg a 26G útvonalban az ALG-3, -4 és ERGO-1 fehérjék vesznek részt.

2.5. Az RNS silencing a *Drosophila melanogaster*-ben

D. melanogaster-ben a miRNS, siRNS és a piRNS útvonal is működik. 2 Dicer-t találunk, melyek funkciójukban élesen elkülönülnek egymástól: a Dicer-1 a miRNS-ek, a Dicer-2 pedig a siRNS-ek képzését végzi (Lee, Nakahara et al., 2004).

A RISC felépülése jól ismert *D. melanogaster*-ben. A Dicer-2 a siRNS útvonalon egy DRB-vel, az R2D2-val és a TAF11 fehérjével együtt alkotja a RISC-töltő komplexet (*RISC loading complex*, RLC) (Liang, Wang et al., 2015). A Dicer-2 a ds kis RNS kevésbé stabil, az R2D2 pedig a stabilabb végét köti, ez teszi lehetővé, hogy az AGO2 MID doménje a kevésbé stabil véget vegye fel, végeredményben tehát az RLC a kis RNS aszimmetriáját detektálja. A egyik javasolt modell szerint az RLC-ből alakul ki a ds kis RNS-el töltött komplex, a pre-RISC, majd miután megtörtént a * szál eliminációja, kialakul az aktivált 80S holo-RISC (Lee et al., 2004). Ma már tudjuk, hogy Hsp70/90 is szükséges a RISC töltődéshez, ATP függő módon a chaperon tartja megfelelő konformációban az AGO2-t a ds kis RNS felvételéhez (Iwasaki et al., 2010).

Az R2D2 szerepet játszik a *Drosophila*-ban abban is, hogy az AGO1 siRNS-eket ne csak miRNS-eket kössön (Förstemann et al. 2007). A LOQS DRB fehérje mind a siRNS, mind a miRNS útvonalban szerepet játszik, 4 izoformája pedig tovább diverzifikálja funkcióját (12. ábra).

A piRNS útvonal jól tanulmányozott, milliós nagyságrendű különböző piRNS szekvencia ismert, melyek néhány száz lókuszról képződnek. A *Drosophila* 5 AGO fehérjéje közül az AGO3, Piwi és Aub tartozik a PIWI fehérje alcsaládba, melyek főleg a csíravonalban expresszálnak és a piRNS útvonalban vesznek részt (Ghildiyal & Zamore, 2009).

Az AGO2-nek vágó aktivitása van, és a siRNS útvonalon hat, míg az AGO1 a miRNS útvonal effektora, és transzlációs gátlást indukál.

Az RdRP-k *Drosophila*-ban nem vesznek részt a silencingben, ezért a piRNS-ek RdRP-független módon csendesítik a transzpozábilis elemeket.

A már AGO1-be töltődött miRNS-ek 3' vége csonkolódhat. Ezt a Nibbler exonukleáz végzi, és funkciója ellentétes a HEN1 metiltranszferázéval. Feltételezhetően a piRNS-ek keletkezésük után hosszabbak, mint az optimális lenne, ezért e megfelelő hosszat a Nibbler alakítja ki, és a lecsonkolt véget metilálva stabilizálja a piRNS-t a HEN1. A piRNS végeként valószínűleg verseng a két enzim, amely folyamat egyensúlya a légy korának előrehaladtával a Nibbler irányába tolódik, és hozzájárul az öregedéshez és a reprodukciós képesség gyengüléséhez (Wang, Wu et al., 2010).

2.6. Az RNS silencing az emberben

Az ember az emlősök egyik fő modellje, és a humán RNS silencing mechanizmusának felderítése kiemelt fontosságú az orvosi kutatások szempontjából is a betegségekben betöltött szerepe miatt.

Mindhárom kis RNS útvonal működik emberben. Itt is két RNáz III enzimet találunk, a Drosha-t és a Dicer-t. A Drosha a DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region 8*) DRB-vel kapcsolódva a pre-miRNS-ek képzését végzi, melyekből a Dicer vágja ki a miRNS-t a citoplazmában a már korábban ismertetett módon (I2. ábra).

A Dicer emlősökben is része az RLC-nek, a TRBP (*transactivating response RNA-binding protein*) DRB fehérjével, és az Ago-val együtt (MacRae et al. 2008).

Összesen nyolc AGO fehérjét azonosítottak emberben, ebből négy - HIWI1, HIWI2, HIWI3 és HILI - a PIWI szupercsaládba tartozik, a másik négy - AGO1, AGO2, AGO3 és az AGO4 – pedig az AGO fehérjecsaládba (3. ábra). A PIWI fehérjék a piRNS útvonal effektorai. Expressziójuk szomatikus sejtekben sokszor különböző daganatos betegségekkel kapcsolatban merül fel, de a HIWI2 például többféle testi szövettípusban is megtalálható, bár alacsonyabb szinten, mint csírvonalban (Keam et al. 2014).

Az AGO1 a TGS effektora. Az AGO2 az egyetlen humán Argonauta, melynek esetében pedig leírták, hogy vágó aktivitása van (Liu et al. 2004). Az általa tartalmazott DDH motívum a katalitikus centrumban megtalálható az AGO3-ban is, amelynek azonban nincs *slicer* funkciója (Liu et al. 2004). A vágáshoz a DDH-hoz közel kell lennie két másik doménnek is, melyek azonban az AGO3-ból hiányoznak és helyette vágást gátló szubdomének találhatóak. Az AGO2 N domén 47. metioninja esszenciális a RISC aktivitáshoz. Az AGO4

funkcionálisan különbözik a három másik AGO-tól, funkciója jelenleg nem világos (Schürmann et al. 2013).

Humánban írták le *in vitro*, hogy a minimál RISC AGO-t és kis RNS-t tartalmaz, és a vágáshoz ATP-t és Mg^{2+} iont igényel (Rivas, Tolia et al., 2005). Az AGO2 tartalmú RISC-be töltött siRNS 5' vége felől kezd el bázispárosodni a cél mRNS-el, és amennyiben ez a kapcsolat elég stabil, úgy a 3' vég is kapcsolódik. Ha nagymértékű a komplementaritás, úgy megvalósul a vágás (Ameres, Martinez et al., 2007).

2.7. RNS silencing az *Arabidopsis thaliana*-ban

A növényi RNS silencing elsőszámú modellnövénye az *A. thaliana*. Összesen 4 DCLt, 10 AGO-t és 6 RdRp-t és 6 DRB-t azonosítottak benne, melyek nagy komplexitású és esetenként redundáns rendszert biztosítanak.

A DCL1 a miRNS és a genomi fordított ismétlődésekről siRNS-ek biogenezéséért felel. A DCL2 a nat-siRNS, a DCL3 a genomi ripít régiókról képez siRNS-eket, a DCL4 pedig ta-siRNS útvonal RNáz III enzime, és néhány miRNS kialakításáért felelős. A DCL1 és -4 21 nt hosszú kis RNS-eket vág, a DCL2 22, a DCL3 pedig 24 nt hosszúakat. A DCL-ek funkciói és expressziós mintázatai részben átfednek és promótereikben fény-, stressz- és hormonválasz elemek találhatók, melyek hozzájárulnak a növények környezeti adaptációjához (Liu, Feng et al., 2009).

Az eddig azonosított növényi AGO-k közül egy sem tartozik a PIWI alcsaládba, ennek megfelelően a piRNS útvonal növényekből hiányzik, de néhány speciális egyéb kis RNS útvonal csak ebben a törzsben jellemző. Az *Arabidopsis* 10 AGO fehérjéje három - AGO1/5/10, AGO2/3/7 és az AGO4/6/8/9 - kládba sorolható, míg az *Oryza sativa* 18 AGO fehérjéje négy kládba tagozódik (Vaucheret, 2008). Jellemző az 5' végi nukleotid preferencia, ami hozzájárul a kis RNS-ek szétszétválasztásához az AGO-k között. Az AGO1 az uracil véget, az AGO2/4/6/9 pedig az adenin 5' végű kis RNS-eket köti (Mi et al., 2008). Bizonyított vágó aktivitással az AGO1/2/4/10 rendelkeznek, az AGO4/5/6/9 a 24 nt hosszú siRNS-eket kötik, és a TGS útvonal elemei. Az AGO1/2 az antivirális útvonal effektorai (ld. később).

A silencing útvonal egyes elemei maguk is a silencing által reguláltak. A miR162 és miR838 a DCL1 (Xie, Kasschau et al., 2003) (Rajagopalan, Vaucheret et al., 2006), miR168 pedig az AGO1 transzlációját szabályozza (Vaucheret, Mallory et al., 2006).

Növényekre jellemző a kis RNS-ek 3' végi metilációja, mely szükséges azok stabilizálásához. A metilációt a HEN1 sejtmagi lokalizációjú metiltranszferáz végzi (Li, E et al., 2005b). A *hen1* hipomorf mutánsokban a miRNS-ek mennyisége lecsökken, és változatos

méretűek lesznek (Li et al., 2005b). Ennek oka az oligouridiláció, mely során 1-6 uracil adódik a metilálatlan kis RNS 3' végéhez, és amely kijelöli azt az exonukleázok általi lebontásra. Az uridilációt végző nukleotidil-transzferázok a HESO1 és a URT1 (Ren, Chen et al., 2012) (Tu, Liu et al., 2015).

Bár a növényi miRNS-ek nagy szekvencia komplementaritást mutatnak a regulált mRNS-hez, és az mRNS vágás sokkal gyakoribb növényekben, mint állatokban, ugyanakkor a transzlációs gátlás is elterjedt mechanizmus (Brodersen et al., 2008).

A növényi silencing nem sejt-autonóm, a siRNS-ek sejtről-sejtre a plazmodezmákon keresztül terjedve rövid és hosszútávú szignálmolekulaként funkcionálnak. A szisztémikus silencinghez RdRP aktivitás szükséges (Himber, Dunoyer et al., 2003). A floémbe szállítódó 24 nt hosszú kis RNS-ek a távoli szövetekben is géncsendesítést indukálhatnak (Melnik, Molnar et al., 2011).

2.8. A WG/GW fehérjék

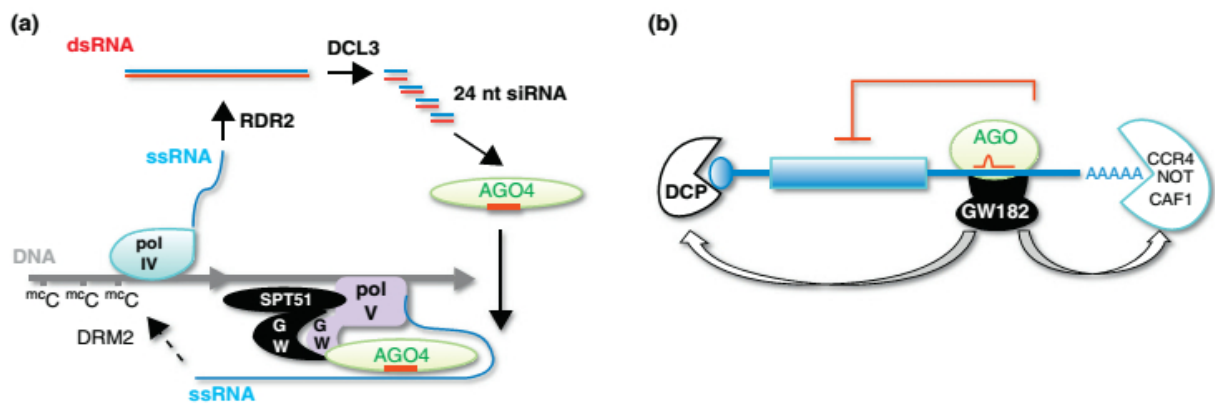
A GW182 családba tartozó fehérjecsalád első tagját egy kevert polineuropátiában szenvedő páciensben azonosították (Eystathiou, Chan et al., 2002). A 182 kDa-os fehérje egy foszoprotein, melyen egy RNS kötő helyet és egy glicin-triptofán (GW) ismétlődéseket tartalmazó domént azonosítottak. A fehérje egy elektrondenz citoplazmás struktúrában volt lokalizálható, melyet elneveztek GW-testnek: Ezt később a P-testekkel (*processing body*) azonosították, ahol számos más folyamat mellett az mRNS-ek lebontása, és transzlációs gátlása is megvalósul. Hogy a GW/P-testeknek a PTGS-ben van szerepük, azután vált nyilvánvalóvá, hogy *C. elegans*-ban és emberben is miRNS-eket és AGO fehérjéket detektáltak bennük (Sen & Blau, 2005) (Ding, Spencer et al., 2005).

Meg kell jegyezni, hogy a P-test elnevezést gyakran csereszabatosan használják a GW-testtel. Úgy tűnik azonban, hogy e két struktúra nem feltétlenül azonos. *D. melanogaster* embrióban a fejlődés bizonyos stádiumaiban a GW-testek a sejtmagban is megjelennek, szemben a kizárólag citoplazmás P-testekkel, valamint számos fehérje azonosítható, melyek jelenléte csak az egyik struktúrára jellemző. Ráadásul a P-testek cikloheximid kezelés hatására szétesnek, míg a GW testek rezisztensek erre (Patel, Barbee et al., 2016).

Az AGO kötésre képes GW ismétlődéseket AGO-horognak nevezték el, ezen keresztül kötődik a fehérje a PIWI domén 5' nukleotidkötő helyéhez. A motívumok evolúciósan konzerváltak bizonyultak, és az azonosított GW fehérjék szerepét mind a TGS, mind a PTGS szintjén kimutatták (Till, Lejeune et al., 2007). Ezzel egyidőben *A. thaliana*-ban leírták, hogy a DNS függő RNS polimeráz V (PolV) NRPE1 nevű legnagyobb alegységének

C terminálisán AGO-horgot találunk (El-Shami, Pontier et al., 2007). A PolV az AGO4-gyel kapcsolódik, és ez a komplex végzi a TGS-ben az RNS függő DNS módosítást (RdDM) (Li, Pontes et al., 2006). Később a humán GW182 vizsgálata során kiderült egyrészt, hogy egy GW motívum egy AGO-t köt, és bizonyították azt is, hogy egy GW fehérje több AGO2 fehérjét is képes kötni egyszerre (Takimoto, Wakiyama et al., 2009).

A GW182 fehérjék mind a PTGS, mind a TGS (4. ábra, a) útvonalában részt vehetnek. Napjainkig mindössze néhányat azonosítottak, prediktálásuk igen nehéz, mivel az egyébként funkcionális és evolúciósan is konzervált ismétlődő GW, WG és GWG motívumok eltérő helyeken és mintázatban és mennyiségben helyezkedhetnek el, ezen kívül viszont nem tartalmaznak homológ szekvenciákat (Karlowski, Zielezinski et al., 2010). Ezen felül valószínű, hogy a kötéshez csak a triptofánra van szükség, a mellette bármely rövid oldalláncú aminosav lehet, melynek szak annyi a szerepe, hogy biztosítsa a sztérikus hozzáférhetőséget a triptofánhoz. Az is valószínű, hogy a triptofán oldallánc nukleotidot utánozva kötődik be a PIWI doménbe (Pfaff & Meister, 2013). Az AGO-horog általában az N terminálison található, a C terminálison a Poli-A kötő fehérjét (PABP) kötő kötőhelyet találunk, és ez a vég toborozza a deadenilázokat is, melyek a poliA lebontását végzi, melyet a sapka levágása követ, végül az RNS lebomlik (4. ábra, b).



I4. ábra A WG/GW fehérjék funkciója a) a TGS, b) és a PTGS során (Azevedo et al. 2011)

A GW182 humánban, és gerincesekben azonosított paralógjai a TNRC6A, B és C (*trinucleotide repeat containing*) fehérjék több tíz GW motívumot tartalmaznak, melyek közül csak néhány vesz részt az AGO kötésében. Mindhárom TNRC6 fehérje képes azonban mind a 4 AGO-hoz kötődni és a kötés esszenciális a RISC és RITS funkcióhoz (Lazaretti, Tournier et al., 2009).

Növényekben is ismert néhány endogén AGO-horog fehérje. Az SDE3 helikáz az RDR6-tól *downstream* vesz részt a silencing folyamatában, valószínűleg az RDR6 ss templát RNS-ek mennyiségének növelésével (Garcia, Garcia et al., 2012). Az SPT5 transzkripcióss elongációs faktor több, mint 40 GW motívummal pedig az eddig leírt legnagyobb AGO platform növényekben (Bies-Etheve, Pontier et al., 2009).

Az evolúció során több különböző - például vírus eredetű - fehérjében jelent meg az AGO-horog, mely tükrözi annak hatékonyságát (Giner, Lakatos et al., 2010) (Azevedo, Garcia et al., 2010).

2.9. Vírusok

A vírusok egy vagy több nukleinsavból és fehérjeburokból álló templátmolekulák, melyek képesek önmaguk replikációjukat irányítani a gazdasejtben (Hull, 2002). Míg az állati vírusok terjedése többnyire a sejt lízisét vagy exocitózist igényel, addig a növényi vírusok mechanikai úton – sebzésekkel -, vagy állati/növényi vektorok által terjednek. Így a növényi vírusok számára előnyös, ha a gazda a fertőzést túléli, és a régóta fennálló gazda-vírus kapcsolatokat ezért attenuált tünetek és kifinomult molekuláris interakciók jellemzik.

A növényi vírusok túlnyomó többsége pozitív szálú (+) ssRNS vírus, melyek így részben, vagy egészben azonnal transzlálható mRNS-ként működnek. A virális genomok több fehérjét is kódolnak, transzlációjuk pedig többféle stratégia által valósulhat meg.

A *Potyviridae* család a gazdaságilag legjelentősebb csoportok közé tartozik, széles gazdaspektrum és súlyos tünetek jellemzik sok tagjukat. Legtöbb nemzetségében a vírusok mintegy 10 kilobázis (kb) hosszú genomjukról egyetlen óriás poliproteint transzlálnak, és amelyből autoproteolitikus aktivitással jönnek létre az egyes fehérjék. Ebben az esetben a vágás után keletkező fehérjék 1:1 arányban jönnek létre. További fehérjék kódolása lehetséges alternatív leolvasási keretekben. A *Potyvirus*-ok esetében a P3 fehérjében egy transzlációs csúszásra hajlamosító régió található, így bizonyos százalékban a C terminális eltolt keretben készül el, így jön létre a sejtről sejtre terjedésben szerepet játszó P3N-PIPO fehérje (Chung, Miller et al., 2008).

A *Tombusviridae* családba tartozó vírusok stratégiája, hogy az első ORF-ben kódolt virális RdRP (vRdRP) transzlációja után az szubgenomi RNS-eket (sgRNS) készít. Egyes sgRNS-eken több leolvasási keret is található, például a p19 fehérje belül, egy másik *frame*-ben (*nested*) helyezkedik el a p22 mozgási fehérjét kódoló ORF-ben.

A *Tombusvirus*-ok laboratóriumi körülmények között történő sorozatos átfertőzése (passzálása) során gyakran 400-700 nt hosszú deléciós genomok, ún. DI (*defective interfering*) RNS-ek is keletkeznek. Ezek elvesztik a replikációhoz és terjedéshez szükséges fehérjeiket, és a vad típusú vírus (*helper virus*) végzi sokszorozásukat. A DI RNS-ek jelenlétében a *helper* vírus titere leeshet, és a tünetek is enyhülnek (Havelda, Hornyik et al., 2005).

A vírusok replikációja membránkötött folyamat. A *Tombusvirus*-ok a mitokondrium vagy a peroxiszóma membránjában képeznek betűrődéseket, melyeket elektronmikroszkópos képük miatt multivezikuláris testeknek (*multivesicular body*, MVB) nevezzük (Burgyan & Russo, 1998). A *Potyvirus*-ok az endoplazmatikus retikulumhoz (ER) kötötten replikálnak, ahol az ER proliferációját indukálják. Továbbá elképzelhető, hogy egyes *Potyvirus*-ok az ER-ről képződött vezikulumokba csomagolva a kloroplasztisza, vagy a Golgi-készülékbe szállítódnak (Cotton, Grangeon et al., 2009).

2.10. Az antivirális silencing

A vírusok replikációja és transzkripciója során keletkező RNS-ek ds régiókat tartalmaznak vagy antiszensz orientációjuk miatt vagy, mert másodlagos szerkezetükben nyél-hurok struktúrák alakulnak ki. 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 (Deleris, Gallego-Bartolome et al., 2006).

A virális dsRNS-eket a DCL-ek siRNS-ekké vágják fel (vsirRNS-ek), melyek elsősorban az AGO1-be, vagy az AGO2-be, esetenként az AGO5-, vagy AGO7-be épülve antivirális RISC-eket hoznak létre. A DCL-ek szerepe redundáns és hierarchikus az antivirális silencingben. Az *A thaliana*-ban általában a DCL4 az elsődleges Dicer, ennek hiányában a DCL2 vágja fel a vírus genomot (Deleris et al., 2006). A DCL2 és -4 valószínűleg egy néhai génduplikáció eredményeként alakultak ki, talán ennek köszönhetően helyettesíthetik egymást. A DCL2 a másodlagos siRNS-ek képzésének fő enzime, az általa vágott siRNS-ek 22 nt hosszúak, így jól elkülöníthetőek a többi DCL termékétől. A *dcl2/dcl4* mutánsokban a DCL3, végső esetben (*dcl2/dcl3/dcl4* mutáns háttér) a DCL1 kompenzálja azok hiányát kis mértékben (Blevins et al. 2006). DNS vírusok ellen valószínűleg inkább a DCL3-nak lehet nagyobb

szerepe (Akbergenov et al. 2006). Megjegyzendő, hogy az *Arabidopsis*-ban leírt folyamatokat nem lehet teljes mértékben általánosítani a növények körében. Az egyszikűek modellnövényében, *Oryza sativa*-ban például 6 DCL-t találunk, melyek antivirális szerepe nem tisztázott. Elképzelhető továbbá, hogy egyes DCL-ek hatása bizonyos vírusok esetében szükséges lehet azok replikációjának fenntartásához (Urayama et al. 2010).

A vsiRNS-ek preferenciálisan a vírusgenom egyik száláról, annak is főleg az ún. forró pontjairól keletkeznek. Mindez arra utal, hogy a vsiRNS-ek elsődleges forrásai nem a replikációs intermedierek, hanem a másodlagos RNS struktúrák (Molnar et al. 2005). A virális dsRNS-ről közvetlenül keletkező siRNS-ek az elsődleges siRNS-ek, melyek mennyisége azonban nem elegendő a hatékony antivirális válaszhoz. Annak fenntartásához elengedhetetlen a RdRP-k aktivitása, melyek primer-függő vagy primer-független módon újabb dsRNS-eket készítenek az elvágott RNS-ekből, melyekből egy újabb adag siRNS-t készítenek a DCL-ek. Ezt, a főleg az RDR6 által megvalósított folyamatot tranzitivitásnak nevezzük (Himber et al. 2003). A másodlagos siRNS-ek mennyisége hamar meghaladja az elsődlegesekét, és növeli a silencing hatékonyságát (Nishikura 2001). Az RDR1, -2 és -6 szerepe az antivirális silencingben több vírussal összefüggésben is bizonyított (Donaire et al. 2008; Wang et al. 2010; Garcia-Ruiz et al. 2010).

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, ekkor a fertőzés gyorsan visszaszorul, és a növény kigyógyul (Havelda et al. 2003). A másodlagos vsiRNS-ek, melyek keletkezéséhez elsősorban az RDR1, RDR6, és annak kofaktorai szükségesek, a floémában terjedő szisztemikus antivirális jelként szolgálhatnak egyes vírusok esetében (Molnar et al. 2010; Vaistij & Jones 2009; Schwach et al. 2005).

Növényekben az AGO1, másodsorban pedig az AGO2 tölt be antivirális funkciót. Az AGO1 hipomorf mutánsok fogékonyabban a vírusfertőzésekre (Morel et al. 2002).

Egyes vírusfertőzések hatására megfigyelhető a mir168 indukciója, mely az AGO1 negatív regulátoraként segítheti a fertőzést (Várallyay et al. 2010). Ugyanakkor bár több válaszelemet találtak már a miR168 promótoreiben, a vírus általi indukcióért felelős regulátort még nem azonosították.

Az antivirális silencinget kihasználva, mesterséges rekombináns vírussal is indukálhatunk géncsendesítést (*virus induced gene silencing*, VIGS), ami által sok gén

biológiai funkciója tanulmányozható anélkül, hogy mutánsokat, vagy stabil transzformánsokat kellene létrehozni. A módszer úgy működik, hogy egy arra alkalmas vírusvektorba beklónoznak egy génszakaszt, melynek csendesítését akarják indukálni. Az inokulálás után a vírus szisztemizálódik a szervezetben, és a róla keletkező vsiRNS-ek csendesítik a célzott gént. A vektor általában tartalmaz egy marker gént is (például GFP) mellyel lokalizálható a vírus. A VIGS előnye, hogy szisztemikus, és lehetővé teszi a további tranziens expressziót is, így egy sokszintű tesztrendszert biztosít.

Növényeken kívül más szervezetekben is játszhat antivirális szerepet az RNS silencing, bár egyes törzsfajlódási vonalakból hiányzik. *C. elegans*-ban már régóta sejtették, hogy létezik antivirális silencing, azonban sokáig nem sikerült természetes vírushatás leírni az állatban, ami minden korábbi témában született eredményt némileg kétségessé tett. Az első azonosított vírus az Orsay vírus volt 2011-ben, de a természetből izolált nematóda silencing deficiens volt, és a laboratóriumi törzsek fertőzése során a vírus titere igen alacsony maradt (Félix et al. 2011). Mások viszont indukált vírushatás során azt találták, hogy szisztemikus antivirális válasza képes, az adott vírus elleni szerzett rezisztencia öröklődik, mely utóbbihoz RdRP aktivitás szükséges (Rechavi et al. 2011). Mindezek arra utalnak, hogy *C. elegans*-ban az antivirális silencing olyan hatékony, hogy a vírushatás csak mutáns egyedekben lehetséges. *D. melanogaster*-ben az RNS silencing széleskörű védelmet biztosít vírushatás esetében a Dicer-2 részvételével, szemben a JAK-STAT útvonallal (Kemp et al. 2013). A silencing antivirális szerepét alacsonyrendű gombákban szintén kimutatták (Segers et al. 2007).

2.11. A virális silencing szupresszorok

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) (Merai, Kerenyi et al., 2006). Napjainkig több, mint 100 vírus szupresszorát azonosították, melyek számos, különböző stratégiát alkalmazva különböző pontokon gátolják az antivirális silencinget növényekben és állatokban és gombákban (Csorba, Kontra et al., 2015).

Feltételezhetően minden vírusnak kell legyen valamilyen stratégiája, hogy védekezzen az antivirális silencing ellen, és a legkézenfekvőbb a VSR-ek használata. Azok a vírusok, melyekben a silencing szuppressziót megszüntetjük, csak korlátozott mértékben képesek fertőzni. Ez első ilyen mutáns modellvírus a *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV) volt, mely a *Tombusvirus*-ok közé tartozva a p19 VSR-t használja. A p19 defektív Cym19stop

a floémába betöltődik, és megjelenik a szisztémikus levelekben is, de csak néhány sejtsornyi terjedésre képes. A növény hamar kigyógyul a fertőzésből, szemben a vad típusú vírusfertőzéssel, mely egy héten belül csúcsnekrózist okoz (Havelda, Hornyik et al., 2003).

A VSR-ek többsége nehezen prediktálható, szupresszor funkciójuk csak kísérletesen bizonyítható. Sok közülük a silencing konzervált kulcsmolekuláit támadja, ezért heterológ rendszerben, vagy a biotechnológiában is alkalmazhatóak. A VSR-ek elengedhetetlenek az *Agrobacterium*-mediálta tranziens expressziós kísérletekben, megakadályozzák ugyanis a transzgén csendesítését, ld. pl. (Nyiko, Sonkoly et al., 2009). A p19 tisztított fehérje kereskedelmi forgalomban is kapható, és alkalmas kis RNS-ek szelektív tisztítására bármely rendszerben (New England Biolabs).

3. CÉLKITŰZÉS

Munkánk során a következő célok megvalósítását tűztük ki:

1. A *Cymbidium ringspot virus* p19 szupresszorának vizsgálata
2. Egységes *in vitro* és *in vivo* rendszer a virális silencing szupresszorok vizsgálatára
3. A ds kis RNS-kötő silencing szupresszorok hatásának vizsgálata a kis RNS-ek metilációs állapotára
4. A *Sweet potato mild mottle virus* P1 silencing szupresszorának jellemzése
5. Az *Sweet potato feathery mottle virus* P1 fehérjéjének jellemzése

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Molekuláris biológiai módszerek

A plazmidizolálást, restrikciós emésztést, molekuláris klónozást és a polimeráz láncreakciót (PCR) standard körülmények között végeztük.

4.1.1. Plazmidkonstrukciók

Konstrukció neve	Vektor	Forrás
35S-GPF	pBin61S	(Silhavy, et al., 2002)
35S-sigma (Reovirus)	pBin61S	(Lichner, et al., 2004)
TEV HC-Pro	pBin61S	(Lakatos et al., 2006)
GFP-IR	pBin61S	(Silhavy, et al., 2002)
GFP171.1	pBin19	(Parizotto et al., 2004)
GFP171.2	pBin19	(Parizotto et al., 2004)
GFP-Cym	pBin19	(Lakatos et al., 2006)
GFP-PoLV	pBin19	(Lakatos et al., 2006)
35S-p19 (CIRV)	pBin61S	(Silhavy, et al., 2002)
CIRV p19	pGEX-2T	(Vargason et al., 2003)
CIRV p19 W39/42	pGEX-2T	(Vargason et al., 2003)
CymRSV p19	pGEX-2T	(Silhavy, et al., 2002)
BYV p21	pGEX-2T	(Lakatos et al., 2006)
HA-P1 (SPMMV)	pSanyi	(Giner et al., 2010)
HA-P1 ₁₋₃₈₃ (SPMMV)	pSanyi	(Giner et al., 2010)
HA-P1mut ₁₋₂₋₃ (SPMMV)	pSanyi	(Giner et al., 2010)
HA-P1mut ₁₋₂ (SPMMV)	pSanyi	(Giner et al., 2010)

Konstrukció neve	Vektor	Forrás
Ha-P1mut ₁₋₃ (SPMMV)	pSanyi	(Giner et al., 2010)
myc-AGO1	pGreen	(Zhang et al., 2006)
SPMMV P1	pBin61	(Giner et al., 2010)
SPMMV P1HC-Pro	pBin61	(Giner et al., 2010)
HA-UPF1	pSanyi	(Kertesz et al., 2006)
MBP-NS3	pMal-2c	(Hemmes et al., 2007)
P1 ₁₋₃₉₅	pBin-Flag	(Kenesi et al., 2017)
P1-C88A/C91A	pBin-Flag	(Kenesi et al., 2017)
P1-C88A/C103A	pBin-Flag	(Kenesi et al., 2017)
P1-C88A/C106A	pBin-Flag	(Kenesi et al., 2017)
P1-C91A/C103A	pBin-Flag	(Kenesi et al., 2017)
P1C91A/C106A	pBin-Flag	(Kenesi et al., 2017)
P1-C103A/C106A	pBin-Flag	(Kenesi et al., 2017)
P1-C85A/C88A	pBin-Flag	(Kenesi et al., 2017)
P1-C85A/C91A	pBin-Flag	(Kenesi et al., 2017)
HA-AGO1	pMDC-32	(Carbonell et al., 2012)
HA-AGO1-DAH	pMDC-32	(Carbonell et al., 2012)
TAS1c	pGreen	(Carbonell et al., 2012)
amiR173-5'A	pGreen	(Carbonell et al., 2012)
TAS1c-A388T	pGreen	(Carbonell et al., 2012)
HA-AGO2	pMDC-32	(Carbonell et al., 2012)
HA-AGO2-DAD	pMDC-32	(Carbonell et al., 2012)

4.2. Tranziens génexpresszió *Agrobacterium tumefaciens*-szel (agroinfiltrálás)

A *Nicotiana benthamiana* növények infiltrálását alapvetően Silhavy és mtsai (2002) szerint végeztük. Az expresszálni kívánt plazmidkonstrukciót az ún. "triparental mating" segítségével *A. tumefaciens* C58CI törzsbe vittük át, majd a törzset folyékony táptalajban felszaporítottuk a megfelelő antibiotikumok jelenlétében. A kultúrát centrifugáltuk (3000g, 5 perc, 25 °C), majd felfuszpendáltuk az infiltrációs pufferben (10 mM MES pH=5.8, 10 mM MgCl₂, 150 µM 3'5' dimetoxi-hidroxiacetofenon. A riportergéneket (35S-GFP, GFP171.1, GFP171.2, GFP-IR (GFP inverted repeat) OD=0,1-gyel, míg a silencing szupresszorokat (p19, HC-Pro, p21, P1 sigma3, NS3) OD=0,3-as koncentrációban infiltráltuk.

4.3. RNS izolálás növényi szövetből

Kb. 100 mg szövetmintát 1 ml TRIzol-lal (Sigma-Aldrich) dörzscsészében eldörzsöltünk, majd 200 µl kloroformot adtunk hozzá. A szerves és a vizes fázist centrifugálással szétválasztottuk (12000 g, 5 perc), majd a vizes fázisból 500 µl-t egy új mikrocsőbe pipettáztunk és az RNS-t azonos térfogatú etanollal kicsaptuk. Centrifugálás (10 perc 15000 g) után a pelletet 1 ml 70%-os etanollal mostuk, majd újra centrifugáltuk (5 perc, 15000 g). A mosófolyadékot leöntöttük, a pelletet óvatosan beszárítottuk, majd az RNS-t RNáz mentes vízben feloldottuk.

4.4. RNS izolálás kromatográfiás frakciókból, natív fehérjekivonatokról és immunoprecipitátumból

200 µl kromatográfiás frakcióhoz vagy natív fehérjekivonatokhoz vagy a kb. 50 µl-nyi immunoprecipitátumhoz 200 µl 2×PK puffert (200 mM TRIS pH=7.5, 300 mM NaCl, 25 mM EDTA pH=8.0, 2% SDS), 10 µl Proteinase K-t (Fermentas) (10 mg/ml) és 1 µl glikogént (10 g/µl) adtunk, majd 55 °C-on 10 percig inkubáltuk. Amennyiben dupla szálú siRNS-t izolálása volt a célunk, 55 °C helyett 37 °C-on végeztük az inkubálást. Az elegyet azonos térfogatú fenol-kloroformmal extraháltuk, majd centrifugáltuk (10 perc 15000 g). A nukleinsavakat 2 térfogat etanollal kicsaptuk, centrifugáltuk (10 perc 15000 g), 70 %-os etanollal mostuk, majd beszárítottuk.

4.5. Immunoprecipitáció

Az immunoprecipitációhoz agaróz gyöngyökhöz kovalensen kötött antitesteket, vagy Protein A agarózhoz kapcsolt antitestet használtunk.

4.5.1. Antitestek rögzítése Protein A agarózhoz

Kb. 50 µl térfogatú Protein A agarózt mostunk háromszor 1-1 ml immunoprecipitációs (IP) pufferrel. A mosások során a gyöngyöket centrifugálással ülepítettük (1 perc, 1000 g). Majd az előkészített gyöngyöket 500 µl IP pufferben 10-100 µl antitesttel inkubáltuk 4 °C-on 1 óráig. A puffert centrifugálással elválasztottuk.

4.5.2. Immunoprecipitáció

Kb. 0,5 g növényi szövetet 1 ml IP puffer jelenlétében eldörzsöltünk, majd az oldhatatlan anyagokat centrifugálással eltávolítottuk (10 perc 15000 g, 4 °C). A felülúszót az előkészített antitesteket tartalmazó gyöngyökre öntöttük és 1 órán át 4 °C-on inkubáltuk. Inkubálás után a gyöngyöket centrifugálással ülepítettük (1 perc, 1000 g), majd háromszor mostuk IP pufferrel. Az eluátumból RNS-t és/vagy fehérjét izoláltunk.

Munkánk során IP módszerét különböző célok érdekében más-más körülmények között használtuk. Az általunk használt IP pufferek összetételét alább közöljük. Egy adott IP puffer használatát az adott kísérlet ismertetésekor jelezzük.

IP1

30 mM TRIS pH=7.5

100 mM NaCl

66 mM KCl

10 mM MgCl₂

10 mM DTT

IP2

30 mM HEPES pH=7.5

100 mM NaOAc

5 mM MgCl₂

5 mM DTT

IP3

30 mM TRIS pH=7.5

150 mM NaCl

5 mM MgCl₂

5 mM DTT

10 % glicerín

4.6. Northern hibridizáció

A nagy mólsúlyú RNS-ek kimutatására az RNS-eket 1,2 % agaróz, 2,2 M formaldehid, 1×MAE tartalmú denaturáló gélen szétválasztottuk, 20×SSC jelenlétében kapilláris blottolással Hybond N membránra vittük és UV fénnel rögzítettük.

A kis RNS-eket 8, 10 vagy 12 % akrilamidot és 8 M ureát tartalmazó denaturáló gélen választottuk szét, majd vákuumblottolással vittük Hybond N membránra (GE Healthcare) és UV fénnel rögzítettük.

A dupla szálú kis RNS-ek kimutatására 12 %-os natív akrilamid géleket használtunk. Elválasztás után, az RNS-eket 50mM NaOH jelenlétében vákuumblottolással Hybond N⁺ membránra vittük át. Az 50 mM NaOH blottoló puffer az RNS-eket a membránra is rögzítette.

A nagy mólsúlyú RNS detektálásához PerfectHyb (Sigma) puffert és random primer módszerrel előállított DNS próbát használtunk (Feinberg & Vogelstein, 1983).

A kis RNS-ek detektálásához az ún. "kis RNS puffert" (50 % formamid, 5×SSPE, 1 % SDS, 5×Denhardt's és 200 µg/ml hővel denaturált heringsperma DNS) és radioaktívan jelölt egyszálú RNS próbát használtunk.

4.7. A *Drosophila in vitro* RNS silencing rendszer

A 2 órás *Drosophila* embriókat összegyűjtöttük, majd 50 %-os hipoklórossavban dechorionáltuk 3 percen át. Az embriókat egy szűrőre helyeztük, majd a hipoklórossavat desztillált vízzel kimostuk. Az embriókat szárítás után IP2 pufferben feltártuk, az oldhatatlan anyagokat centrifugálással (10 perc 15000g, 4 °C) eltávolítottunk. Az fehérjekivonat fehérjekoncentrációját megmértük, majd IP2 pufferrel 10 µg/µl-re állítottuk be és a 10 µl-es *in vitro* reakciókban 0.5-1.0 µg/µl végkoncentrációban használtuk. A reakciót IP2 pufferben mértük össze és az előbb említett összetevőkön kívül tartalmazott még ATP-t 1mM végkoncentrációban és ATP regeneráló rendszert is (Zamore, Tuschl et al., 2000).

4.7.1. DsRNS indukálta RNS silencing

Az *in vitro* *Drosophila* RNS silencing rendszert Zamore et al., (2000) alapján állítottuk be. A Green Fluorescent Protein (GFP) nyílt leolvasási keretéről (ORF) két kb. 350 bázispár hosszúságú PCR terméket készítettünk a T7gfp5' GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA GGG TGA AGG TGA TGC AAC és a GFP5'-GGG AGA GGG TGA AGG TGA TGC

AAC-3' és a T7gfp3' GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CTG CCA TGA TGT ATA CAT TGT GT és Gfp3' GGG CTG CCA TGA TGT ATA CAT TGT GT primerekkel. A két PCR termékről átfedő *in vitro* transzkriptumot állítottunk elő a "T7 Message Machine" kit (Ambion) segítségével. Az *in vitro* transzkriptumokat RQ1 DNase (Promega) kezeltük, majd 1×transzkripció pufferben összekevertük, 1 percig 95 °C-on denaturáltuk és 37 °C-on 1 órán át anelláltuk. Az anellálás után megmaradt egyszálú RNS-t 100 ng/ml RNáz A-val 2×SSC-ben 37 °C-on 20 percen keresztül elbontottuk. A reakciót fenol kloroformmal extraháltuk, majd 2 térfogat etanollal kicsaptuk. A dsRNS-t az *in vitro* RNS silencing reakciókban 3 nM koncentrációban használtuk.

Az *in vitro* RNS silencing rendszerhez használt target RNS-t egy 725 bp PCR termékről készítettük, amelyet a T7Gfp5' GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG ATG AGT AAA GGA GAA GAA CTT TT és a GFPtga TCG ACA TTT ATT TGT ATA GTT CAT primerek segítségével állítottunk elő. A target RNS-t az *in vitro* transzkripció reakció során radioaktívan jelöltük α -³²P UTP-vel. A templát DNS-t RQ1 DNase-zal (Promega) megemésztettük, majd a be nem épült nukleotidokat Sephadex G-50 oszlop kromatográfiával eltávolítottuk. A target RNS-t 100 és 220 pM végkoncentrációban használtuk (Lakatos, Szittyay et al., 2004).

4.7.2. A siRNS indukálta RNS silencing

A) Ds siRNS preparálás

A komplementer egyszálú siRNS-ekből 200-200 ng-ot ATP-vel (1 mM végkoncentráció) 20 µl-ben foszforiláltunk 37 °C-on, 60 percen keresztül, majd a két reakciót összekevertük. Denaturálás (95 °C, 1 perc) után 37 °C-on 60 percen keresztül anelláltuk a két szálát. A ds siRNS-t 12 %-os natív akrilamid gélen elválasztottuk az egyszálú formától. A ds siRNS-t kivágtuk a gélből, majd 25 °C-on 14 órán át 500 µl 2×PK pufferben extraháltuk. Az fehérjekivonatot azonos térfogatú fenol-kloroformmal extraháltuk és a centrifugálás után a vizes fázist 2 térfogat etanollal kicsaptuk. A ds siRNS-t fotometriásan kvantifikáltuk és 0.5-5 nM végkoncentrációban használtuk (Lakatos et al., 2004) (Lakatos, Csorba et al., 2006).

B) Target RNS preparálás

A target RNS-eket kétféleképpen állítottuk elő:

1. lásd a "DsRNS indukálta RNS silencing" alfejezetben

2. PCR-rel olyan terméket állítottunk elő, amely a GFP ORF 5' végén a T7 promóter régiót tartalmazta, így a "T7 Message Machine" kit (Ambion) segítségével nagy mennyiségű egyszálú *in vitro* transzkriptumot készíthetünk. 50 pmol-nyi *in vitro* transzkriptumot 10 µl-ben α -³²P GTP-vel (CAP) megjelöltünk, majd 6 % akrilamidot és 8 M ureát tartalmazó denaturáló gélből izoláltuk ugyanazzal a módszerrel, amit a ds siRNS izoláláshoz használtunk. A cap-pel jelölt RNS-t 0,5 mM végkoncentrációban használtuk.

4.8. Gélkromatográfia

Gélkromatográfias kísérleteinkhez az Amersham FPLC rendszerét használtuk Superdex 200 HR (GE Healthcare) oszloppal. Az fehérjekivonatokat az immunoprecipitációs kísérletekhez használt módszerrel IP2 és IP3 pufferben készítettük el és az elválasztáshoz az fehérjekivonatnak megfelelő puffert használtuk. 200 µl fehérjekivonatot injektáltunk az oszlopra, majd 0.4 ml/perc sebességgel történt az elválasztás. A kizárási térfogat (7.5 ml) után 50, egyenként 200 µl-es frakciót szedtünk. A páros számú frakciókból RNS-t izoláltunk 2×PK pufferrel, a páros számú frakciókat 4 térfogat acetonnal kicsaptuk, majd 20 µl 2×SDS loading pufferben feloldottuk a fehérjéket. Az RNS mintákat denaturáló poliakrilamid gélen elválasztottuk és a kis RNS-eket Northern hibridizációval detektáltuk. A fehérjéket 8, 10 vagy 12 % SDS poliakrilamid gélen elválasztottuk és a megfelelő antitestekkel detektáltuk a fehérjéket (Giner et al., 2010, Lakatos et al., 2004).

4.9. Rekombináns fehérjék termeltetése és tisztítása

4.9.1. GST és GST fúziós fehérjék

A termeltetést BL21 *E. coli* (New England Biolabs) törzsben végeztük. A kultúrát 37 °C-on OD=0,6 tenyésztettük, majd IPTG-vel (0,1 mM) indukáltuk 3 órán át. A baktériumtömeget elválasztottuk, ultrahanggal feltártuk, majd IP2 pufferrel oldottuk ki a fehérjéket. A fúziós fehérjét (vagy a GST fehérjét) GST affinitás kromatográfiával izoláltuk. 10 mM TRIS pH=8,0, 20 mM redukált glutation-t tartalmazó oldattal eluáltuk, majd éjszakán át IP2 pufferbe dializáltuk.

4.9.2. Az MBP fúziós fehérjék termeltetése és izolálása

Az MBP (Invitrogen) és az MPB fúziós fehérjéket az eluálás kivételével ugyanúgy termeltettük és izoláltuk, mint a GST fúziós fehérjéket. Az eluálást IP2 puffer, 10 mM maltózzal végeztük, majd éjszakán át IP2 pufferbe dializáltuk.

4.9.3. A 6×His TEV HC-Pro termeltetése és tisztítása

4 hetes dohánynövényeket TEV virionnal fertőztünk, majd 10-14 nap múlva a tünetes leveleket használtuk fel. 4 °C-ra előhűtött késés darálóban a leveleket összeaprítottuk, majd 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 20 mM Mg₂SO₄, 500 mM NaCl, 0,5 mM EGTA, 0,2% Na₂SO₃, 0,1% polyvinylpyrrolidon, 1 µg/ml of RN-áz A, és 1 µg/ml DN-áz I pufferrel kioldottuk a fehérjéket. Az oldhatatlan sejtalkotók nagy részét gézlapokon való átszűréssel távolítottuk el. Az oldatot centrifugáltuk (15000 g, 15perc), majd a 6×HIS TEV HC-Pro fehérjét NiNTA (Qiagen) oszlopon izoláltuk. Az elúciót 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 20 mM Mg₂SO₄, 100 mM NaCl, and 400 mM EGTA pufferrel végeztük. Az eluátumot Centricon 10 szűrőn (Amicon) koncentráltuk, majd egy éjszakán át IP2 pufferbe dializáltuk. A rekombináns fehérjéket a fehérjekoncentráció megmérése után -80 °C-n tároltuk.

4.10. RNS fehérje interakció kimutatása EMSA-val (Electrophoretic Mobility Shift Assay)

Az EMSA kísérleteket háromféle-képpen végeztük el:

1. RNS fehérje interakció kimutatása *Escherichia coli*-ban expresszálatott és tisztított fehérjével

Az N-terminális tag-et tartalmazó rekombináns fúziós fehérjéket felező hígítással addig hígítottuk, amíg, az RNS fehérje kapcsolatot már nem tudtuk detektálni. Minden reakcióhoz az egyik szálán radioaktív γ -32P ATP-vel jelölt ds siRNS-t azonos végkoncentrációban használtuk. A reakciókat IP2 pufferben állítottuk össze 10 µl térfogatban, majd 20 percig 25 °C-on inkubáltuk. Ezután 2 µl 6×DNS loading festékkel összekevertük, majd 6 %-os natív poliakrilamid géltre töltöttük. A géleket beszárítottuk, majd az ún. “storage phosphor screen”-nel exponáltuk. A screen leolvasását Molecular Dynamics Typhoon Phosphor-Imager-rel végeztük (Amersham Biosciences). A kísérlet kiértékeléséhez Genius Image Analyser statisztikai szoftvert (Syngene) használtuk.

2. RNS fehérje interakció kimutatása kompetitív módon *E. coli*-ból, vagy rekombináns vírussal növényben expresszálatott és tisztított fehérje és *Drosophila* embrió fehérjekivonat között.

A kompetíciós siRNS kötési vizsgálatainkat *Drosophila* embrió fehérjekivonat és rekombináns siRNS-kötő fehérjék között végeztük. Az embrió fehérjekivonatot azonos

koncentrációban (0,5-1,0 µg/µl), míg a szupresszor fehérjét növekvő koncentrációban alkalmaztuk. Az egyik szálán radioaktív γ -32P ATP-vel jelölt ds siRNS-t 0,5 mM végkoncentrációban használtuk. 30 perces inkubálás után a 10 µl-es reakciókat 4 % poliakrilamid 1×TBE géltre töltöttük. A kész géleket beszárítottuk, majd az ún. “storage phosphor screen”-nel exponáltuk. A screen leolvasását a Molecular Dynamics Typhoon Phosphor-Imager-rel végeztük (Amersham Biosciences). A kísérlet kiértékeléséhez Genius Image Analyser statisztikai szoftvert (Syngene) használtuk (Lakatos et al., 2004).

3. SiRNS-kötő képesség kimutatása növényi fehérjekivonatokról

A vizsgálni kívánt RNS silencing szupresszort agroinfiltrációval *N. benthamiana* növényekbe infiltráltuk, 3 nappal az infiltrálás után 100 mg infiltrált növényi szövetből IP2 és IP3 pufferekben extraktumot készítettünk. 10 µl-es reakciókban a növényi fehérjekivonatot együtt inkubáltuk az egyik szálán radioaktív γ -32P ATP-vel jelölt ds siRNS-sel (0,5 mM végkoncentrációban), majd 6 %-os natív poliakrilamid géltre töltöttük a mintákat. A géleket beszárítottuk, majd az ún. “storage phosphor screen”-nel exponáltuk. A screen leolvasását Molecular Dynamics Typhoon Phosphor-Imager-rel végeztük (Amersham Biosciences) (Meraï et al., 2006).

4.11. RNS immunoprecipitáció

Az RNS immunoprecipitációt Terzi et al., (2009) alapján végeztük el, kis módosításokkal. Az infiltrált leveleket 0,1 %-os formaldehid oldattal vákuum alatt fixáltuk (15'), majd 125 mM glicin oldat infiltrálásával semlegesítettük a feleslegben lévő formaldehidet (15'). A mintákat 0.5 ml/g lízis pufferben (15 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1% Triton-X (w/v), 1 mM EDTA) eldörzsöltük, majd az extraktumot lecentrifugáltuk. A felülúszót 12 órán át inkubáltuk az M2 anti-Flag géllél, majd a gélt 3-szor egyenként 5'-ig mostuk (20 mM Tris-HCl, pH 8, 500 mM NaCl, 1% (w/v) Triton-X és 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8, 500 mM NaCl, 1% (w/v) Triton-X and 2 mM EDTA), majd a második mosópufferrel kétszer 5'-ig (20 mM Tris-HCl, pH 8 and 2 mM EDTA). A gyöngyöt kétszer eluáltuk 50°C-on 120 µl elúciós pufferrel (50 mM Tris-HCl, pH 7, 2.5 mM EDTA, 10 mM DTT, 1% SDS). Ezzel a lépéssel a formaldehides keresztkötést is visszafordítottuk. Az input és az IP frakciókból RNS-t izoláltunk, majd reverz transzkripcióval cDNS-sé írtuk át. A TAS1

target RNS-t és kontrollként az aktin mRNS-t amplifikáltuk fel.

4.12. Kvantitatív reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció (qRT-PCR)

Az infiltrált *N. benthamiana* levelekből teljes RNS-t izoláltunk, majd DN-ázzal kezeltük. 500 ng RNS-t használtunk a reverz transzkripcióhoz. A *N. benthamiana*-ban az AGO2 relatív expresszióját SYBR Select Master Mix-et használva (Applied Biosystems) a CFX 96 real-time PCR detection system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) készülékkel mértük meg. Kontrollként az elongációs factor 1 (EF-1) gént használtuk. Az eredményeket a $2^{-\Delta\Delta Ct}$ módszerrel értékeltük ki. Három független kísérletben mintánként két ismétlést alkalmazva az átlagot $\pm$ SD-t ábrázoltuk. A csoportokat egyutas ANOVA-val Bonferoni korrekciót alkalmazva (* $P < 0.05$) hasonlítottuk össze.

Primerek:

AGO2 fwd CATGACTTTGGGTTTGGAGTT

AGO2 rev CGGAATGCCAAGACTGAGTAA

EF-1 fwd AGCTTTACCTCCCAAGTCATC

EF-1 rev AGAACGCCTGTCAATCTTGG

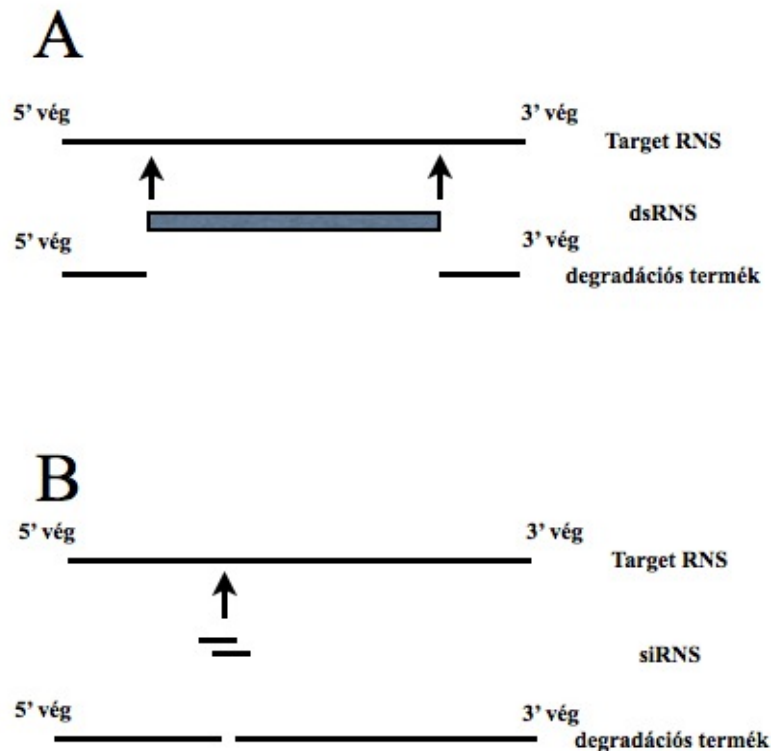
5. EREDMÉNYEK

5.1. A p19 silencing szupresszor jellemzése a *Drosophila in vitro* rendszerben

Az RNS silencing szupresszorok működési mechanizmusának vizsgálata hamar a növényi virológusok érdeklődési körébe került. Alapfeltevésük az volt, hogy a szupresszorok a növényi RNS silencing bizonyos lépésének gátlásával kikapcsolják a gazda antivirális védekezési mechanizmusát. Azonban az akkoriban használatos módszerek nem voltak megfelelő mértékben kidolgozottak, ami sokszor egymásnak ellentmondó következtetések levonásához vezetett. A *Tobacco etch virus* HC-Pro és a CymRSV p19 tranziens termeltetése során is megfigyelhető volt a silencing szuppressziója és a kis RNS-ek mennyiségének csökkenése, melyből arra lehetett következtetni, hogy a két fehérje gátolja a kis RNS-ek képződését (Szittyá, Silhavy et al., 2003). Azonban arra is volt adat, hogy a p19 protoplasztrendszerben ugyanannyi virális eredetű siRNS keletkezik a p19 jelenlétében (CymRSV) és annak hiányában (Cym19stop) (Szittyá, Molnár et al., 2003 #69) (Mallory, Ely et al., 2001). Hasonló megfigyelést tettek Silhavy és mtsai is (Silhavy, Molnar et al., 2002). Ebből arra is lehetett következtetni, hogy mindkét szupresszor a kis RNS képződését gátolja. Továbbá azt az eredményt sem hagyhatjuk figyelmen kívül, hogy a CymRSV p19 *in vitro* siRNS-kötő aktivitással rendelkezik (Silhavy et al., 2002). Elhatároztuk, hogy a CymRSV p19 silencing szupresszor vizsgálatát egy jól definiált rendszerben végezzük el: ezért esett választásunk a *Drosophila melanogaster* 2 órás embrió fehérjekivonattal beállított *in vitro* RNS silencing rendszerre.

5.1.1. A *Drosophila* RNS silencing rendszer működése

A *Drosophila* embrióból készült *in vitro* RNS silencing rendszert Zamore és mtsai állították be és jellemezték (Zamore et al., 2000). A rendszerben a DICER enzim a hosszú (>39 nt) dupla szálú RNS-eket 21-23 nt hosszúságú siRNS-ekké vágja ATP függő módon (Zamore et al., 2000).

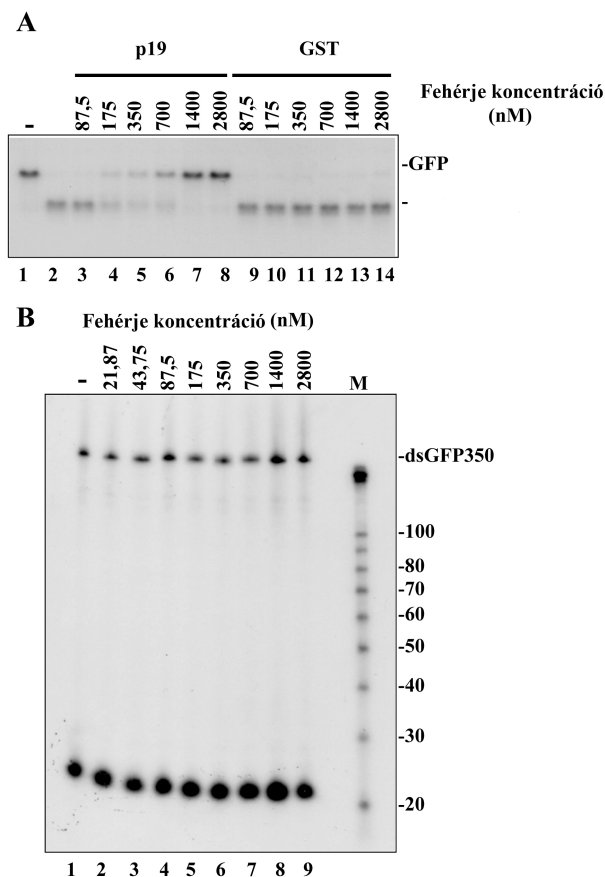


E1. ábra A dsRNS (A) és a siRNS (B) indukálta RNS silencing sémája

Mint ahogy azt az E1 A. ábrán láthatjuk, a dsRNS indukálta RNS silencing esetében a dsRNS-el komplementer/homológ részen következik be a target RNS vágása. Mivel az indukáló dsRNS esetünkben rövidebb, mint a target RNS, ezért 5' és 3' degradációs termékek maradnak a vágási reakció után (Zamore et al., 2000). A siRNS indukálta RNS silencing során az AGO egy ponton - a siRNS-nek megfelelő pozícióban - vágja el a target RNS-t (E1 B. ábra). Két meghatározott méretű RNS marad a vágási reakció után, azonban csak az 5' véget tudjuk detektálni (Nykanen, Haley et al., 2001). A *Drosophila in vitro* RNS silencing rendszer csak az RNS silencing iniciációs (siRNS képzés hosszú dsRNS-ből) és végrehajtó (kis RNS-függő target RNS vágás) lépésekkel rendelkezik, de nem található meg benne növényekre és a *C. elegans*-ra jellemző ún. fenntartó lépés, amiben fontos szerepet játszik az RNS-függő RNS polimeráz (RdRP) (Dalmay, Hamilton et al., 2000). Mivel a *Drosophila in vitro* RNS silencing rendszer rendelkezik az RNS silencing minden élőlényben megtalálható ún. iniciációs és végrehajtó lépéseivel, úgy gondoltuk, hogy megfelelő rendszer lesz az RNS silencing szuppresszió modellezésére.

5.1.2. A p19 hatékonyan gátolja a dsRNS indukálta RNS silencinget

Az RNS silencing szuppressziót vizsgáló kísérleteinkhez rekombináns, N-terminálisan GST tag-el ellátott CymRSV p19 fehérjét termeltettünk *E. coliban*. Kontrollként GST fehérjét használtunk, amit hasonló módon izoláltunk, mint a GST-p19 fehérjét. A *Drosophila in vitro* rendszerben az RNS silencing-et egy kb. 350 bp-os duplaszálú RNS molekulával indukáltuk, amely hatékony target RNS degradációt eredményezett. A target RNS degradációját csak a szekvencia homológiát mutató RNS hozzáadása indukálja (E2 A. ábra 1. és 2. oszlop).



E2. ábra A CymRSV p19 gátolja a dsRNS indukálta RNS silencing-et.

A GST fehérje nem, azonban a p19 hatékonyan gátolja a dsRNS indukálta RNS silencing-et (A).

A p19 nincs hatással a siRNS képződésre a *Drosophila in vitro* RNS silencing rendszerben (B).

Az RNS silencing szuppresszió modellezéséhez növekvő mennyiségben GST-p19 fehérjét adtunk a silencing reakciókhoz, ami a GST-p19 koncentrációjának függvényében a target RNS degradációjának gátlásához vezetett. A kontroll reakciókban a GST fehérjét ugyanolyan koncentrációban alkalmaztuk, mint a GST-p19-et. A vártan megfelelő módon, a GST fehérje nem gátolta az *in vitro* rendszerben kialakult RNS silencing-et (E2 A ábra) (Lakatos et al., 2004). A *Drosophila* embrió *in vitro* RNS silencing rendszer alkalmasnak

bizonyult az RNS silencing szupresszió vizsgálatára a megfelelő körülmények (dsRNS, fehérjekivonat, target RNS és p19 koncentráció) beállítása után. Azonban eredményeinkből látszik, hogy míg az RNS silencing indukálásához a dsRNS-t 220 pM (0,22 nM) koncentrációban használtuk, addig az RNS silencing teljes gátlását 1400 nM GST-p19 koncentrációval tudtuk elérni, ami 7000-szeres moláris felesleget jelent. Ha feltételezzük, hogy az összes dsRNS siRNS-sé alakul az embrió fehérjekivonat DICER aktivitása következtében, akkor a keletkező siRNS-ek koncentrációja kb. $16,6 \times 0,2 = 3,32$ nM. Ebben az esetben is a GST-p19 közel 422-szeres moláris feleslegben van a siRNS koncentrációjához képest. Erre a nagy koncentráció különbségre többféle magyarázat lehetséges. Elképzelhető, hogy a GST-tag valamilyen oknál fogva csökkenti a p19 fehérje aktivitását azáltal, hogy elfedi a fehérje aktív doménjeit. Másik magyarázat lehet, hogy az *E. coliban* termeltetett fehérjék, főleg az eukariótákból származóak, számos esetben nem megfelelően hajtogatódhatnak össze a transzlációt követően, így kis hányaduk rendelkezik az *in vivo* állapothoz hasonló aktivitással. Az is lehetséges, hogy maga a *Drosophila* fehérjekivonat csökkentheti a GST-p19 aktivitását, pl. proteolitikus aktivitás következtében.

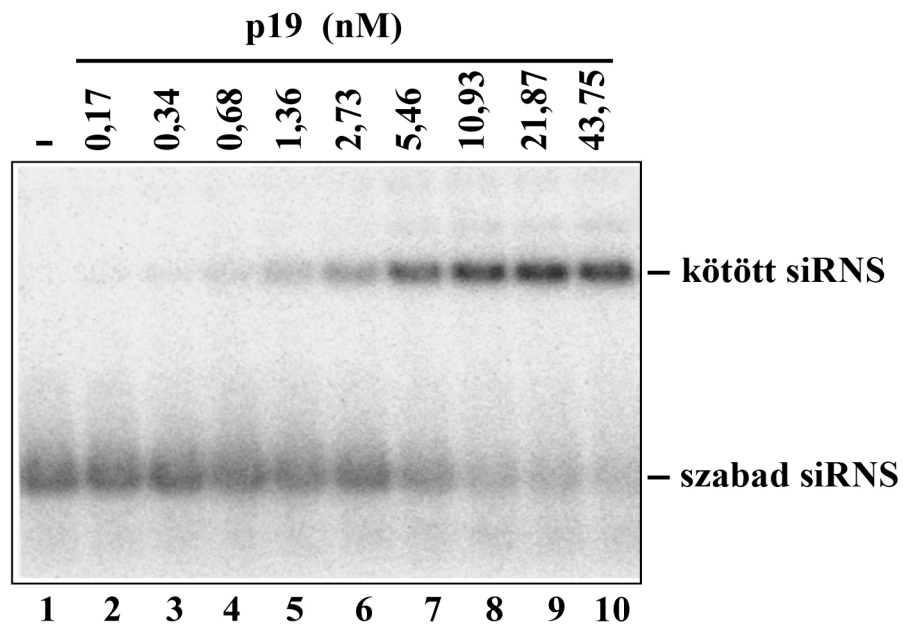
5.1.3. A CymRSV p19 nem gátolja a DICER aktivitást a *Drosophila in vitro* RNS silencing rendszerben

A *Drosophila in vitro* RNS silencing rendszerben azt tapasztaltuk, hogy a CymRSV p19 protein dózis függő módon gátolja az RNS silencinget (Lakatos et al., 2004), valamint rendelkezünk olyan információval, amely szerint a CymRSV p19 siRNS-kötő fehérje (Silhavy et al., 2002). A következő lépésben azt vizsgáltuk, hogy a CymRSV p19 *in vitro* RNS silencing szupresszor aktivitása kapcsolatban áll-e a p19 kis RNS képződést gátló aktivitásával. A jelölt dsRNS-t és a GST-p19-t emelkedő koncentrációban adtuk az embrió fehérjekivonathoz. A reakciókban a GST-p19 koncentrációja megegyezett az RNS silencing szupressziót modellező kísérletben használt szupresszor koncentrációval azért, hogy az eredmények összevethetőek legyenek. Eredményeim azt mutatták, hogy a *Drosophila* fehérjekivonat hatékonyan 21-23 nt siRNS-ekké alakította a 350 bp-os dsRNS-t (E2 ábra B panel 1. oszlop). A GST-p19 alkalmazása nem csökkentette az fehérjekivonatban a képződött siRNS mennyiségét (E2 ábra B panel 2-9 oszlop), ami arra utal, hogy a CymRSV p19 nem a siRNS képződésének gátlásával fejt ki RNS silencing szupresszor aktivitását (Lakatos et al., 2004).

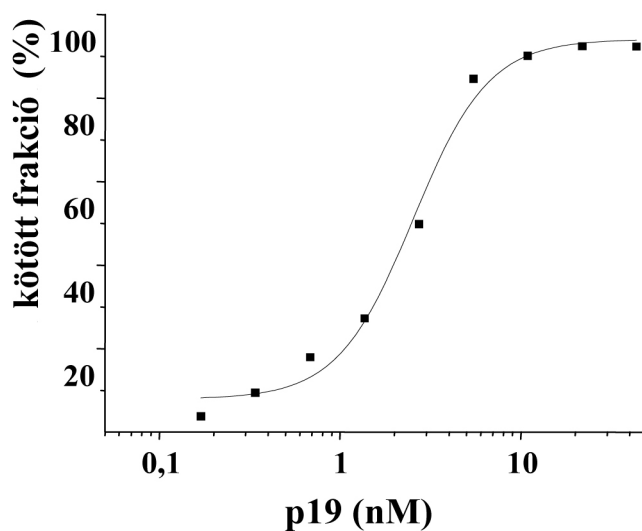
5.1.4. A CymRSV p19 siRNS-kötő képességnek *in vitro* vizsgálata

Bebizonyítottuk, hogy a p19 fehérje hatékonyan gátolja a *Drosophila in vitro* rendszerben az RNS silencing-et.

A



B



E3. ábra A GST-p19 K_{d} értékének meghatározása

EMSA kísérlet radioaktívan jelölt siRNS (0,144 nM) és emelkedő koncentrációjú GST-p19-cel (A).

A kötött siRNS arányának ábrázolása a p19 koncentráció függvényében (B).

Továbbá vizsgálataink segítségével kizártuk azt a lehetőséget, hogy a CymRSV p19 gátolja a siRNS-ek képződését *in vitro*. Ezután célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk,

rendelkezik-e a p19 siRNS-kötő tulajdonsággal. Ezen kívül szeretnénk volna a p19-siRNS kötés erősségét is meghatározni. A p19 siRNS kötőképességét EMSA vizsgálattal mértük meg és a disszociációs állandóval (K_d) jellemeztük. A ds siRNS-t azonos (0,144 nM végkoncentráció), míg a GST-p19 fehérjét emelkedő koncentrációban mértük a reakcióelegyekbe. Inkubálás után a kötött és a szabad siRNS frakciót natív poliakrilamid gélen választottuk szét (E3. A ábra). A GST-p19 koncentráció függvényében ábrázoltuk a kötött siRNS frakciót. A GST-p19 koncentráció függő módon kötötte a siRNS-t. Az 50 %-os telítettséghez tartozó koncentráció érték $2,5 \pm 0,3$ nM, ez kb. ~35-ször magasabb, mint a kísérletben használt siRNS koncentráció. Mivel a GST-p19 preparátumunk aktív (RNS-kötő) frakcióját nem határoztuk meg, az általunk mért érték a látszólagos disszociációs konstansnak ($K_{\text{látszólagos}}$) felel meg. A GST-p19 $K_{\text{látszólagos}}$ értéke így is a nanomólos koncentráció tartományba esik, ami egy erős siRNS-fehérje kötésnek felel meg (Lakatos et al., 2004).

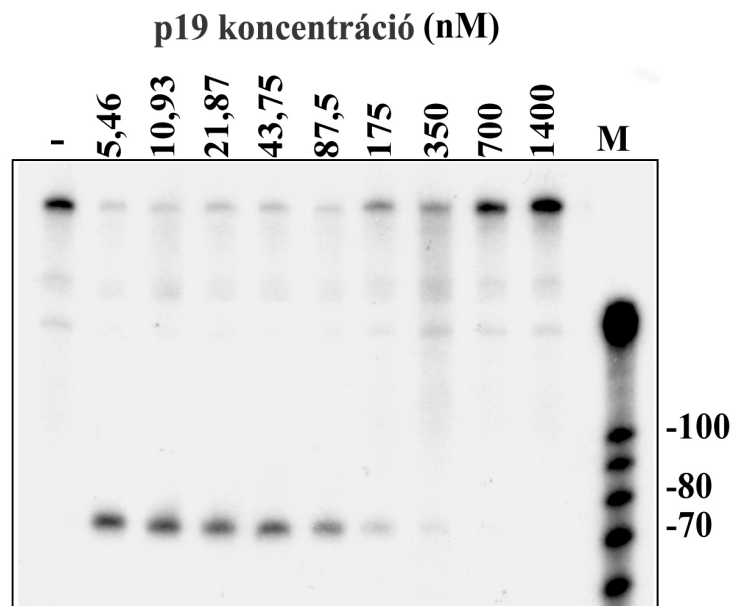
Hasonló eredmény kaptak Vargason és mtsai (2003) is a CymRSV p19-hez magas homológiát mutató *Carnation italian ringspot virus* (CIRV) p19 fehérjével. A kísérletükben a CIRV p19 GST tag-et nem tartalmazott, feltehetően ennek tudható be a CIRV p19 egy nagyságrenddel alacsonyabb K_d értéket kaptak (0,2 nM) (Vargason et al., 2003). Az EMSA kísérletünkéből az a következtetés is levonható, hogy a CymRSV p19 más, akár virális-, vagy gazdafaktor nélkül is képes az siRNS-ek megkötésére.

5.1.5. A CymRSV p19 a siRNS-ek megkötésével gátolja az RNS silencinget az *in vitro* Drosophila RNS silencing rendszerben

A *Drosophila in vitro* rendszer használatával lehetőség nyílik arra, hogy az RNS silencing lépéseit külön-külön megvizsgálhassuk. Ezt tettük korábban is, mikor a p19 hatását vizsgáltuk az *in vitro* siRNS képződésre. A *Drosophila* rendszerben a siRNS-ek duplaszálú formában kerülnek be a RISC-be, ahol ATP függő módon a siRNS-ek két szála elválík egymástól. Az egyik szál a komplexben marad, így válik az “aktív RISC” képessé a szekvenciaspecifikus RNS degradációra. A siRNS másik szála nem épül be a komplexbe, feltehetően az fehérjekivonatban lévő RNázok lebontják (Nykanen, 2001). Mivel bizonyítást nyert, hogy a p19 siRNS-kötő képességgel rendelkezik (Silhavy et al., 2002) (Vargason, 2003 #1705) (Lakatos et al., 2004), ezért azt a kérdést tettük fel, hogy a CymRSV p19 a siRNS-kötő aktivitásával gátolja-e az RNS silencinget a *Drosophila in vitro* RNS silencing rendszerben.

A kérdés megválaszolására siRNS-sel indukáltuk az RNS silencinget, amit 20 nM koncentrációban alkalmaztunk. A siRNS hatására bekövetkező RNS vágás egy kb. 75 nt hosszúságú fragmentet eredményezett (E4. ábra 2. oszlop). Ebben a kísérletben a siRNS-t, a

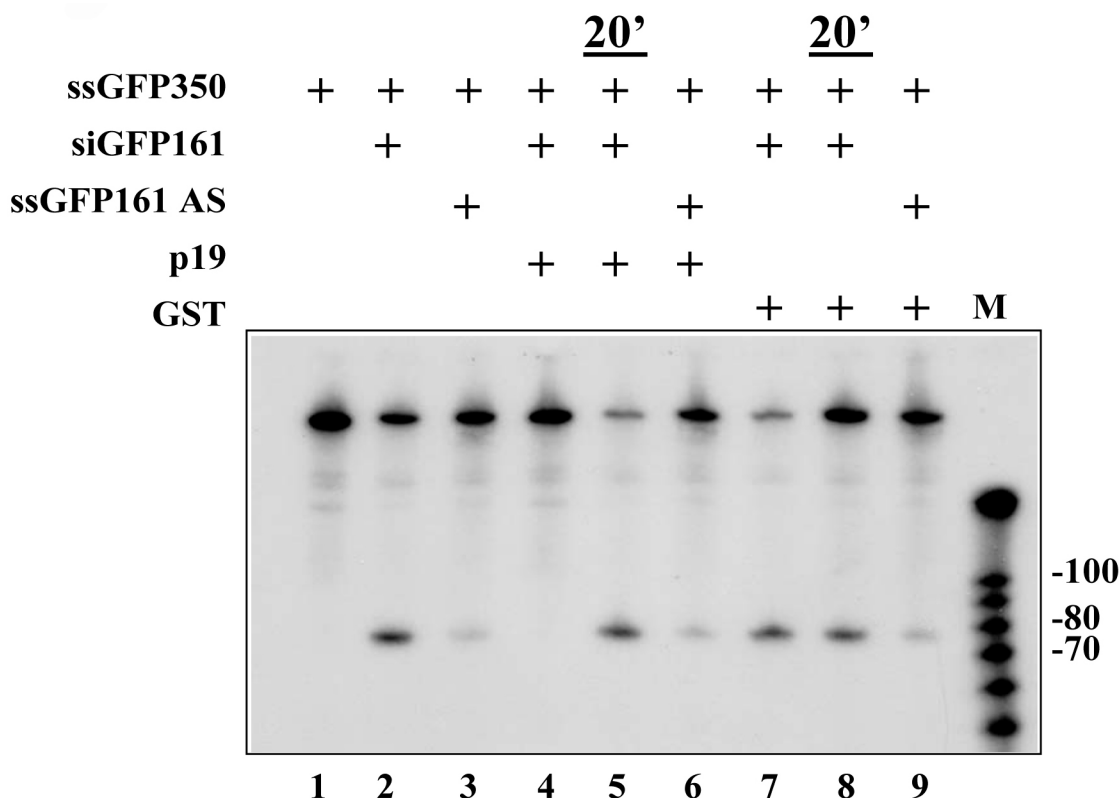
target RNS-t és a szupresszor fehérjét egy időben adtuk a fehérjekivonathoz, így meg tudtuk vizsgálni a p19 fehérje hatását a RISC kialakulására. Eredményeink azt mutatják (E4. ábra A), hogy a CymRSV p19 gátolja a siRNS indukálta RNS silencing-et és a p19 koncentrációjának növekedésével arányosan nő az RNS silencing szupressziója (vagy a p19 koncentrációjának növekedésével fordított arányban változik a RNS silencing aktivitás) (E4. ábra).



E4. ábra A CymRSV p19 gátolja a siRNS indukálta RNS silencing-et

A p19 koncentráció függő módon gátolja az RNS silencing-et. A vágási termék kb. 75 bázis hosszúságú.

Az E4. ábrán szereplő kísérlet kontrolljának tekinthetjük a következő kísérletünket, amelyben összehasonlítottuk a p19 hatását a RISC felépülésére és a már felépült, ún. aktív RISC-re. A target RNS mellé egyszálú vagy kétszálú siRNS-t adtunk, és vagy ezzel egyidőben adtuk hozzá a szupresszort is, vagy megvártuk, míg felépülnek a siRNS-el töltött aktív RISC-ek, és csak ezután adtuk hozzá a szupresszort. Így vizsgálhattuk, hogy a szupresszor a RISC “felépülését” akadályozza meg, vagy az töltött RISC aktivitását gátolja. Az ss siRNS alkalmazásakor nagyobb koncentrációban kell az ss siRNS-t alkalmazni, mint a ds siRNS-t (20 mM helyett 500 nM), mert az ss siRNS jóval kisebb hatékonysággal épül be a RISC-be (Schwarz et al., 2002) (E5. ábra 3. és 6. oszlop). Eredményeink azt mutatják, hogy a dupla szálú (ds) siRNS-kötő p19 csak a RISC felépülését gátolja, mivel a ds siRNS-kötő képességgel rendelkező CymRSV p19 megkötötte az indukáló siRNS-t (E5. ábra). A CymRSV p19 nem gátolta az egyszálú siRNS-t tartalmazó aktív RISC-eket, függetlenül attól, hogy ds, vagy ss siRNS-sel indukáltuk azok felépülését. A GST fehérjét tartalmazó kontroll reakciókban a vártak megfelelően nem kaptunk silencing-et gátló hatást (Lakatos et al., 2004).



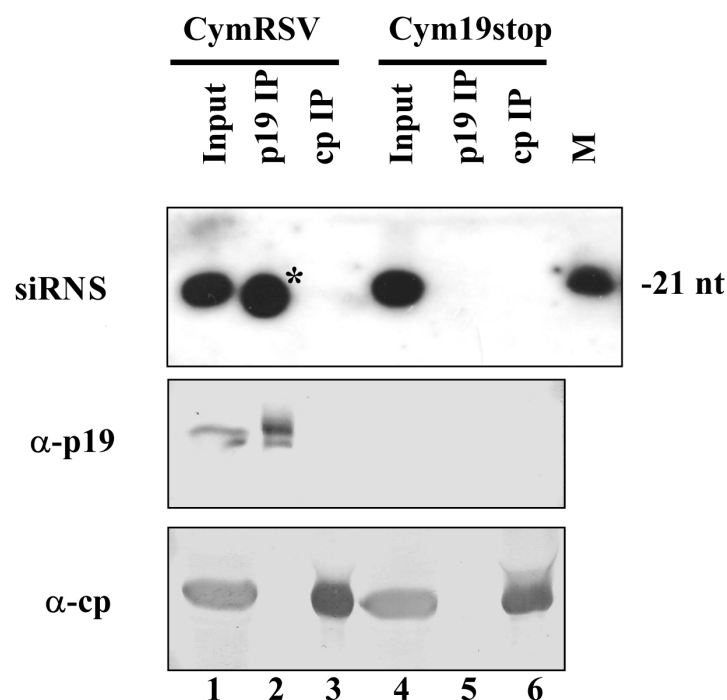
E5. ábra A p19 csak a RISC felépülését gátolja

1. Kontroll reakció siRNS nélkül. 2. Kontroll reakció ds siGFP161-gyel. 3. Kontroll reakció antiszenz (AS) ssGFP161-gyel. 4. a p19 és a ds siGFP161-t egyszerre adtuk a reakcióhoz. 5. A siRNS hozzáadása után megvártuk, míg a RISC felépül, majd hozzáadtuk a p19 fehérjét. 6. Az antiszenz (AS)ssGFP161-et és a p19-et egyszerre adtuk a reakcióhoz. 7-9. Ugyanaz, mint 4-6-ig, azonban p19 helyett GST használtunk kontrollként.

5.2. A CymRSV p19 a virális eredetű siRNS-eket köt *in vivo*

Munkánk kezdetekor 2002-ben az RNS silencing szupresszorok *in vivo* működési mechanizmusáról gyakorlatilag nem álltak rendelkezésünkre adatok. A CymRSV p19 működési mechanizmusát ismertük a legjobban, de erről is csak annyit tudtunk, hogy *in vitro* siRNS-kötő tulajdonsággal rendelkezik (Silhavy et al., 2002). A p19 *in vitro* siRNS-kötő tulajdonsága alapján azt a hipotézist állítottuk fel, hogy a p19 silencing szupresszor aktivitása *in vivo* siRNS kötésen alapul (Lakatos et al., 2004). Hipotézisünket immunoprecipitáción (IP) alapuló megközelítéssel ellenőriztük. Ennek érdekében CymRSV-vel fertőzött *N. benthamiana* szisztémikus leveleiből natív fehérjekivonatot készítettünk és a CymRSV p19-re specifikus poliklonális ellenanyaggal immunoprecipitáltuk a p19 fehérjét. Negatív kontrollként a Cym19stop mutánst használtuk. A Cym19stop mutáns vírus nem termeli a p19 fehérjét, ezért az RNS silencing-et nem képes elnyomni, azonban robusztus replikációja miatt képes a szisztémikus levelekbe eljutni (Dalmay, Rubino et al., 1993). Az IP kontrolljaként a CymRSV

coat proteint (CP), a CP fehérje nem rendelkezik silencing szupresszor aktivitással, sem siRNS-kötő képességgel. Az IP-k eluátumából RNS-t és fehérjét izoláltunk, majd Northern és Western blottal mutattuk ki a siRNS-eket illetve a fehérjéket. Eredményeink azt mutatták, hogy az α -p19 ellenanyag kikötötte a p19 fehérjét a CymRSV fertőzött növényi fehérjekivonatból. Továbbá, a p19 fehérjével együtt 21 nt hosszúságú CymRSV eredetű kis RNS is detektáltunk Northern blottal, ami a p19szupresszor és a siRNS közötti fizikai kapcsolatra utal (E6. ábra 2. és 3. oszlop). A p19 és a RNS-ek között a kapcsolat specifikus, ugyanis a Cym19stop fehérjekivonatból sem kimutatni, sem immunoprecipitálni nem sikerült a p19 fehérjét (mivel nem termeli a mutáns vírus) (E6. ábra 5. és 6. oszlop). Mindezek mellett a α -p19 ellenanyag önmagában nem rendelkezik siRNS-kötő képességgel (E6. ábra 5. és 6. oszlop). Végül az α -CP ellenanyaggal végzett IP specifikusan csak a CP fehérjét csapta ki, nem detektáltunk kis RNS-t sem a CymRSV, sem a Cym19stop fertőzött növényekből készült fehérjekivonatok IP-jeinek eluátumaiban (E6. ábra 3. és 6. oszlop) (Lakatos et al., 2004).



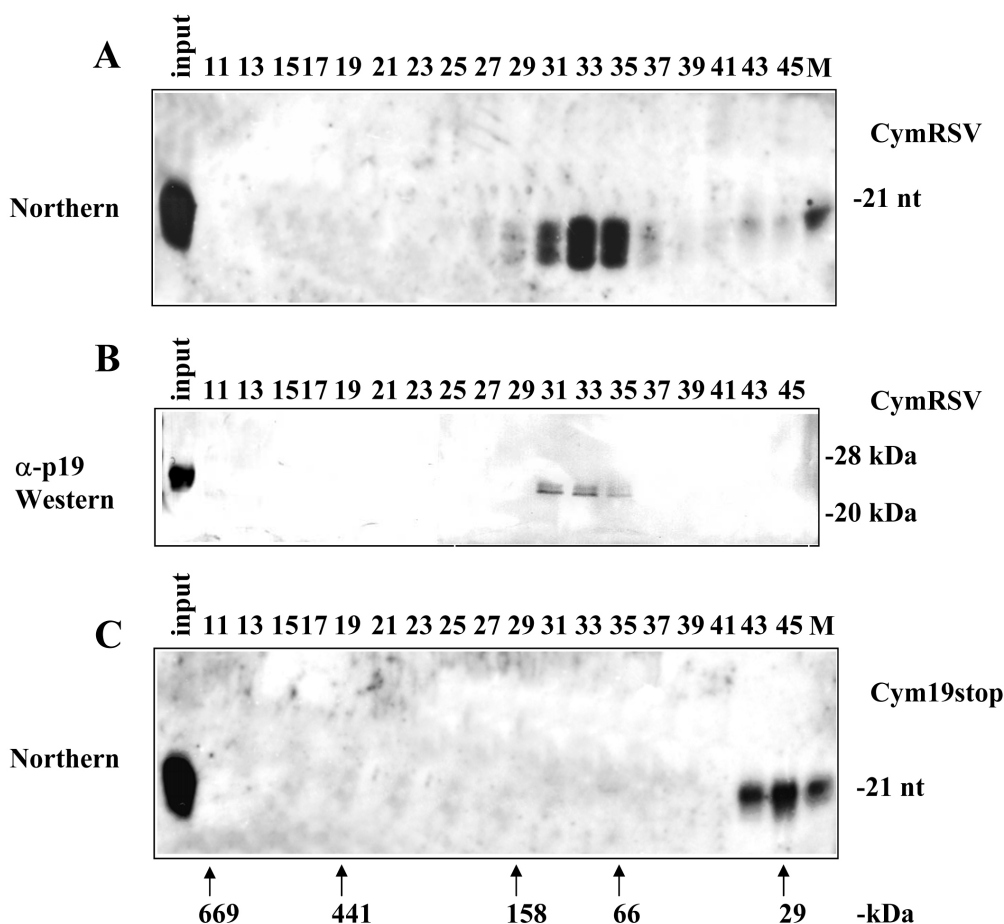
E6. ábra A CymRSV p19 köti a CymRSV-ből származó siRNS-eket *in vivo*

Northern hibridizáció autoradiogrammja (A). Western blot az α -p19 és α -CP ellenanyaggal B és C. A * a p19 IP eluátumából kinyert kisebb méretű virális siRNS-eket mutatja. M- 21 nt marker

5.3. A CymRSV p19 a siRNS-ek megkötésével vonja ki a virális siRNS-eket az RNS silencing útvonalból

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a CymRSV p19 a siRNS-ek megkötésével gátolja a RISC kialakulását a *Drosophila in vitro* RNS silencing rendszerben.

Azt is bebizonyítottuk, hogy a p19 *in vivo* is köti a virális siRNS-eket. Mivel a p19 dózis-függő módon gátolja az RNS silencing-et *in vitro*, azaz egyrészt a szupresszornak el kellett érnie egy bizonyos koncentrációt a RNS silencing teljes gátlásához, másrészt a szabad (a RISC-be potenciálisan beépülő) siRNS koncentrációnak a 0-hoz kellene közelítenie. Ezt a hipotézisünket *in vivo* is tesztelni akartuk. Amennyiben a sikeres CymRSV fertőzés feltétele az, hogy a virális siRNS-t megköti a p19 fehérje, akkor a p19 által megkötött és az ún. “szabad” siRNS-ek különböző méretük alapján gélkromatográfiával szétválaszthatók. Hipotézisünk tesztelése érdekében CymRSV-vel fertőzött *N. benthamiana* növények szisztémikus leveleiből fehérjekivonatot készítettünk, majd Superdex 200HR gélkromatográfiás oszlopon szétválasztottuk. A páratlan számú frakciókból RNS-t izoláltuk, majd Northern blotolással kimutattuk a virális siRNS-eket (E7. ábra A). A páros számú kromatográfiás frakciókból Western blotolással a p19 jelenlétét mutattuk ki (E7. ábra B). Az eredményeink értékeléséhez protein méretmarkereket is szétválasztottunk gélkromatográfiával. A Northern blotolás eredménye alapján megállapítottuk azt, hogy a virális siRNS-ek két mérettartományba estek. Nagy mennyiségű virális siRNS-t detektáltunk a kb. 100 kDa tartományban, míg a kb. 29 kDa mérettartományban nagyon kis mennyiséget detektáltunk (E7. ábra A). Ezzel szemben CymRSV p19 fehérjét kizárólag a kb. 100 kDa mérettartományban detektáltunk, abban a mérettartományban, ahol a CymRSV siRNS-ek jelentős részét is találtuk (E7. ábra B). A kísérlet kontrolljaként a Cym19stop mutáns vírussal fertőztünk növényeket, majd a kísérlet során ugyanúgy jártunk el, mint a CymRSV-vel fertőzött növények esetében. Ebben az esetben kizárólag a kb. 29 kDa mérettartományban detektáltunk virális siRNS-eket (E7. ábra C), melyeket “szabad”, kötésben nem lévő siRNS-eknek tekintettük. Ezen eredményünk alapján az E7. ábra A paneljén lévő 29 kDa mérettartományba eső siRNS-eket is szabad siRNS-eknek tekintettük.



E7. ábra. A CymRSV p19 az összes virális siRNS-t megköti

CymRSV fertőzött növényekből készült fehérjekivonat gélfiltrációs frakcióinak elemzése Northern blottolással (A). B. U.a., mint A., a frakcióból a p19 jelenlétének kimutatása Western blottolással. Cym19stop fertőzött növényekből készült fehérjekivonat gélfiltrációs frakcióinak elemzése Northern blottolással (C).

Kísérleteink eredményéből arra következtettünk, hogy hipotézisünk helyes volt, a vírust aktívan replikáló szövetekben az p19 szinte az összes virális siRNS-t megkötötte, és így akadályozta meg a virális siRNS-ekkel felépülő RISC-ek kialakulását. Munkánk eredményeként elsőként tettünk javaslatot egy virális RNS silencing szupresszor működési mechanizmusára (Lakatos et al., 2004).

5.4. RNS silencing szupresszorok vizsgálata egy egységes *in vitro* és *in vivo* rendszerben

A *Potyvirus*-ok (azon belül is a *Tobacco etch virus*) HC-Pro fehérjéje volt a legrégebben ismert RNS silencing szupresszor. A HC-Pro egy multifunkcionális fehérje, szerepet játszik a rovarátvitelben, és a fehérje N-terminálisán lévő proteáz domén felelős a HC-Pro levágásáért a genomi RNS-ről transzlálódó poliproteinről (Urcuqui-Inchima, Haenni et al.,

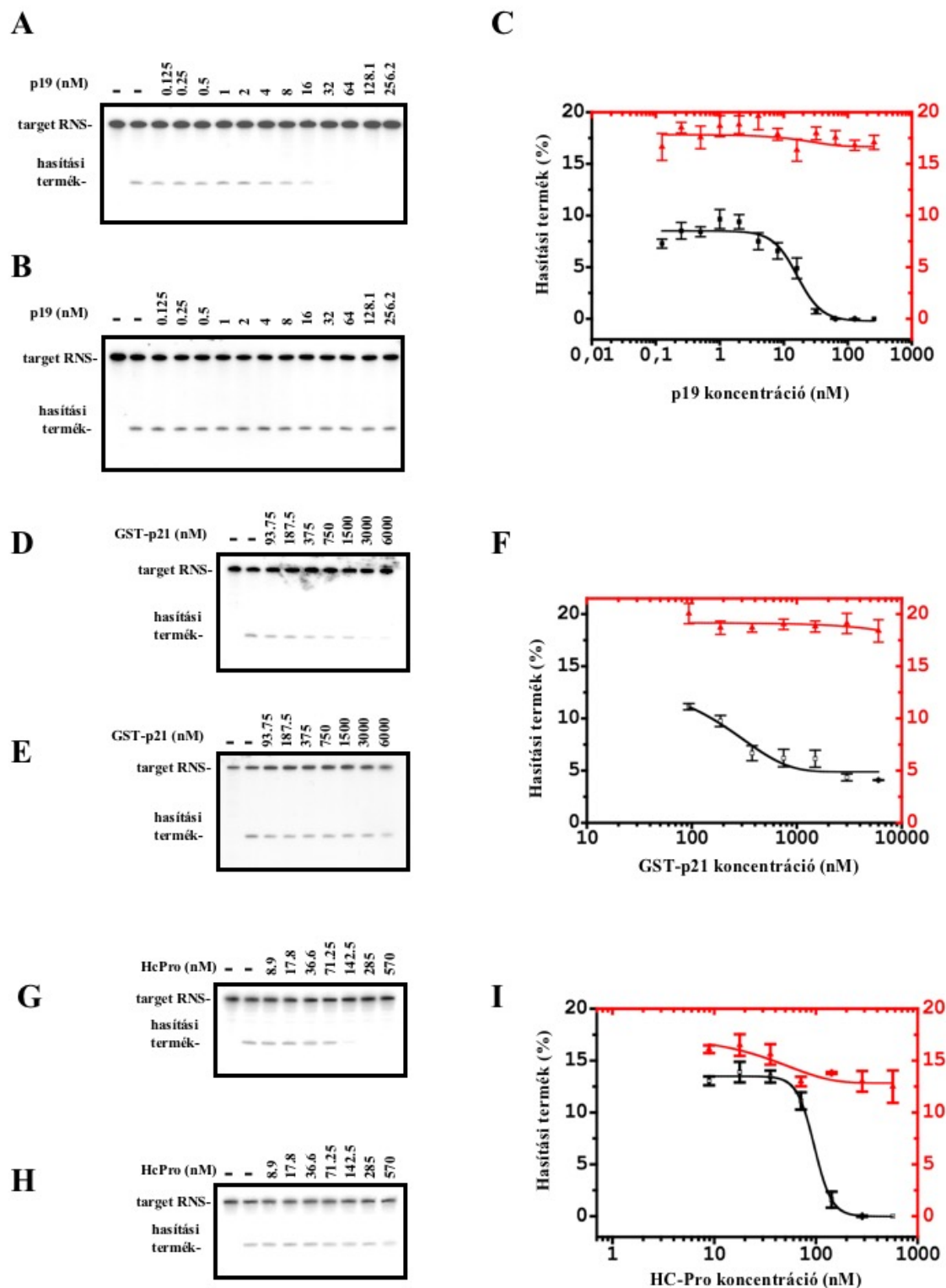
2001). A HC-Pro silencing szupresszor aktivitását különböző rendszerekben vizsgálták, és több modellt javasoltak a működési mechanizmusára. A legkorábbi eredmények azt mutatták, hogy a HC-Pro egyaránt gátolja a transzgén- és a vírus indukálta RNS silencing-et (Anandalakshmi, Pruss et al., 1998, Kasschau & Carrington, 1998). Más csoportok eredményei szerint a HC-Pro képes a már aktív RNS silencing hatását visszafordítani ("silencing reversal assay") (Brigneti, Voinnet et al., 1998, Voinnet, Pinto et al., 1999). Szintén mások szerint a HC-Pro a DICER aktivitás gátlásával csökkenti siRNS-ek képződését (Dunoyer, Lecellier et al., 2004, Mallory et al., 2001). A harmadik modell szerint a HC-Pro a gazda rgs-CAM (calmodulin-szerű molekula) fehérjéjével lép fizikai kapcsolatba és feltehetőleg aktiválja azt (Anandalakshmi, Marathe et al., 2000). A negyedik modell szerint a HC-Pro a siRNS-ek szálainak szétválasztásának gátlásával csökkenti RISC-ek kialakulását, mivel a HC-Pro expresszáltatása megnövelte a ds siRNS-ek mennyiségét a sejtekben (Chapman, Prokhnovsky et al., 2004).

A fent említett rendkívül szerteágazó eredmények hatására elhatároztuk, hogy kialakítunk egy egységes rendszert a HC-Pro és más silencing szupresszorok működési mechanizmusának vizsgálatára.

5.4.1. A p19, HC-Pro és a p21 egyaránt gátolja a RISC kialakulását *in vitro*

A *Drosophila in vitro* RNS silencing rendszerben jól jellemzett a RISC felépülésének mechanizmusa (Pham, Pellino et al., 2004, Tomari, Du et al., 2004). Korábban ebben a rendszerben sikeresen jellemeztük a CymRSV p19 fehérjét is (Lakatos et al., 2004).

Munkánk során megvizsgáltuk a TEV HC-Pro, a *Beet yellows virus* (BYV) p21 és a Rice hoja blanca virus (RHBV) NS3 fehérjéinek hatását a siRNS indukálta RNS silencing-re. Kontrollként a CIRV p19 fehérjét használtuk. A CIRV p19 magas homológiát mutat a CymRSV p19 fehérjével. A CIRV p19-siRNS ko-kristály szerkezete azt mutatta, hogy a p19 dimerként köti a siRNS 5' végi foszfát csoportjait (Vargason et al., 2003). Ez az eredmény megerősítette korábbi *in vitro* és *in vivo* rendszerekben elért eredményeket (Lakatos et al., 2004, Silhavy et al., 2002). A p19, a p21 és az NS3 fehérjéket *E. coli*-ból (Vargason et al., 2003) (Chapman et al., 2004) (Hemmes et al., 2007), míg a HC-Pro-t TEV-vel fertőzött *N. tabacum* növények leveléből tisztítottuk (Ruiz-Ferrer, Boskovic et al., 2005).



E8. ábra. A p19, HC-Pro és a p21 hatása a target RNS vágásra a direkt és az indirekt kompetíciós vizsgálatban

Reprezentatív target RNS vágás a direkt és az indirekt kompetíciós kísérletben ap19 (A és B), a p21 (D és E) és a HC-Pro esetében (G és H). A target RNS vágás ábrázolása a direkt és az indirekt rendszerben 3 ismétlésben. A direkt kompetíciós eredményeket feketével, az indirekt kompetíciós kísérletekből származó értékeket piros színnel jelöltük. (C) p19, (F) p21, (I) HC-Pro. Az elvágott target RNS arányát a szupresszor koncentráció függvényében ábrázoltuk.

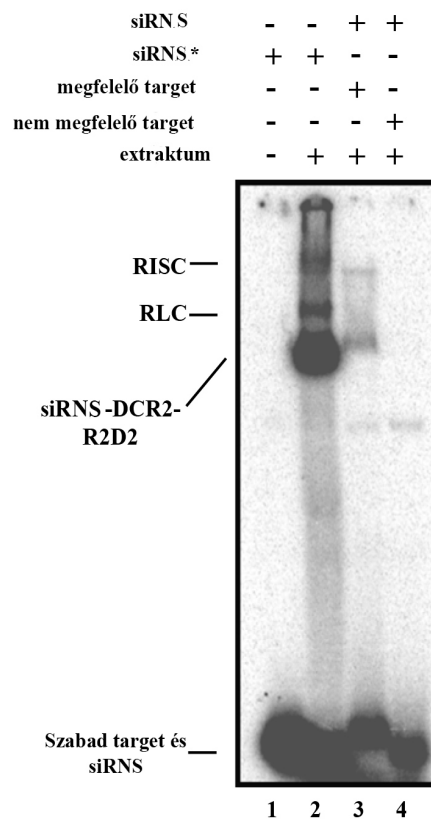
Két kísérleti beállítást használtunk, az ún. direkt kompetitív körülmény a RISC kialakulását, az ún. indirekt kompetitív kísérleti megközelítés az aktív RISC-eket (*in vivo* körülmények között megfelel a silencing reversal assay-nek) modellezi. A direkt kompetitív rendszerben a siRNS-t, a szupresszor 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 hozzáadtuk a target RNS-t és a szupresszor fehérjét.

Korábbi eredményeinkhez hasonlóan a CIRV p19 hatékonyan gátolta a target RNS vágást a direkt kompetitív kísérletben (Lakatos et al., 2004). Az 50%-os RISC aktivitáshoz szükséges p19 koncentrációt (IC₅₀) 15,247±2,3 nM-nak mértük (E8 ábra A és C). A GST-p21 fehérje szintén gátolta a target RNS vágást ebben a vizsgálati rendszerben, azonban magas GST-p21 koncentráció sem okozott teljes silencing szupressziót. A GST-p21 esetében sikerült siRNS kötést kimutatni *in vitro*, az általunk alkalmazott körülmények között mért $K_{\text{látszólagos}}=22$ nM (ábra nem mutatja). Az RHBV NS3 fehérjét maltose binding protein tag-gel (MBP tag) termeltettük *E. coli*-ban. Az *in vitro* rendszerben az 50%-os RISC aktivitáshoz szükséges NS3 inhibitor koncentrációt (IC₅₀) 12 nM-nak mértük (Függelék, 1A. ábra). Az NS3 nagy affinitással köti a 21nt kis RNS-t, az NS3-siRNS komplex látszólagos disszociációs állandója a nanomólos tartományba esik ($K_{\text{látszólagos}}=2,45\pm0,26$ nM) (ábra nem mutatja). A dohánylevélből tisztított HC-Pro is gátolta a target RNS vágást (IC₅₀=118,22±5,36 nM) (E8. ábra G és I). A vártan megfelelően, az indirekt kompetitív rendszerben sem a p19, sem a p21 és az NS3 sem nem gátolta az egyszálú siRNS-t tartalmazó aktív RISC-ek működését, hiszen mindkét szupresszor duplaszálú siRNS-kötő aktivitással rendelkezik (E8 ábra B és E, Függelék, 2B. ábra). A HC-Pro esetében azt a meglepő eredményt kaptuk, hogy nem gátolta az aktív RISC-ek működését *in vitro* (E8. ábra H és I). Ebből az eredményből azt a következtetést is levonhatjuk, hogy az általunk használt *in vitro* rendszer nem felel meg az *in vivo* körülményeknek és ezért nem kaptunk silencing szupressziót (Brigneti et al., 1998, Tomari et al., 2004). Ennek ellentmond az az általunk kapott eredmény, hogy a HC-Pro fehérje dózis függő módon (a p19-hez, a p21-hez és az NS3-hoz hasonlóan) gátolta az RNS silencing-et a direkt kompetitív rendszerben, de az indirekt kompetitív rendszerben nem mutat silencing szupresszor aktivitást (E8. ábra, Függelék, 1. ábra).

5.4.2. A p19, p21 és a HC-Pro a silencing iniciátor komplex kialakulásának gátlásával akadályozza meg a RISC felépülését

Az irodalmi adatoknak ellentmondó eredményeink hatására további *in vitro* vizsgálatokat végeztünk el. Kidolgozták korábban, hogy hogyan követhető nyomon a *Drosophila* RNS silencing rendszerben a köztes RNS silencing komplexek és a RISC kialakulása (Pham, et al, 2004). Munkánk során a silencing szupresszorok jellemzéséhez a Pham et al (2004) módszerét adaptáltuk, amelynek működését röviden ismertetem. A *Drosophila* embrió fehérjekivonatban az RNS silencing-et radioaktívan jelölt duplaszálú siRNS hozzáadásával indukálták, majd 3,9 %-os natív PAGE gélen választották szét a kialakult komplexeket. A komplexeket genetikai és biokémiai megközelítéssel is jellemezték, ezért sok információ áll rendelkezésünkre az azokat alkotó fehérjékről és a működésükről. A legnagyobb mennyiségben kialakult komplexben a DICER2 és R2D2 fehérjék találhatók meg. Az R2D2 egy ds RNS-kötő fehérje, így ebben a komplexben a siRNS még duplaszálú formában van jelen. Ez alakul tovább az ún. RISC Loading Complex-szé (RLC), amely ezen körülmények között a leginstabilabb és ATP hiányában nem alakul ki (Pham et al., 2004). Az RLC ATP igénye feltehetően arra utal, hogy ebben a stádiumban megkezdődhet a duplaszálú siRNS-ek szálainak szétválása valamiféle energiát igénylő “motor” molekula/molekulák hatására. Az RLC-ből alakul ki a legnagyobb méretű komplex, a RISC, amelyben egyszálú siRNS található, ez a komplex képes a target RNS elvágására, ezért ezt aktív, vagy holo-RISC-nek is nevezzük (Pham et al., 2004). A módszer beállítása után radioaktívan jelölt let-7 siRNS-sel indukált körülmények között 3 komplexet detektáltunk (E9. ábra 2. oszlop). Annak eldöntésére, hogy ezek megfelelnek-e Pham et al (2004) által leírtaknak, további vizsgálatokat végeztünk. Az RNS silencing-et radioaktívan nem jelölt let-7 siRNS-el indukáltuk, majd a komplexek feltételezett kialakulása után egy radioaktívan jelölt 2'-O-metil nukleotidokból álló mRNS analóg molekulát adtunk a reakcióhoz, amely reverz komplementere volt a let-7 RNS-nek. A 2'-O-metil nukleotidokból álló molekula RNS-ekkel alkotott hibridje stabilabb, mint az RNS-RNS kötés, ezért az így “megjelölt” komplexet könnyű detektálni. Ahogy az E9. ábra 3 oszlopában is látszik, a radioaktívan jelölt 2'-O-metil target analóg a RISC-el fut azonos magasságban, ami azt bizonyítja, hogy ds siRNS-sel indukált körülmények között a leglassabban vándorló komplex megfelel az aktív RISC-nek. Érdekes még megjegyezni, hogy a radioaktívan jelölt 2'-O-metil target RNS-t tartalmazó oszlopban a ds siRNS-t tartalmazó DICER-R2D2 komplexet nem láttuk feltehetően azért, mert ez a komplex ds siRNS-eket tartalmaz. Továbbá, mikor a let-7 siRNS-sel indukált reakcióhoz olyan radioaktívan jelölt 2'-

O-metil target analógot adtunk, amely nem reverz komplementere a let-7 RNS-nek, akkor nem kaptuk meg a RISC-et (E9. ábra 4. oszlop).



E9. ábra Az RNS silencing komplexek képződésére a *Drosophila in vitro* rendszerben

1. Ds siRNS önmagában. 2. Radioaktívan jelölt ds siRNS indukálta komplexek elválasztása natív gélen. 3. A silencing komplexek kialakulását jelöletlen ds siRNS-sel indukáltuk, majd radioaktívan jelölt target RNS analógot adtuk a reakcióhoz, hogy kimutassuk a RISC-et. 4. A 3. oszloppal megegyező, de a target analóg molekula nukleotid sorrendjét tekintve nem felel meg a RISC-be beépült siRNS szál reverz komplementérének.

Ebben a jól jellemzett rendszerben vizsgáltuk meg a rekombináns RNS silencing szupresszorok hatását a silencing komplexek kialakulására. Kísérleteink során ugyanazokat a körülményeket (fehérjekivonat, radioaktívan jelölt siRNS, szupresszor fehérje koncentrációja) használtuk, mint a target RNS vágást bemutató kísérleteinkben, azért, hogy az eredmények az egyes szupresszorok esetében összevethetőek legyenek. Továbbá, ezekben a kísérletekben is alkalmaztuk az ún. direkt és indirekt kompetitív beállításokat, mert ettől választ reméltünk arra a kérdésre, hogy az adott szupresszor fehérje az RNS silencing mely lépésénél gátolja a RISC kialakulását.

Eredményeink szerint a p19 dózisfüggő módon gátolta mind a három silencing komplex kialakulását a direkt kompetitív rendszerben (E10. ábra A 4-15. oszlop), ezzel együtt a p19-siRNS komplex koncentrációja emelkedett. Ezzel szemben az indirekt kompetitív

rendszerben a p19 koncentráció növekedésével csak a siRNS-DICER2-R2D2 komplex koncentrációja csökkent, a RISC és az RLC koncentrációja alig csökkent. Eredményeink azt mutatják, hogy a ds siRNS-kötő képességgel rendelkező p19 az RNS silencing iniciációjában szerepet játszó ds siRNS-kötő komplex kialakulását gátolja. Amennyiben a feltehetően egyszálú siRNS-t tartalmazó RLC és a bizonyosan egyszálú siRNS-t tartalmazó RISC már kialakult, a p19 már nem képes beleavatkozni az RNS silencing folyamatába (E10. ábra A és B).

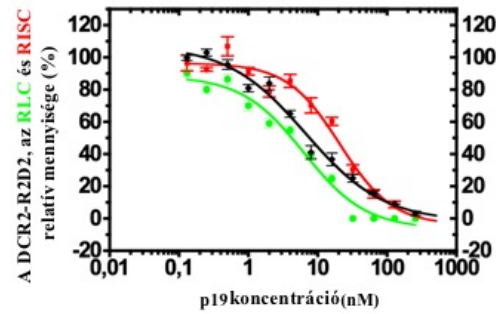
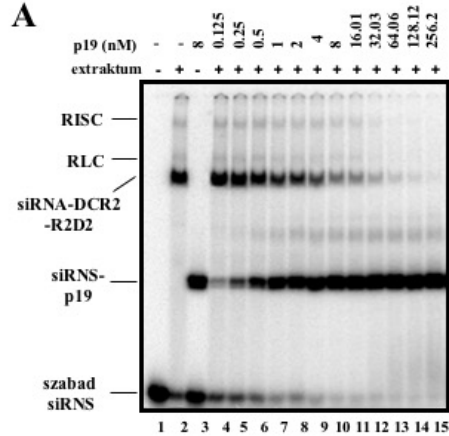
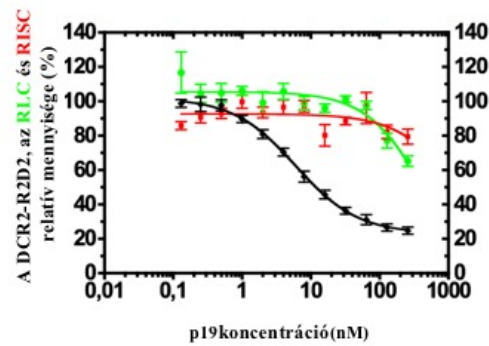
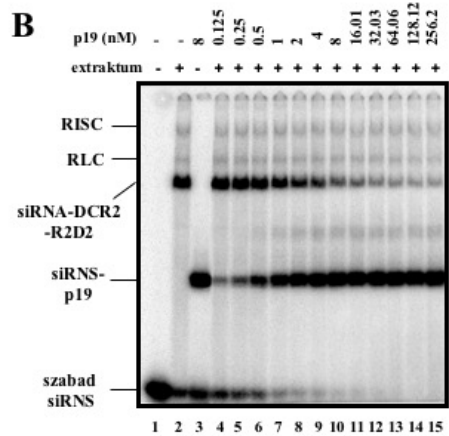
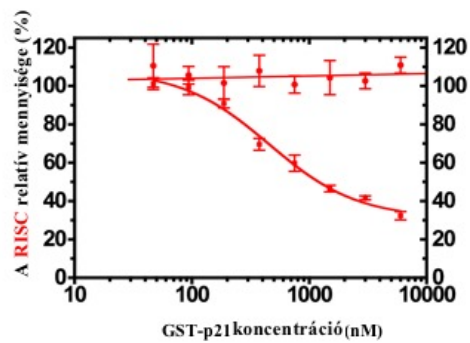
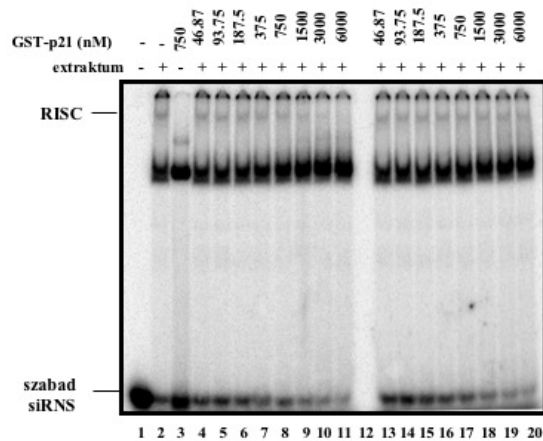
Hasonló eredményeket kaptuk a p21 és az NS3 esetében is. Ez nem meglepő, mivel a p19 mellett a p21 és az NS3 is siRNS-kötő tulajdonsággal rendelkező silencing szupresszor. Szeretném megjegyezni, hogy az általunk használt futtatási körülmények között a sem a GST-p21-siRNS, sem az NS3-siRNS komplexeket nem tudtuk elválasztani a siRNS-DICER2-R2D2 és az RLC komplexektől, ezért csak a RISC mennyiségét mértük meg (vesd össze az E10. ábra C 3 és 8 oszlopát, Függelék 2A, B és C. ábra).

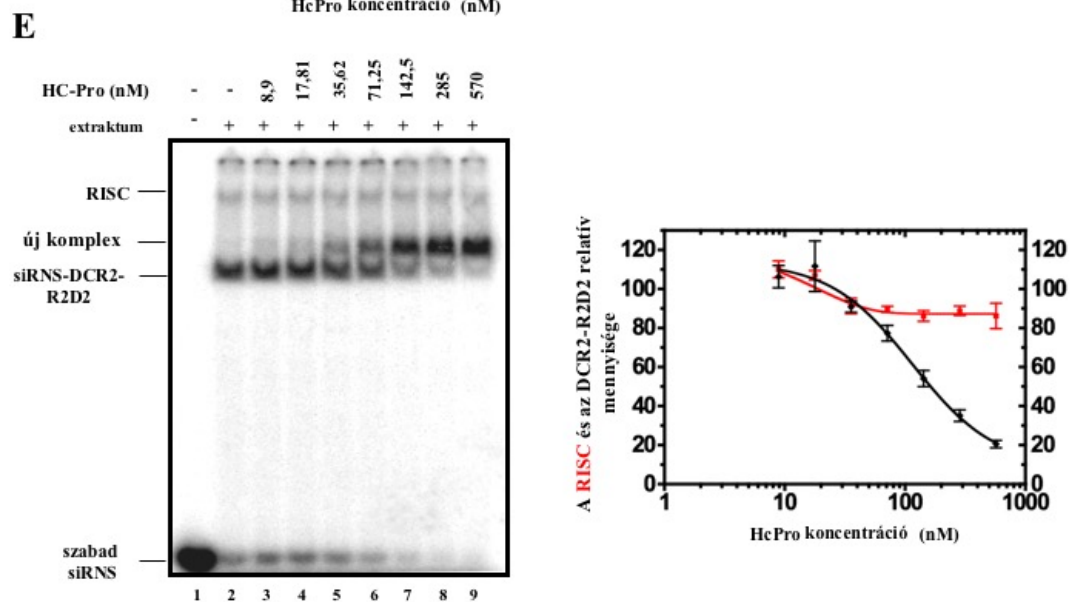
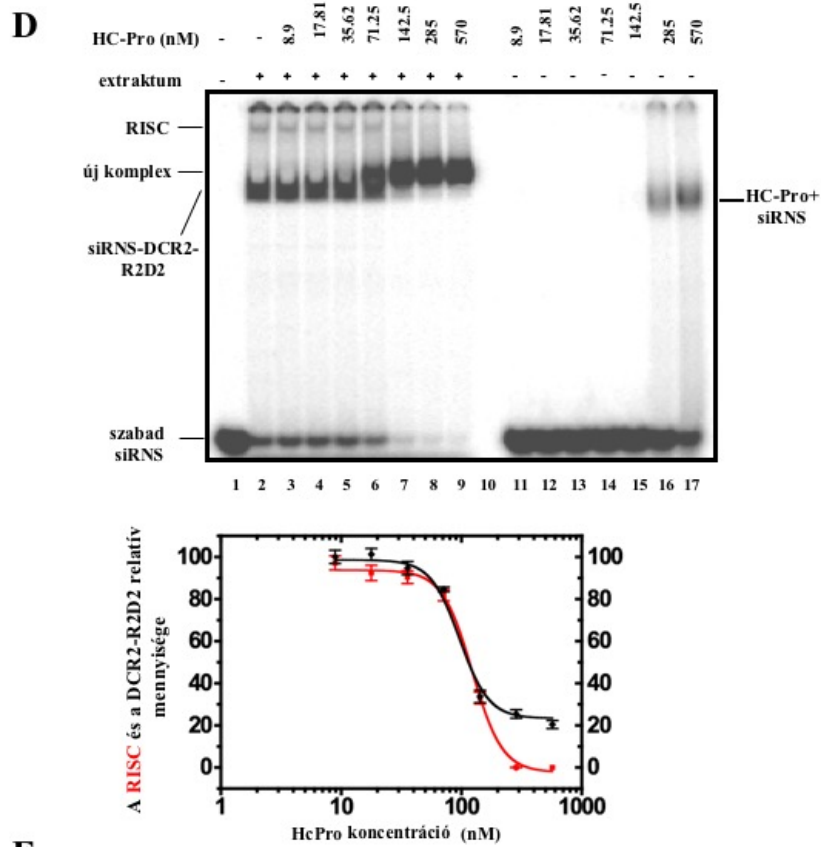
A HC-Pro jellemzése során érdekes megfigyelést tettünk. A direkt kompetitív rendszerben megjelent egy új komplex abban a reakcióban, amelyben a HC-Pro-t 71,25 nM koncentrációban alkalmaztuk (E10. ábra D 6. oszlop). Az új komplex koncentrációja a HC-Pro koncentrációjának emelkedésével pozitív korrelációt mutatott (E10. ábra D). Ugyanakkor az új komplex megjelenésével csökkenni kezdett az siRNS-DICER2-R2D2 és a RISC mennyisége is. Az RLC-t nem tudtuk mérni, mivel a feltehetőleg HC-Pro fehérjék által alkotott komplex közel ugyanabban a magasságban futott. Megvizsgáltuk a tisztított rekombináns HC-Pro siRNS-kötő képességet önmagában és azt tapasztaltuk, hogy kisebb affinitással köti a siRNS-t, mint ahogy arra a fehérjekivonat jelenlétében képes (E10. ábra D, vö. 2-9 és 11-17 oszlopait). Mindezek mellett a rekombináns HC-Pro önmagában kisebb méretű komplexet képez a siRNS-sel, mint fehérjekivonat jelenlétében (E10. ábra D, vö. 2-9 és 11-17 oszlopait).

Heparinnal kezeltük a *Drosophila* embrió fehérjekivonatot. Mivel a heparin megakadályozza a silencing komplexek kialakulását, ezért heparin kezeléssel kizártuk annak a lehetőségét, hogy a HC-Pro megváltozott siRNS-kötő tulajdonsága kapcsolatban legyen az RNS silencing-gel (Pham et al., 2004, Tomari et al., 2004). A HC-Pro ennek ellenére nagyobb affinitással és nagyobb méretű komplexben kötötte a siRNS-t, mint fehérjekivonat nélkül. Feltehetőleg a *Drosophila* fehérjekivonat egy "fehérjegazdag" környezetet alakít ki, minek hatására megnő a HC-Pro fehérje aktív frakciójának aránya. Nagy valószínűség szerint ez történhetett, mert ugyanezt a hatást el lehetett érni néhány mikrogramm *Arabidopsis* sejtkultúrából származó fehérjekivonattal is (lásd később).

A direkt kompetitív kísérleti beállításban a HC-Pro fehérje megakadályozta a silencing iniciációjáért felelős DICER2-R2D2 komplex kialakulását. Az indirekt kompetitív rendszerben is ugyanabban a koncentrációban alkalmaztuk a HC-Pro fehérjét, de csak a siRNS-DICER2-R2D2 komplex mennyisége csökkent, de a HC-Pro az aktív RISC-re nem volt hatással (E10. ábra E).

A *Drosophila in vitro* rendszerben elért eredményeink az mutatják, hogy a TEV HC-Pro siRNS-kötő tulajdonsággal rendelkezik és a CIRV p19, a BYV p21 és az RHBV NS3 RNS silencing szupresszorokhoz hasonlóan a siRNS-ek megkötésével akadályozza meg a RISC kialakulását (Merai et al., 2006).

A**B****C**



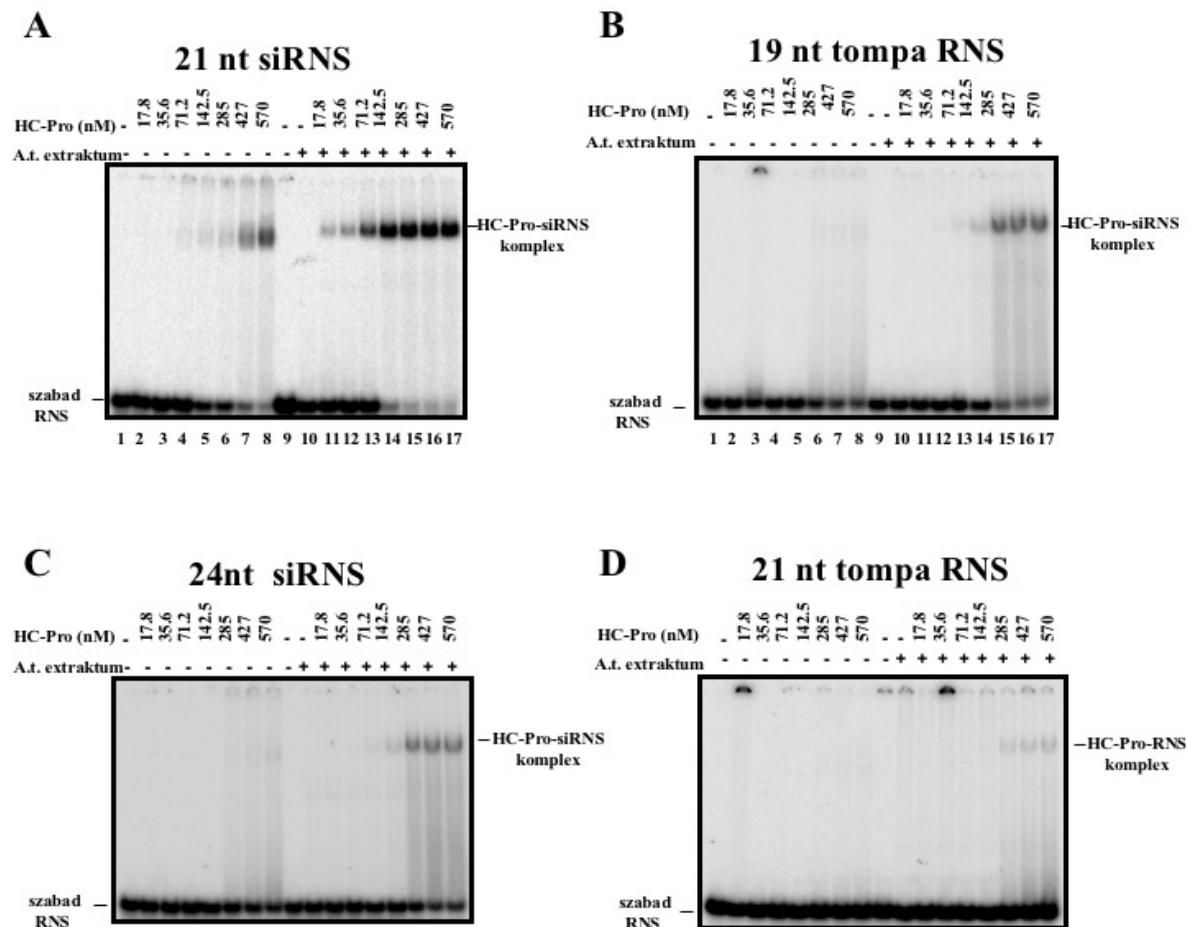
E10. ábra A szupresszorok hatása a silencing komplexek képződésére

Reprezentatív direkt és indirekt kompetitív kísérlet bemutatása a p19 (A és B), a p21 (C) és a HC-Pro esetében (D és E). A képződött RNS silencing komplexek mennyiségének ábrázolása a direkt és az indirekt rendszerben 3 ismétlésben. A RISC mennyiségét pirossal, az RLC-t zölddel, míg a siRNS-DICER2-R2D2 mennyiségét a kontrollhoz lépes fekete színnel jelöltük. A komplexek arányát a szupresszor koncentráció függvényében ábrázoltuk.

5.5. A TEV HC-Pro fehérje a 21 nt siRNS 3' végét köti

Az RNS silencing központi molekulái a siRNS-ek, amelyek 21-25 nt hosszúságú duplaszálú A-hélix szerkezettel rendelkező molekulák. 5' végükön foszfát csoportot és a 3' végükön két bázispáros túlnyúló véget tartalmaznak, amelyek az ún. RN-áz III csoportba tartozó DICER enzimek vágási termékeire jellemzőek (Ding & Voinnet, 2007, Hutvagner, McLachlan et al., 2001). A CIRV p19 fehérje a 21 nt hosszúságú siRNS-eket köti a legnagyobb affinitással, biokémiai és szerkezetbiológiai megközelítések eredményeképpen megállapították, hogy a p19 a kis RNS-ek 5' foszfát csoportját köti meg (Dunoyer et al., 2004, Vargason et al., 2003).

Munkánk során célul tűztük ki a HC-Pro fehérje siRNS kötési tulajdonságainak meghatározását. EMSA kísérleteket végeztünk, amelyben különböző hosszúságú és szerkezeti tulajdonságokkal bíró kis RNS molekulákat használtunk. A *Drosophila in vitro* rendszerben tett megfigyelésünk alapján a rekombináns HC-Pro affinitását a különböző siRNS-ekhez önmagában és *Arabidopsis thaliana* sejtszuspenziós kultúrából származó nyers fehérjekivonat jelenlétében vizsgáltuk meg (E11. ábra A, B, C és D panel vö. 1-8 és 9-17. oszlopokat). Az affinitás vizsgálatokhoz 21 és 24 nt hosszúságú szabályos siRNS-eket, valamint 19 és 21 nt tompa végű duplaszálú RNS molekulákat használtunk (E10. ábra). Eredményeink szerint a legnagyobb affinitással a 21 nt-os szabályos siRNS molekulát kötötte a HC-Pro. A 24 nt siRNS és a tompa véggel rendelkező 19 és 21 nt hosszúságú molekulákkal alkotott komplexeket gyengén lehetett detektálni (E11. ábra A, B, C és D). Továbbá, a HC-Pro az egyszálú 21 nt siRNS-et sem kötötte az általunk alkalmazott körülmények között (nem közölt eredmény). Ezek alapján levonhatjuk azt a következtetés, hogy a HC-Pro csak a 21 nt duplaszálú siRNS-eket köti, és a siRNS-ek 3' túlnyúló végei fontos szerepet játszanak a kötés kialakításában. A *Drosophila in vitro* rendszerben elért eredményeinkhez hasonlóan az *A. thaliana* fehérjekivonat jelentősen megnövelte a HC-Pro affinitását az összes duplaszálú RNS molekulához (E11. ábra A, B, C és D).



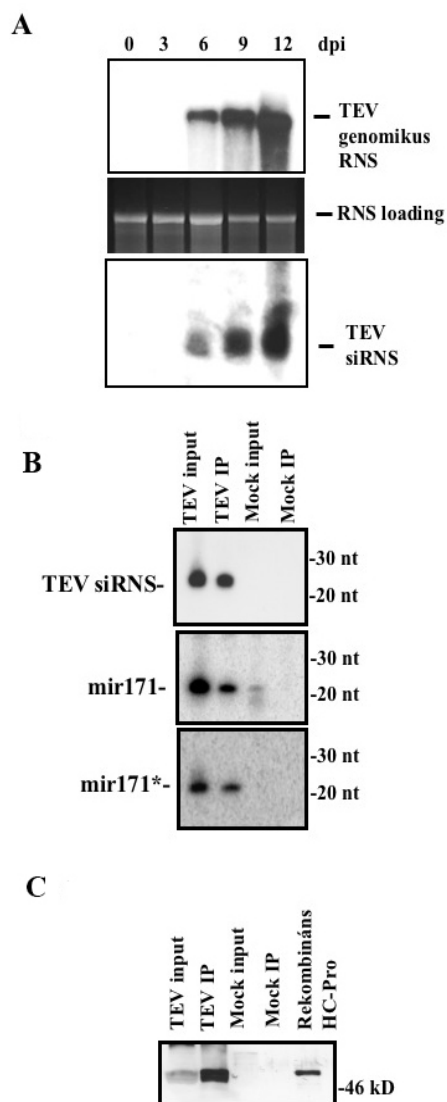
E11. ábra A HC-Pro kis RNS kötése önmagában és *A. thaliana* extraktum jelenlétében.

21 nt ds siRNA (A), 19 nt tompa végű dsRNA (B), 24 nt 3' végén 2 nt túlnyúló véggel rendelkező kis RNA (C), 21 nt tompa végű kis RNA (D). A panelek bal oldalán az adott kis RNA-akat HC-Pro-val, míg a jobb oldalán a HC-Pro-val és *A. thaliana* extraktummal inkubáltuk együtt.

5.5.1. A HC-Pro *in vivo* jellemzése

Korábbi eredményeink azt mutatták, hogy a CymRSV fertőzés során nagy mennyiségű virális siRNA keletkezik, és a p19 a virális siRNA-ek megkötésével akadályozza meg az RNA silencing kialakulását. A HC-Pro-val kapcsolatos *in vitro* eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a HC-Pro is egy siRNA-kötő képességgel rendelkező silencing szupresszor. Azonban mások eredményei szerint a TEV HC-Pro megakadályozta a siRNA-ek képződését stabil transzgenikus dohány és Arabidopsis növényekben (Mallory et al., 2001). Ezért további munkánk során megvizsgáltuk azt, hogy TEV fertőzött *N. benthamiana* növényekben a HC-Pro fehérje gátolja-e siRNA-ek képződését. TEV fertőzött *N. benthamiana* növények szisztémikus leveleiből totál RNA-t izoláltunk 0, 3, 6, 9 és 12 nappal a fertőzés után. A nagy móltömegű RNA-akat formaldehid-agaróz gélen szétválasztottuk és Northern blotolással már 3 nappal a fertőzés után ki tudtuk mutatni a TEV genomi RNA jelenlétét a

fertőzött levelekben. Továbbá a fertőzés után eltelt idő előrehaladtával a TEV genomi RNS mennyisége nőtt (E12. ábra A, felső panel). Ugyan ezekből az RNS preparátumokból TEV eredetű virális siRNS-ek jelenlétét is kimutattuk. A siRNS-ek szintén 3 nappal a fertőzés után jelentek meg, és a genomi RNS mennyiségének növekedésével párhuzamosan a siRNS mennyiség is nőtt az idővel (E12. ábra A, alsó panel). Mivel a genomi és a siRNS-ek mennyisége nőtt és hasonló módon változott a fertőzés során, ebből azt a következtetés vontuk le, hogy a TEV HC-Pro nem gátolja a virális siRNS-ek kialakulását *in vivo*.

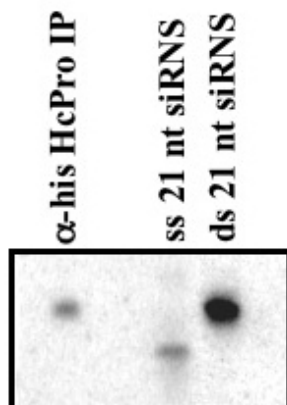


E12. ábra A TEV HC-Pro nincs hatása a virális siRNS-ek képződésére

TEV genomi és TEV eredetű siRNS-ek kimutatása Northern blotolással 0, 3, 6, 9 és 12 nappal a fertőzés után (A). A TEV 6×His-HC-Pro kis RNS-kötő tulajdonságának bemutatása immunoprecipitációval (B). Immunoprecipitációval feldúsítottuk a TEV 6×HisS-HC-Pro fehérjét és Western blotolással mutattuk ki (C).

5.5.2. A TEV HC-Pro duplaszálú si- és miRNS-eket köt *in vivo*

In vitro eredményeink szerint a TEV 6×His-HC-Pro siRNS-kötő tulajdonságot mutatott (E10. és E11. ábra). Továbbá, a 6×His-HC-Pro nem volt a hatással a TEV eredetű virális siRNS-ek keletkezésére sem. Ezért megvizsgáltuk az, hogy a TEV HC-Pro milyen kis RNS-eket köt *in vivo*. A kérdés megválaszolására TEV-vel fertőzött *N. benthamiana* növények szisztémikus leveleiből fehérjekivonatot készítettünk IP1 pufferben és az anti- 6×His ellenanyaggal immunoprecipitáltuk a TEV által termelt 6×His-HC-Pro fehérjét. Az eluátumból fehérjét és RNS-t izoláltunk, majd Northern és Western blotolással mutattuk ki a kis RNS-ek és a 6×His-HC-Pro jelenlétét. Eredményeink azt mutatták, hogy a 6×His ellenanyag specifikusan immobilizálta a 6×His-HC-Pro fehérjét a TEV 6×His-HC-Pro vírussal fertőzött növényekből, mert a vírussal nem fertőzött növényekből nem tudtunk 6×His-HC-Pro-t kimutatni (E12. ábra C). Az IP eluátumok Northern analízise azt mutatta, hogy TEV eredetű siRNS-eket csak a TEV-vel fertőzött növényekből tudtunk kimutatni. A miR171 expressziójának vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy az érett miR171 miRNS mind a TEV fertőzött, mind a mock fertőzött növényekből kimutatható. Az érett miR171 kvázi komplementer szála, az miR171 csillag szál (miR171*) a TEV fertőzött növényekben és a 6×His ellenanyaggal végzett IP eluátumából egyaránt kimutatható volt, ami arra utal, hogy a miR171 duplaszálú formáját “konzerválta” a HC-Pro fehérje a TEV fertőzés során (E12. ábra B). Ezután azt is megvizsgáltuk, hogy a miRNS-ek mellett vajon a virális siRNS-ek is duplaszálú formában vannak-e jelen a TEV-vel fertőzött növényekben. Ezért a HC-Pro immunoprecipitáció eluátumából RNS-t izoláltunk, amelyet 15 %-os natív PAGE gélen futtatunk meg egyszálú és duplaszálú szintetikus siRNS-ekkel együtt és Northern blotolással mutattuk ki a kis RNS-ek jelenlétét. A TEV-vel fertőzött növényekből immunoprecipitált virális siRNS-ek egyértelműen a 21 nt duplaszálú kontroll RNS-sel futottak ugyanabban a magasságban, ami azt jelenti, hogy a TEV HC-Pro *in vivo* is kis RNS-kötő funkcióval rendelkezik (E13. ábra).



E13. ábra A TEV HC-Pro a 21 nt hosszúságú duplaszálú siRNAs-eket köti *in vivo*

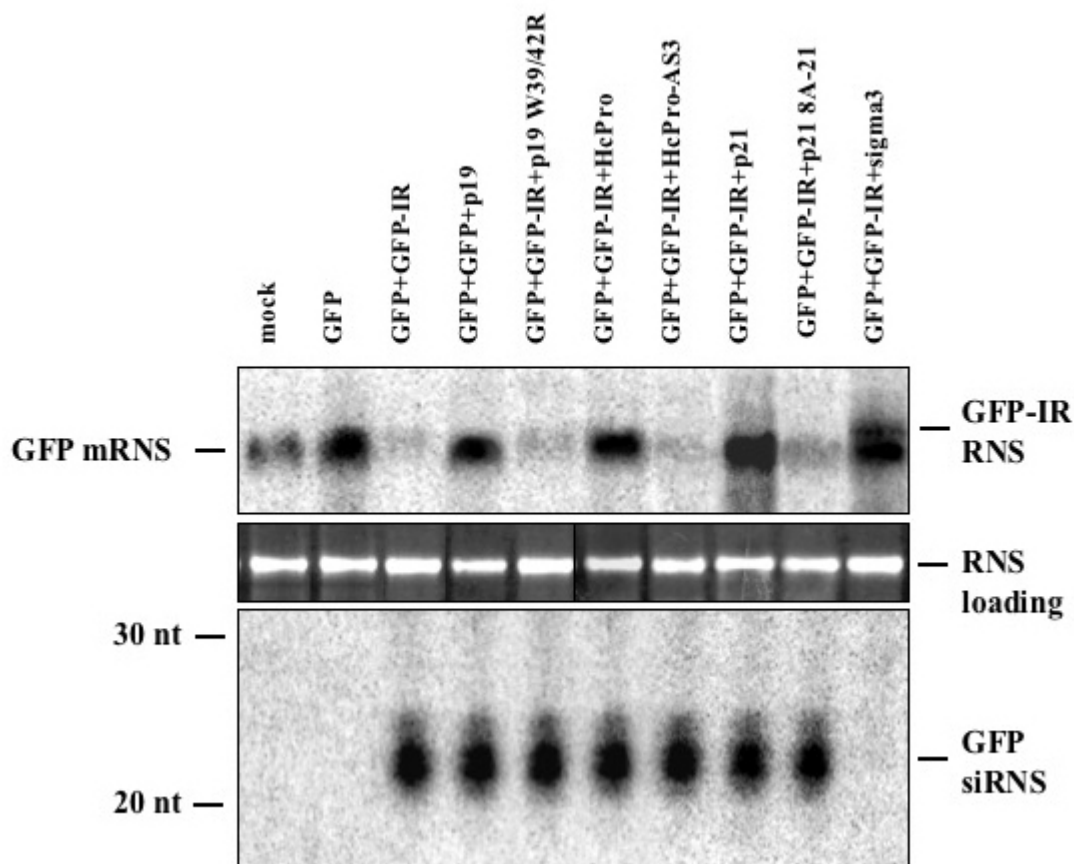
A TEV HC-Pro immunoprecipitátumból izolált RNS-t 15 %-os natív gélen futtattuk meg egyszálú és duplaszálú siRNA kontrollok mellett.

Továbbá, ez az eredmény arra is utal, hogy a TEV-ről képződött virális siRNA-ek 21 nt hosszúságúak. Korábbi *in vitro* eredményeink azt mutatták, hogy a rekombináns TEV HC-Pro a 21 nt ds siRNA-hez mutatta a legnagyobb affinitást (E11. ábra). Ugyanezt az eredményt kaptuk a BYV vírus esetében is *in vivo* (Merai et al., 2006).

5.6. A duplaszálú siRNA-kötő RNS silencing szupresszorok gátolják a target RNS vágását *in vivo*

Az RNS silencing antivirális funkciója magában foglalja a vírus felismerését és eliminálását. A virális RNS szekvenciaspecifikus degradációjáért a RISC felelős (Zamore, 2002). Agroinfiltrációs rendszerben megvizsgáltuk, hogy a ds siRNA-kötő RNS silencing szupresszorok gátolják-e a target RNS vágást *in vivo*. *N. benthamiana* növényekbe agroinfiltráltuk a GFP-inverted repeat-et (GFP-IR), a különböző szupresszorokat és szupresszor mutánsokat, valamint a 35S-GFP-t, mint target RNS-t (ez a kísérleti beállítás a direkt kompetitív *in vitro* rendszernek feleltethető meg). Northern blotolással vizsgáltuk meg a target RNS vágás hatékonyságát és a GFP-IR-ről képződött kis RNS-ek mennyiségét. Az E14. ábrán jól látható, hogy a GFP-IR erősen indukálta az RNS silencinget, ami hatékony GFP degradációt idézett elő. A siRNA-kötő szupresszorok, úgymint a CIRV p19, TEV HC-Pro és BYV p21 erősen szupresszálták az RNS silencing-et (E14. ábra), miközben nem gátolták a GFP-IR-ről képződött siRNA képződést *in vivo*. A kis RNS képződést egyedül a reovírus sigma3 fehérje gátolta, amiről ismert, hogy nagy affinitással köti a hosszú duplaszálú RNS molekulákat, így akadályozva meg a siRNA-ek képződését (Lichner, Silhavy et al., 2003) (E14. ábra felső alsó és felső panel). Ugyanakkor azok a szupresszor mutánsok, amelyek nem

képesek a siRNS-eket megkötni (Chiba, Reed et al., 2006, Vargason et al., 2003, Yu et al., 2006), nem mutattak RNS silencing szupresszor aktivitást (E14. ábra).



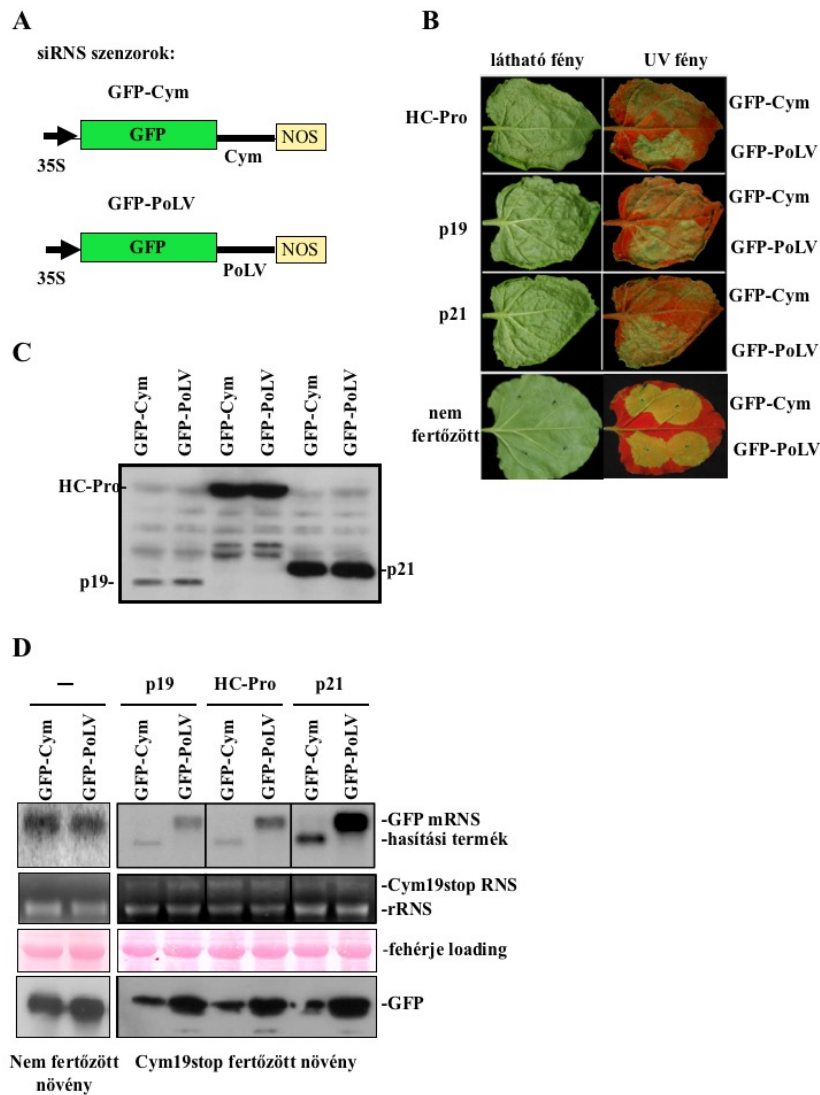
E14. ábra A siRNS- kötő szupresszorok nem gátolják a siRNS képződést *in vivo*

5.7. A duplaszálú siRNS-kötő RNS silencing szupresszorok nem gátolják a si- és a miRNS indukálta aktív RISC-eket *in vivo*

A ds siRNS-kötő silencing szupresszorok hatékonyan gátoltak a RISC felépülését és ezáltal a RISC aktivitást a *Drosophila in vitro* rendszerben, azonban az egyszálú siRNS-t tartalmazó aktív RISC-et nem képesek gátolni. *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. 14-18 nappal a fertőzés után a növény elkezd kigyógyulni a p19 fehérjét nem expresszáló, attenuált vírus által okozott fertőzéstől, mivel a fertőzött növény RISC komplexeibe nagy mennyiségű virális siRNS épült be, így az RNS silencing visszaszorítja az attenuált vírust. A kísérleti rendszerünkhöz két GFP alapú riportergént alakítottunk ki. A GFP-Cym konstrukcióról olyan mRNS íródik át, amely a GFP

ORF után a Cym19stop vírus 3' végéhez közeli régiójából tartalmaz egy kb. 200 bp-os régiót. Ezt az mRNS-t a Cym19stop vírussal fertőzött növények leveleiben lévő RISC-ek a szekvenciahomológia miatt nagy hatékonysággal képesek degradálni. Kontrollként egy hasonló konstrukciót építettünk, abban azonban a *Pothos latent virus* (PoLV) 3' végén található kb. 200 bp-os régiót illesztettünk a GFP ORF után (GFP-PoLV). Mivel a Cym19stop és a PoLV között alacsony a szekvenciahomológia, az Cym19stop-pal fertőzött növényekben az RNS silencing nem degradálja a GFP-PoLV mRNS-t (E15)



A).

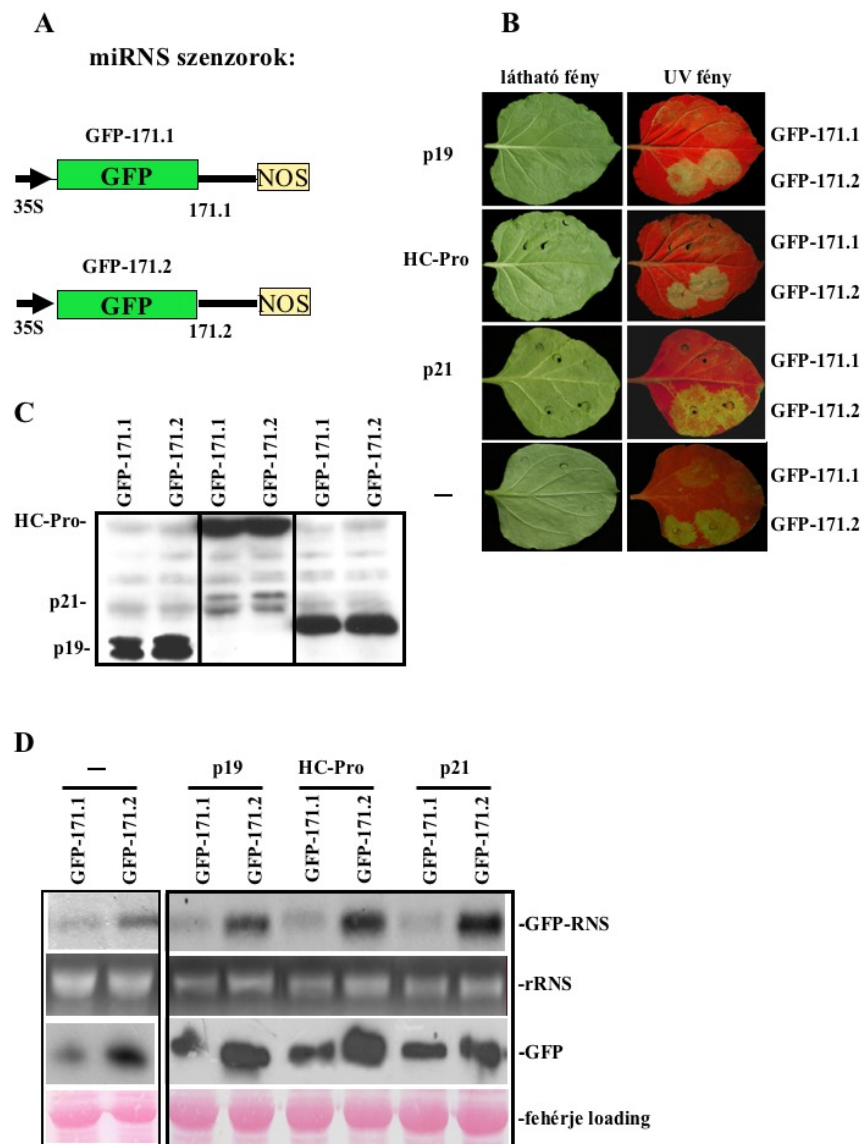
E.15. ábra A siRNS-kötő silencing szupresszorok nem gátolják a virális siRNS-sel töltött RISC-eket *in planta*

A GFP-Cym és GFP-PoLV konstrukciók sematikus ábrázolása (A). A riportergénnel és a szupresszorokkal infiltrált levelek látható és UV fényben (B). A szupresszorok összevethető mértékben expresszálják mind a GFP-Cym, mind a GFP-PoLV-val együtt infiltrálva (C). Az infiltrált foltok Northern és Western analízise (D). A Northern blot autoradiogramján jól látható a GFP-Cym mRNS és a GFP ORF, mint vágási termék közötti méretkülönbség (felső panel, vö. az 1. oszlopot a 3., 5., és 7. oszloppal). A legalsó panelen a GFP expresszióját vizsgáltuk.

A kigyógyulás jeleit mutató Cym19stop vírussal fertőzött növények leveleit a riporter génekkel és a silencing szupresszorokkal infiltráltuk. 36-48 óra inkubáció idő után UV fény alatt megvizsgáltuk a GFP expresszióját. A GFP mRNS expresszióját Northern-, a GFP fehérje mennyiségét Western blotolással állapítottuk meg. Az UV fényben végzett vizuális vizsgálat szerint a Cym19stoppal meg nem fertőzött növényekben a két riporter gén egyformán expresszált (E15. ábra A). Ezzel szemben a Cym19stop vírussal fertőzött növények leveleiben a siRNS- kötő silencing szupresszorok, úgymint p19, HC-Pro, p21 nem gátolták az aktív RISC működését (E15. ábra B), ami a GFP-Cym riporter konstrukcióval infiltrált levelekben a GFP-Cym mRNS vágásához vezetett (E15. ábra C). Szeretnénk megjegyezni, hogy a GFP-Cym konstrukcióval infiltrált levelekben egyforma (kb. GFP ORF méretű vágási terméket detektáltunk a Northern blotolással. Erre az lehet a magyarázat, hogy a virális siRNS-ekkel töltött RISC komplexek csak a Cym19stop eredetű 3' nem-transzlálódó régióban találták el a GFP-Cym mRNS-t. A GFP régióról nem keletkezett másodlagos siRNS a viszonylag rövid, 36-48 órás inkubációs idő alatt (Schwach et al., 2005), ezért *in vivo* rendszerünk csak a holo-RISC aktivitását mérte. Ezzel összhangban, jelentősen nagyobb mennyiségű GFP fehérjét mutattunk ki a GFP-PoLV-val infiltrált foltokból, mint azokból, amelyeket GFP-Cym konstrukcióval infiltráltunk (E15. ábra D (Lakatos et al., 2006)).

A miRNS indukálta aktív RISC-ek vizsgálatához két GFP alapú riporter konstrukciót használtunk. Tudtuk azt, hogy a miR171 a *N. benthamiana* kifejlett leveleiben már nem íródik át, nem alakít ki de novo RISC komplexeket. Ezért a kifejlett leveleiben található RISC-ek kizárólag aktív RISC-nek tekinthetőek. A GFP-171.1 konstrukciókban a GFP ORF után közvetlenül egy miR171 felismerőhely található (E16. ábra A). Amennyiben a konstrukciót agroinfiltrálással *N. benthamiana* levelekbe juttatjuk, a miR171 indukálta RNS silencing lebontja a konstrukcióról átíródott mRNS-t (E16. ábra D panel, 1. oszlop), így fehérje sem transzlálódik róla (E16. ábra, B legalsó panel, D 1. oszlop). Kontrollként az ún. GFP-171.2 konstrukciót alkalmaztuk (E16. ábra A), amely egy mutáns miR171 felismerőhelyet tartalmaz, amit nem vág el a miR171 indukált RNS silencing (E16. ábra B legalsó panel, D. 1. és 2. oszlop) (Parizotto, Dunoyer et al., 2004). Annak eldöntésére, hogy a ds siRNS-kötő silencing szupresszorok gátolják-e a miRNS -t tartalmazó aktív RISC komplexeket, a GFP-171.1 és GFP-172.1 riporter konstrukciókat a siRNS-kötő silencing szupresszorokkal *N. benthamiana* levelekbe infiltráltuk. 36-48 óra múlva megvizsgáltuk az infiltrált leveleket UV fényben. A kontroll riporter gént és az adott szupresszort tartalmazó foltokban erős GFP aktivitást láttunk, míg a GFP-171.1 konstrukcióval infiltrált foltokban jóval gyengébb GFP aktivitást észleltünk (E16. ábra B). Az infiltrált foltok Northern és Western analízise azt mutatta, hogy a siRNS-

kötő RNS silencing szupresszorok nem tudták megakadályozni a miR171 indukálta RNS silencing-et (E16. ábra D, 1. és 3. panel). Eredményeink valóságát bizonyítja az, hogy az infiltrált foltokban a szupresszorok szinte azonos mértékben expresszálódtak, a silencing szupresszió hiánya a GFP171.1 konstrukcióval infiltrált foltokban nem annak tulajdonítható, hogy a szupresszorok különböző mértékben expresszálódtak (E16. ábra B).



E.16. ábra A siRNS-kötő silencing szupresszorok nem gátolják a miRNS-sel töltött RISC-eket *in planta*

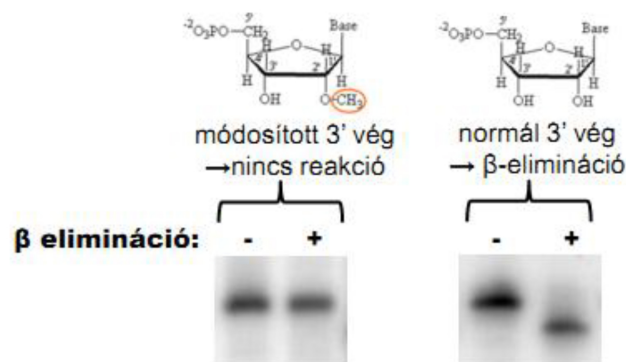
A GFP-171.1 és GFP-171.2 konstrukciók sematikus ábrázolása (A). A riportergénnel és a szupresszorokkal infiltrált levelek látható és UV fényben (B). A szupresszorok összevethető mértékben expresszálnak mind a GFP-171.1, mind a GFP-171.2-vel együtt infiltrálva (C). Az infiltrált foltok Northern és Western analízise. A legelső panelen a GFP fehérje expresszióját vizsgáltuk (D).

Eredményeinket összefoglalva megállapítottuk, hogy a CIRV P19, TEV HC-Pro és BYV p21 fehérjék ds 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.

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

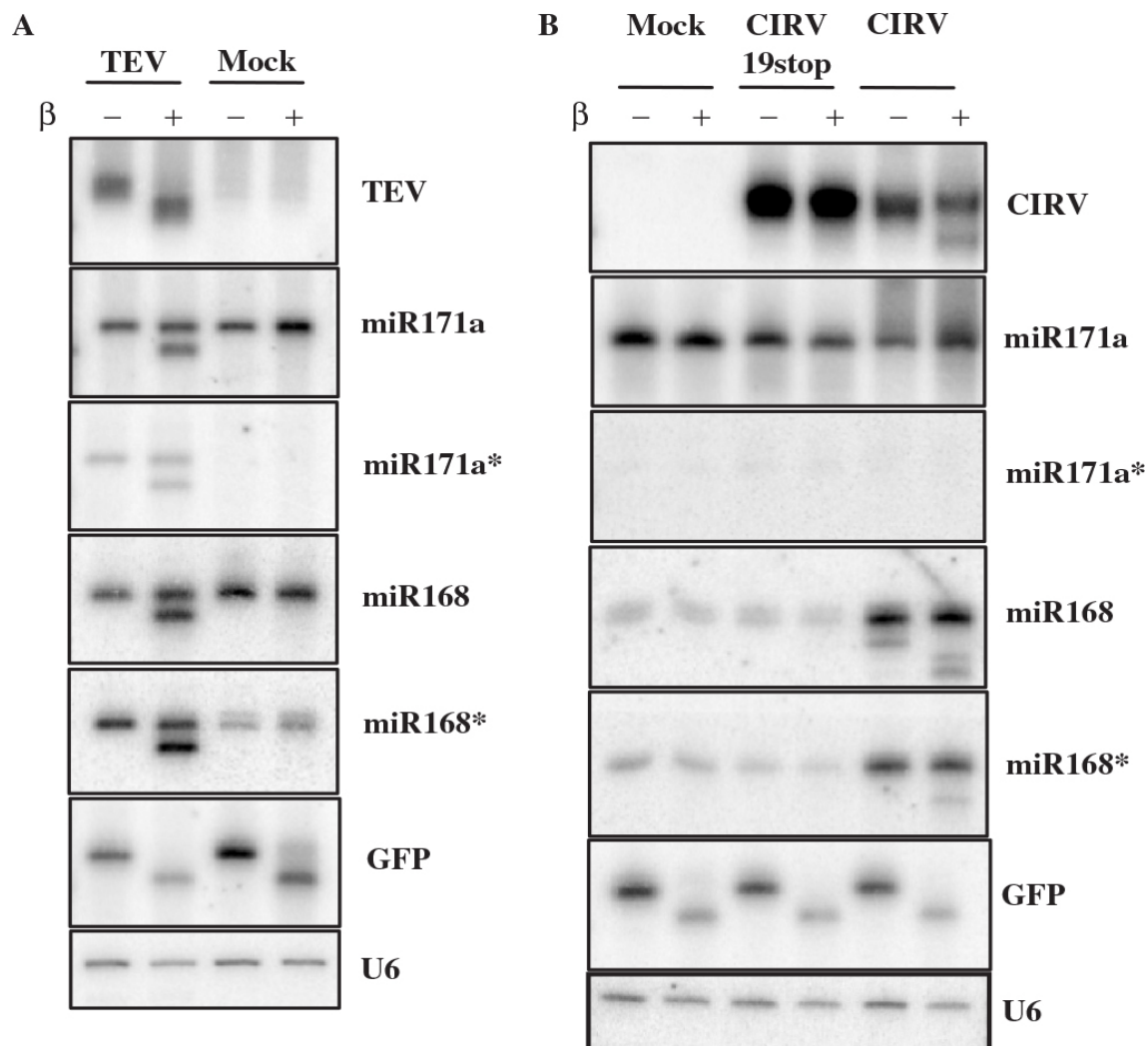
Az *A. thaliana* hen1 (Hua ENhancer) mutáns növények fenotípusa rendkívül nagy hasonlóságot mutatott a miRNS silencing-ben résztvevő génekben mutáns növényekével. További kutatások alapján kiderült, hogy a HEN1 egy RNS metil-transzferáz fehérjét kódol, ami a kis RNS-ek 3'-végének metilációját végzi (Li, Yang et al., 2005a). HEN1 függő metiláció hiányában a kis RNS-ek poliuridilálódnak és lebomlanak. Az általunk is korábban vizsgált és jól jellemzett ds siRNS-kötő RNS silencing szupresszorok, úgymint a tombusvírusok p19, a TEV HC-Pro és a BYV p21 fehérjei transzgénként *A. thaliana*-ban gátolták a miRNS-ek és tasiRNs-ek metilációját (Yu et al., 2006). Ezért azt a kérdést tettük fel, vajon a vírusfertőzés során a CIRV p19 és a TEV HC-Pro hogyan befolyásolja a virális siRNS-ek és a miRNS-ek metilációját.

A kérdés megválaszolására vírusfertőzött növények szisztémikus leveleiből teljes RNS kivonatot készítettünk, majd az ún. β -eliminációs reakcióval vizsgáltuk meg a kis RNS-ek metilációját. A perjodáttal végzett β -eliminációs reakció (erős oxidáló lépés) során a metilátlan kis RNS 3'-végén lévő ribóz gyűrű felnyílik, majd lúgos körülményeket alkalmazva a ribóz a bázissal együtt lehasad negatív töltésű foszfát csoportot hagyva az RNS molekulán. A β -eliminációs reakciót 1 nukleotidos felbontású denaturáló PAGE gélen megfuttatva a metilátlan RNS a relative nagyobb negatív töltése miatt gyorsabban vándorol, amit könnyen detektálható Northern blotolással (E17. ábra).



E17. ábra A β -eliminációs reakció sémája (Lózsza, 2012)

Először TEV és mock fertőzött növények teljes RNS kivonatait vizsgáltuk meg. Az RNS preparátumokba szintetikus, metilálatlan 21 nt hosszúságú RNS molekulát kevertünk, amivel a β -eliminációs reakció hatékonyságát mértük. Sikertült olyan körülményeket beállítani, amelynél a reagenseket olyan mértékű feleslegben adtuk a reakciókhoz, hogy a reakció hatékonysága közel 100 % volt. Eredményeink szerint a TEV eredetű siRNS-ek 100 %-ban metilálatlan formában voltak a fertőzött növényekben. Megvizsgáltuk néhány miRNS metiláltságát is. A miR171a érett szála és a csillag szála is kb. 50%-ban volt metilált. Hasonló arányban volt metilálva a miR168 és a miR168* szála is. Loading kontrollként az U6 RNS-t használtuk (E18. ábra A).



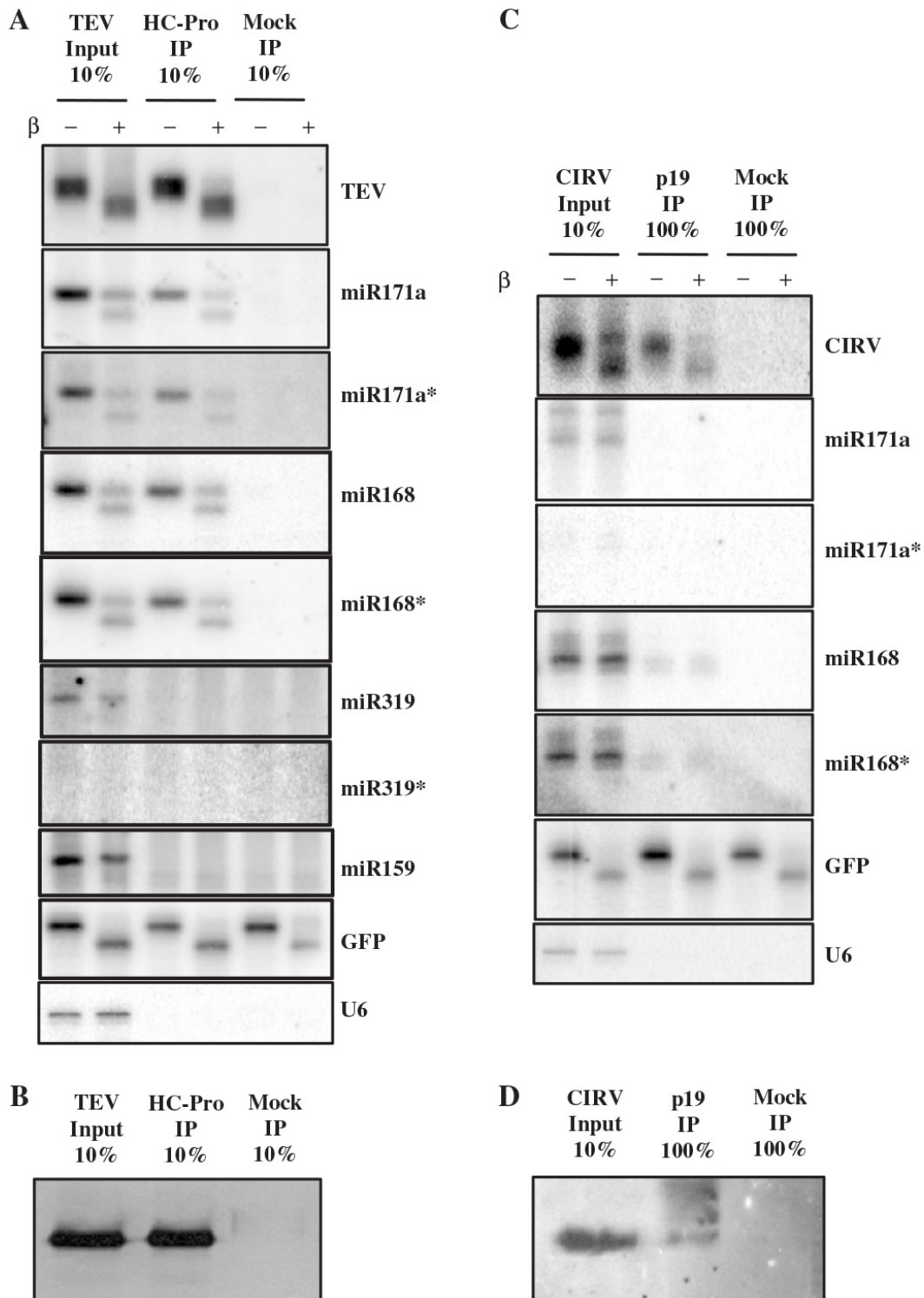
E18. ábra A TEV és a CIRV hatása a kis RNS-ek metiláltságára.

A TEV-vel és Mock-kal fertőzött növényekben az virális si- és endogén miRNS-ek metilációs vizsgálata (A). A CIRV19stop-pal, CIRV-vel fertőzött és mock növényekben az virális si- és endogén miRNS-ek metilációs vizsgálata (B). Loading kontrollként U6 RNS-t használtunk (A és B).

Ezután megvizsgáltuk a CIRV hatását a kis RNS-ek metilációjára. CIRV-vel, CIRV19stoppal és mock fertőzött növényekből származó teljes RNS kivonatok β -eliminációs

analízise után megállapítottuk, hogy a ds siRNS-kötő p19 fehérjét nem termelő CIRV19stop mutánsal fertőzött növények leveleiben a virális eredetű siRNS-ek 100 %-ban metiláltak voltak. Ezzel szemben a CIRV fertőzött növényekben a CIRV eredetű virális siRNS-ek kb. 80 %-a volt csupán metilált. A CIRV-vel fertőzött növényekben a miRNS-ek metiláltsága jelentős különbséget mutatott a TEV-vel fertőzött növényekben lévő miRNS-ekhez képest. Az miR171a érett szála 100 %-ban metilált volt és nem tudtuk kimutatni a miR171a* szálát. A miR168 erős indukciót mutatott a CIRV-vel fertőzött növényekben a CIRV19stoppal fertőzött és a mock növényekhez képest, és a p19 jelenléte alig csökkentette a miR168 és miR168* metiláltsági fokát (E18. ábra B).

Korábbi és az E18. ábrán látható eredményeink felvetették azt a lehetőséget, hogy azoknak a miRNS-eknek jelenik meg a csillag szála a fertőzött levelekben, amelyek duplaszálú formában vannak jelen a sejtekben, így a vírus szupresszora képes megkötni. Emellett megállapítottuk azt is, hogy csak azoknak a miRNS-eknek változott meg a metiláltsági foka, amelyeknek a csillag szálát is detektáltuk. Mindezen eredmények azt a kérdést vetették fel, hogy a kis RNS-ek metilációját negatívan befolyásolhatják-e a ds kis RNS-kötő RNS silencing szupresszorok. A kérdés megválaszolására immunoprecipitációval izoláltuk a szupresszorok által kötött kis RNS-eket, megvizsgáltuk a metiláltsági állapotukat és összehasonlítottuk a teljes RNS kivonatban lévő kis RNS-ek metiláltsági állapotával. Immunoprecipitációval izoláltunk a HC-Pro fehérjét és a HC-Pro által kötött si- miRNS-eket (E19. ábra A és B).



E19. ábra A HC-Pro és a p19 különböző hatással van a miRNS-ek metilációs státuszára

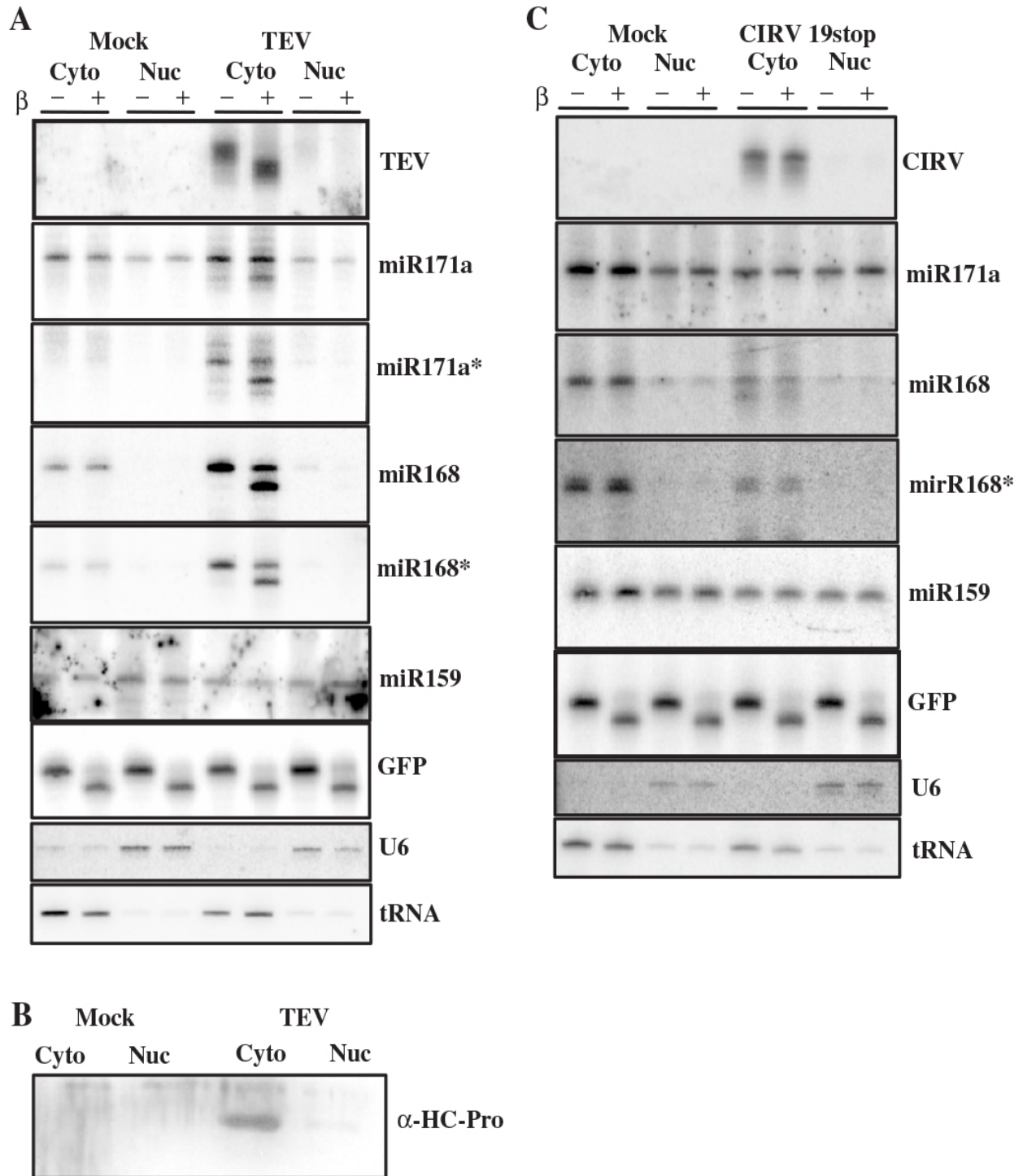
TEV fertőzött növények extraktumaiból HC-Pro IP után megvizsgáltuk a HC-Pro-val kicsapott virális si- és az endogén miRNS-ek metilációs állapotát (A). A HC-Pro kimutatása az inputban és az eluátumban (B). CIRV fertőzött növények extraktumaiból p19 IP után megvizsgáltuk a p19-cal kicsapott virális si és az endogén miRNS-ek metilációs állapotát (C) A p19 kimutatása az inputban és az eluátumban (D).

Eredményeink szerint a HC-Pro által kötött virális siRNS-ek, a miR171a, miR171a*, miR168 és miR168* metiláltsági foka megegyezett a teljes RNS kivonatban lévő kis RNS-ek

metiláltsági fokával. A miR-159 és a miR319 100 %-ban metilált állapotban volt jelen a teljes RNS kivonatban. A miR139* és a miR159* szálát nem is detektáltuk, amiből arra következtettünk, hogy a miR139 lókusztól nem történik mRNS átírás a TEV fertőzött levelekben.

A CIRV-vel fertőzött növényekben a p19 IP-ből izolált kis RNS-ek metilációs analízise azt mutatta, hogy a virális eredetű siRNS-ek közel 90 %-a metilált állapotban van. A p19 nem köti a miR171 érett és csillag szálát, a miR168 érett és csillag szálát pedig sokkal kisebb mértékben köti, mint a virális siRNS-eket. A p19 IP-vel vizsgált miRNS-ek 100 %-ban metiláltak, ami azt jelenti, hogy a HC-Pro-val szemben, a CIRV p19 nem interferál a miRNS-ek metilációjával a vírusfertőzés során (E19. ábra C és D).

Mind a TEV, mind a CIRV19stop a növényi sejtek citoplazmájában replikálódik. Ezzel szemben a miRNS-ek a sejtmagban íródnak át, majd a DCL1 enzim végzi a pri-miRNS → pre-miRNS → ds miRNS átalakítást a sejtmagban. Majd a ds miRNS az exportin-5 segítségével jut ki a sejtmagból. Annak eldöntésére, hogy a sejten belül hol találhatóak a nem metilált kis RNS-ek, a vírusfertőzött sejtek frakcionálását végeztük el. A nukleáris és a citoplazmás frakcióból RNS-t preparáltunk, és megvizsgáltuk a metilációs státuszukat. A sejtfractionálás hatékonyságát a citoplazmás tRNS és a nukleáris U6 RNS kimutatásával ellenőriztük. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a TEV-vel fertőzött növényekben a HC-Pro és a TEV eredetű virális siRNS-ek a citoplazmában lokalizálódtak (E20. ábra A és B). A miR171a mindkét kompartmentben jelen volt, azonban csak a citoplazmás frakcióban találtuk nem metilált formát. A miR171a* csak a citoplazmában volt jelen metilált és nem metilált formában egyaránt. A miR168 és miR168* csak a citoplazmában volt jelen és a két szál metilációs szintje megegyezett. Érdekes módon a miR159 teljesen metilált formája mindkét kompartmentben jelen volt.



E20. ábra A kis RNS-ek a citoplazmában metilálódnak

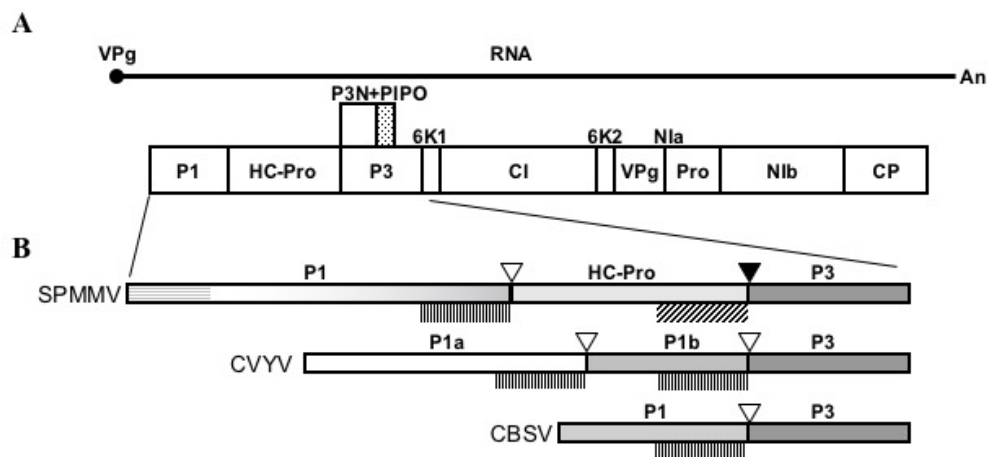
Mock és TEV fertőzött növények citoplazmás és nukleáris frakcióiban a virális és az endogen kis RNS-ek metilációs vizsgálata (A). A TEV HC-Pro lokalizációja Western blottal (B). Mock és CIRV fertőzött növények citoplazmás és nukleáris frakcióiban a virális és az endogen kis RNS-ek metilációs vizsgálata (C). A frakciók validálására U6 (magi) és tRNS (citoplazmás) kontrollokat használtunk (A és C).

A CIRV19stop mutánsal 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 teljes mértékben metiláltnak bizonyultak (E20. ábra C és D). 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.

5.9. A *Sweet potato mild mottle virus* P1 silencing szupresszora új típusú működési mechanizmussal rendelkezik

A *Potyvirus*-ok családja (*Potyviridae*) a legnépesebb a növényi vírusok közül. 6 genus-ában több, mint 100 fajtát azonosítottak eddig. A *Potyvirus*-ok genomja egyszálú pozitív értelmű RNS, amely egy nagy poliproteint kódol. A *Potyvirus*-ok családjában a 42-56 %-s homológiát mutattak ki a poliprotein egészét tekintve. Az érett fehérjét tekintve azonban jóval alacsonyabb a homológia. A legnagyobb különbséget a P1 fehérjék között mutatták ki (Adams, Antoniw et al., 2005). Az átlagos P1 fehérje 300-400 aminosav hosszúságú, ezzel szemben az SPMMV P1 fehérje 759 as (Valli, Lopez-Moya et al., 2007) (E21. ábra).

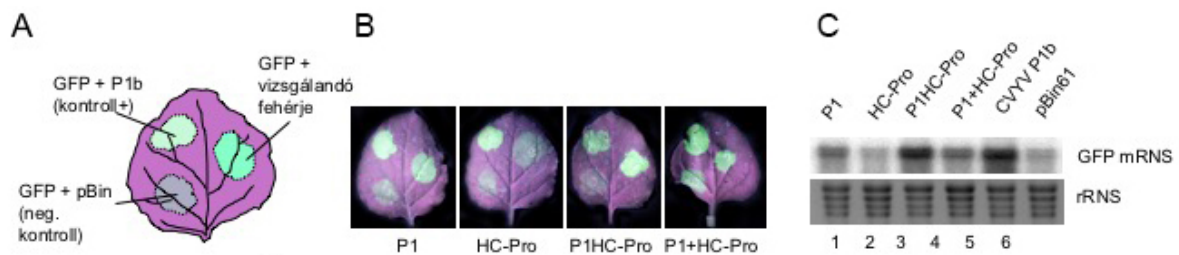


E21. ábra Az SPMMV virális RNS (A) és a róla transzlálódó poliprotein és az érett polipeptidjeinek (B) vázlatos rajza. A P1 és a HC-Pro fehérjéket kiemeltük.

5.9.1. Az SPMMV silencing szupresszorának azonosítása

Az SPMMV esetében nem volt ismert, vajon a vírus rendelkezik-e silencing szupresszor aktivitású fehérjével, ezért célul tűztük ki az SPMMV VSR-ének azonosítását. Mivel a *Potyvirus*-ok esetében több ízben is a HC-Pro fehérjét azonosították szupresszorként,

valamint az SPMMV P1 fehérje jóval nagyobb, mint az átlagos P1 fehérje, ezért mind a két fehérje silencing szupresszor aktivitását teszteltük. Növényi expressziós vektorba klónozott P1, HC-Pro, P1-HC-Pro és P1+HC-Pro konstrukciókat tartalmazó *Agrobacterium* törzseket együtt infiltráltunk 35S-GFP-t tartalmazó *Agrobacterium* törzsszel. Negatív kontrollként üres pBIN19-vektor infiltráltunk a 35S-GFP-t tartalmazó törzsszel, pozitív kontrollként a *Cucumber vein yellowing virus* (CVVY) P1 fehérjét (Valli et al., 2006) használtuk (E22. ábra).



E22. ábra Az SPMMV P1 VSR azonosítása

Az infiltrálás vázlatos benutatója (A). A P1, HC-Pro, P1-HC-Pro és a P1+HC-Pro *in vivo* vizsgálata (B). A (B) panel vizsgálata Northern blotolással (C).

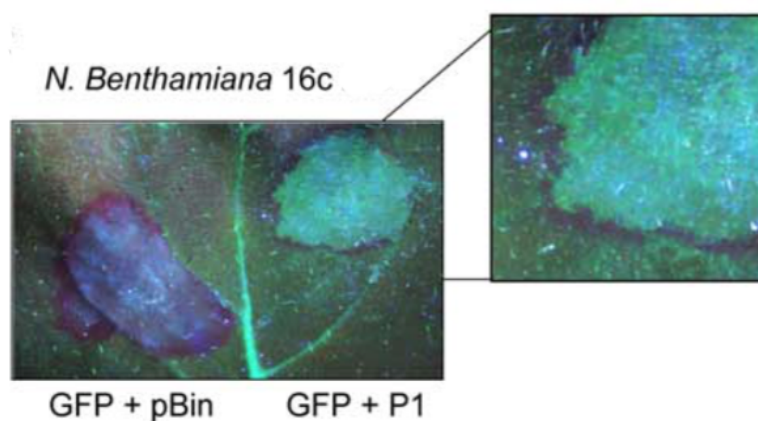
3 nappal az infiltrálás után UV fénynél megvizsgáltuk a növényeket és az infiltrált foltokból mintát vettünk. A mintákban RNS izolálás után Northern blotolással ellenőriztük a GFP expressziót. Eredményeink azt mutatták, hogy az SPMMV HC-Pro nem rendelkezett silencing szupresszor aktivitással. Ugyanakkor a P1, a P1-HC-Pro és a P1+HC-Pro mintákban a GFP ellen kialakult RNS silencinget az infiltrált fehérje elnyomta, amit a GFP megemelkedett expressziója jelzett. Az említett körülmények között a P1 fehérje minden pozitív eredményt adó mintában benne volt, így azt a következtetés vontuk le, hogy az SPMMV P1 cisztron által kódolt fehérje silencing szupresszor aktivitással rendelkezik (E22. ábra).

5.9.2. Az SPMMV P1 nem képes gátolni a mobilis silencing szignált

A sejtautonóm RNS silencing lokálisan gátolja a génexpressziót, ugyanakkor elindít egy olyan mobilis szignált, ami indukálni képes az expresszálódó gének szekvenciaspecifikus degradációját. Rövid és hosszú távon ható mobilis silencing szignált is azonosítottak növényekben (Himber et al., 2003, Mlotshwa, Voinnet et al., 2002). A hosszú dsRNS-kötő és a siRNS-kötő RNS silencing szupresszorok egyaránt gátolják a rövid és a hosszútávú mobilis silencing szignált (Silhavy & Burgyn, 2004). Az SPMMV P1 szupresszor működési mechanizmusáról nem állt semmilyen információ a rendelkezésünkre, ezért először megvizsgáltuk azt, hogy az P1 gátolja-e a rövid távú mobilis silencing szignált. A *N. benthamiana* 16c vonal egy stabil GFP transzformáns, mely viszonylag gyengén expresszálja

a GFP fehérjét. Ha ebbe a vonalba bejuttatjuk a 35S-GFP-t agroinfiltrációval, akkor először az infiltrált foltban csendesedik el a GFP expresszió, majd néhány nappal később az infiltrált folton kívül is egy vékony, de jól látható, sávban elcsendesedik. A rövidtávú mobilis szignál kialakulását kísérő jelenséget “vörös gyűrű”-nek nevezzük.

A 35S-GFP-t a *N. benthamiana* 16c vonalba infiltrálva megkaptuk a sejtautonóm és a rövidtávú mobilis szignált is (E23. ábra GFP+pBin). Az SPMMV P1 és a 35S-GFP ko-infiltrálása után kialakult a sejtautonóm RNS silencing szuppressziója, ugyanis az infiltrált foltban a GFP jóval erősebben expresszált, mint a levél infiltrálatlan régiójában. Ugyanakkor 8 nappal az infiltrálás után az infiltrált régió kívül megjelent az ún. vörös gyűrű, ami arra utalt, hogy az SPMMV P1 nem volt képes a rövidtávú mobilis silencing szignál kialakulásának megakadályozására (E23. ábra GFP+P1).



E23. ábra Az SPMMV P1 nem gátolja a kis RNS-ek terjedését.

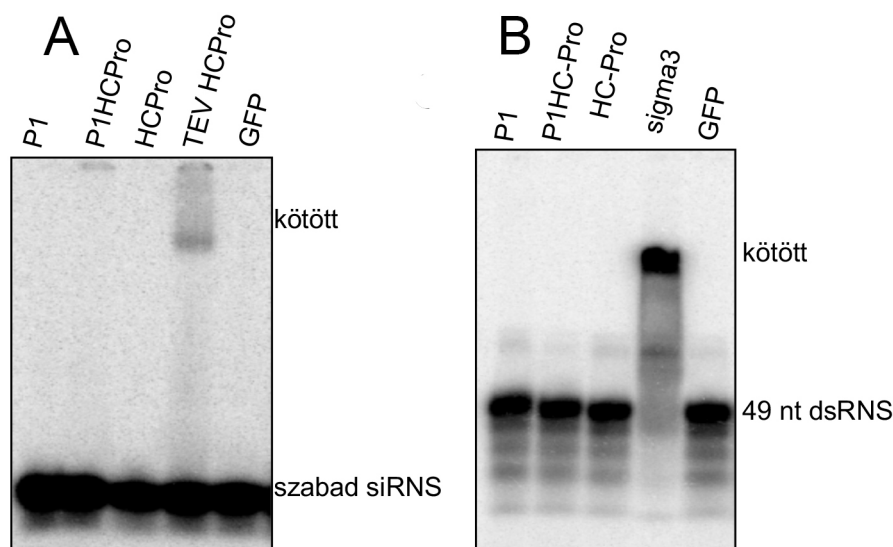
35S-GFP-t és pBin-t infiltráltunk a levél bal oldalába, míg a jobb oldalába 35S-GFP-t és P1-et a *N. benthamiana* 16c vonalba. Mind a két esetben kialakult az ún vörös gyűrű, amit kinagyítottunk.

5.9.3. Az SPMMV P1 nem rendelkezik dsRNS-kötő tulajdonsággal

Előző kísérletünk alapján megállapítottuk, hogy az SPMMV P1 nem képes megakadályozni a mobilis RNS silencing szignál kialakulását, ami arra, utalt, hogy feltehetőleg sem az siRNS képződést nem képes megakadályozni, sem siRNS-kötő tulajdonsággal nem rendelkezik. Ennek bebizonyítására több *in vitro* és *in vivo* megközelítést használtunk.

Először megvizsgáltuk azt, hogy az SPMMV P1 köti-e a 21 nt hosszúságú duplaszálú kis RNS-eket *in vitro*. A vizsgálandó fehérjéket kódoló konstrukciókat hordozó *Agrobacterium* törzseket *N. benthamiana*-ba infiltráltuk majd 3 nappal az infiltrálás után IP1 pufferrel fehérjekivonatot készítettük, amit 15 percig inkubáltunk az 5'-végén jelölt kis RNS-sel. A kötési reakciókat 6 % natív poliakrilamid gélen futtattuk meg (Merai et al., 2006). A vizsgálat

eredményéből az látszik, hogy sem az SPMMV P1, sem a HC-Pro fehérje nem kötötte a siRNS-t az általunk alkalmazott körülmények között. A kontrollként használt TEV HC-Pro markáns siRNS kötést mutatott (E24. ábra A). Hasonló módon vizsgáltuk meg a hosszú dsRNS-kötő képességet is (Meraï et al., 2006). Az infiltrálással megtermeltetett fehérjékhez 5'-végén radioaktívan jelölt 49 nt hosszúságú dsRNS adtunk a kötési reakciókban. Pozitív kontrollként a reovírus sigma3 dsRNS-kötő fehérjét (Lichner et al., 2003), míg negatív kontrollként a GFP fehérjét használtuk. Eredményeink szerint sem az SPMMV P1, sem a HC-Pro fehérje nem kötötte a 49 bp hosszúságú dsRNS-t (E24. ábra B).

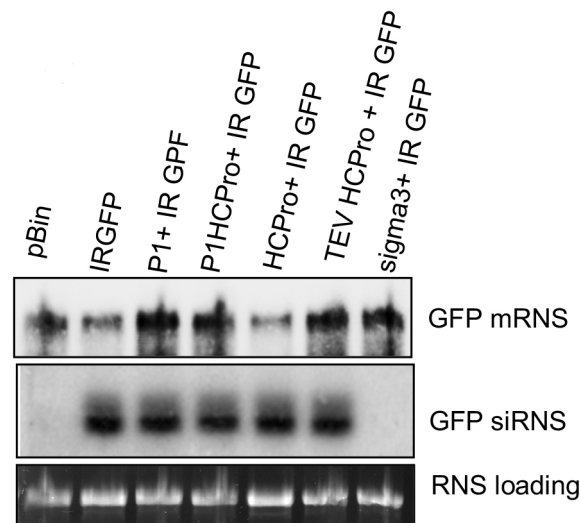


E24. ábra A P1 nem kötött a 21 nt siRNS-eket, sem a 49 nt ds RNS-t sem.

EMSA kísérlet siRNS liganddal. Pozitív kontrollként a TEV HC-Pro fehérjét használtuk (A). EMSA kísérlet a 49 nt dsRNS-sel. Pozitív kontrollként a sigma3 fehérjét használtuk (B).

In vitro vizsgálatok mellett *in vivo* megközelítést is használtunk. Egy agroinfiltráción alapuló tesztet alkalmaztunk annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy az SPMMV P1 hatással van-e az siRNS-ek képződésére *in vivo*. Ennek érdekében a vizsgálandó fehérjét tartalmazó konstrukciót hordozó *Agrobacterium* törzset és 35S-GFP-t infiltráltunk *N. benthamiana* levelekbe és IR-GFP-vel indukáltuk az RNS silencing-et. 3 nappal az infiltrálás után mintát vettünk és a mintákban a GFP expressziót és a siRNS képződést vizsgáltuk meg Northern blotolással. Eredményeink azt mutatják, hogy az IR-GFP-ről keletkezett siRNS-ek nagy mennyiségben képződtek az IR-GFP-vel infiltrált levelekben, ami hatékony RNS silencing-et eredményezett. A P1 fehérjét expresszáló mintákban a nagy mennyiségű siRNS által indukált silencing-et a P1 hatékonyan szupresszálta. Az SPMMV HC-Pro ebben a vizsgálati rendszerben sem bizonyult RNS silencing szupresszor aktivitású fehérjének. A pozitív kontrollként alkalmazott TEV HC-Pro, mint ahogy azt korábban megállapítottuk, hatékonyan elnyomta az RNS silencing-et, de nem volt hatással a kis RNS képződésre. A kis

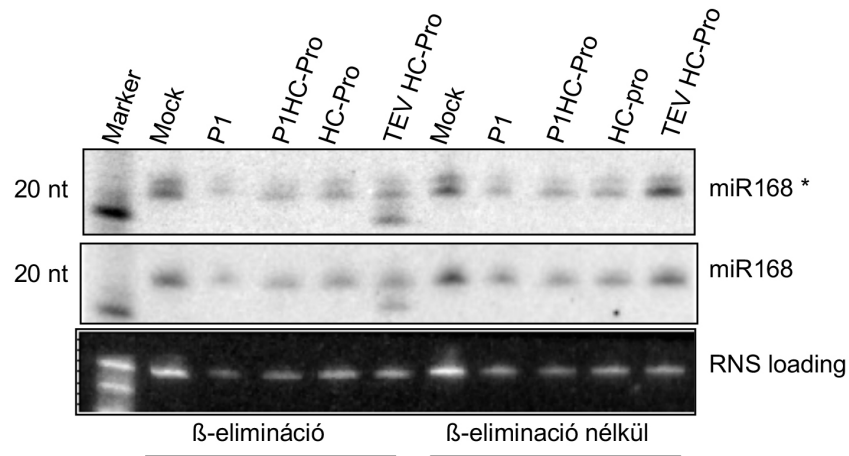
RNS képződés kontrolljaként a reovírus sigma3 fehérjét használtuk, ami mind az RNS silencing-et, mind a kis RNS-ek képződését gátolta (E25. ábra).



E25. ábra Az SPMMV P1 hatása a siRNS képződésre

GFP-IR indukálta rendszerben a 35S-GFP silencingjét és a képződött kis RNS-ek mennyiségét vizsgáltuk ds RNS-kötő fehérjét (sigma3) használtunk pozitív kontrollként

A siRNS kötés vizsgálatára egy, általunk korábban beállított módszert alkalmaztunk (Lozsa, Csorba et al., 2008). Mivel a siRNS-kötő silencing szupresszorok gátolják bizonyos növényi miRNS-ek metilációját, ezért ezt a vizsgálandó fehérjéket kódoló konstrukciókat tartalmazó *Agrobacterium* törzsekkel *N. benthamiana* leveleket infiltráltunk, majd 3 nappal az infiltrálás után mintát vettünk és RNS izolálás után megvizsgáltuk a miR168 és miR168* metilációs státuszát. Eredményeink szerint a pozitív kontrollként használt ds siRNS-kötő aktivitással bíró TEV HC-Pro fehérje expresszáltatása feldúsította a miR168 mindkét szálát és megakadályozta metilációját. Ugyanakkor sem az SPMMV P1, sem az SPMMV HC-Pro nem dúsította fel miR168 és miR168* mennyiségét és a metilációját sem akadályozta meg (E26. ábra).



E26. ábra A P1 hatása az siRNS kötésre a metilációs státusz alapján

A vizsgálandó fehérjét *N. benthamiana* növényekbe infiltráltuk, majd megvizsgáltuk a miR-168 metilációs állapotát. Pozitív kontrollként TEV HC-Pro-t használtunk.

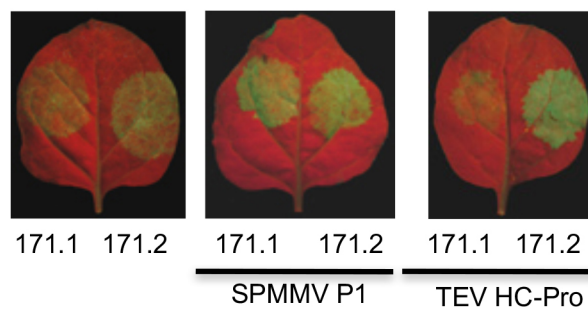
In vitro és *in vivo* vizsgálataink eredményéből arra következtettünk, hogy az SPMMV P1 nem az RNS silencing iniciációs lépéseinek gátlásával nyomja el az RNS silencing-et.

5.9.4. Az SPMMV P1 gátolja a si- és a miRNS indukálta RISC komplexeket

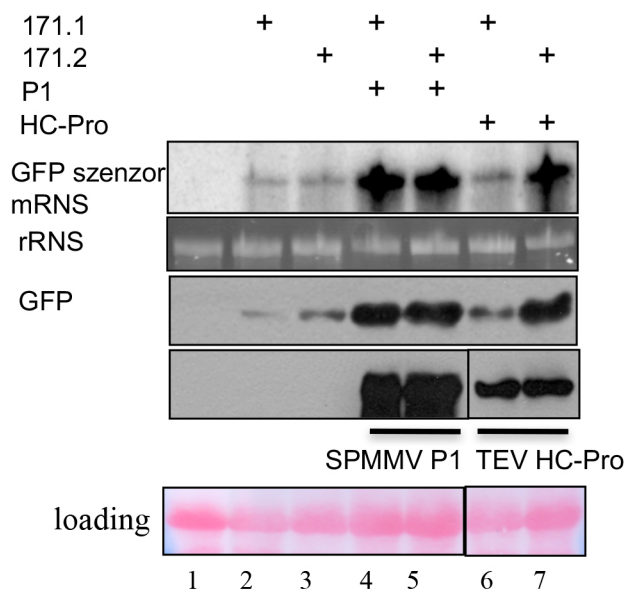
Eredményeink azt mutatták, hogy a SPMMV P1 nem az RNS silencing iniciációs lépésénél hat, ezért megvizsgáltuk azt, hogy képes-e a végrehajtó lépést gátolni. Korábbi munkánk során kidolgoztunk egy módszert, aminek segítségével megvizsgálható, hogy egy adott RNS silencing szupresszor gátolja-e az aktív RISC komplexet (végrehajtó lépés) (Lakatos et al., 2006). A módszer kidolgozásakor azt bizonyítottuk be, hogy a siRNS-kötő RNS silencing szupresszorok nem képesek az aktív RISC komplexet gátolni, tehát pozitív eredményt nem kaptunk.

Az SPMMV P1 aktivitását először a miRNS indukálta rendszerben vizsgáltuk meg. A GFP-171.1 és GFP-171.2 riporter konstrukciókat és a HA tag-gel jelölt SPMMV P1 fehérjét expresszáló *Agrobacterium* törzseket *N. benthamiana* levelekbe infiltráltuk. Kb. 48 órával az infiltrálás után UV fényben megvizsgáltuk a leveleket és mintát vettünk. A mintákban a GFP RNS és fehérje, valamint a P1 és a HC-Pro fehérjék expresszióját vizsgáltuk meg. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a kontrollként használt TEV HC-Pro, a korábbi eredményeinkhez hasonlóan nem gátolta az aktív RISC-et. Azonban a P1 fehérje hatékonyan gátolta az aktív RISC komplexeket, ahogy azt a vizuális, az RNS és a fehérje szintű vizsgálataink egyaránt mutatták (E27. ábra).

A



B



E27. ábra Az SPMMV P1 gátolja a miR171 indukálta RNS silencing-et.

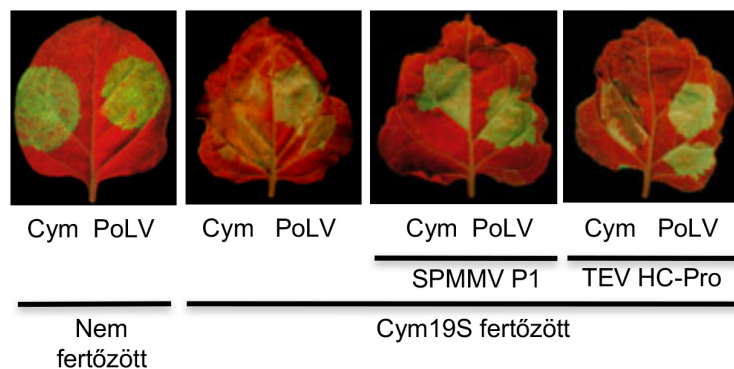
In vivo kísérlet az SPMMV P1 gátló hatásának bemutatására (A). Az *in vivo* kísérlet Northern és Western analízise. Negatív kontrollként TEV HC-Pro-t használtunk (B).

Ebben a kísérletben a Northern bloton a GFP mRNS szintjének emelkedése jelzi a silencing szupresszió bekövetkeztét.

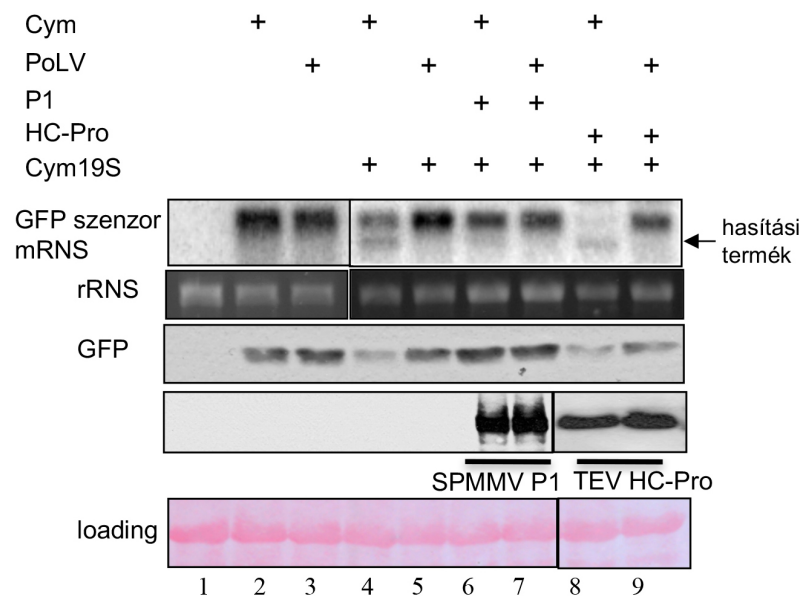
A pozitív eredmény hatására megvizsgáltuk azt is, hogy az SPMMV P1 gátolja-e a virális siRNS-ek által indukált RNS silencing-et. A GFP-Cym és GFP-PoLV riporter konstrukciókat és a HA tag-gel jelölt SPMMV P1 fehérjét expresszáló *Agrobacterium* törzseket olyan *N. benthamiana* növények leveleibe infiltráltuk, amelyek kigyógyuló félben voltak a Cym19stop fertőzésből (14-18 nappal a fertőzés után). Kb. 48 órával az infiltrálás után

UV fényben ellenőriztük a leveleket és mintát vettünk. A mintákban a GFP RNS és fehérje, valamint a P1 és a HC-Pro fehérjék expresszióját vizsgáltuk meg. Eredményeink szerint a TEV HC-Pro nem, de az SPMMV P1 hatékonyan gátolta a virális siRNS-eket tartalmazó aktív RISC komplexek aktivitását (E28. ábra). A riportergének mRNS szintű expresszióját vizsgáló Northern blottokon jól látszik, hogy az virális siRNS indukálta target RNS vágás következtében a GFP mRNS mérete csökken (E28. ábra 4. és 9. oszlop), míg P1 hatására a vágási termék nem alakul ki (E28. ábra 6. oszlop).

A



B



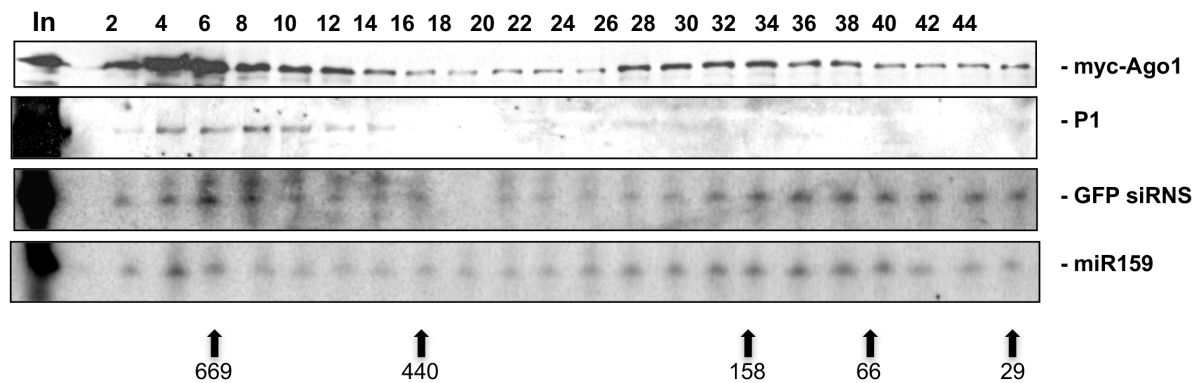
E28.ábra. Az SPMMP1 gátolja a vírus indukálta RNS silencing-et.

In vivo kísérlet az SPMMV P1 gátló hatásának bemutatására (A). Az *in vivo* kísérlet Northern és Western analízise Negatív kontrollként TEV HC-Pro-t használtunk (B).

5.9.5. A virális P1 egy AGO1-kötő fehérje

Mivel eredményeink azt mutatták, hogy az SPMMV P1 gátolja a si- és a miRNS-sel töltött aktív RISC-eket, ezért azt a kérdést tettük fel, hogy a P1 képes-e fizikai kapcsolatba lépni a RISC központi alegységével, az Argonaute 1 (AGO1) fehérjével.

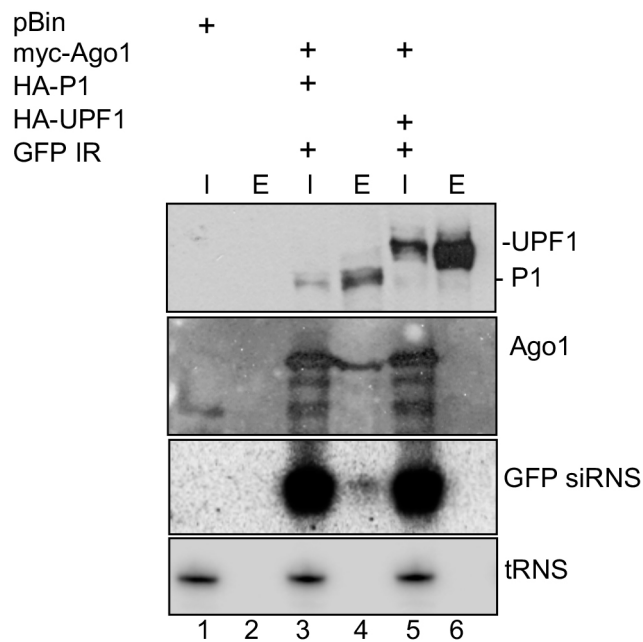
Először azt vizsgáltuk meg, hogy egy méret szerinti elválasztás során az AGO1 és a P1 azonos mérettartományban található-e meg. A kérdés megválaszolására a gélkromatográfiás elválasztás technikát alkalmaztuk. A myc tag-gel jelölt *A. thaliana* AGO1 (6×myc-AGO1) fehérjét (Zhang, Yuan et al., 2006), a HA-P1 fehérjét és a GFP-IR-t expresszáló Agrobacterium törzseket *N. benthamiana* levelekbe infiltráltuk. 72 órával az infiltrálás után mintát vettünk és IP1 pufferben fehérjekivonatot készítettünk, amit Superdex200HR kromatográfiás oszlopon elválasztottunk. A páratlan számú frakciókból fehérjét, a páros számú frakciókból RNS-t izoláltunk. A fehérjék jelenlétét Western-, a GFP-IR-ből származó siRNS-ek jelenlétét 12 %-os denaturáló PAGE gélen való elválasztás után Northern blotolással mutattuk ki. Eredményeink szerint a 6×myc-AGO1 legnagyobb mennyiségben a 669 kDa feletti tartományban volt jelen. Ugyanakkor a 6×myc-AGO1-et a kb. 200 kDa-os mérettartományban is detektáltuk. A HA-P1 fehérjét kizárólag a 669 kDa feletti frakciókban tudtuk kimutatni (E29. ábra). A GFP-IR-ről kialakult siRNS-ek és a miR159 a 6×myc-AGO1 csúcs frakcióiban voltak kimutathatóak. Mindezen eredmények azt mutatják, hogy a 6×myc-AGO1, az endogén AGO1-hez hasonló módon, nagy molekulatömegű komplexeket képezett, ami feltehetően a RISC komplexnek felel meg (Csorba et al., 2010). A GFP siRNS-ek megjelenése a >669 kDa frakciókban azt jelenthette, hogy a GFP-IR-ről keletkezett siRNS-ek beépültek az endogén és/vagy az általunk infiltrált 6×myc-AGO1 fehérjékbe. A kb. 200 kDa mérettartományban a 6×myc-AGO1 feltehetően azért jelent meg, mert a kromatográfiás elválasztás során a >669 kDa RISC komplexek szétestek. Egy másik lehetséges magyarázat szerint a 6×myc-AGO1 olyan nagy mennyiségben termelődött, hogy nagyobb koncentrációban volt jelen, mint azok az endogén fehérjék, amelyek a RISC kialakulásához szükségesek.



E29. ábra. Az SPMMV P1 kofrakcionálódik az AGO1 fehérjével méret szerinti kromatográfiás elválasztás során

Az infiltrált növények leveleiből készített nyers extraktumot Sephadex 200-as oszlopon választottuk szét. Az inputot jelöltük (In). A páros számú frakciókból detektáltuk az AGO1 és P1 fehérjét Western blottolással. A GFP siRNS-t és a miR159-et Northern blottolással mutattuk ki apáratlan számú frakciókból.

A 6×myc-AGO1 és a HA-P1 kofrakcionálódása egy jó indikáció arra, hogy *in vivo* fizikai kapcsolatban vannak egymással. A továbbiakban a két fehérje *in vivo* kapcsolatát immunoprecipitációval vizsgáltuk meg. A 6×myc-AGO1, a HA-P1 fehérjét és a GFP-IR-t expresszáló *Agrobacterium* törzseket *N. benthamiana* levelekbe infiltráltuk. Negatív kontrollként az N-terminális végén HA tag-et tartalmazó UPF1-et együtt infiltráltuk a 6×myc-AGO1 és az GFP-IR-t hordozó *Agrobacterium* törzsekkel (Kertesz, Kerenyi et al., 2006). Infiltrálást követően 72 órával mintát vettünk és IP1 pufferben fehérjekivonatot készítettünk. Immunoprecipitációval izoláltuk a HA-P1 és HA-UPF1 fehérjét, majd megvizsgáltuk az IP-k eluátumainak 6×myc-AGO1 és GFP siRNS tartalmát western és Northern blottolással. Eredményeink azt mutatták, hogy a HA-P1 és HA-UPF1 fehérjét nagy mennyiségben izoláltuk az anti-HA ellenanyaggal E30. ábra 3, 4 és 5, 6 oszlop). Ezzel szemben a 6×myc-AGO1 és a GFP siRNS-eket kizárólag a HA-P1 IP eluátumából mutattuk ki, ami azt bizonyítja, hogy a 6×myc-AGO1 és a HA-P1 fehérjék *in vivo* fizikai kapcsolatban vannak (E30. ábra 4. oszlop).

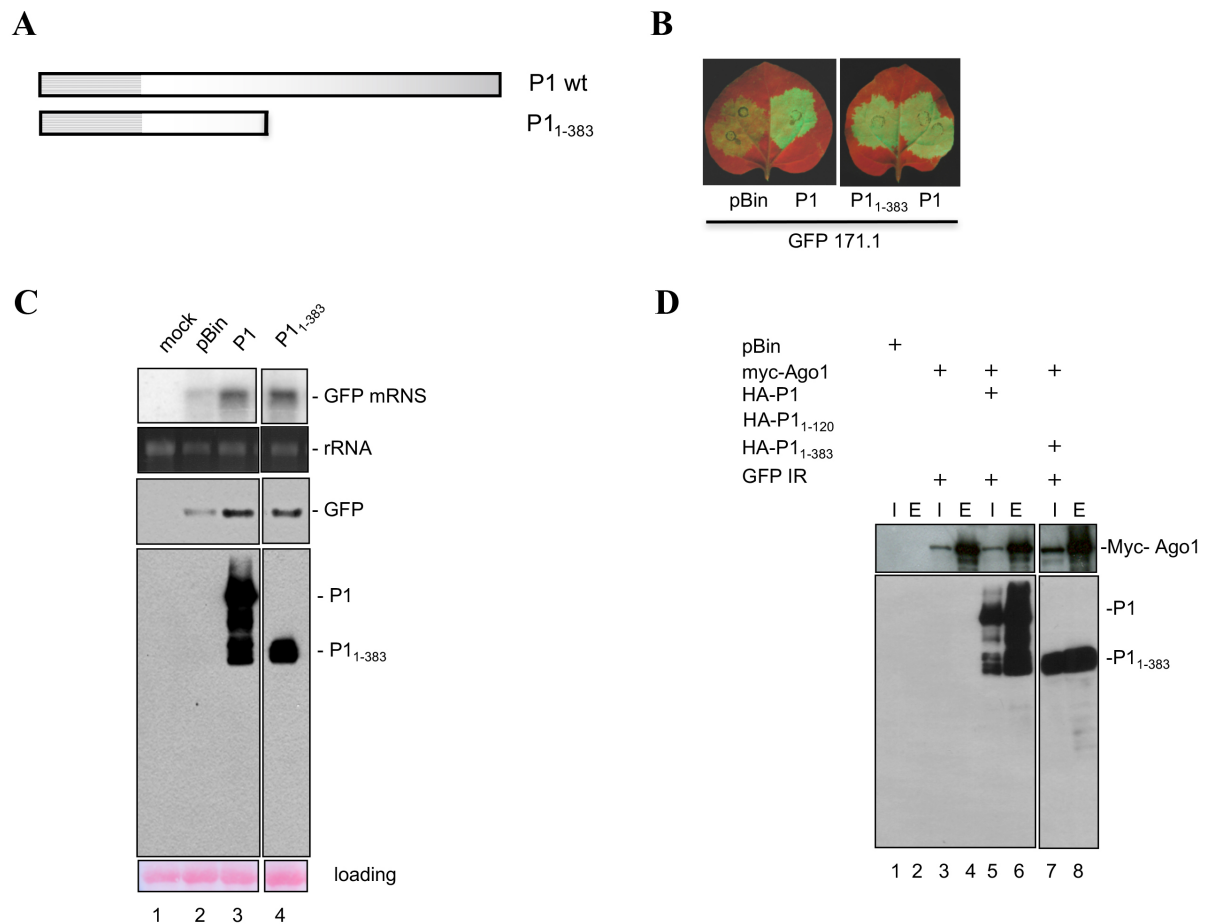


E30. ábra. Az AGO1 és a P1 fizikai kapcsolatban van *in vivo*

A 6×myc-AGO1-et és a HA-P1-et, valamint a HA-UPF1-et és a 6×myc-AGO1-et GFP-IR-rel infiltráltuk. HA IP-t végeztünk, majd az inputokból és az eluátumokból a fehérjéket Western, a GFP siRNS-eket Northern blotolással mutattuk ki. Az IP kontroljaként a tRNS-t használtuk.

5.9.6. A P1 N-terminális 383 aminosavas régiója tartalmazza az RNS silencingért felelős domént

A P1 C-terminális régiójában a *Potyvirus*-okra jellemző proteáz domén található. Az SPMMV P1 N-terminális régiója tartalmaz egy hosszú N-terminális részt az "átlag" *Potyvirus* P1 fehérjéjéhez képest. Célul tűztük ki az RNS silencing-ért felelős domén azonosítását. A kérdés megválaszolására a korábban is használt, a P1 első 383 aminosavát tartalmazó konstrukciót (E21. ábra A) együtt infiltráltuk a GFP-171.1-et tartalmazó *Agrobacterium* törzsszel *N. benthamiana* levelekbe. Kontrollként a teljes hosszúságú P1 konstrukciót használtuk. Az infiltrálás eredménye azt mutatta, hogy a P1₁₋₃₈₃ a teljes hosszúságú P1 fehérjével azonos erősségű RNS silencing szupresszor aktivitással rendelkezik (E31. ábra B és C). Továbbá koimmunoprecipitációs kísérletünk alapján a P1₁₋₃₈₃ a P1-hez hasonlóan kötődik az *A. thaliana* AGO1 fehérjéhez (E31. ábra D). Eredményeink szerint az RNS silencing szupresszor domén a P1 fehérje N-terminális régiójában található.



E31. ábra. A P1₁₋₃₈₃ csonkolt mutáns jellemzése

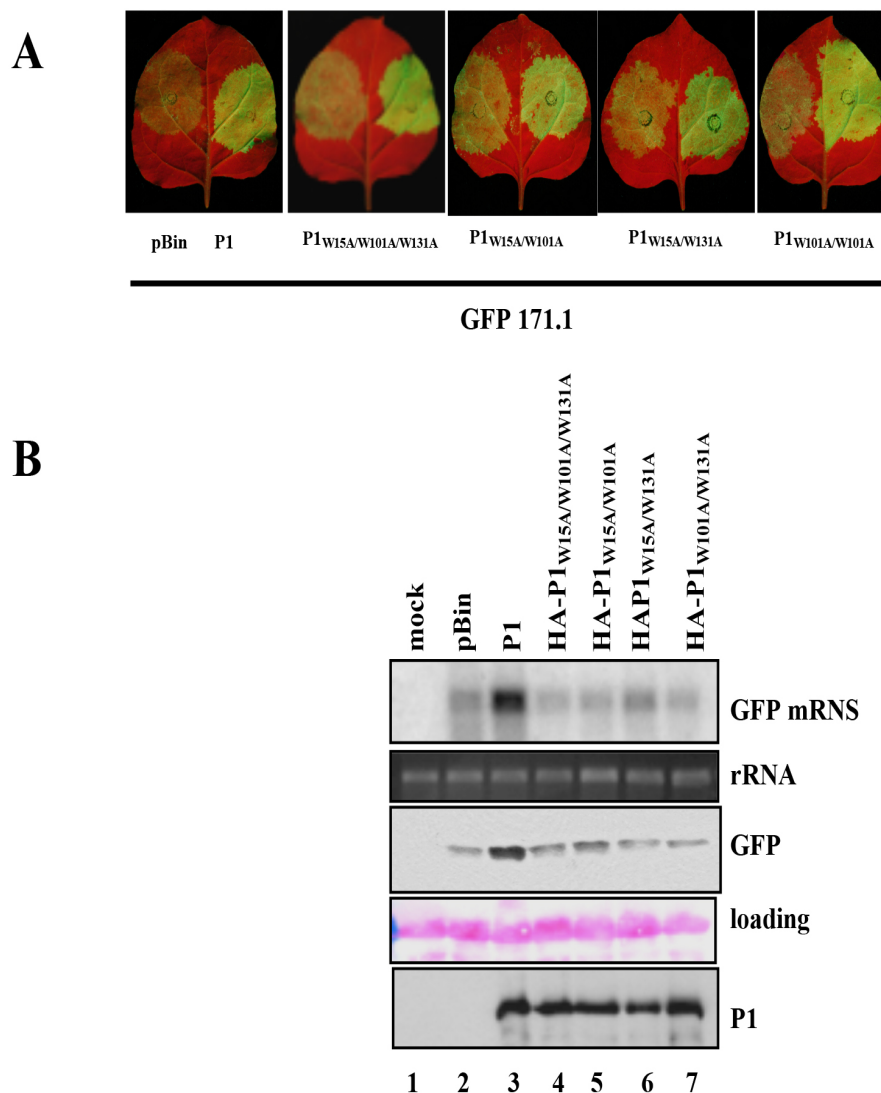
A P1 és a P1₁₋₃₈₃ sematikus ábrázolása (A). A P1₁₋₃₈₃ csonkolt mutáns *in vivo* vizsgálata (B). Az *in vivo* vizsgálat Northern és Western analízise (C). A P1₁₋₃₈₃ mutáns hasonló erősséggel köti az AGO1-t, mint a P1 wt (D).

5.9.7. Az SPMNV P1 egy virális WG/GW fehérje

A P1 N-terminális RNS silencing szupresszor doménjét tovább vizsgálva 3 WG/GW doménhez hasonló régiót azonosítottunk. Ilyen WG/GW doméneket tartalmazó fehérjéket találtak a *Schizosaccharomyces pombe*-ben, *A. thaliana*-ban és emlősökben is (El-Shami et al., 2007, Till et al., 2007). Közös jellemzőjük, hogy a WG/GW doméneken keresztül képesek különböző AGO fehérjék kötésére. Az *A. thaliana* NRPD1b (RNS polimeráz IV alegysége) protein például megköti az AGO4-et és a transzkripcionális silencing kialakításában játszik szerepet (Eamens, Vaistij et al., 2008). A humán GW182 fehérje a miRNS silencing-ben játszik fontos szerepet (Pfaff & Meister, 2013). A WG/GW fehérjék másik közös jellemzője, hogy pozitív hatással vannak az RNS silencing-re.

Ezen korábbi megfigyelések hatására azt a kérdést tettük fel, vajon a P1 is a WG/GW doméneken keresztül kapcsolódik-e az AGO1-hez. A P1 N-terminális doménjében a W15,

W101 és W131 aminosavakról feltételeztük, hogy WG/GW domének kialakításában vesznek részt.



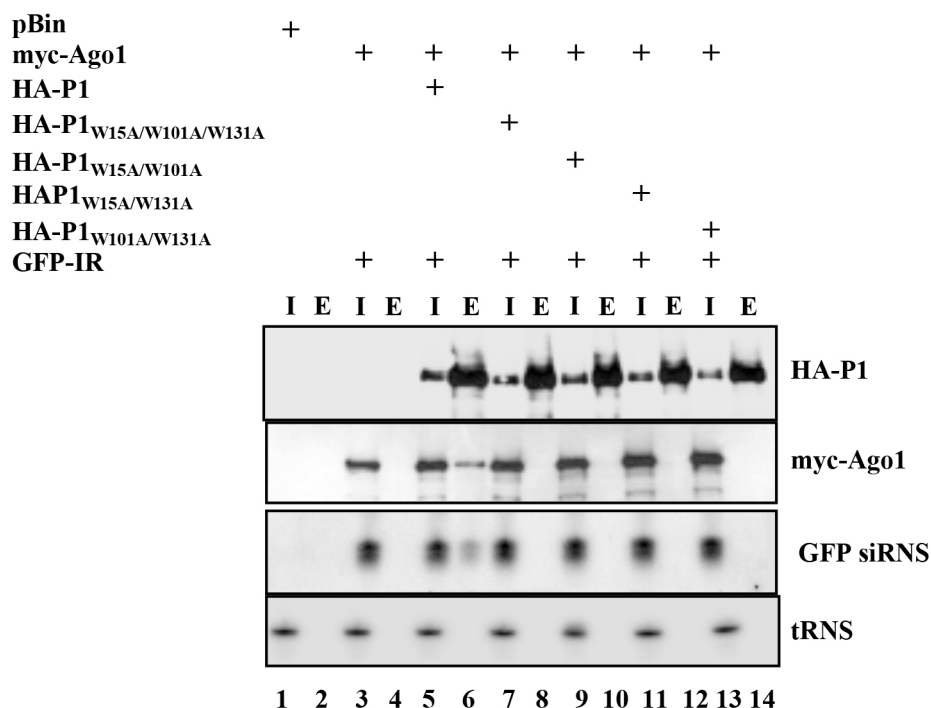
E32. ábra. Az SPMMV P1 kettős és hármas W→A mutánsainak vizsgálata

A mutánsok silencing szuppressziós képességének vizsgálata *in vivo*. A levelek jobb felébe rendre az SPMMV P1-et, míg a bal oldalra a vizsgálandó mutánst infiltráltuk (A). Az *in vivo* eredmények molekuláris szintű elemzése. A GFP mRNS-t Nortern, a GFP és a P1 fehérjék expresszióját Western blotolással detektáltuk (B).

Ennek érdekében irányított mutagenézissel egyenként kicseréltük a WG/GW domének triptofán (W) aminosavait alaninra (A), azonban ezek a mutánsok továbbra is silencing szupresszor aktivitással bírtak (ábra nem mutatja). Majd elkészítettük a dupla mutánsokat az összes kombinációban és a tripla mutánst is. A HA-P1_{W15A/W101A/W131A}, a HA-P1_{W15A/W101A}, a HA-P1_{W101A/W131A} és a HA-P1_{W15A/W131A} mutánsokat együtt infiltráltuk a GFP-171.1 konstrukciót tartalmazó *Agrobacterium* törzzsel *N. benthamiana* leveleibe. Kontrollként vad típusú P1 fehérjét használtunk. Az infiltrált levelek vizuális vizsgálata azt mutatta, hogy

sem a kettős mutánsok, sem a hármas mutáns nem gátolták az RNS silencinget, mivel a mutánsok jelenlétében a GFP fluoreszcencia jóval alacsonyabb szintű volt, mint a vad típus esetében (E32. ábra A). Továbbá ezt támasztják alá RNS és fehérjeszintű vizsgálataink is (E32. ábra B). Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy bármelyik két WG/GW doménben lévő triptofán cseréje alaninra a szupresszor aktivitás elvesztésével jár.

Mivel az SPMNV P1 AGO-kötő aktivitással rendelkezik *in vivo*, ezért megvizsgáltuk, hogy az AGO kötés összefügg-e a silencing szupresszor aktivitással. Ennek a kérdésnek a megválaszolására a vad típusú, a dupla és tripla mutáns P1-eket, a GFP-IR-rel és 6×myc-AGO1-gyel infiltráltuk együtt *N. benthamiana* GFP16c/RDR6i vonal leveleibe. A *N. benthamiana* GFP16c/RDR6i vonalban a másodlagos siRNS képződés az RDR6 gén csendesítése miatt szinte elhanyagolható mértékben következik be (Schwach, Vaistij et al., 2005). 72 órával az infiltrálás után a levelekből IP1 pufferben fehérjekivonatot készítettünk és anti-HA ellenanyaggal immobilizáltuk a HA-tag-gel jelölt P1 fehérjéket. Az IP eluátumaiban megvizsgáltuk a 6×myc-AGO1 és a GFP siRNS-ek jelenlétét is. Azt tapasztaltuk, hogy mind a 6×myc-AGO1, mind a GFP siRNS csak a P1_{W15A/W101A/W131A} IP-eluátumából volt kimutatható (E33. ábra 6. oszlop). Sem a dupla, sem a tripla W → A mutánsok nem mutattak AGO1-kötő képességet.



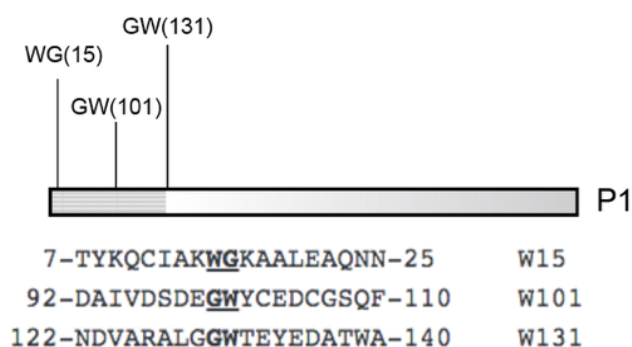
E33. ábra. Kizárólag a HA-P1wt rendelkezik AGO1 kötő képességgel.

Az adott konstrukció kombinációkat *N. benthamia*-ba infiltráltuk, majd IP után a P1, AGO1 fehérjéket Western bolttolással, a GFP siRNS-eket Northern bolttolással detektáltuk. tRNS-t használtunk IP kontrollként.

Eredményeinket összefoglalva megállapítottuk, hogy az SPMMV P1 egy WG/GW domén fehérje, amelyben a WG/GW domének fontos szerepet játszanak az aktivitásban és az AGO kötés kialakításában. Azonban a virális SPMMV P1 a celluláris WG/GW fehérjékkel ellentétben negatív hatással van az RNS silencingre.

5.9.8. A legrövidebb funkcionális SPMMV P1 fehérje azonosítása

Az SPMMV P1 egy 759 aminosav hosszúságú fehérje. Az AGO1 kötésben és a silencing szupresszor aktivitásban esszenciális WG/GW domének a fehérje N-terminálisán helyezkednek el (E34. ábra) (Giner et al., 2010).

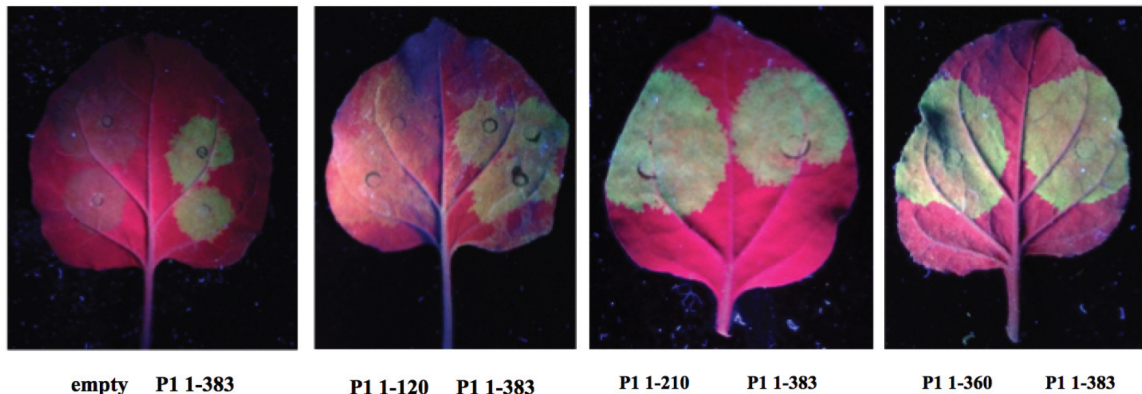


E34. ábra. Az SPMMV P1 WG/GW doménjeinek elhelyezkedése az környezete

A triptofán (W) pozícióit számmal jelöltük a WG/GW domének összehasonlításakor.

Azóta azonosítottunk egy cink-ujj motívumot is a 88-106. aminosavig tartó régióban, ami szintén elengedhetetlen a silencing szupresszor aktivitás szempontjából (Lakatos, nem közölt eredmény). A 759 aminosav hosszúságú fehérje mellett azonosítottunk egy 383 aminosavas fehérjét, ami a P1 N-terminális részét tartalmazza. Ez a C-terminálisáról csonkolt P1 fehérje a wt P1-hez hasonló silencing szupresszor aktivitással és AGO1-kötő képességgel rendelkezik (Giner et al., 2010). Mivel a P1 aktivitásához szükséges domének a fehérje első 131 aminosavas régiójában helyezkednek el, ezért azt a kérdést tettük fel, hogy melyik az a legrövidebb P1 N-terminális szakasz, amely a wt P1-hez hasonló tulajdonságokkal rendelkezik. Ennek megfelelően elkészítettük a P1 fehérje N-terminálisának 120, 210, 305 és 360 aminosav hosszúságú változatait. A 120 aminosavas változat nem tartalmazza az utolsó, 131. pozícióban lévő WG/GW domént. Ezeket a különböző hosszúságú kódoló régiókat a pSany1 növényi expressziós vektorba klónoztuk, amelyben a képződő fehérjéket N-terminális HA-taggal láttuk el. Majd elvégeztük a különböző hosszúságú P1 fehérjék funkcionális

vizsgálatát. A P1₁₋₁₂₀, P1₁₋₂₁₀, P1₁₋₃₀₅ és a P1₁₋₃₆₀ tartalmazó Agrobacterium törzseket a GFP-171.1 riportergénnel infiltráltuk *N. benthamiana* növényekbe. Kontrollként a P1₁₋₃₈₃ konstrukciót alkalmaztuk (Giner et al., 2010). 48 óra elteltével UV fényben megvizsgáltuk a különböző változatok silencing szupresszor aktivitását. Eredményeink szerint a P1₁₋₁₂₀ fehérje kivételével mindegyik rövidített változat gátolta az RNS silencinget (E35. ábra).



E35. ábra. A P1₁₋₂₁₀ a legrövidebb silencing szupresszor tulajdonsággal rendelkező P1 változat

A különböző P1 változatokat a GFP-171.1 riportergénnel infiltráltuk. A silencing szupresszor aktivitást UV fényben detektáltuk.

Továbbá azt is megállapítottuk, hogy a P1 fehérje 210 aminosavas változata a legrövidebb RNS silencing szupresszor tulajdonsággal rendelkező P1 változat (Szabo EZ, 2014).

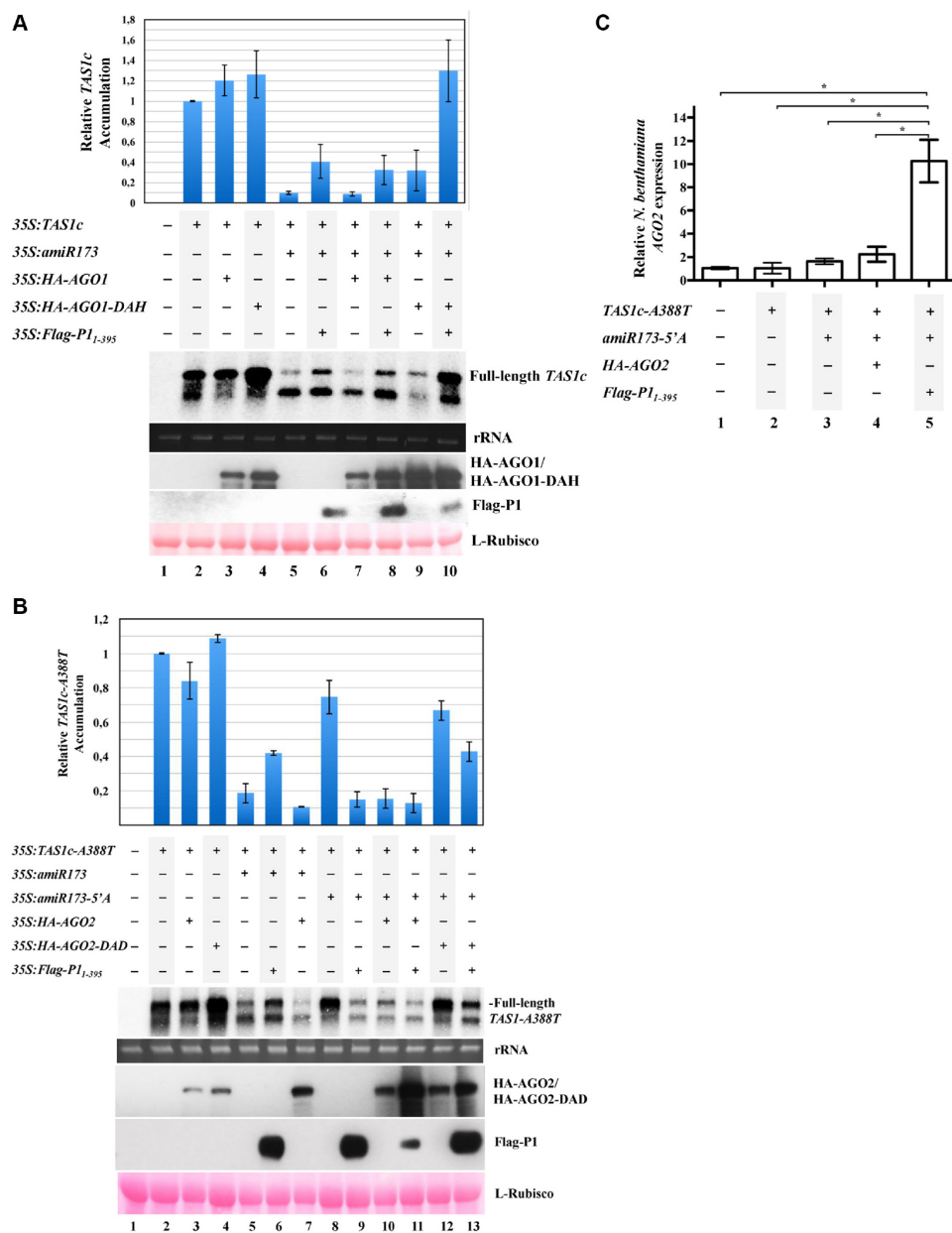
5. 10. Az SPMNV P1 működési mechanizmusa

5.10.1. A P1 fehérje specificitásának vizsgálata

Korábbi kísérleteink eredménye azt mutatta, hogy az SPMNV P1 gátolja az AGO aktivitást és képes az AGO1 fehérjéhez kötődni {Giner, 2010 #1508}. Azonban nem rendelkezünk információval arról, hogy a P1 melyik AGO fehérjére hat. Ezért megvizsgáltuk a P1 hatását az antivirális RNS silencingben fontos szerepet játszó AGO1 és AGO2 fehérjékre *in vivo*, a Carbonell és mtsai (2012) által kidolgozott módszert adaptálva. Ennek érdekében az adott AGO fehérjét és a neki megfelelő mesterséges miRNS-t és annak target RNS-ét, valamint az SPMNV P1-et agroinfiltrációval *N. benthamianában* expresszáltattuk majd Northern

blottolással vizsgáltuk meg az intakt target RNS mennyiségét. Kísérleteinkben az AGO aktivitás fordítottan arányos az intakt target RNS mennyiségével.

Először a P1 AGO1-re való hatását vizsgáltuk meg, kihasználva azt, hogy a miR173 miRNS szinte kizárólag az AGO1-be épül be. Ebben a rendszerben a miR173 a TAS1c target RNS vágását eredményezi, ami az endogén AGO1 aktivitásra utal (vö. E36. ábra A, 2-4. és 5. oszlop). A miR173/TAS1c és az *A. thaliana* AGO1 fehérjét expresszáltatva az AGO1 aktivitás kis mértékben megemelkedett (E36. ábra A, 7. oszlop). Amennyiben miR173/TAS1c/(AGO1) mellett a P1 fehérjét is expresszáltattuk, az AGO1 aktivitás csökkent (E36. ábra. A, vö. 5. és 6., 7. és 8. oszlop). Ez az eredmény arra utal, hogy az SPMMV P1 gátolja az AGO1 aktivitását *in vivo*. Az ún. AGO1-DAH mutánsban a katalitikus centrumban



E36. ábra. A P1 *in vivo* jellemzése.

AGO1 aktivitás mérése *in vivo* (A). AGO2 aktivitás mérése *in vivo* (B). A relatív aktivitást a 2. oszlopra vonatkoztatva adtuk meg (A és B). A P1 indukálja az endogén AGO2 mRNS szintjét. Az eredményeket kétutas ANOVA analízissel vizsgáltuk $p < 0,05$ esetében (C). **(A, B és C) A levelekbe infiltrált konstrukció kombinációkat megadtuk (A, B és C. RNS kontrollként a 28S riboszómális RNS szintjét, míg a Western blotolás kontrolljának az L-Rubiscót használtuk (A és B).**

lévő három aminosavból (DDH) a második aszparaginsav (D) alaninra (A) való cseréje a katalitikus aktivitás elvesztését eredményezi (Carbonell et al., 2012). Az AGO1-DAH expresszáltatása kis mértékben megnövelte a TAS1c mennyiségét, valószínűleg azért, mert a miR173 megkötésével lecsökkentette az endogén AGO1 számára hozzáférhető miR173 mennyiségét. Azonban, a miR173/TAS1c/AGO1-DAH/P1 expresszáltatása során a target RNS mennyisége jelentős mértékben megnőtt, ami az AGO1-DAH és a P1 együttes hatásának tulajdonítható (E36. ábra. A, vö. 9. és 10. oszlop).

Ezután az AGO2 aktivitást vizsgáltuk meg az SPMMV P1 jelenlétében. Az AGO2 aktivitásának méréséhez az un. miR173-5'A miRNS-t használtuk. A miR173-5'A 5' végén adenin helyett timin található, ami az érett miRNS beépülését az AGO1 helyett az AGO2 fehérjébe irányítja (Carbonell et al., 2012), ami lehetővé teszi a specifikus AGO2 aktivitás mérését. A miR173-5'A/TAS1c-A388T expresszáltatása során nem mértünk AGO2 specifikus aktivitást (E36. ábra. B, 8. oszlop), azonban a miR173-5'A/TAS1c-A388T/AGO2 mintában erős AGO2 aktivitást mértünk (E36. ábra, 10. oszlop). AGO2 infiltrálás nélkül, de P1 jelenlétében is megmértük az AGO2 aktivitást, és meglepő módon azt tapasztaltuk, hogy a P1 nem gátolja, hanem inkább felerősíti az AGO2 aktivitást (E36. ábra, 9. oszlop). Az AGO2 aktivitás mértékének növekedését detektáltuk az AGO2 és a P1 együttes expresszáltatása során. (E36. ábra. B, vö. 11. és 9.; 11. és 10. oszlop). A katalitikus aktivitással nem rendelkező AGO2-DAD mutáns expresszáltatása során mi sem tapasztaltunk AGO2 aktivitást (Carbonell et al., 2012), míg a miR173-5'-A/TAS1c-5'A388T/AGO2-DAD/P1 jelenlétében viszonylag gyenge AGO2 aktivitást detektáltunk (E36. ábra. B, 11. és 12. oszlop), mivel AGO2-DAD is rendelkezik bizonyos mértékű target RNS stabilizációs képességgel (Carbonell et al., 2012).

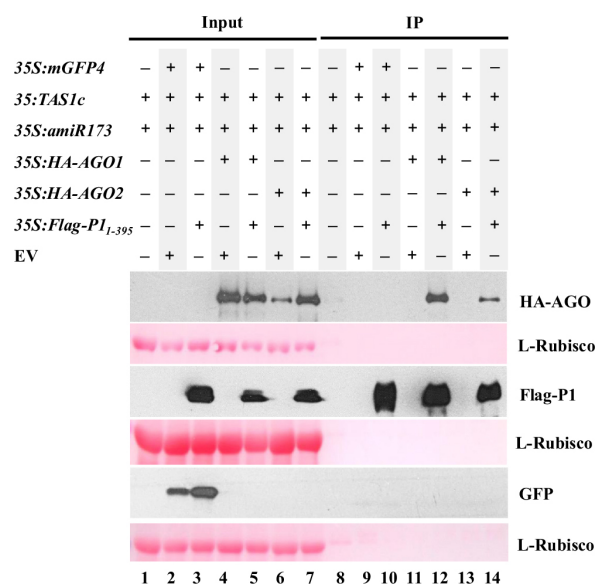
A P1 hatására bekövetkező AGO2 aktivitás növekedés felveti azt a kérdést, hogy az AGO2 mRNS szintjében bekövetkezik-e változás. A kérdés megválaszolására qRT-PCR vizsgálatot végeztünk. MiR173-5'A, miR173-5'A/TAS1c-A388T, miR173-5'A/TAS1c-A388T/AGO2 és miR173-5'A/TAS1c-A388T/P1 kombinációkat infiltráltuk *N. benthamiana*

levelekbe, majd az endogén AGO2 mRNS relatív mennyiséget mértük. Eredményeink azt mutatták, hogy a P1 jelenlétében kb. 10-szeresére emelkedik az AGO2 mRNS szintje a többi mintához képest, míg az 1., 2., 3. és 4. minta eredménye között nincs szignifikáns különbség (E36. ábra C).

Eredményeink azt mutatják, hogy az SPMMV P1 hatékonyan gátolja az AGO1 aktivitását. Ezzel szemben, a P1 jelentős AGO2 aktivitást indukál, ami szignifikáns AGO2 mRNS szint emelkedéssel jár együtt.

Korábbi eredményeink azt mutatták, hogy az SPMMV P1 fehérjében található un. WG/GW domének elengedhetetlenül szükségesek a silencing szupresszor aktivitáshoz és az AGO1 kötéshez {Giner, 2010 #1508}. Azonban a P1 nem gátolta az AGO2 aktivitást, amiből arra következtettünk, hogy a P1 feltehetőleg nem képes az AGO2 fehérjével kapcsolatba lépni.

A feltételezésünk ellenőrzésére az AGO2 és a P1 fehérjéket *N. benthamiánában* expresszáltattuk, majd az SPMMV P1 fehérjét immunoprecipitáltuk. A pozitív kontrollként használt AGO1-et detektáltuk a P1 IP elúciójában, míg a negatív kontrollként használt GFP fehérjét nem. Az AGO2 fehérje detektálása az P1 IP elúciójában azt jelenti, hogy feltehetően a P1 a WG/GW doménjein keresztül kötődik az AGO2 fehérjéhez is {Giner, 2010 #1508}, azonban aktivitását nem gátolja (E37. ábra).



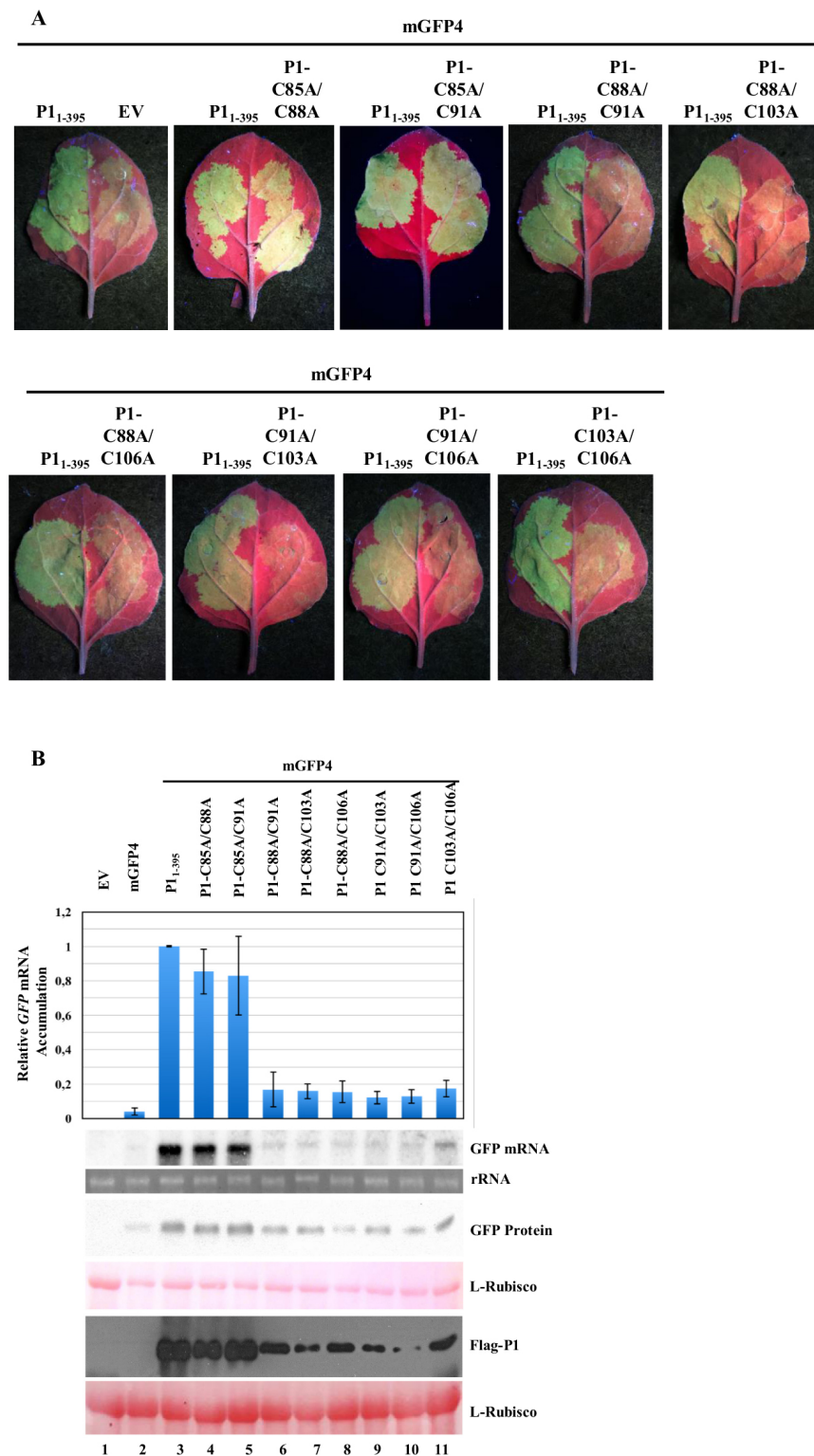
E37. ábra. Az AGO2 fizikai kapcsolatba lép az SPMMV P1-gyel.

A tranziens módon termeltetett fehérjék és RNS-eket az inputban és az immunoprecipitációban (IP) jelöltük. Western blottolás kontrolljának az L-Rubiscót használtuk.

5.10.2. A cink finger domén szerepe a P1 működésében

Az SPMMV P1-ben egy C4 típusú cink finger motívumot azonosítottak a fehérje 88., 91., 103. és 106. pozíciójában, ami hasonló pozícióban található meg az édesburgonyát fertőző *Potyvirus*-okban {Li, 2012 #2143}. Az általunk használt SPMMV P1 fehérjében ezen kívül a 85. pozícióban is található egy nem konzerválódott Cys aminosav is.

Munkánk során megvizsgáltuk a cink finger motívum lehetséges szerepét a P1 silencing szuppresszor aktivitásában. Helyspecifikus mutagenezissel a 88., 91., 103. és 106. és a nem konzerválódott 85. pozícióban lévő cisztein aminosavakat egymástól függetlenül alaninra cseréltük. Az egyszeres Cys-Ala mutánsok vizsgálata alapján megállapítottunk, hogy a mutánsok silencing szuppresszor aktivitása elhanyagolható mértékben alacsonyabb, mint amit a vad típus esetében mértünk {Kenesi, 2017 #2301}. Ezután létrehoztunk a konzervált Cys aminosavakat érintő hat dupla mutánst, (P1-C88A/C91A, P1-C88A/C103A, P1-C88A/C106A, P1-C91A/C103A, P1-C91A/C106A és P1-C103A/C106A) és a nem konzervált Cys85 is érintő további két duplamutánst is (P1-C85A/C88A és P1-C85A/C91A). A GFP marker génnel végzett koinfiltrációs teszt eredménye szerint a



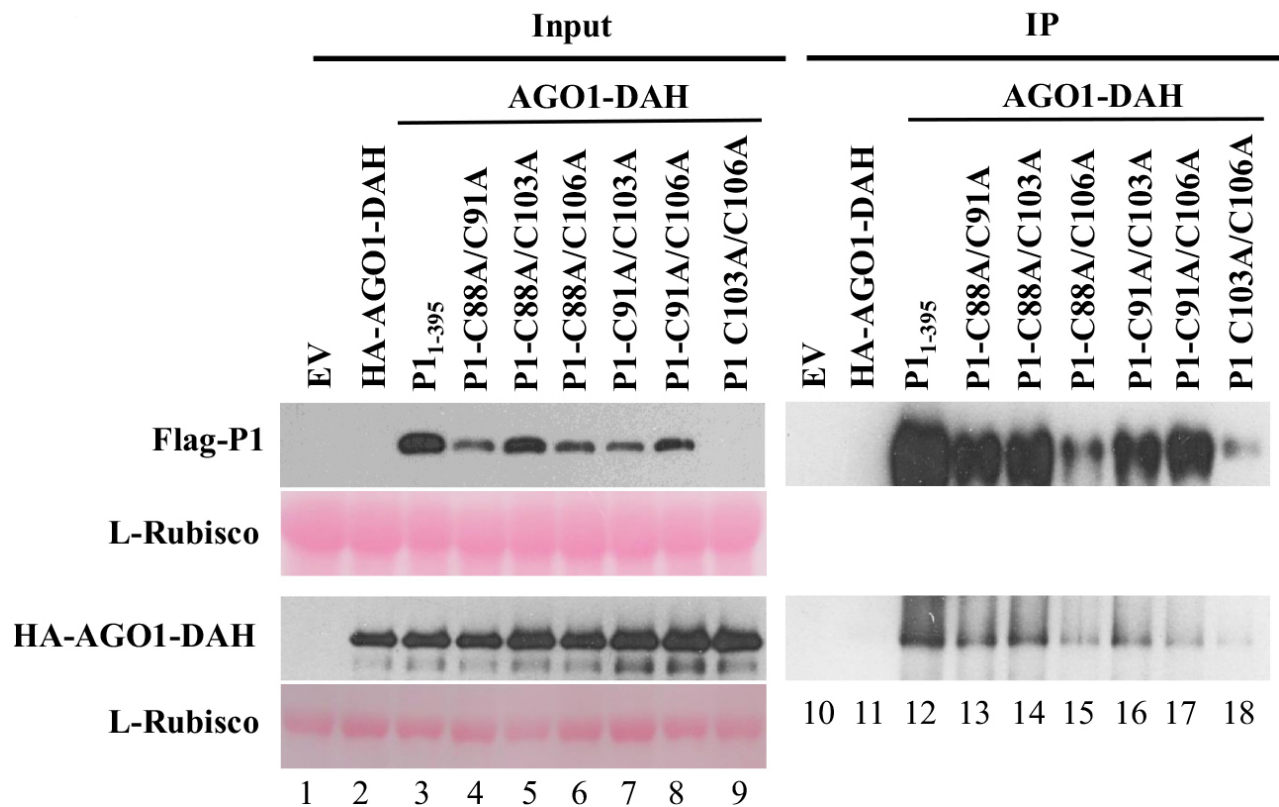
E38. ábra. A P1 dupla Cys mutánsok vizsgálata.

A mutánsok silencing szupresszor aktivitásának vizsgálata *in vivo* (A). Az (A) panelen látható minták Northern és Western analízise. Az rRNS-t és az L-Rubiscót használtuk Northern és Western kontrollként. A relatív mGFP4 mRNS expressziót a 3. oszlopra vonatkoztatva adtuk meg (B).

feltételezett cink fingerben lévő bármelyik két Cys cseréje a silencing szupresszor funkció elvesztésével jár. Ezzel szemben a P1-C85A/C88A és P1-C85A/C91A mutánsok a P1-C88A és P1-C91A egyszeres mutánsokhoz hasonló aktivitást mutattak annak ellenére, hogy a C85A mutációt is hordozták. Az *in vivo* eredményeket molekuláris analízissel is alátámasztottuk. Mindezekből arra következtettünk, hogy a C85 nem vesz részt a cink finger motívum kialakításában (E38. ábra)

5.10.3. A P1 fehérjébe a silencing szupresszor és az AGO1 kötésért felelős régiók különböző doméneken találhatók

Korábbi eredményeink azt mutatták, hogy az SPMMV P1 három WG/GW doménből bármelyik kettő mutációja megszüntette az AGO1 kötést és a silencing szupresszor aktivitást is {Giner, 2010 #1508}. Ezért megvizsgáltuk, hogy a dupla Cys-Ala mutánsok, amelyek nem mutatnak silencing szupresszor aktivitást, rendelkeznek-e AGO1 kötő képességgel. Agrobaktérium mediálta tranziens expresszióval termeltettük a P1 vad típusú és a cink finger motívumban két Cys-Ala mutációt hordozó mutánsokat és a HA-AGO1-DAH mutánst. Immunoprecipitáltuk a P1 fehérjét és az eluátumokban az AGO1-DAH és a P1 fehérjét detektáltuk. Eredményeink azt mutatják, hogy az input frakciókból az összes fehérje kimutatható a P1-C103A/C106A kivételével. A P1 vad típus és mutáns fehérjék AGO1-DAH kötő képessége kb. azonos volt, mivel az AGO1-DAH mennyisége korrelált az immunoprecipitált P1 mennyiségével (E39. ábra).



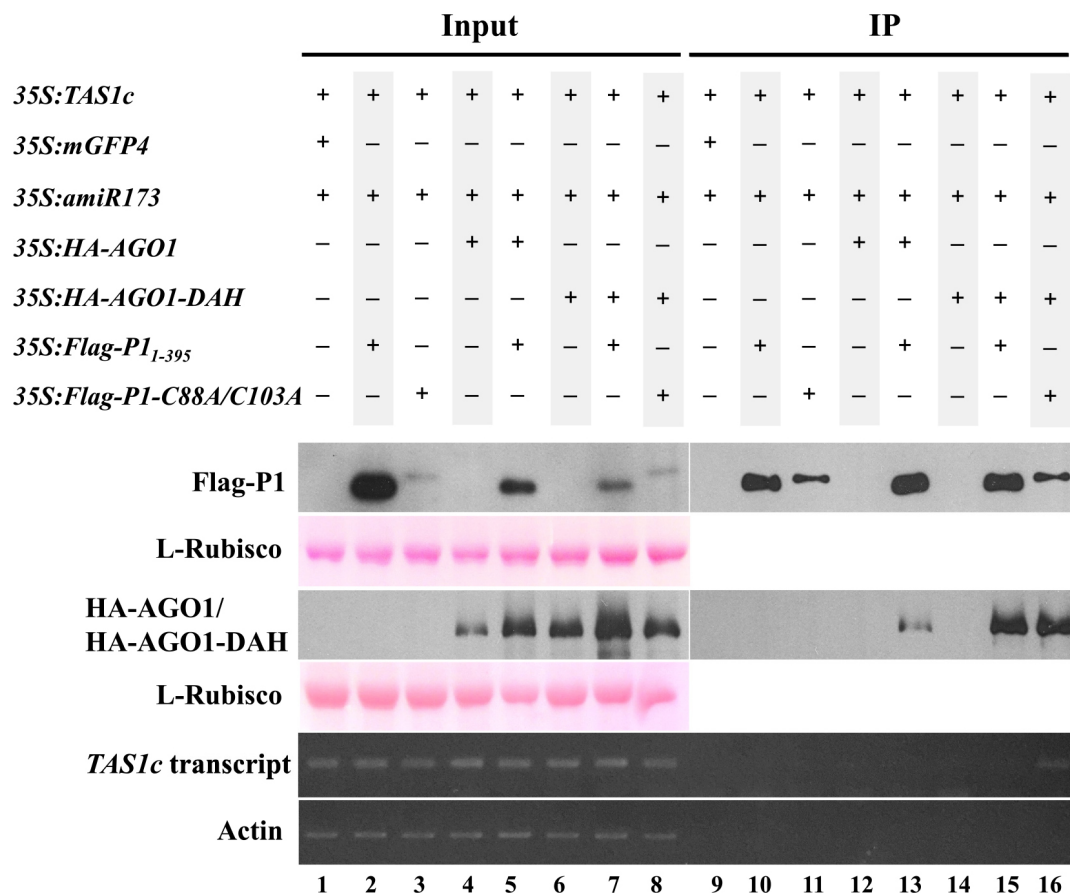
E39. ábra. A dupla Cys-Ala P1 mutánsok hasonló erősséggel kötik az AGO1-et.

Az expresszált konstrukciókat feltüntettük. EV: üres vector, Ponceau festést használtunk a Western blotolás loading kontrolljának (L-Rubisco).

Eredményeinkből azt is következik, hogy mivel a P1 Cys-Ala duplamutánsok nem rendelkeznek szupresszor aktivitással, de AGO1 kötő képességgel igen, ezért az AGO1 kötő és a szupresszor aktivitásért felelős régiók a P1 más-más részein helyezkednek el. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a P1 cink finger doménje un efektor doménként is funkcionál.

5.10.4. Az SPMMV P1 meggátolja az AGO1/kis RNS komplex target RNS kötését

Korábbi eredményeink szerint az SPMMV P1 a si- és a miRNS-sel töltött AGO komplexek aktivitását gátolja, azonban a pontos hatásmechanizmusra ezekből a kísérletekből nem lehetett következtetni.



E40. ábra. A P1 nem engedi atarget RNS kapcsolódását az AGO1-sRNS komplexhez.

Az input frakcióban az azonos kiindulási fehérje mennyiséget az L- Rucisco- val mutattuk be. Az RT-PCR kontrolljaként az aktin mRNS-t használtuk.

Az a kérdés fogalmazódott meg bennünk, hogy vajon az SPMMV P1 az AGO1 aktivitást úgy gátolja-e meg, hogy a P1 jelenlétében az AGO1/sRNS bináris komplex nem képes megkötni a target RNS-t. Ezt a kérdést egy, az agroinfiltráció és az RNS immunoprecipitáció (RNAIP) alapuló módszerrel válaszoltuk meg. *N. benthamiana* levelekbe infiltráltuk a TAS1c, miR173, mGFP4, HA-AGO1, HA-AGO1-DAH, Flag-P1₁₋₃₉₅ és a P1-C88A/C103A konstrukciókat hordozó agrobaktérium törzseket különböző kombinációkban, majd a leveleket formaldehiddel fixáltuk extraktum készítés előtt, az extraktumokból a Flag-P1₁₋₃₉₅ és a P1-C88A/C103A fehérjéket immunoprecipitáltuk. A mintákból a fehérjéket Western blotolással, a TAS1c mRNS-t RT-PCR-rel mutattuk ki.

A input frakciókban a fehérjéket az adott kombinációnak megfelelő módon detektáltuk (E40. ábra, 1-8. oszlop). TAS1c transzkriptumot nem detektáltunk a TAS1c/amiR173/mGFP4 mintában, így kizártuk a TAS1c RNS nem-specifikus kötődését az antitesthez és hordozójához (E40. ábra, 9. oszlop). A Flag-P1₁₋₃₉₅ és a P1-C88A/C103A fehérjéket detektáltuk, de a TAS1c

RNS-t nem az amiR173/TAS1c/Flag-P1₁₋₃₉₅ és a TAS1c/miR173/P1-C88A/C103A mintákban, ami azt jelenti, hogy sem a Flag-P1₁₋₃₉₅ sem a P1-C88A/C103A nem köti a TAS1c RNS-t (E40. ábra, 10. és 11. oszlop). Várakozásunknak megfelelően a Flag-P1₁₋₃₉₅ hiányában sem AGO1, sem AGO1-DAH fehérjét nem tudtunk kimutatni a amiR173/TAS1c/AGO1 sem a amiR173/TAS1c/AGO1-DAH minták Flag-IP frakcióiból (E40. ábra, 12. és 14. oszlop). Hipotézisünknek megfelelően a TAS1c RNS nem volt kimutatható az amiR173/TAS1c/AGO1/Flag-P1₁₋₃₉₅ minta IP frakciójából (E40. ábra, 13. oszlop). Az AGO1-DAH katalitikusan inaktív mutáns stabilizálja (megköti) a TAS1c mRNS-t (Carbonell et al., 2012), azonban, ha a P1-gyel alkot komplexet, akkor az IP frakcióban nem tudtunk TAS1c RNS-t kimutatni. Ez az eredmény arra utal, hogy a P1 meggátolja a target RNS kötődését (E40. ábra, 15. oszlop). Ezzel szemben, a TAS1c RNS detektálható volt az amiR173/TAS1c/AGO1-DAH/P1-C88A/C103A minta IP frakciójában (E40. ábra, 16. oszlop). Mivel a P1-C88A/C103A mutáns megköti az AGO1-DAH fehérjét, azonban ez a komplex nem tartalmazza a target RNS-t egyértelműen arra utal, hogy a cink finger domén effektor doménként funkcionál.

5.11. Virális WG/GW fehérjék azonosítása és vizsgálata

Az SPMMV P1 fehérje egyedi mechanizmussal rendelkező RNS silencing szupresszor. Továbbá a P1 egy, a celluláris WG/GW fehérjékhez hasonló doméneken keresztül kapcsolódik az AGO1 fehérjéhez. Valli és mtsai (2007) bioinformatikai analízissel azonosították az SPMMV P1-hez legnagyobb homológiát mutató fehérjét. A *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) P1 fehérjéje hasonló N-terminális extenzióval bír, mint az SPMMV P1, azonban csak egy WG/GW domén található benne (E41. ábra).

19-KECCNKWGKAAMEQQ-33

107-D---GHKCDSCGH-116

131-DIARALGGYDAYCAS-145 SPFMV

9-KQCIAGWGKAALAEAQ-23

96-DSDEGWYCEDCGS-108

123-DVARALGGWTEYEDA-137 SPMMV

E41. ábra Az SPMMV P1 WG/GW doménjei és környezetük valamint az SPFMV P1 megfelelő régióinak összehasonlítása.

A felső sorban az SPFMV, az alsó sorban az SPMMV P1 régiói találhatók. A számok a bemutatott peptidek pozícióit mutatják az adott P1 fehérjében.

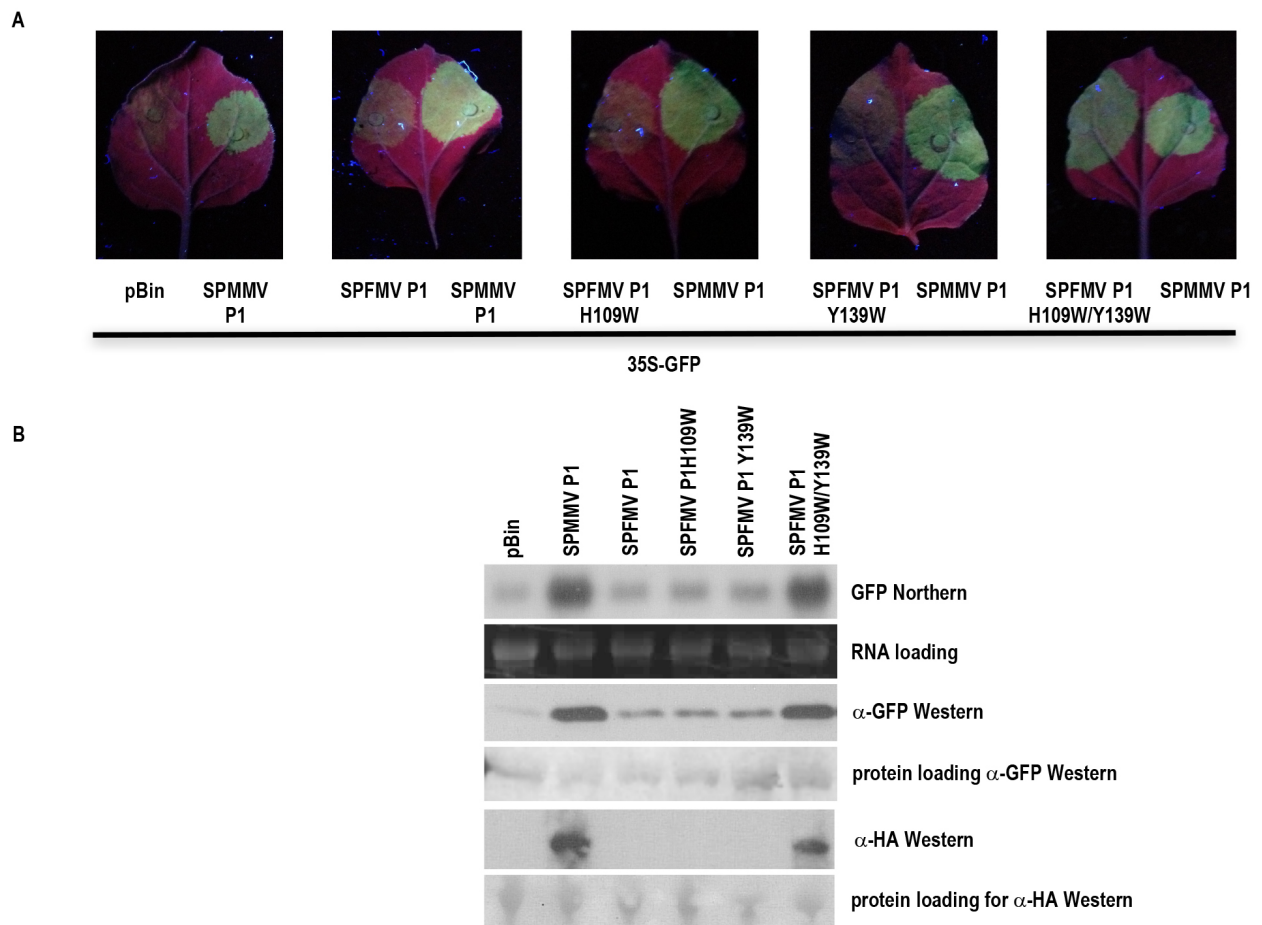
Kíváncsiak voltunk, hogy az egyértelmű homológia mellett van-e funkcionális hasonlóság a két fehérje között, ezért elhatároztuk az SPFMV P1 izolálását és silencing szupresszor funkciójának vizsgálatát.

Degenerált primereket terveztünk az adatbázisokban lévő nukleotidszekvenciák alapján az SPFMV P1 cisztronjának 5'- és 3'-végére. SPFMV-vel fertőzött *Ipomoea batatas* leveléből származó RNS-ről cDNS-t írtunk, majd a degenerált primerekkel egy kb. 2100 bp-os terméket kaptunk, amit klónoztunk és meghatároztuk a teljes nukleotid szekvenciáját. A nukleotidszekvenciából származtatott aminosav sorrend alapján megállapítottuk, hogy az általunk izolált SPFMV P1 egy 689 aminosav hosszúságú fehérjét kódol, ami 80-96 %-ban mutat homológiát az adatbázisokban található SPFMV P1 fehérjékhez. Továbbá megállapítottuk azt is, hogy a fehérje első 193 aminosavas régiója 41 %-os homológiát mutat az SPMMV P1 megfelelő szakaszával, míg a teljes fehérjét tekintve a homológia mértéke 26 %-os.

5.11. Az SPFMV P1 fehérje funkcionális vizsgálata

Az SPFMV P1 fehérje funkcionális vizsgálatához első lépésként a P1 kódoló régióját a pSanyi növényi expressziós vektorba illesztettük be. A pSanyi vektorban lévő ORF-ek a növényben expresszáltatva az N-terminális végükön HA (hemagglutinin) epitópot tartalmaztak (Kertész et al., 2006).

Az SPFMV P1 fehérje silencing szupresszor aktivitását agroinfiltrációs teszttel vizsgáltuk meg. A 35S-GFP riporter konstrukcióval infiltráltuk együtt az SPFMV HA-P1 konstrukciókat tartalmazó *Agrobacterium* törzseket. Infiltrálás után 72 órával a pozitív kontrollként használt SPMMV P1 erősen szupresszálta az RNS silencing-et, míg az SPFMV P1-gyel infiltrált folt nem mutatott GFP fluoreszcenciát (E42. ábra A és B 3. oszlop), amiből arra következtettünk, hogy a vad típusú SPFMV P1 nem rendelkezik RNS silencing szupresszor aktivitással.



E42. ábra. Az SPFMV P1 kettős mutáns silencing szupresszor tulajdonsággal rendelkezik.

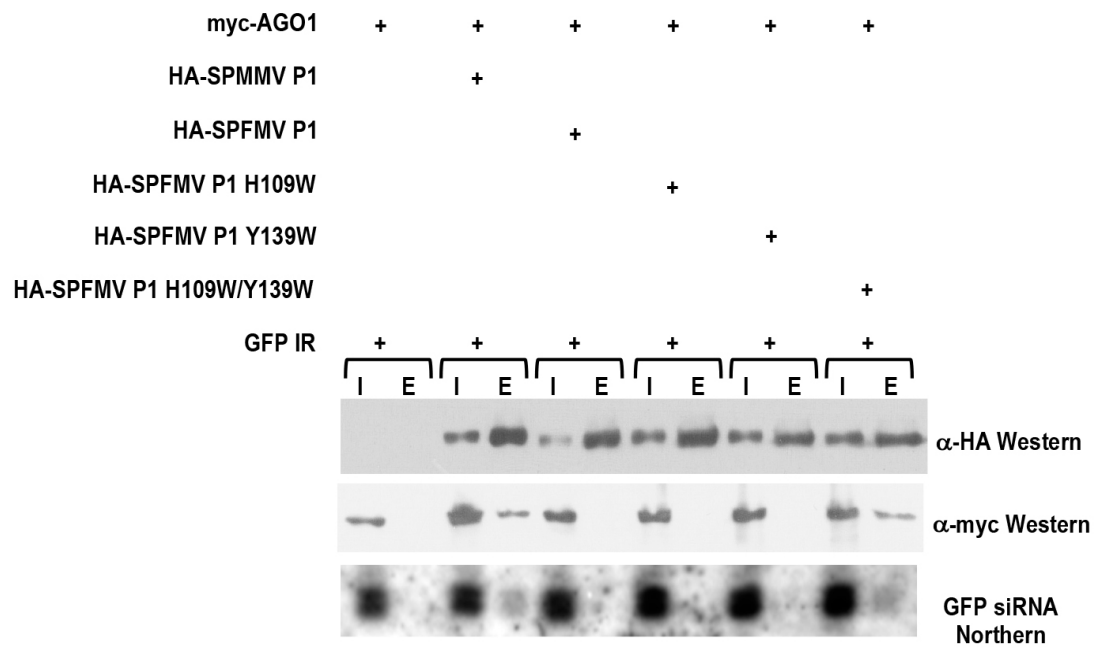
A mutánsok *in vivo* vizsgálata (A). Az *in vivo* vizsgálat Northern és Western analízise (B).

Az SPMMV P1 fehérje 3 WG/GW domént tartalmaz és legalább 2 intakt WG/GW domén szükséges a silencing szupresszor aktivitásához (Giner et al., 2010). Mivel az SPFMV P1 csak egy ilyen domént tartalmaz, ezért azt a hipotézist állítottuk fel, hogy a WG/GW domén(ek) hiánya miatt a silencing szupresszor funkció az megszűnéséhez vezetett. A hipotézisünk ellenőrzésére irányított mutagenezissel létrehoztuk a H109W és a Y139W mutáns P1 fehérjéket, amelyek kettős-, és a H109W/Y139W P1 fehérjét, amely 3 WG/GW domént tartalmaztak, majd a pSany1 vektorba klónoztuk a mutánsokat. A mutánsok aktivitásának vizsgálatát agroinfiltrációs teszttel végeztük. A mutáns fehérjéket kódoló konstrukciókat hordozó *Agrobacterium* törzseket a 35S-GFP-vel koinfiltráltuk *N. benthamiana* levelekbe. Kontrollként az SPMMV P1-et használtuk. 3 nappal az infiltrálás után UV fényben megvizsgáltuk a leveleket. Az SPMMV P1 jelentősen gátolta az RNS silencing-et, amit az erős fluoreszcencia jelzett. A H109W és a Y139W mutánsok nem, de a H109W/Y139W kettős

mutáns szintén hatékonyan gátolta az RNS silencing-et (E42. ábra A). Ezt az eredményt támasztotta alá az infiltrált foltok Northern és Western analízise is (E42. ábra B.)

A SPFMV P1_{H109W/Y139W} mutáns silencing szupresszor aktivitást mutatott a RISC felépülését vizsgáló aktivitás tesztben, ahol ugyanazt a módszert használtuk, mint amivel az SPMMV silencing szupresszorát azonosítottuk (E22. ábra). Mivel az SPMMV P1 az aktív RISC működését is képes gátolni, ezért azt a kérdést tettük fel, vajon az egy WG/GW domén tartalmazó és a kettő és három GW/WG domént hordozó mutáns fehérjék közül melyik fehérje képes az aktív RISC gátlására. A 35S-GFP-vel végzett kísérleteink alapján azt feltételeztük, hogy csak a H109W/Y139W mutáns lesz aktív ebben a tesztben is. A kérdés megválaszolására a miRNS-sel feltöltött RISC komplexeket vizsgáló tesztrendszerünket használtuk (Lakatos et al., 2006).

Az SPMMV P1 esetében a silencing szupresszor aktivitás összefügg az AGO-kötő képességgel. Megvizsgáltuk, hogy az SPFMV P1 wt és mutáns fehérjék rendelkeznek-e AGO1 kötő aktivitással. Ezért együtt expresszáztattuk az SPFMV HA-P1 fehérjéket 6×myc-AGO1-gyel és GFP-IR-rel *N. benthamiana* leveleiben. A HA-epitóppal jelölt P1 wt és mutáns fehérjéket immunoprecipitációval kinyertük, majd az eluátumban megvizsgáltuk a 6×myc-AGO1 fehérje jelenlétét Western blotolással. Eredményeink azt mutatták, hogy a kontrollként használt SPMMV P1 megkötötte a 6×myc-AGO1 fehérjét és az GFP-IR eredetű siRNS-eket. Az SPFMV P1 fehérjék közül kizárólag a silencing szupresszor aktivitást mutató SPFMV P1_{H109W/Y139W} rendelkezett 6×myc-AGO1-kötő képességgel. Az SPMMV P1 fehérjéhez hasonló módon, az SPFMV P1_{H109W/Y139W} mutáns is egyaránt rendelkezik silencing szupresszor aktivitással és AGO-kötő képességgel (E43. ábra). Munkánk során elsőként sikerült egy funkció nélküli fehérjéből aminosavak cseréjével egy RNS silencing szupresszor fehérjét létrehozunk (Szabo, Manczinger et al., 2012).



E43. ábra A wt, a P1_{H109W}, a P1_{H139W} és a SPFMV P1_{H109W/Y139W} AGO1 kötésének vizsgálata

Az adott konstrukció kombinációkat *N. benthamiana*-ba infiltráltuk, majd IP után a P1, AGO1 fehérjéket Western boltolással, a GFP siRNS-eket Northern boltolással detektáltuk.

6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Az elmúlt több mint 15 évben munkánk jelentős részét képezte a növényi virális silencing szupresszorok működési mechanizmusának vizsgálata. A kezdetekkor rendelkezésre állt már néhány módszer a silencing szupresszorok vizsgálatára, úgymint az *Agrobacterium*-mediálta tranziens génexpresszió, a kis RNS-ek elválasztását és detektálását lehetővé tevő molekuláris technikák. A különböző vírusok RNS silencing szupresszorainak vizsgálata során azonban olyan kérdések merültek fel, amikre az akkor létező módszertani repertoárral nem lehetett kielégítő válaszokat adni. Ezért kérdéseink megválaszolására egyrészt új módszereket fejlesztettünk ki, másrészt, meglévő módszereket adaptáltunk a silencing szupresszorok vizsgálatára. Az új technikai repertoár lehetővé tette számunkra a felmerülő tudományos kérdések más oldalról történő megközelítését, amely remélhetőleg hozzájárult a virális RNS silencing szupresszorok működésének pontosabb megértéséhez.

6.1. A Tombusvírusok silencing szupresszora a p19 fehérje

A *Tombusvirus* nemzetségbe tartozó vírusok a *Tombusvirideae* családba tartozó vírusok prototípusának tekinthetők. Legismertebb tagjaik a CymRSV, a CIRV és a *Tomato bushy stunt virus* (TBSV). Azonos genomszerveződésűek, valamint hasonló méretű és funkciójú fehérjéket kódolnak (Russo M, 1994), továbbá a három vírus által kódolt fehérjék is magas homológiát mutatnak egymáshoz. Mivel a CymRSV feltételezett silencing szupresszorának, a p19-nek kódoló régiója a movement (p22) ORF-en belül, egy másik leolvasási keretben található, ezért létre lehetett hozni egy olyan vírus mutánst, amely nem termeli a p19 fehérjét, de a p22 fehérje zavartalanul transzlálódik (Cym19stop). A Cym19stop-pal fertőzött növények jóval enyhébb tüneteket mutattak, mint a vad típusú CymRSV-vel fertőzöttek, sőt a Cym19stoppal fertőzött növények néhány héten belül kigyógyultak a vírusfertőzésből, míg a CymRSV-vel fertőzött növények elpusztultak (Szittyá, Molnár et al., 2002). A TBSV és a CIRV p19 fehérjét is VSR-ként azonosították (Vargason et al., 2003) (Qiu, Park et al., 2002).

6.2. A heterológ *in vitro* rendszer alkalmas a p19 vizsgálatára

A CymRSV p19 fehérjéről bebizonyították, hogy *in vitro* duplaszálú virális siRNA kötésére képes (Silhavy et al., 2002). Ez az eredmény azt sugallta, hogy más virális/növényi faktor nem szükséges a p19 siRNA kötő aktivitásához. A *Drosophila* 2 órás embrió extraktumból készített ún. transzlációs extraktum mind dsRNA-sal, mind siRNA-sal programozható és szekvenciaspecifikus RNS silencing kiváltására alkalmas (Nykanen et al.,

2001). A *Drosophila in vitro* rendszer használatával elsőként modelleztük a p19 hatásmechanizmusát. Eredményeink szerint a p19 a kis RNS-ek megkötésével hatékonyan gátolja az RNS silencinget *in vitro* (Lakatos et al., 2004). Mások későbbi eredményei megerősítettek minket abban, hogy a *Drosophila in vitro* rendszer jó választás volt, ugyanis a 2 órás embrióban nagy mennyiségben jelenlévő AGO2-ről bebizonyították, hogy kulcsszerepet játszik a *Drosophila* antivirális RNS silencing útvonalában (van Rij, Saleh et al., 2006). Az általunk adaptált és továbbfejlesztett rendszert mások is felhasználták virális RNS silencing szupresszorok tanulmányozására. A rendszer segítségével sikerült bebizonyítani, hogy a pl. *Tobacco mosaic virus* replikáz fehérjéje az RNS silencing központi molekulájának, a virális siRNS-ek megkötésével gátolja az RNS silencinget (Csorba, Bovi et al., 2007) (D1. ábra).

6.3. A p19 működési mechanizmusa *in vivo*

Az *in vitro* rendszerben elért eredményeinket *in vivo* is igazoltuk. Munkánk során elsőként sikerült bebizonyítanunk, hogy egy virális silencing szupresszor virális siRNS-t köt *in vivo* (Lakatos et al., 2004). Az RNS silencinget indukáló virális kis RNS-ek megkötésével a CymRSV p19 blokkolni tudja az RNS silencing kialakulását. A CIRV és a TBSV – a CymRSV közeli rokonai - p19 fehérjéinek kristályszerkezete összhangban áll eredményeinkkel. A szerkezet ismeretében megállapítható, hogy a p19 dimer formában köti a bázispárosodási szakaszon 100 % homológiát mutató kis RNS-eket. *In vitro* vizsgálatokkal megállapították, hogy a p19-siRNS komplex K_d -je a szubnanomólos tartományba esik, ami egy nagyon erős fehérje-RNS interakciónak tekinthető (Vargason et al., 2003) (Ye et al., 2003). Az általunk meghatározott CymRSV p19-siRNS K_d értéke 10-szer magasabbnak bizonyult, amiben feltehetőleg az játszott közre, hogy mi a GST-p19 fúziós fehérjét használtuk kísérleteinkben (Lakatos et al., 2004). A kristályszerkezet alapján megállapították azt is, hogy a p19 monomerek 39. és 42. pozícióiban lévő Trp aminosavak kötést létesítenek a siRNS 5' végén található nukleotid foszfát csoportjával. A Trp 39 és 42 aminosavak esszenciális szerepet töltenek be az siRNS kötés szempontjából, mert ezeknek az aminosavaknak az alaninra való cseréje a p19 silencing szupresszor aktivitását jelentős mértékben lecsökkentette (Vargason et al., 2003). Ezek után megvizsgálták a CIRV p19 különböző hosszúságú siRNS-ekhez való relatív affinitását. A 21 nt siRNS 19 bp (19-2) duplaszálú szakaszához képest csökkentették, illetve növelték a bázispárosodásban résztvevő régió hosszát. A CIRV p19 affinitása a 19 bázispáros (17-2) kis RNS esetében az 1/320-ára, a 20-hoz (18-2) és a 22-hez (20-2) az 1/5-ére, a 23-hoz (21-2) és a 24-hez (22-2) az 1/22-ére, míg a 25-höz (23-2) és a 26-hoz (24-2) 1/37-ére illetve 1/75-ére csökkent a 21-es hosszúságú (19-2) siRNS-hez való affinitásához

képest. Mindezek azt mutatták, hogy a p19 fehérje mintegy egy mérőállásos “tolómérőként” (molecular caliper) működik (Silhavy & Burgyan, 2004). Ez nem meglepő, ugyanis a tombusvírusokról (és más vírusokról is zömében) 21 nt hosszúságú kis RNS-ek keletkeznek a fertőzés során (Szittyá et al., 2010).

Fontos volt annak a tisztázása is, hogy az RNS silencing egy koncentráció függő mechanizmus, azaz van egy küszöbérték, illetve siRNS koncentráció ebben az esetben, amely az RNS silencing folyamatának beindításához szükséges. A CymRSV fertőzött növényi extraktum méret szerinti elválasztása során azt az eredményt kaptuk, hogy a CymRSV eredetű kis RNS-ek szinte kizárólag a p19-es fehérjével kötött állapotban vannak (Lakatos et al., 2004). Ebből a direkt bizonyítékból az következik, hogy a p19 és a virális siRNS koncentrációinak legalább meg kell egyeznie, de inkább a p19 koncentrációjának magasabbnak kell lennie a virális kis RNS koncentrációjánál, mivel a “szabad” kis RNS-ek azonnal beindítják az antivirális RNS silencinget. Eredményeink más megközelítésekből származó korábbi és későbbi bizonyítékokkal is összhangban állnak. CymRSV és DI RNS koinfekciója során azt tapasztalták, hogy a DI RNS koncentrációja messze felülmúlja a CymRSV genomi RNS koncentrációját a fertőzött sejtekben. Továbbá, a csak CymRSV-vel fertőzött sejtekben a genomi RNS koncentrációja jóval magasabb, mint a CymRSV és DI RNS-sel fertőzött növényekben (Havelda et al., 2005). Megállapították, hogy a CymRSV és DI RNS fertőzés során a kis RNS-ek jelentős hányada a többszörös “stem” másodlagos szerkezettel rendelkező DI RNS-ről képződik. A DI RNS-ek “stem” struktúrája az intenzív bázispárosodás következtében nem hozzáférhető az RNS silencing végrehajtó komplexe számára, azonban a DI RNS-ekről képződő kis RNS-ek szekvenciahomológiájuk miatt hatástalanítják a virális genomi RNS-t. Ezért csökken le a virális genomi RNS koncentrációja és emelkedik meg a DI RNS koncentrációja. Mivel azonban a DI RNS a genomi RNS replikációjához szükséges 5’ és 3’ végen a replikációhoz szükséges promótereket és egyéb virális szekvenciákat tartalmaz, ezért a DI fenmaradásához elengedhetetlen a virális genomi RNS-ről keletkező replikációs fehérjék jelenléte. Ezért alakul ki egy alacsony virális genomi RNS és magas DI RNS arány, ami jellemző a virális genomi és DI RNS-sel való fertőzésre. A koncentráció különbség változhat a fertőzés előrehaladása során, de valószínűleg egy adott idő után egy egyensúlyi állapot alakul ki, amely során a virális genomi RNS koncentrációja lecsökken, de csak olyan szintre, ami még biztosítja a genomi és a DI RNS replikációját is.

További fontos kérdés az, hogy a p19 jelenléte hogyan befolyásolja a lokális és a szisztémikus silencinget. *In vitro* eredményeink azt mutatják, hogy a p19 hatékonyan gátolta a reakcióterfogatban – a sejtben - lejátszódó RNS silencing-et (Lakatos et al., 2004). Azonban

Havelda és mtsai *in situ* hibridizációs technikával bemutatták, hogy a genomi RNS mennyisége megegyezik a CymRSV és a Cym19stop fertőzött növényekben lokálisan, tehát a p19 jelenléte nem befolyásolja a lokális RNS silencinget ebben az esetben (Havelda et al., 2003). Azonban a CymRSV egy robusztus módon replikálódó vírus, ezért feltételezhetjük azt, hogy egy kevésbé robusztus módon replikálódó vírus esetében a vírus szupresszora fontos szerepet játszik a lokális silencing kialakításában is.

A CymRSV és a Cym19stop közel azonos hatékonysággal mozog a fertőzött növény szállítószöveiben, majd a szisztémikus levelek ereiből kilép a környező szövetekbe. A Cym19stop kb. tíz sejtsornyi távolságot képes megtenni, míg a CymRSV akadálytalanul terjed tovább. A Cym19stop esetében a virális kis RNS-ek feltehetőleg a plazmodezmákon keresztül haladnak előre, és megelőzik a fertőzés frontját. Egy bizonyos távolság megtétele után a Cym19stop egy olyan sejtbe lép be, amelyben a RISC-ek az előző sejtben képződött virális kis RNS-ekkel vannak feltöltve, melyek megakadályozzák a vírus további terjedését és szaporodását (Havelda et al., 2003).

6.4. A p19, a p21, az NS3 és a HC-Pro megakadályozzák a siRNS-ek beépülését az RNS silencing iniciátor komplexébe

Munkánk során több különböző megközelítést alkalmaztunk evolúciós szempontból távoli növényi vírusok RNS silencing szupresszorainak vizsgálatára. A *Drosophila* embrió RNS silencing rendszerrel kapott eredményeink szerint a p19, p21, az NS3 és a HC-Pro is gátolja a siRNS-sel indukált target RNS vágást. Ez azonban csak akkor következett be, ha az indukáló kis RNS-t és a tisztított szupresszor fehérjét egy időben adtuk a reakció elegybe, amennyiben a szupresszor fehérjét az RNS silencing indukálása után adtuk, nem tapasztaltunk gátló hatást. A *Drosophila* RNS silencing rendszer EMSA vizsgálata során egyértelműen el tudták választani a silencing iniciátor és végrehajtó komplexeket (Pham et al., 2004). Ezt a megközelítést alkalmazva, amennyiben az indukáló kis RNS-t és az adott szupresszort egyidejűleg adtuk az elegybe, akkor a kis RNS-eket a szupresszor fehérjék kötötték meg és nem az DICER2-R2D2 RNS silencing iniciáló komplex, így nem detektáltunk RISC komplexet. Ha viszont a DICER2-R2D2 RNS silencing iniciáló komplex már kialakult, a szupresszorok nem voltak képesek a RISC komplex kialakulását meggátolni (Lakatos et al., 2006). Ezek az eredmények mind arra utalnak, hogy a p19, a p21 az NS3 és a HC-Pro a kis RNS-ek megkötésével akadályozza meg a RISC felépülését, de nem tudják magát a RISC működését gátolni. Az általunk használt heterológ rendszer mellett növényi *in vitro* RNS silencing rendszert is sikerült kialakítani BY-2 sejt kultúrából készült extraktummal, azonban

ebben a rendszerben csak a RISC detektálása, illetve a siRNS indukálta target vágása modellezhető, silencing iniciátor komplexet nem sikerült detektálni (Iki et al., 2010) (Iwakawa & Tomari, 2013).

A p19, a p21, az NS3 és a HC-Pro szuppresszorok működésére felállított modellünk csak akkor érvényes, ha a szupresszor nagyobb affinitással köti a kis RNS-t, mint a DICER2-R2D2 komplex. Korábbi vizsgálatokból tudjuk, hogy a p19-siRNS komplex disszociációs állandója (K_d) a szubnanomoláris koncentrációs tartományba esik (Vargason et al., 2003). A GST-p21 siRNS-hez való affinitását $K_{látszólagos}=22$ nM értékkel jellemezhető, míg ugyanez az érték az NS3 esetében $K_{látszólagos}=2,45$ nM (Lakatos et al., 2006) (Hemmes, et al., 2007). Mind a két érték erős affinitást jelent. A HC-Pro esetében nem tudtunk K_d -t mérni, mert a HC-Pro tisztított formában csak nagyon magas koncentrációban képes kis RNS-t kötni, ha összehasonlítjuk a *Drosophila* extraktummal végzett kísérleti eredményeinkkel. Ugyancsak nagyobb siRNS-hez való affinitást tapasztaltunk, ha a reakcióelegyet pl. *Arabidopsis* sejtkultúrából készített durva extraktummal egészítettük ki. Ezért azt gondoljuk, hogy HC-Pro siRNS-kötő képességéhez nem egy specifikus gazdafaktor szükséges, hanem az extraktumban lévő más fehérjék segítették elő a HC-Pro aktív harmadlagos szerkezetének kialakulását. Ezt a feltételezést támasztja alá Lopez-Moya és munkatársai eredménye, mely szerint a HC-Pro-t dimer, tetramer és oktamer formában is detektálták elektrommikroszkópus technikával (Ruiz-Ferrer et al., 2005). A többféle forma kialakulása valószínűleg az oktamer forma szétesésével magyarázható. Kísérleteink alapján azonban nem tudtuk eldönteni, melyik forma rendelkezik kis RNS-kötő aktivitással. Sajnos, a DICER2-R2D2-siRNS K_d értékét sem akkor, sem azóta nem határozták meg.

Kimutattuk, hogy a TEV HC-Pro a virális siRNS-ek mellett a miR171-miR171* miRNS duplexet is megkötötte. Továbbá azt tapasztaltuk, hogy a miR171-miR171* duplex mennyisége megnőtt a TEV fertőzött növényekben. Mások is hasonló eredményeket kaptak. Transzgenikus *Arabidopsis* növényekben, amelyek a *Turnip mosaic virus* (TuMV) HC-Pro-t, a TBSV p19-et, vagy a *Beet yellows virus* p21 szupresszorát termelték, megnövekedett a miR171, miR167b és a miR160c RISC-be be nem épülő, szabad szálak mennyisége. Immunoprecipitációval fizikai kapcsolatot tudtak kimutatni a miRNS-ek és a p19, valamint a p21 szupresszorok között, de érdekes módon a TuMV HC-Pro-miRNS-kapcsolatot nem sikerült igazolniuk (Chapman et al., 2004). Ez utóbbi eredmény hátterében vagy az immunoprecipitációhoz alkalmazott eltérő körülmények állhattak, vagy – ami valószínűbb, hogy az általunk használt N-terminális 6×HIS tag-gel rendelkező TEV HC-Pro a Chapman és

munkatársai által használt C-terminális HA tag-elt HC-Pro-val szemben funkcionális volt (Chapman et al., 2004).

A virális silencing szupresszorok a virális siRNS-eken kívül az endogén miRNS-eket is megkötik. Ezért a vírusfertőzés során a szupresszor fehérje koncentrációjának nagyobbnak kell lennie az endogén miRNS és a virális siRNS koncentrációjának összegénél, mert csak így valósulhat meg az összes virális siRNS megkötése, ezáltal az antivirális silencing gátlása.

Munkánk során kifejlesztettünk két, a GFP riportergéneken alapuló rendszert, amellyel megállapítható, hogy az adott RNS silencing szupresszor fehérje az aktív RISC-et gátolja-e. A két rendszer segítségével a virális siRNS és a miRNS silencing hatását külön-külön meg lehet vizsgálni (Lakatos et al., 2006). Eredményeink azt mutatták, hogy az általunk vizsgált (p19, HC-Pro, p21) duplaszálú kis RNS-kötő szupresszorok nem képesek az egyszálú kis RNS-t tartalmazó RISC-et gátolni (Lakatos et al., 2006). Ezzel ellentmondtak Vance és munkatársai eredményei, akik azt találták GFP csendesített GFP transzgenikus növényekben, hogy az rgs-CaM calmodulin-szerű gén expresszáltatása utáni TEV fertőzés hatására a szisztémikus levelekben a GFP transzgén újra megnyilvánul. Eredményeiket úgy magyarázták, hogy a rgs-CaM és a HC-Pro az RNS silencing végrehajtó komplexét, a RISC-et gátolta (Anandalakshmi et al., 2000). A TEV HC-Pro-val végzett *in vitro* és és többféle *in vivo* eredményeink nem erősítették meg a fent említett megfigyeléseket, hanem egyértelműen azt mutatták, hogy a HC-Pro egy kis RNS-kötő fehérje, ami az aktív RISC-et nem gátolja (D1. ábra). A Vance csoport későbbi eredményei szerint az etilén indukálta RAV2 transzkripció faktor elengedhetetlenül szükséges a HC-Pro és a *Carmovirus* p38 silencing szupressziós aktivitásához, továbbá megállapították, hogy a RAV2 által indukált FRY1 and CML38 gének endogén silencing szupresszor aktivitással rendelkezhetnek. Érdekes módon ez a jelenség nem befolyásolta az RNS silencingben résztvevő gének expresszióját. Eredményeik szerint a RAV2, ami mind biotikus, mind abiotikus stresszekre indukálódik, felerősítheti a HC-Pro aktivitását (Endres, Gregory et al., 2010). Ezek az eredmények ugyan árnyalják az RNS silencing szupresszióról alkotott képünket, de a HC-Pro általunk javasolt működési mechanizmusával nem fednek át.

HC-Pro transzgenikus növényeket használva több laboratórium is azt az eredményt kapta, hogy a HC-Pro gátolja a siRNS-ek képződését (Llave, Kasschau et al., 2000) (Mallory et al., 2001) (Dunoyer et al., 2004). Eredményeink azonban egyértelműen megmutatták, hogy a HC-Pro nem befolyásolja a dsGFP-ről képződő siRNS-ek mennyiségét egy olyan *N. benthamiana* vonalban, ami nem expresszálja az RdRP6 fehérjét (Lakatos et al., 2006). A növényekben az RdRP6 fontos szerepet játszik a siRNS indukálta RNS silencing fenntartó/amplifikáló lépésében (Dalmay et al., 2000) (Mourrain, Beclin et al., 2000), így az

elsődleges siRNS-ek inaktiválásával az RNS silencing fenntartó/amplifikáló lépése nem következik be, az *rdrp6* mutáns növények fenotípusa ezért hasonlít a DICER 2 és 4 mutáns növényekhez, amelyekben nem keletkezik siRNS.

6.5. A siRNS kötés gyakori és hatékony silencing szuppressziós mechanizmus

Vírusfertőzés során az antivirális RNS silencing szuppressziója létfontosságú a vírus szisztemikus terjedése szempontjából. Munkánk során három különböző növényi virális silencing szupresszorról is bebizonyítottuk, hogy a kis RNS-ek megkötésével akadályozza meg a RISC kialakulását (Lakatos et al., 2006, Lakatos et al., 2004) (D1. ábra). A későbbiekben bebizonyították, hogy a *Pothos latent virus* (PoLV) (Merai et al., 2005), a *Peanut clump virus* (PCV) (Merai et al., 2005), a *Barley stripe mosaic virus* (BSMV) (Merai et al., 2005), a *Turnip crinkle virus* (TCV) (Merai et al., 2005), a *Cucumber vein yellowing virus* (CVYV) (Valli et al., 2011), a *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) (Schnettler, Hemmes et al., 2010), a *Tobacco mosaic virus* (TMV) (Csorba et al., 2010), *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Schnettler et al., 2010), a *Pelargonium line pattern virus* (PLPV) (Goto, Kobori et al., 2007) és a *Flock house virus* (FHV) (Chao, Lee et al., 2005) és számos *Potyvirus* is kis RNS-kötő silencing szupresszor fehérjét kódol. Mivel a kis RNS-ek az RNS silencing központi molekulái és a kis RNS-kötő tulajdonsággal rendelkező RNS silencing szupresszorok hatékony antivirális védekezést biztosítanak, nem meglepő, hogy rendszertanilag távol álló vírusokban azonos RNS silencing szuppressziós mechanizmusú szupresszor fehérjék alakultak ki az evolúció során.

6.6. A kis RNS-kötő silencing szupresszorok RNS-kötő tulajdonságaiknak megfelelő módon gátolják a kis RNS-ek metilációját

A duplaszálú kis RNS molekulák, kétszálú tulajdonságuk folytán *in vitro* és *in vivo* is jelentősen stabilabbak, mint az azonos hosszúságú egyszálú kis RNS-ek. A ds kis RNS-ek nagyobb hatékonysággal épülnek be a RISC-be, ezáltal erősebben képesek indukálni az RNS silencing kialakulását (Schwarz et al., 2003). A ds kis RNS-ek azonban a molekula duplaszálú régiója mellett rendelkeznek egy ún. 3' túlnyúló véggel is, amely az AGO fehérjék PAZ doménjéhez kötődik (Zamore et al., 2000) (Schwarz et al., 2002). A kis RNS 3' vége ezáltal vesz részt a target RNS megkötésében (Kim, Han et al., 2009). A kis RNS-ek 3' vége 2 bázispárral túlnyúlik a duplaszálú szakaszon és ez védtelenné teszi az RN-ázokkal szemben. Feltehetőleg ezért alakult ki a növényekben és az állatokban egyaránt a kis RNS-ek 3' végének metilációja (Yu, Yang et al., 2005). Metiláció hiányában a RNS-ek poliuridilálódnak, majd enzimatis módon bomlanak le (Ren et al., 2012).

Munkánk során megvizsgáltuk, hogy vírusfertőzés során hogyan alakul a kis RNS-ek metilációs állapota két ds kis RNS-kötő aktivitással rendelkező szupresszort kódoló vírus estében. A TEV eredetű virális siRNS-ek 100 %-ban metilálatlan állapotban vannak, míg a CIRV p19 alig gátolja a virális siRNS-ek metilációját (Lozsa et al., 2008). Ez feltehetőleg azzal magyarázható, hogy a CIRV a mitochondrium külső membránjában replikálódik (Burgyn, Rubino et al., 1996), ami jobban elkülönül a citoplazmától, mint az endoplazmatikus retikulum, ahol a TEV replikációja történik (Schaad, Jensen et al., 1997). A miR171 és miR168 kb. 50 %-ban volt metilált a TEV fertőzött növényekben, míg a CIRV p19 csak kismértékben csökkentette ezeknek a miRNS-eknek a metilációját (Lozsa et al., 2008). Hasonló eredményeket kapott a miRNS-ek metilációs állapotáról a HC-Pro-t és a p19-et stabil transzgenikus formában tartalmazó Arabidopsis növényekkel végzett kísérletek során Chen és munkatársai (Yu et al., 2006). Ez a jelenség magyarázható egyrészt azzal, hogy a két vírus a sejtben különböző helyen replikálódik (lásd fent). De magyarázható azzal is, hogy a TEV HC-Pro és a tombusvírusok p19 fehérjeje különböző képpen köti a kis RNS-eket. A TEV HC-Pro a kis RNS-ek 3' végével fizikai kapcsolatba lép és ez hatékonyan gátolhatja a kis RNS-ek metilációját (Lakatos et al., 2006). A p19 fehérje a kis RNS-ek 5' végének foszfát csoportjával lép interakcióba, ezért elképzelhető az is, hogy a HEN1 metiláz nemcsak a szabad kis RNS-eket, hanem a p19 kötésben lévő kis RNS-eket is metilálja (Vargason et al., 2003). A TEV HC-Pro és a CIRV p19 immunoprecipitátumban lévő kis RNS-ek metilációs aránya megegyezett a vírusfertőzött kis RNS-ek metiláció arányával, ami azt jelenti, hogy a szupresszor fehérjék és a kis RNS-ek közötti fizikai kapcsolat természete határozza meg döntően a kis RNS-ek metilációs arányát

(Lozsa et al., 2008). Szintén ezzel függhet össze annak a megfigyelésnek a magyarázata, hogy a miR171 és miR168 jelentős mértékben metilált állapotban volt a CIRV fertőzött sejtekben. A miR171 duplexben kettő, míg a miR168 duplexben három nem párosodó nukleotid pár található. A nem párosodó nukleotidok lerövidítik a kis RNS méretét és korábbi eredményekből tudjuk, hogy a 21 nt (19-2) siRNS-hez képest a 20 nt (18-2) és a 19 nt (17-2) a p19 affinitása 1/5-re illetve 1/320-ra csökkent (Vargason et al., 2003), ami magyarázhatja a magas metilációs szintet.

Sejtfractionáláson alapuló kísérleteink azt mutatták, hogy mind a TEV, mind a CIRV esetében a kis RNS-ek a citoplazmában helyezkednek el, ezért feltehetőleg ott történik a kis RNS-ek metilációja. Azonban a miR171 és miR159 esetében a sejtmagban is detektáltunk metilált miRNS-eket. A növényi HEN1 metiltranszferáz fehérje egy nukleáris lokalizációs szignált tartalmaz, ami megmagyarázhatja az általunk kapott eredményeket (Xie, Johansen et al., 2004). Azonban a CIRV eredetű virális siRNS-ek citoplazmás jelenléte feltételezi a HEN1 metiltranszferáz citoplazmás lokalizációját is.

6.7. Az SPMMV P1 egy egyedi tulajdonságokkal rendelkező silencing szupresszor

A P1 fehérjét azonosítottuk az SPMMV RNS silencing szupresszoraként (Giner et al., 2010). Az *Ipomovirus* nemzetségben az SPMMV az egyetlen vírus, ami a *Potyvirus* nemzetségre jellemző genomszerveződéssel rendelkezik (Colinet, Kummert et al., 1998), azaz genomjában megtalálható a P1 és a HC-Pro cisztron egyaránt, míg a nemzetség eddig ismert fajai nem kódolnak HC-Pro-nak megfelelő tethető fehérjét (Janssen, Martin et al., 2005, Li, Hilf et al., 2008, Mbanzibwa, Tian et al., 2009). Az *Ipomovirus* nemzetségben az SMMPV mellett az a *Cucumber vein yellowing virus* (CVYV) genomszerveződése is egyedi, mivel a vírus által kódolt poliprotein N-terminálisán két P1 fehérjét is azonosítottak és a második P1 kópia rendelkezik RNS silencing szupresszor aktivitással (Valli, Martin-Hernandez et al., 2006).

6.8. Az SPMMV P1 gátolja az aktív RISC-et

Eredményeink bemutatták, hogy az SPMMV P1 kofrakcionálódik az AGO1 fehérjével. Továbbá azt is megállapítottuk, hogy a P1 a kis RNS-t tartalmazó AGO1 frakcióval fizikai kapcsolatban van *in vivo*. Ez az eredmény arra utalt, hogy az SPMMV P1 az RNS silencing utolsó, ún. végrehajtó lépését (aktív RISC) gátolja (D1. ábra). Ezzel egyidőben kizártuk azt, hogy a P1 az RNS silencing útvonal korábbi lépéseire is hatással lenne (Giner et al., 2010).

Más növényi vírusok is kódolnak AGO-kötő tulajdonsággal rendelkező RNS silencing szupresszorokat. A *Potato virus X* (PVX) ún. p25 fehérjét azonosították silencing szupresszorként (Voinnet, Lederer et al., 2000). Megállapították, hogy a p25 képes kapcsolatba lépni az AGO1, AGO2, AGO3 és AGO4 fehérjékkel, de a vizsgálatba szintén bevont AGO5-tel és AGO9-cel nem. Az AGO 1-4 fehérjék közül a p25 kizárólag az AGO1 proteoszómán keresztül történő degradációját iniciálta. Ennek alapján a szerzők azt feltételezték, hogy a p25 az ubikvitin ligáz komplex egyik alegységeként funkcionál (Chiu, Chen et al., 2010). A *Potatovirus* nemzetségbe tartozó *Beet western yellows virus* ún. P0 fehérje az AGO1 fehérje degradációjához vezetett. Annak ellenére, hogy a P0 az ubikvitin E3 ligázokra jellemző F-boxot tartalmaz, megállapították, hogy az AGO1 fehérje lebomlása nem a proteoszómán keresztül történik (Baumberger, Tsai et al., 2007). Burgyán és munkatársai ezután azt találták, hogy az AGO1 siRNS-sel való feltöltése részben gátolja az AGO1 P0 általi degradációját (Csorba et al., 2010). Végül Genschik és munkatársai megállapították, hogy a P0 által iniciált AGO1 degradációhoz szükség van az SCF ubikvitin ligáz komplexre, amelynek feltehetőleg a virális P0 is tagja, de az ubikvitinált AGO1 az autofágia útvonalon keresztül bomlik le (Derrien, Baumberger et al., 2012). Ez az eredmény arra is rámutat, hogy az SCF ubikvitin ligáz nemcsak a proteoszóma irányába, hanem az autofágia irányába is továbbíthatja a kijelölt fehérjéket. Az AGO fehérje degradációja egy hatékony RNS silencing szupressziós stratégia, azonban az SPMNV P1-el ellentétben a *Potatovirus* P0 és a PVX p25 nem az aktív RISC-et, hanem a RISC kialakulását gátolja.

A CMV 2b RNS silencing szupresszor is AGO1-kötő fehérjének bizonyult. A CMV FNY törzs 2b fehérje az AGO1 PAZ doménjével lép kapcsolatba és gátolja a kis RNS indukálta target RNS vágást *in vitro* (Duan, Fang et al., 2012). Továbbá a CMV FNY 2b esetében nem tudtak kis RNS-kötő aktivitást detektálni (Zhang et al., 2006). A CMV SD törzsének vizsgálata során kapott eredmények részben átfedtek az FNY 2b tulajdonságaival. Az SD 2b szintén egy AGO1-kötő fehérje, és szintén gátolja a kis RNS indukálta target RNS vágást *in vitro* (Duan et al., 2012). A CMV FNY és SD törzsek 2b fehérjeinek összehasonlítása után megállapították, hogy mindkét fehérje két sejtmagi lokalizációs szignált tartalmaz. Azonban a SD 2b fehérje esetében kimutatták, hogy az AGO1-SD 2b interakció során az AGO1 a sejtmagba kerül, és a nukleólusban detektálható. Továbbá megállapították, hogy az FNY 2b-vel ellentétben az SD 2b kis RNS-kötő tulajdonsággal rendelkezik (Duan et al., 2012, Zhang et al., 2006). Az ellentmondó eredmények magyarázata a két fehérje különbözőségéből eredhet, de az sem zárható ki, hogy a két tanulmányban az oldható 2b előállításához más expresszálatási módot használtak, ami befolyással lehetett a fehérjék harmadlagos

szerkezetére, így az aktivitására is. A CMV SD 2b esetében egy deléciós soron alapuló mutáns sorozatot állítottak elő, majd megvizsgálták a mutánsok *in vivo* silencing szupressziós, siRNS-kötő és a kis RNS indukálta target RNS vágást gátló aktivitását. Eredményeikből egyértelműen az derült ki, hogy a target RNS vágást gátló aktivitás nem szükséges, viszont a siRNS kötés elengedhetetlen a CMV SD 2b RNS silencing szupresszor aktivitásához (Duan et al., 2012). Ennek az eredménynek az az érdekessége, hogy egy fehérje kétféle aktivitása közül csak az egyik szükséges a szupresszor funkció szempontjából.

Egy nemrég megjelent tanulmány szerint a *Lettuce necrotic yellows virus* (LNYV) P foszfoproteinje, az SPMMV P1-hez hasonlóan gátolja az RNS silencing végrehajtó lépését, azaz az aktív RISC-et, úgy, hogy kölcsönhatásba lép az AGO1 fehérjével (Mann, Johnson et al., 2016). Vizsgálataikhoz az általunk kifejlesztett miR171 riporter génen alapuló rendszert használták (Giner et al., 2010, Lakatos et al., 2006). Továbbá azt találták, hogy az LNYV P, ellentétben az SPMMV P1-gyel, nem tartalmaz WG/GW doméneket. Ez azt jelenti, hogy a virális silencing szupresszor fehérjék AGO1-kötő képessége - hasonlóan a kis RNS-kötő képességhez – az evolúció során egymástól függetlenül jöttek létre. Az LNYV P az antivirális RNS silencingben szintén fontos szerepet játszó AGO2 fehérjével is kapcsolatba lép, ami szintén megkülönbözteti az SPMMV P1-től. És végül az LNYV P fehérjét az teszi igazán érdekessé, hogy nemcsak az aktív RISC-et gátolja, hanem az RNS silencing RDR6/SGS3 függő ún. amplifikációs lépését is (Mann et al., 2016).

Az elmúlt kb. 15 évben a számos növényi vírus RNS silencing szupresszorát azonosították és karakterizálták sokféle megközelítést használva. A felhalmozódott nagymennyiségű adat ismeretében kijelenthetjük, hogy az SPMMV P1 RNS silencing szupresszor az eddig ismert növényi vírusokból származó elsőként leírt olyan fehérje, amely az aktív RISC gátlására képes (Giner et al., 2010) (D1. ábra).

6.9. Az SPMMV P1 egy WG/GW domént tartalmazó AGO1-kötő fehérje

Munkánk során három ún. WG/GW doménhez hasonló aminosav szekvencia motívumot találtunk az SPMMV P1 fehérje N-terminális régiójában. Mutációs analízissel megállapítottuk, hogy a három WG/GW domén közül legalább kettő szükséges az AGO1 kötéshez és a silencing szupresszor aktivitáshoz (Giner et al., 2010). 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 fehérjeje (Till et al., 2007). Az akkor még csak *Archea*-kból rendelkezésre álló AGO 3D struktúrák ismeretében 58 humán AGO2 mutánst készítettek, amelyekből 17 veszítette el a GW182-kötő képességét *in vitro*. A Tyr529, Lys533 és a Gln545 mutánsok esetében megállapították, hogy ezek az aminosavak a GW182 és a kis RNS 5' végi foszfát csoportjának megkötéséhez egyaránt szükségesek (Till et al., 2007). Továbbá kimutatták azt is, hogy a kis RNS és a GW182 fehérje megkötése nem kompetitív módon történik (Till et al., 2007). Ezek az eredmények párhuzamba állíthatók a mi eredményeinkkel, mely szerint az SPMMV P1 a kis RNS-sel töltött AGO1 fehérjéhez kötődik (Giner et al., 2010), tehát a celluláris WG/GW fehérjék és a virális eredetű P1 fehérje feltehetően ugyanabba az AGO-kötő „zsebbe” dokkolnak. A humán AGO2-kis RNS komplex szerkezetét Trp aminosavat tartalmazó fehérje kristályokból határozták meg és a Trp aminosav helyzete egyértelműen kijelölte az AGO2 felszínén azt a két apoláros jelleggel rendelkező régiót, amelyek a WG/GW fehérjék kötésében részt vehetnek (Schirle & MacRae, 2012). A humán GW182 fehérje 34 WG/GW doménnel rendelkezik. *In vitro* módszerekkel azt találták, hogy a W470, W755 és a W828 nélkülözhetetlen az AGO2 kötés és a let-7 indukálta transzlációs represszió szempontjából. Továbbá azt találták, hogy egy AGO2 fehérje csak egy GW182-vel lépett kapcsolatba, de egy GW182 több AGO2 megkötésére volt képes. Modelljük szerint a GW182 létrehozhat egy olyan platformot, ami több AGO2 megkötésére is képes, ezért hatékonyabban gátolhatják az olyan mRNS-ek transzlációját, ami több miRNS-kötő helyet tartalmaz a 3' nem transzlálódó végén (Takimoto et al., 2009). Ezzel szemben mások mutációs analízissel kizárólag a W623 és W634 aminosavakat azonosították elengedhetetlenül szükségesnek az AGO2 kötéshez *in vitro* és a miRNS indukálta RNS silencinghez *in vivo* (Pfaff & Meister, 2013). Schirle és munkatársai (2012) két Trp-kötő zsebet találtak kb. 24 angström távolságra az AGO2 felszínén, és ezzel összhangban a Pfaff és munkatársai (2013) által leírt, az AGO2 kötésben résztvevő W623 és W634 aminosavakat összekötő 11 aminosavas linker is hasonló távolságot köt össze az AGO2

felszínén a bioinformatikai predikciók alapján. Az SPMMV P1 fehérjében a WG/GW doméneket összekötő linker régió ennél jóval hosszabb (86 és 30 aminosav), ami alapján azt feltételezzük, hogy a P1-AGO1 kötés másképp alakulhat ki. Talán ez a magyarázata annak, hogy a P1 a GW182 fehérjével szemben, negatív hatással van az RNS silencingre.

Eredményeink alapján azt is megállapítottuk, hogy a 759 aminosav hosszúságú P1 fehérje 1-383 aminosavig tartó N-terminális régiója hatékony RNS silencing szupressziós aktivitást mutat (Giner et al., 2010). Különböző hosszúságú P1 deléciós sorozat silencing szupressziós vizsgálata során azt találtuk, hogy a 120 aminosavas P1 még nem, de a 210 aminosav hosszúságú P1 már hatékonyan gátolja az RNS silencing-et (Szabo EZ, 2014). A P1 1-120 aminosav hosszúságú régiója két WG/GW domént tartalmaz, ami korábbi eredményeink szerint elvileg elégséges a silencing szupressziós aktivitáshoz (Giner et al., 2010). Eredményeink azonban azt sugallják, hogy a WG/GW doméneket tartalmazó N-terminális mellett a P1 további kb. 80 aminosavas régiója is nélkülözhetetlen az aktivitás szempontjából.

6.10. WG/GW domént tartalmazó virális RNS silencing szupresszorok és működési mechanizmusuk

Egy másik csoporttal szinte egyidőben sikerült bemutatnunk, hogy a virális RNS silencing szupresszorok között is vannak WG/GW domént tartalmazó fehérjék. A *Turnip crinkle virus* p38 köpenyfehérjéről szintén kimutatták, hogy AGO1-kötő aktivitással rendelkezik, azonban az SPMMV P1-gyel szemben a miR171-gyel töltött aktív RISC-et gátló aktivitással nem rendelkezett (Azevedo et al., 2010, Derrien et al., 2012).

A *Tomato ringspot virus* (ToRSV) kapszid fehérje (CP) is silencing szupresszorként funkcionál. A fehérje C-terminálisán található WG/GW domén mutációja a silencing szupresszor aktivitás elvesztésével jár. Továbbá azt találták, hogy a ToRSV CP egy AGO1-kötő fehérje, és az AGO kötéshez elengedhetetlenül szükséges a CP fehérje C-terminális régiójában található WG/GW domén. Mindemellett, a ToRSV CP jelenlétében az AGO1 fehérje szintje lecsökken, és megállapították, hogy AGO1 degradációjában, a *Polyomavirus* P0 fehérjéhez hasonlóan, az autofágia útvonal vesz részt (Karran & Sanfacon 2014). Karran és Sanfacon (2014) azt találta, hogy ToRSV CP jelenlétében a GFP mRNS a poliriboszómákon található meg, ami egybevág azzal az általánosan elfogadott paradigmával, miszerint az RNS silencing szupresszorok megnövelik az RNS silencing-et indukáló mRNS-ek transzlációját (is). Továbbá, a CP illetve a CP^{AG} funkcióvesztéses mutáns jelenlétében nem volt különbség a riportergénként használt GFP mRNS mennyiségében, amiből arra következtettek, hogy a ToRSV CP fehérje az RNS silencinget transzlációs szinten gátolja (Karran & Sanfacon, 2014).

Tanulmányukban ugyanazon az ábrán az is látható (2. ábra C panel), hogy a negatív kontrollként használt üres vektor jelenlétében sem csökkent le a GFP mRNS mennyisége. A szerzők 4 nappal az infiltrálás után vettek mintát. Irodalmi adatok szerint azonban, már 3 nap után is erős RNS silencing indukálódik az agroinfiltrált gén mRNS-e ellen (Bucher, Sijen et al., 2003, Cao, Zhou et al., 2005, Chiu et al., 2010, Diaz-Pendon, Li et al., 2007, Haasnoot, de Vries et al., 2007, Kreuze, Savenkov et al., 2005, Lucy, Guo et al., 2000, Mangwende, Wang et al., 2009, Merai et al., 2005, Qu et al., 2003, Renovell, Carmen Vives et al., 2012, Silhavy et al., 2002, Tenllado, Barajas et al., 2003, Thomas, Leh et al., 2003, Valli et al., 2006, Vargason et al., 2003, Li et al., 2008, Pfeffer et al., 2002). Véleményünk szerint a negatív kontrollban valamilyen okból nem detektáltak a GFP ellen indukálódott RNS silencing-et, ezért vonhatták le azt a valószínűleg nem megfelelő következtetést, hogy a ToRSV CP kizárólag transzlációs szinten gátolja az RNS silencing-et (Karran & Sanfacon, 2014). Véleményünk szerint, nagy biztonsággal csak azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a ToRSV CP az autofágia útvonalon keresztül degradálja az AGO1 fehérjét, így gátolva meg az aktív RISC kialakulását (D1. ábra).

A *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) NSs fehérjéjének RNS silencing szupresszor aktivitását már régóta ismerik (Bucher et al., 2003, De Ronde, Butterbach et al., 2013). Azonban a TSWV NSs fehérjeje avirulencia (Avr) faktorként is működik olyan paradicsom vonalakban, amelyek egy bizonyos domináns rezisztencia (R) gént tartalmaznak. A TSWV-re érzékeny vonalakban az Avr hiperszenzitív reakciót (HR) indukál. Mutációs analízissel térképezték az silencing szupresszor aktivitásért és a HR indukálásért felelős régiókat az NSs fehérjén. Eredményeik szerint az NSs fehérje N-terminálisán (W17) lévő WG/GW domén fontos szerepet játszik a silencing szupresszor aktivitásban és a HR indukálásában egyaránt. Továbbá más aminosavakat találtak az NSs N-terminálisán (NSs 1-133 aminosavig), amelyek szintén esszenciálisnak bizonyultak a silencing szupresszor aktivitáshoz és a HR indukálásához. Az NSs C-terminálisán lévő bizonyos aminosavak mutációja a silencing szupresszor aktivitás megtartásával, de a HR indukáló képesség elvesztésével járt. Eredményeik alapján megállapították, hogy HR indukálásához az NSs N- és C- terminális régiója egyaránt fontos szerepet játszik, azonban nem tudták egyértelműen elkülöníteni a silencing szupresszor és a HR indukáló aktivitásért felelős régiókat (de Ronde et al., 2014 #1777). A WG/GW domén mutációja okozta szupresszor és HR indukáló funkcióvesztés lehetséges magyarázata az, hogy a Trp→Ala aminosav csere a fehérje harmadlagos szerkezetének jelentős átalakulását okozta. Sajnos a TSWV NSs WG/GW doménjének az AGO1 fehérjéhez kapcsolható funkciójáról egyelőre nem áll rendelkezésünkre információ.

Pelargonium line pattern virus (PLPV) p37 köpenyfehérjéjénél RNS silencing szupresszor aktivitást és AGO1-kötő képességet is detektáltak (Perez-Canamas & Hernandez, 2015). Az AGO1 kötés következtében a p37 a nukleoluszba kerül a CMV SD 2b-hez hasonló módon (Duan et al., 2012). Továbbá megállapították azt is, hogy egy WG doménnel is rendelkezik a fehérje. A WG domén mutációjának hatására a p37 elvesztette kis RNS-kötő képességét, azaz silencing szupresszor aktivitását, kapszid fehérje funkcióját és a nukleoláris lokalizációját egyaránt (Perez-Canamas & Hernandez, 2015).

Munkánk nyomán (Giner et al., 2010) több WG/GW domént tartalmazó különböző szupressziós mechanizmusú RNS silencing szupresszort is azonosítottak, de ezek közül egyik sem rendelkezik az SPMMV-hez hasonló aktív RISC-et gátló szupressziós mechanizmussal (D1. ábra).

6.11. A P1 cink finger doménje kulcsszerepet játszik a fehérje silencing szupresszor aktivitásában

Az SPMMV P1 fehérjében azonosítottunk egy C4 típusú cink finger motívumot. Mutációs analízissel bebizonyítottuk, hogy a cink finger fontos szerepet játszik a P1 silencing szupresszor funkciójában. C4 típusú cink finger motívumok találhatók többek között transzkripció faktorokban és RNS kötő fehérjékben is. Az adenovírusok E1 transzkripció aktivátorában a Cys Ser aminosav csere funkcióvesztéssel jár (Webster, Zhang et al., 1991). Az E1 fehérjéhez hasonlóan a *Mungbean yellow mosaic virus-Vigna* (MYMV) AC2-ben lévő cink finger motívum elengedhetetlenül szükséges a transzaktivátor és a silencing szupresszor funkcióhoz (Trinks, Rajeswaran et al., 2005).

Megállapítottuk, hogy az SPMMV P1 WG/GW doménje felelős a silencing szupresszor aktivitásért és az AGO1 kötésért (Giner, Lakatos et al., 2010). 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 doménon helyezkednek el. Így a cink finger domén a P1 fehérje effektor doménjének tekinthető. Az eukarióta élőlényekben lévő WG/GW fehérjék esetében is hasonló dolgot tapasztaltak. Az RNS silencingben kizárólag pozitív hatást kifejtő GW182, KTF1, Tas3 és RNA Pol IV fehérjékben az AGO kötésért és a funkcióhoz szükséges régiókat különböző doménekre térképezték (Bies-

Etheve, Pontier et al., 2009, Chekulaeva, Filipowicz et al., 2009, El-Shami, Pontier et al., 2007, He, Hsu et al., 2009, Till & Ladurner, 2007, Zipprich, Bhattacharyya et al., 2009). A WG/GW fehérjék moduláris felépítésével magyarázható az, hogy a WG/GW fehérjék pozitív és negatív hatást is kifejthetnek.

6.12. A SPMNV P1 feltételezett működési mechanizmusa

Mint ahogy azt bemutattuk az SPMNV P1 egyedi RNS silencing szupresszor mechanizmussal rendelkezik (Giner et al., 2010). A kis RNS-t tartalmazó aktív RISC az RNS silencing végrehajtó lépése, ami a target RNS endonukleolitikus hasításában, és/vagy a transzlációs represszió kialakulásában nyilvánulhat meg a növényekben és az állatokban egyaránt (Brodersen et al., 2008, Burgyan & Havelda, 2011, Li, Liu et al., 2013, Pfaff & Meister, 2013, Silhavy & Burgyan, 2004, Zamore et al., 2000). A *Drosophila* és a humán RISC-ről *in vitro* kísérletek alapján megállapították, hogy működését modellezni lehet a Michaelis-Menten kinetikával. Ez alapján, amennyiben a target RNS jóval nagyobb koncentrációban van jelen, mint a RISC, a RISC kb. 50 vágási ciklus végrehajtására képes. Az elvágott target RNS disszociál a RISC-ről, így válik lehetővé egy újabb target RNS elvágása (Haley & Zamore, 2004). Ezzel szemben az állatokban az AGO2 a GW182 fehérje jelenlétében nem vágja el a target RNS-t hanem a miRNS-nek megfelelő mRNS transzlációját represszálja (Chekulaeva, Filipowicz et al., 2009). Ezért a transzlációs gátlás csak úgy következhet be, ha a miRNS és a target RNS kapcsolatban van (és marad). A növényi AGO1 működése feltehetően szintén leírható a Michaelis-Menten kinetikával és a virális siRNS és a miRNS indukálta target RNS vágására számtalan *in vitro* és *in vivo* példát találunk a szakirodalomban (Azevedo et al., 2010, Baksa, Nagy et al., 2015, Gursinsky, Pirovano et al., 2015, Llave, Xie et al., 2002, Tang, Reinhart et al., 2003). Munkánk során bemutattunk, hogy az SPMNV P1 a virális siRNS és a miRNS indukálta target RNS vágást is gátolja *in vivo* (Giner et al., 2010). Azonban ez a vizsgálati módszer nem alkalmas annak a megállapítására, hogy a P1 pontosan mely AGO fehérjére hat.

Ennek a kérdésnek a megválaszolására Carbonell et al. (2012) módszerét adaptáltuk és megállapítottuk, hogy a P1 az AGO2-t nem, de AGO1 működését hatékonyan gátolja (Kenesi et al., 2017). Továbbá azt is megfigyeltük, hogy a P1 megnöveli az AGO2 aktivitást és az AGO2 mRNS szintjét is *N. benthamiana*-ban. Az AGO2 mRNS transzlációját a miR403/AGO1 gátolja (Harvey et al., 2011), azonban a P1 hatására valószínűleg felszabadul

a translációs gátlás alól, ami AGO2 aktivitást eredményez. De emellett a P1 az AGO2 transzkripció aktivitását is indukálhatja.

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 szuppressziós mechanizmust mutatnak be (Kenesi et al., 2017). Véleményünk szerint a P1 kompetitív, vagy nem-kompetitív módon gátolhatja az AGO1 aktivitást. A cink finger domén, a P1 effektor doménje, az AGO1 megkötéséért versenyezhet target RNS-sel. Az humán AGO2 szerkezet vizsgálatokból tudjuk, hogy az AGO2-ben lévő kis RNS un. „seed” régiója (2-7 nukleotid a kis RNS-en) fontos szerepet játszik a target RNS megkötésében (Schirle & MacRae, 2012). Így a „seed” régió lefedése megakadályozhatja a target RNS kötődését. A szerkezeti vizsgálatok azonban azt is bemutatták, hogy a humán AGO2 L2 régiójában lévő un. helix-7 domén a kis RNS 6. és 7. nukleotidja közé ékelődik be, ami az A-szerkezeti formában lévő kis RNS szerkezetét megtöri, és így gátolja meg a target RNS kötődését. Az is elképzelhető, hogy a P1 effektor doménje a helix-7 beékelődését stabilizálja. A nem-kompetitív AGO1 gátlás úgy is megvalósulhat, hogy a P1 kötődése során oly módon változtatja meg az AGO1 konformációját, hogy a miRNS-mRNS kapcsolat nem alakulhat ki. Véleményünk szerint erre a kérdésre az AGO1/kisRNS/P1 komplex háromdimenziós szerkezetének meghatározása adhatna pontos választ.

Az állati rendszerekben leírt miRNS indukálta translációs gátlás a növényekben is fontos szerepet tölt be az egyedfejlődés és a stresszválasz szabályozásában (Mallory, Hinze et al., 2009). A növényekben az Altered Meristem Program 1 (AMP1) fehérje az endoplazmatikus retikulumban található és AGO1-kötő tulajdonsággal rendelkezik (Li et al., 2013). Az *amp1* mutáns *A. thaliana* növényben több mRNS, közöttük az AGO1 translációjának mértéke is megnövekszik, kizárólag az endoplazmatikus retikulumban lokalizált riboszómákon (Li et al., 2013). Ez alapján azt feltételezik, hogy a miRNS-AGO1-AMP1 komplex miRNS függő módon megkötve tartja a target mRNS-t, ami emiatt alacsonyabb mértékben transzlálódik endoplazmatikus retikulumban lévő riboszómákon. Amennyiben az SPMMV P1 silencing szuppressziós mechanizmusa a target RNS kizárásán alapul, akkor feltehetően a P1 a translációs represszió gátlására is képes, bár ezt a feltevést kísérleti eredmény egyelőre nem bizonyítja.

6.13. A P1 fehérje szerepe az SPMMV patogenitásában

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 (Mukasa, Rubaihayo et al., 2006), kigyógyul a fertőzésből (Baulcombe, 2004). 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 si- és a miRNS-t tartalmazó RISC az SPMMV P1 potenciális target molekulájának tekinthető (Giner et al., 2010). Azonban a P1 nem tud különbséget tenni a si- és a miRNS-t tartalmazó RISC között, így az AGO1/miR403 gátlás 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 (Kenesi et al., 2017).

6.14. Elvesztette-e az SPFMV P1 a silencing szupresszor aktivitását?

A *Potyviridae* családba tartozó SPMMV (*Ipomovirus* nemzetség) és az SPFMV (*Potyvirus* nemzetség) hasonló méretű P1 fehérjét kódol, ami valószínűleg egy korábbi rekombinációs esemény következménye (Valli et al., 2007). Eredményeink szerint az SPFMV P1 nem rendelkezik silencing szupresszor aktivitással (Szabo et al., 2012), amit annak tulajdonítottunk, hogy az SPFMV P1 az SPMMV P1-hez képest csak egy, az AGO1 kötés és a silencing szupresszor aktivitás szempontjából esszenciális WG/GW domént tartalmaz. Továbbá elképzelésünket az is alátámasztotta, hogy az SPFMV enyhe tüneteket okoz különböző *Ipomoea* fajokon (Tugume, Mukasa et al., 2008). Mivel a P1 fehérjék N-terminális viszonylag magas homológiát mutat, az SPFMV P1-ből hiányzó WG/GW domének kialakításával egy silencing szupresszor aktivitással rendelkező, mesterségesen létrehozott P1 fehérjét hoztunk létre, amely az SPMMV P1-hez hasonlóan AGO1-kötő képességgel rendelkezik (Szabo et al., 2012).

Az SPFMV fertőzés során a virális genomi RNS-ről egy kb. 3500 aminosav hosszúságú fehérje transzlálódik, amiből egy proteolitikus hasítás révén keletkezik a 689 aminosav hosszúságú P1 fehérje (Sakai, Mori et al., 1997). Később megfigyelték azt, hogy a kb. 3500 aminosavas fehérje mellett egy másik fehérje is keletkezik, ami a stop (TAG) kodonnal végződik, ezért a genomi RNS további transzlációja befejeződik (Rodamilans, Valli et al., 2015). A DNS és RNS polimerázoknál ismert, hogy az ismétlődéseket tartalmazó

régióknál a polimeráz bizonyos valószínűséggel leválik a templátról (megcsúszás, slippage), az átíródnak nukleinsavlánc 3' vége elválik a templáttól, a neki nem a megfelelő pozícióba hibridizálódik vissza, és a polimeráz folytatja a lánchosszabbítást. A nukleotid kihagyás, vagy extra nukleotid beépülése a leolvasási keret eltolódásával jár, így a polimeráz "slippage" pozíciója után megváltozott aminosav sorrendű fehérjét keletkezik (Viguera, Canceill et al., 2001). Az SPFMV P1 leolvasási kerete tartalmaz egy GAAAAAA (GA₆) motívumot, ahol ha megcsúszik az virális RNS polimeráz, a képződő RNS lánc egy adeninnel kevesebbet tartalmaz és ennek hatására a 679 aminosavas ún. P1-PISPO fehérje keletkezik (Rodamilans et al., 2015). 35S-GFP riportergénnel végzett agroinfiltrációs teszttel megállapították, hogy a P1-PISPO (GA₅) RNS-ről transzlálódó fehérje silencing szupresszor tulajdonsággal rendelkezik (Mingot, Valli et al., 2016). A P1-PISPO fehérje négy WG/GW domént is tartalmaz, azonban AGO1-kötő képességét nem sikerült kimutatni (Dr. Juan José Lopez-Moya, személyes közlés). Továbbá megvizsgálták a wt SPFMV P1 fehérje silencing szupressziós aktivitását is, és csoportunkhoz hasonló módon negatív eredményt kaptak (Mingot et al., 2016, Szabo et al., 2012). Ez nem meglepő, ugyanis az agroinfiltrációs teszt nem tartalmazza a virális RNS polimerázt, ami a P1-PISPO fehérje létrehozásában esszenciális szerepet játszik.

A két csoport eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy kiindulási hipotézisünk hibás volt. Az SPFMV P1 nem veszítette el a VSR aktivitását, hanem a virális RNS polimeráz bizonyos gyakorisággal bekövetkező megcsúszása miatt a leolvasási keret eltolódik és az így létrejött P1-PISPO fehérje az SPFMV silencing szupresszora. Az SPFMV RdRP kb. minden tizedik replikációs ciklus során "csúszik meg", ezért P1-PISPO mRNS alacsonyabb koncentrációban van jelen a genomi RNS-hez képest, kevesebb P1-PISPO keletkezik. Ez magyarázhatja a gyenge tüneteket és az alacsony vírustitert is (Mingot et al., 2016).

6.15. Lehet-e az RNS silencing szupresszorokat "erősség" alapján rangsorolni?

A növényi RNS silencing szupresszorok tesztelésére alkalmazott leggyakoribb módszer az *Agrobacterium* által közvetített tranziens expresszió. Az ezt követő mRNS és fehérje vizsgálatok azt mutatják, hogy a legtöbb szupresszor hatékonyan gátolja az RNS silencing-et, feltehetőleg azért, mert a szupresszor fehérje magas koncentrációban van jelen a sejtben. Korábban mi és mások is bemutatták, hogy az RNS silencing szupresszió mértéke függ a szupresszor fehérje koncentrációjától, *in vitro* és *in vivo* is (Havelda et al., 2005, Lakatos et al., 2006, Lakatos et al., 2004). Zamore (2004) hipotézise szerint a silencing szupresszorral rendelkező vírusok sikeres fertőzésének egyik feltétele, hogy a fertőzött sejtben a szupresszor fehérje koncentrációjának magasabbnak kell lennie a szupresszor és a target molekulájának

disszociációs állandójánál, valamint a target molekula sejtbeli koncentrációjánál (Zamore, 2004). Sajnos nagy kihívást jelent a szupresszor fehérje és a target molekula sejtbeli koncentrációjának megmérése, de a szupresszor és a target molekula disszociációs állandójának megmérése pl. az siRNS-kötő silencing szupresszorok esetében (CIRV és CymRSV p19, RHBV NSs) *in vitro* megoldható (Vargason et al., 2003) (Lakatos et al., 2004) (Hemmes et al., 2007).

A vírusfertőzés során megjelenő ds replikációs intermedierek, vagy a virális genomi és antigenomi RNS-eken kialakuló ún. "hairpin" alakzatok is hatékonyan indukálják az RNS silencinget (Burgyan & Havelda, 2011, Molnar, Csorba et al., 2005. A TCV CP és a PoLV p14 fehérjéi dsRNS-kötő képességük által lefedik a virális RNS ds szakaszait, így tudják hatékonyan megakadályozni a virális RNS felismerését, a DCL enzimek siRNS processzálo aktivitását, ezáltal az RNS silencing kialakulását (Merai et al., 2006). Azonban a dsRNS-kötő növényi silencing szupresszorok esetében a szupresszor és a target molekula disszociációs állandójáról nincs információ.

Az AGO degradációját elősegítő (PVX p25, BWYV P0, ToRSV CP) és az aktív RISC-et gátló (SPMMV P1, PLPV p37) szupresszorok esetében a szupresszor –target fehérje (AGO) kölcsönhatás erősségét meg lehetne mérni, pl. izotermális titrációs kalorimetriával (ITC), amihez azonban viszonylag nagy tisztaságú és fajlagos aktivitású fehérjékre van szükség.

A modell igazolásához szükséges paramétereket, mint a szupresszor fehérje és a target molekulája sejtbeli koncentrációjának meghatározása, egyelőre nem sikerült adatot találni.

Így a silencing szupresszorok „erősségének” megbecsülésére egyelőre csak a matematikai modellek állnak rendelkezésre. Groenenboom és Hogeweg számos paramétert, köztük a Zamore (2004) által javasolt paramétereket is bevonva matematikai modellel jellemezte a vírus szaporodást sejtszinten, valamint a vírus terjedését, az eddig ismert négy silencing szupressziós stratégia, úgymint dsRNS kötés, siRNS kötés, AGO degradáció és aktív RISC gátlás esetében (Groenenboom & Hogeweg, 2012). Eredményeik szerint sejtszinten mind a négyféle silencing szupresszor növelte a virális RNS koncentrációját, azonban az AGO inaktiváció és az aktív RISC gátlása hatékonyabb stratégia volt, mint a ds- vagy a siRNS kötés. A különbség a fertőzés előrehaladtával csökkent, de a ds- vagy a siRNS-kötő stratégia nem érte el az AGO inaktivációs és az aktív RISC gátló szupresszorok hatékonyságát (Groenenboom & Hogeweg, 2012). Véleményünk szerint ez a modell nem megfelelően jellemzi a sejtszintű eseményeket, mert két fontos paraméterrel nem számolt. (1) Az aktív RISC gátló szupresszorok esetében kizárólag a virális siRNS-ek AGO-ba való betöltésével, illetve ezek gátlásával

számol. Mint ahogyan korábban is leírtuk, az SPMMV P1 nem tud különbséget tenni a virális si- és a miRNS-sel töltött AGO (RISC) között és a miRISC-ek koncentrációja feltehetőleg magasabb, mint siRISC-eké, ezért a fertőzés kezdetén a relatív alacsony P1 koncentráció a miRISC-ek és a siRISC-ek megkötésével jelentősen csökkenheti az antivirális RNS silencing hatékonyságát. Az AGO inaktivációs (degradációs) aktivitással rendelkező szupresszorok (pl. BWYV P0) a *de novo* keletkező AGO fehérjék ellen hatásosak, amelyek nem tartalmazzak kis RNS-t (Csorba et al., 2010). (2) Elméletileg, ha a P0 transzkripció és transzláció rátája magasabb fehérjekoncentrációt biztosítana, mint a *de novo* AGO koncentráció, akkor az AGO inaktivációján alapuló stratégia nagyon hatékony lehet. Azonban a *Beet western yellows virus* esetében kimutatták, hogy a P0 ORF-e a többi virális fehérjéhez képest alacsonyabb szinten transzlálódik, ami alacsonyabb P0 koncentrációt biztosít. Ha a P0 transzlációjának hatékonyságát a genomi RNS mutációjával megnövelték, a mutáció nem volt stabil, az ATG transzlációs iniciációs kodon a kevésbé hatékony ACG-re, GTG-re vagy ATA-ra változott meg a vírus replikációja során (Pfeffer, Dunoyer et al., 2002). Az alacsony P0 koncentráció alacsonyabb vírustitert és gyengébb tüneteket okoz.

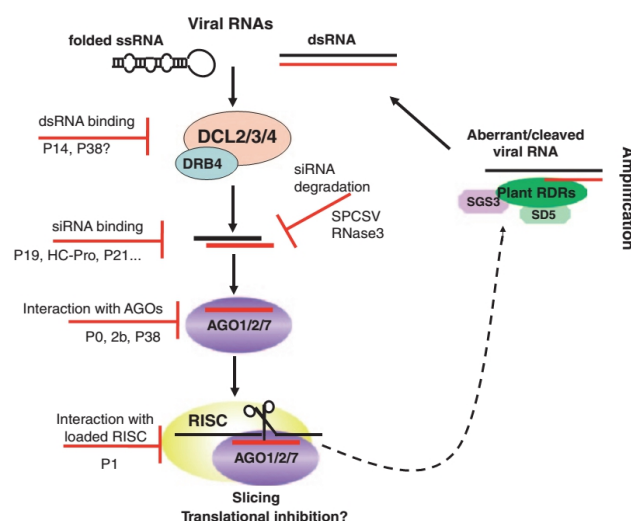
Ugyanabban a tanulmányban a szerzők modellezték szerint a különböző silencing szupresszor mechanizmusok hatását a vírus terjedésére. Egy pontból kiinduló sugárirányban történő terjedést modellezték és a kiszámolták az adott sugárhoz tartozó virális RNS mennyiségét is. Eredményeik szerint a ds- és a siRNS-kötő szupresszorok egységnyi idő alatt gyorsabb sejtről-sejtre való terjedést biztosítottak, így nagyobb felületet fertőztek meg, mint az AGO inaktivációs és az aktív RISC gátló szupresszorokkal rendelkező vírusok. Továbbá, a fertőzött területen a magas víruskoncentrációval jellemezhető sejtek aránya jóval magasabb volt a ds- és a siRNS-kötő szupresszorok hatására, mint az AGO inaktivációs és az aktív RISC gátló szupresszorok esetében. A szerzők szerint ez azért valószínű, mert a ds- és a siRNS-kötő szupresszorok a siRNS képződés vagy a siRNS-ek AGO-ba való beépülését akadályozzák meg, ami jelentősen lecsökkenti a szabad virális siRNS-ek koncentrációját. Ugyanis a szabad siRNS-ek sejtről-sejtre való terjedése hatékony RNS silencing-et indukál, ezzel ellentétben az SPMMV P1 és a BWYV P0 csak a lokális (sejtszintű) silencing-et gátolja. Így a szupressziós mechanizmust tekintve elképzelhető a silencing szupresszorok közötti „erősségbeli” különbség, azonban véleményünk szerint csak abban az esetben, ha a különböző szupresszorok koncentrációja közel azonos. Ezt pedig csak *Agrobacterium* mediálta tranziens expresszióval lehet elérni, ami nem megfelelő modellje a vírusfertőzésnek. Így a szerzők modellje véleményünk szerint nem jól közelíti az *in vivo* megfigyeléseket (Groenenboom & Hogeweg, 2012).

Összefoglalva, egy RNS silencing szupresszor “erősségét” a vírus által biztosított transzkripció és transzláció ráta határozza meg, ami jól korrelál a vírus által okozott tünetek mértékével *in vivo*.

6.16. A virális silencing szupresszorok többféle módon gátolják az RNS silencing-et

A virális szupresszorok az előbb említett négyféle szupressziós stratégia mellett még egy nagyon érdekes mechanizmus segítségével csökkentik az RNS silencing mértékét. Havelda és munkatársai (2010) megfigyelték, hogy CIRV fertőzés során a miR168 mennyisége jelentősen megnövekszik a fertőzött sejtekben (Varallyay et al., 2010). A miR168-ról ismert, hogy az antivirális védekezés első vonalába tartozó AGO1 mRNA transzlációját gátolja (Vaucheret et al., 2006). Továbbá Havelda és munkatársai (2010) megállapították, hogy vírusfertőzés során az AGO1 fehérje szint, feltehetőleg a miR168 következtében jelentősen lecsökkent, ami az antivirális RNS silencing hatékonyságának csökkenésével járt együtt. Végül meghatározták, hogy a CIRV fehérjéi közül egyedül a p19 szupresszor indukálta a miR168 expressziójának növekedését és növelte az AGO1 transzlációs gátlását (Varallyay et al., 2010). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a p19 indirekt módon részt vesz a lokális silencing gátlásában is.

Havelda és munkatársai (2010) más növényi vírusok silencing szupresszorait vizsgálva megállapította, hogy evolúciós tekintetben távoli vírusok silencing szupresszorai hasonló aktivitással bírnak, bár a jelenség pontos mechanizmusa egyelőre még nem ismert (Varallyay & Havelda, 2013).



D1. ábra A virális silencing szupresszorok hatása az antivirális silencing útvonalán (Szittyá & Burgyán 2013)

6.17. Az RNS silencing szupresszorok alkalmazása a biotechnológiában

Széleskörben elfogadott az az elmélet, mely szerint az RNS silencing legfontosabb feladata az invazív nukleinsavak elleni védelem, úgymint az exogén eredetű vírusok, és az endogén eredetű transzpozonok (Tang & Galili, 2004). Ilyen invazív nukleinsavnak számítanak a transzgenikus növényekbe integrált transzgének, melyek, főleg a magas kópiaszám miatt, óriási mennyiségben termelik az általuk kódolt mRNS-t. A különböző célból létrehozott transzgenikus növények esetében azt tapasztalták, hogy hosszútávon jelentős különbség van az egyes vonalak között a transzgén által termelt fehérje mennyiségében (Matzke, Primig et al., 1989, Napoli, Lemieux et al., 1990). Később megállapították, hogy a transzgén expressziójának csökkenését az ellene indukálódó RNS silencing okozza (Scholthof, 2007). A virális RNS silencing szupresszorok azonosítása és funkciójának megismerése járult hozzá annak az elképzelésnek a kialakulásához, hogy az RNS silencing szupresszorokkal a transzgén expressziójuk stabilizálható. Ugyanakkor az RNS silencing szupresszorok hatása nem specifikus, azaz pl. egy bizonyos miRNS funkcióját nem lehet velük kiiktatni, csak az RNS silencing globális gátlására alkalmasak (Burgyán & Havelda, 2011) (Baulcombe, 2002). Továbbá fontos azt is megjegyezni, hogy mivel az RNS silencing szupresszorok a vírus patogenezisének meghatározó tényezői, ezért stabil transzgenikus növényekben történő expressziója jelentős fenotípusos elváltozásokat, úgymint törpe növekedés, levél fodrosodás, vagy nekrotikus foltok megjelenése, okozhat. Ezt elkerülendő, olyan transzgenikus vonalakat kell szelektálni, amelyek olyan szinten képesek termelni az RNS silencing szupresszort, hogy az ki tudja fejteni a hatását, de ne okozzon erős fenotípusos változást. A stabil transzgenikus növények használatának ezért hatékony alternatívája lehet a termeltetni kívánt fehérje és az RNS silencing szupresszor *Agrobacterium* mediálta tranziens expresszáltatása (Voinnet, Rivas et al., 2003), vagy a virális vektorok alkalmazása.

Modell rendszerként stabil transzgenikus növényeket használva a siRNS-kötő képességgel rendelkező TEV HC-Pro-val jelentős mértékben sikerült a GFP fehérje mennyiségét megemelni (Ma, Liu et al., 2009). De ez a módszer alkalmas a humán gyógyászatban fontos fehérjék termeltetésére is. A *Yersinia pestis* F1-V antigén expressziója nem volt detektálható transzgenikus paradicsom növények termésében, a TBSV p19 fehérje bejuttatása drasztikus módon megemelte a *Yersinia pestis* F1-V fehérje mennyiségét (Alvarez, Pinyerd et al., 2008). Szintén stabil transzgenikus növényekben *Artichoke mottled crinkle virus*

p19 fehérje koepresszáltatásával 50-100-szorosára sikerült megemelni a tenaszcin-C tumormarker elleni ellenanyag termelődését (Villani, Morgun et al., 2009).

A közelmúltban az Afrikában kitört Ebola járvány gyors terjedése azonnali beavatkozást igényelt, így nem volt idő transzgenikus növények létrehozására. Korábban több Ebola ellenes humán-egér hibrid neutralizáló ellenanyagot is izoláltak. Az ellenanyagok nehéz és a könnyű láncait PVX és TMV alapú vírus vektorokba illesztették és ko-infekcióval rövid idő alatt elő lehetett állítani az aktív ellenanyagot. Az ellenanyagok mennyiségi előállítását a vírusok RNS silencing szupresszora biztosította (Giritch, Marillonnet et al., 2006). Az így kialakított három komponensű Zmapp ellenanyag koktél hatásos volt az Ebola Guinea-i törzse ellen, így fontos szerepet játszott a járvány megfékezésében (Qiu, Wong et al., 2014).

Ezek az eredmények nagyban hozzájárultak az ún. „molecular farming” technológia hatékonyságának növekedéséhez (Circelli, Donini et al., 2010).

7. AZ EREDMÉNYEK RÖVID ÖSSZEFOGLALÁSA

1. A heterológ *Drosophila in vitro* silencing rendszer használatával megállapítottuk, hogy a CymRSV p19 silencing szupresszora a duplaszálú kis RNS-ek megkötésével akadályozza meg az RNS silencing kialakulását.
2. *In vitro* és *in vivo* is igazoltuk, hogy az RNS silencing szupresszió hatékonysága függ a szupresszor fehérje-ligand koncentrációjának arányától.
3. A *Drosophila in vitro* rendszert tovább fejlesztve több szupresszor fehérjéről megállapítottuk, hogy siRNS tulajdonsággal rendelkezik.
4. Kidolgoztunk egy GFP riportergénen alapuló tesztrendszert, amivel négy VSR-t megvizsgálva bebizonyítottuk, hogy a ds siRNS kötő silencing szupresszorok az egyszálú siRNS-sel töltött RISC-re (aktív RISC) nincsenek hatással. *In vitro* és *in vivo* eredményeink alapján valószínűsítettük, hogy siRNS kötés egy gyakori RNS silencing gátló stratégia.
5. A P1 fehérjét azonosítottunk az SPMMV silencing szupresszoraként. *In vitro* és *in vivo* analízissel kizártuk, hogy az SPMMV P1 az eddig ismert siRNS processzinget gátló, vagy siRNS kötő silencing szupresszor mechanizmussal rendelkezik.
6. A 4. pontban ismertetett GFP riportergénen alapuló tesztrendszer segítségével, amivel kizárólag az aktív RISC gátlását vizsgálhatjuk meg, igazoltuk, hogy az SPMMV P1 az első növényi RNS silencing szupresszor, ami az egyszálú siRNS-sel töltött RISC-re van hatással. Ezzel egy új silencing szupresszor stratégiát írtunk le.
7. Megállapítottuk, hogy az SPMMV P1 egy AGO1 kötő fehérje. Igazoltuk, hogy a P1 fehérjében található ún. WG/GW motívumok elengedhetetlenül szükségesek a szupresszor aktivitáshoz és az AGO1 kötéshez. Az állati és növényi szervezetekben számos WG/GW fehérjét ismernek, amelyek pozitív hatással vannak az RNS silencing folyamatára. Az SPMMV P1 az első WG/GW fehérje, ami a negatív módon szabályozza az AGO aktivitást.

8. Térképeztük az SPMMV P1 fehérjét. Megállapítottuk, hogy a három WG/GW domént tartalmazó N-terminális első 131 aminosav mellett még további 79 aminosav szükséges a vad típusú P1-hez hasonló erősségű silencing szupresszor aktivitáshoz.

9. Bebizonyítottuk, hogy az SPMMV P1 az antivirális RNS silencingben elsődleges és másodlagos védelmi vonalakban működő AGO1 és AGO2 fehérjék közül csak az AGO1 funkcióját gátolja. A P1 az AGO2 aktivitást annak ellenére nem gátolja, hogy az AGO1-hez hasonlóan képes fizikai kapcsolatba lépni vele.

9. Megállapítottuk, hogy a P1 fehérjében található cink finger motívum fontos szerepet játszik a silencing szupresszor aktivitásban. Továbbá eredményeink azt mutatták, hogy a cink finger domén a P1 fehérje effektor doménjeként funkcionál.

10. Kísérleteink eredményei alapján javaslatot tettünk az SPMMV P1 pontos molekuláris mechanizmusára: A P1 kapcsolódása az AGO1/kis RNS komplexhez meggátolja a target RNS kapcsolódását, ami az AGO1 aktivitás megszűnéséhez vezet.

11. Létrehoztuk az első mesterséges silencing szupresszor fehérjét. Az SPFMV P1 fehérje elsődleges szerkezete nagy hasonlóságot mutat az SPMMV P1-gyel, azonban az SPMMV P1-gyel szemben csak egy WG/GW motívumot tartalmaz és nem mutatott RNS silencing szupresszor aktivitást. Azonban a „hiányzó” WG/GW motívumokat beépítve az SPFMV P1-be silencing szupresszor aktivitású fehérjét hoztunk létre.

12. Bebizonyítottuk, hogy a „gain of function” SPFMV P1 mutáns az SPMMV P1-hez hasonló módon gátolja az RNS silencing-et.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Kemény Lajosnak, jelenlegi munkahelyi vezetőmnek, a feltétlen támogatásáért. Köszönetet szeretnék mondani Prof. Dr. Burgyán Józsefnek támogatásáért, az érdekes és azóta is időszerű témákért, a kiváló tréningért és azért, hogy a más területen szerzett addigi tapasztalataimat sikerrel kamatoztathattam laboratóriumában. Köszönöm Prof. Dr. Silhavy Dánielnek, Dr. Szittya Györgynek és Dr. Hornyik Csabának a közös munkában való részvételt, és azt, hogy sokat tanulhattam tőlük. Továbbá köszönetet szeretnék mondani korábbi témavezetőmnek Prof. Dr. Tora Lászlónak és Dr. Dallmann Gézának a kiváló tréningért.

Köszönöm korábbi PhD hallgatóimnak, Dr. Lózsa Ritának, Dr. Manczinger Máténak és Dr. Szabó Editnek áldozatos munkájukat. Köszönettel tartozom jelenlegi munkatársaimnak Dr. Kenesi Erzsébetnek és Vörös Andreának kiváló munkájukért.

Köszönöm feleségemnek, Dr. Tekulics Évának, biztatását és feltétlen támogatását.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- Adams MJ, Antoniw JF, Fauquet CM (2005) Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. *Archives of Virology* 150: 459-479
- Alvarez ML, Pinyerd HL, Topal E, Cardineau GA (2008) P19-dependent and P19-independent reversion of F1-V gene silencing in tomato. *Plant Molecular Biology* 68: 61-79
- Ameres SL, Martinez J, Schroeder R (2007) Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC. *Cell* 130: 101-12
- Anandalakshmi R, Marathe R, Ge X, Herr JM, Jr., Mau C, Mallory A, Pruss G, Bowman L, Vance VB (2000) A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 290: 142-4
- Anandalakshmi R, Pruss GJ, Ge X, Marathe R, Mallory AC, Smith TH, Vance VB (1998) A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13079-84
- Azevedo J, Garcia D, Pontier D, Ohnesorge S, Yu A, Garcia S, Braun L, Bergdoll M, Hakimi MA, Lagrange T, Voinnet O (2010) Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes Dev* 24: 904-15
- Baksa I, Nagy T, Barta E, Havelda Z, Varallyay E, Silhavy D, Burgyan J, Szittya G (2015) Identification of *Nicotiana benthamiana* microRNAs and their targets using high throughput sequencing and degradome analysis. *BMC Genomics* 16: 1025
- Baulcombe D (2002) Viral suppression of systemic silencing. *Trends Microbiol* 10: 306-8
- Baulcombe D (2004) RNA silencing in plants. *Nature* 431: 356-63
- Baumberger N, Tsai CH, Lie M, Havecker E, Baulcombe DC (2007) The Polerovirus silencing suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation. *Curr Biol* 17: 1609-14
- Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, Mills AA, Elledge SJ, Anderson KV, Hannon GJ (2003) Dicer is essential for mouse development. *Nature Genetics* 35: 215-217
- Bies-Etheve N, Pontier D, Lahmy S, Picart C, Vega D, Cooke R, Lagrange T (2009) RNA-directed DNA methylation requires an AGO4-interacting member of the SPT5 elongation factor family. *EMBO Rep*
- Brigneti G, Voinnet O, Li WX, Ji LH, Ding SW, Baulcombe DC (1998) Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J* 17: 6739-46
- Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, Dunoyer P, Yamamoto YY, Sieburth L, Voinnet O (2008) Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* 320: 1185-90

Brown KM, Chu CY, Rana TM (2005) Target accessibility dictates the potency of human RISC. *Nat Struct Mol Biol* 12: 469-70

Bucher E, Sijen T, De Haan P, Goldbach R, Prins M (2003) Negative-strand tospoviruses and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. *J Virol* 77: 1329-36

Burgyan J, Havelda Z (2011) Viral suppressors of RNA silencing. *Trends Plant Sci* 16: 265-72

Burgyan J, Rubino L, Russo M (1996) The 5'-terminal region of a tombusvirus genome determines the origin of multivesicular bodies. *J Gen Virol* 77 (Pt 8): 1967-74

Burgyan J, Russo M (1998) Tombusvirus isolation and RNA extraction. *Methods Mol Biol* 81: 225-30

Cao X, Zhou P, Zhang X, Zhu S, Zhong X, Xiao Q, Ding B, Li Y (2005) Identification of an RNA silencing suppressor from a plant double-stranded RNA virus. *J Virol* 79: 13018-27

Chao JA, Lee JH, Chapados BR, Debler EW, Schneemann A, Williamson JR (2005) Dual modes of RNA-silencing suppression by Flock House virus protein B2. *Nat Struct Mol Biol* 12: 952-7

Carbonell A, Fahlgren N, Garcia-Ruiz H, Gilbert KB, Montgomery TA, Nguyen T, Cuperus JT, Carrington JC (2012) Functional analysis of three Arabidopsis ARGONAUTES using slicer-defective mutants. *Plant Cell* 24: 3613-29

Chapman EJ, Prokhnevsky AI, Gopinath K, Dolja VV, Carrington JC (2004) Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev* 18: 1179-86

Chekulaeva M, Filipowicz W, Parker R (2009) Multiple independent domains of dGW182 function in miRNA-mediated repression in Drosophila. *RNA* 15: 794-803

Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R (2005) TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436: 740-4

Chiba M, Reed JC, Prokhnevsky AI, Chapman EJ, Mawassi M, Koonin EV, Carrington JC, Dolja VV (2006) Diverse suppressors of RNA silencing enhance agroinfection by a viral replicon. *Virology* 346: 7-14

Chiu MH, Chen IH, Baulcombe DC, Tsai CH (2010) The silencing suppressor P25 of Potato virus X interacts with Argonaute1 and mediates its degradation through the proteasome pathway. *Molecular Plant Pathology* 11: 641-649

Chung BYW, Miller WA, Atkins JF, Firth AE (2008) An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 5897-5902

Circelli P, Donini M, Villani ME, Benvenuto E, Marusic C (2010) Efficient Agrobacterium-based transient expression system for the production of biopharmaceuticals in plants. *Bioeng Bugs* 1: 221-4

Colinet D, Kummert J, Lepoivre P (1998) The nucleotide sequence and genome organization of the whitefly transmitted sweetpotato mild mottle virus: a close relationship with members of the family Potyviridae. *Virus Res* 53: 187-96

Cotton S, Grangeon R, Thivierge K, Mathieu I, Ide C, Wei TY, Wang AM, Laliberte JF (2009) Turnip Mosaic Virus RNA Replication Complex Vesicles Are Mobile, Align with

Microfilaments, and Are Each Derived from a Single Viral Genome. *Journal of Virology* 83: 10460-10471

Csorba T, Bovi A, Dalmay T, Burgyan J (2007) The p122 subunit of Tobacco Mosaic Virus replicase is a potent silencing suppressor and compromises both small interfering RNA- and microRNA-mediated pathways. *J Virol* 81: 11768-80

Csorba T, Kontra L, Burgyan J (2015) viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology* 479-480: 85-103

Csorba T, Lozsa R, Hutvagner G, Burgyan J (2010) Polerovirus protein P0 prevents the assembly of small RNA-containing RISC complexes and leads to degradation of ARGONAUTE1. *Plant J* 62: 463-72

Cuellar WJ, Kreuze JF, Rajamaki ML, Cruzado KR, Untiveros M, Valkonen JP (2009) Elimination of antiviral defense by viral RNase III. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 10354-8

Cuellar WJ, Tairo F, Kreuze JF, Valkonen JP (2008) Analysis of gene content in sweet potato chlorotic stunt virus RNA1 reveals the presence of the p22 RNA silencing suppressor in only a few isolates: implications for viral evolution and synergism. *J Gen Virol* 89: 573-82

Czech B, Hannon GJ (2016) One Loop to Rule Them All: The Ping-Pong Cycle and piRNA-Guided Silencing. *Trends in Biochemical Sciences* 41: 324-337

Dalmay T, Hamilton A, Rudd S, Angell S, Baulcombe DC (2000) An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 101: 543-53

Dalmay T, Rubino L, Burgyan J, Kollar A, Russo M (1993) Functional analysis of cymbidium ringspot virus genome. *Virology* 194: 697-704

De Ronde D, Butterbach P, Lohuis D, Hedil M, Van Lent JWM, Kormelink R (2013) Tsw gene-based resistance is triggered by a functional RNA silencing suppressor protein of the Tomato spotted wilt virus. *Molecular Plant Pathology* 14: 405-415

Deleris A, Gallego-Bartolome J, Bao J, Kasschau KD, Carrington JC, Voinnet O (2006) Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 313: 68-71

Derrien B, Baumberger N, Schepetilnikov M, Viotti C, De Cillia J, Ziegler-Graff V, Isono E, Schumacher K, Genschik P (2012) Degradation of the antiviral component ARGONAUTE1 by the autophagy pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 15942-6

Diaz-Pendon JA, Li F, Li WX, Ding SW (2007) Suppression of antiviral silencing by cucumber mosaic virus 2b protein in Arabidopsis is associated with drastically reduced accumulation of three classes of viral small interfering RNAs. *Plant Cell* 19: 2053-63

Ding L, Spencer A, Morita K, Han M (2005) The developmental timing regulator AIN-1 interacts with miRISCs and may target the argonaute protein ALG-1 to cytoplasmic P bodies in *C. elegans*. *Molecular Cell* 19: 437-447

Ding SW, Voinnet O (2007) Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 130: 413-26

Dong Z, Han MH, Fedoroff N (2008) The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 9970-5

Duan CG, Fang YY, Zhou BJ, Zhao JH, Hou WN, Zhu H, Ding SW, Guo HS (2012) Suppression of Arabidopsis ARGONAUTE1-mediated slicing, transgene-induced RNA silencing, and DNA methylation by distinct domains of the Cucumber mosaic virus 2b protein. *Plant Cell* 24: 259-74

Dunoyer P, Himber C, Voinnet O (2005) DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal. *Nat Genet* 37: 1356-60

Dunoyer P, Lecellier CH, Parizotto EA, Himber C, Voinnet O (2004) Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell* 16: 1235-50

Eamens A, Vaistij FE, Jones L (2008) NRPD1a and NRPD1b are required to maintain post-transcriptional RNA silencing and RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis. *Plant J* 55: 596-606

Ecker JR, Davis RW (1986) Inhibition of gene expression in plant cells by expression of antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 5372-6

El-Shami M, Pontier D, Lahmy S, Braun L, Picart C, Vega D, Hakimi MA, Jacobsen SE, Cooke R, Lagrange T (2007) Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes Dev* 21: 2539-44

Elkayam E, Kuhn CD, Tocilj A, Haase AD, Greene EM, Hannon GJ, Joshua-Tor L (2012) The structure of human argonaute-2 in complex with miR-20a. *Cell* 150: 100-10

Endres MW, Gregory BD, Gao Z, Foreman AW, Mlotshwa S, Ge X, Pruss GJ, Ecker JR, Bowman LH, Vance V (2010) Two plant viral suppressors of silencing require the ethylene-inducible host transcription factor RAV2 to block RNA silencing. *PLoS Pathog* 6: e1000729

Eystathioy T, Chan EKL, Tenenbaum SA, Keene JD, Griffith K, Fritzler MJ (2002) A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of

human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. *Molecular Biology of the Cell* 13: 1338-1351

Feinberg AP, Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132: 6-13

Feinberg EH, Hunter CP (2003) Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science* 301: 1545-1547

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-11

Fukunaga R, Han BW, Hung JH, Xu J, Weng ZP, Zamore PD (2012) Dicer Partner Proteins Tune the Length of Mature miRNAs in Flies and Mammals (vol 151, pg 533, 2012). *Cell* 151: 912-912

Garcia D (2008) A miRacle in plant development: Role of microRNAs in cell differentiation and patterning. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 19: 586-595

Garcia D, Garcia S, Pontier D, Marchais A, Renou JP, Lagrange T, Voinnet O (2012) Ago Hook and RNA Helicase Motifs Underpin Dual Roles for SDE3 in Antiviral Defense and Silencing of Nonconserved Intergenic Regions. *Molecular Cell* 48: 109-120

Ghildiyal M, Zamore PD (2009) Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet* 10: 94-108

Giner A, Lakatos L, Garcia-Chapa M, Lopez-Moya JJ, Burgyan J (2010) Viral protein inhibits RISC activity by argonaute binding through conserved WG/GW motifs. *PLoS Pathog* 6: e1000996

Giraldez AJ, Mishima Y, Rihel J, Grocock RJ, Van Dongen S, Inoue K, Enright AJ, Schier AF (2006) Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* 312: 75-9

Giritch A, Marillonnet S, Engler C, van Eldik G, Botterman J, Klimyuk V, Gleba Y (2006) Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 14701-14706

Goto K, Kobori T, Kosaka Y, Natsuaki T, Masuta C (2007) Characterization of silencing suppressor 2b of cucumber mosaic virus based on examination of its small RNA-binding abilities. *Plant Cell Physiol* 48: 1050-60

Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R (2005) Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 123: 631-40

Groenenboom MAC, Hogeweg P (2012) Modelling the dynamics of viral suppressors of RNA silencing. *Journal of the Royal Society Interface* 9: 436-447

- Gursinsky T, Pirovano W, Gambino G, Friedrich S, Behrens SE, Pantaleo V (2015) Homeologs of the *Nicotiana benthamiana* Antiviral ARGONAUTE1 Show Different Susceptibilities to microRNA168-Mediated Control. *Plant Physiology* 168: 938-+
- Haasnoot J, de Vries W, Geutjes EJ, Prins M, de Haan P, Berkhout B (2007) The Ebola virus VP35 protein is a suppressor of RNA silencing. *PLoS Pathog* 3: e86
- Haley B, Zamore PD (2004) Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nat Struct Mol Biol* 11: 599-606
- Han JJ, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, Sohn SY, Cho YJ, Zhang BT, Kim VN (2006) Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 125: 887-901
- Havelda Z, Hornyik C, Crescenzi A, Burgyan J (2003) In situ characterization of *Cymbidium Ringspot* Tombusvirus infection-induced posttranscriptional gene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *J Virol* 77: 6082-6
- Havelda Z, Hornyik C, Valoczi A, Burgyan J (2005) Defective interfering RNA hinders the activity of a tombusvirus-encoded posttranscriptional gene silencing suppressor. *J Virol* 79: 450-7
- He XJ, Hsu YF, Zhu S, Wierzbicki AT, Pontes O, Pikaard CS, Liu HL, Wang CS, Jin H, Zhu JK (2009) An effector of RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis* is an ARGONAUTE 4- and RNA-binding protein. *Cell* 137: 498-508
- Hemmes H, Lakatos L, Goldbach R, Burgyan J, Prins M (2007) The NS3 protein of Rice hoja blanca tenuivirus suppresses RNA silencing in plant and insect hosts by efficiently binding both siRNAs and miRNAs. *RNA* 13: 1079-89
- Himber C, Dunoyer P, Moissiard G, Ritzenthaler C, Voinnet O (2003) Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO J* 22: 4523-33
- Hunter C, Willmann MR, Wu G, Yoshikawa M, de la Luz Gutierrez-Nava M, Poethig SR (2006) Trans-acting siRNA-mediated repression of ETTIN and ARF4 regulates heteroblasty in *Arabidopsis*. *Development* 133: 2973-81
- Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293: 834-8
- Iki T, Yoshikawa M, Meshi T, Ishikawa M (2012) Cyclophilin 40 facilitates HSP90-mediated RISC assembly in plants. *EMBO J* 31: 267-78
- Iki T, Yoshikawa M, Nishikiori M, Jaudal MC, Matsumoto-Yokoyama E, Mitsuhashi I, Meshi T, Ishikawa M (2010) In vitro assembly of plant RNA-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperone HSP90. *Mol Cell* 39: 282-91
- Iwakawa HO, Tomari Y (2013) Molecular insights into microRNA-mediated translational repression in plants. *Mol Cell* 52: 591-601

Iwasaki S, Kobayashi M, Yoda M, Sakaguchi Y, Katsuma S, Suzuki T, Tomari Y (2010) Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Mol Cell* 39: 292-9

Janssen D, Martin G, Velasco L, Gomez P, Segundo E, Ruiz L, Cuadrado IM (2005) Absence of a coding region for the helper component-proteinase in the genome of cucumber vein yellowing virus, a whitefly-transmitted member of the Potyviridae. *Arch Virol* 150: 1439-47

Johnston M, Geoffroy MC, Sobala A, Hay R, Hutvagner G (2010) HSP90 Protein Stabilizes Unloaded Argonaute Complexes and Microscopic P-bodies in Human Cells. *Molecular Biology of the Cell* 21: 1462-1469

Jose AM, Hunter CP (2007) Transport of sequence-specific RNA interference information between cells. *Annual Review of Genetics* 41: 305-330

Karlowski WM, Zielezinski A, Carrere J, Pontier D, Lagrange T, Cooke R (2010) Genome-wide computational identification of WG/GW Argonaute-binding proteins in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res* 38: 4231-45

Kasschau KD, Carrington JC (1998) A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95: 461-70

Kasschau KD, Fahlgren N, Chapman EJ, Sullivan CM, Cumbie JS, Givan SA, Carrington JC (2007) Genome-wide profiling and analysis of Arabidopsis siRNAs. *PLoS Biol* 5: e57

Kenesi E, Carbonell A, Lozsa R, Vertessy B, Lakatos L (2017) A viral suppressor of RNA silencing inhibits ARGONAUTE 1 function by precluding target RNA binding to pre-assembled RISC. *Nucleic Acids Res*

Kertesz S, Kerenyi Z, Merai Z, Bartos I, Palfy T, Barta E, Silhavy D (2006) Both introns and long 3'-UTRs operate as cis-acting elements to trigger nonsense-mediated decay in plants. *Nucleic Acids Res* 34: 6147-57

Kim VN, Han J, Siomi MC (2009) Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 126-39

Kreuze JF, Savenkov EI, Cuellar W, Li X, Valkonen JP (2005) Viral class 1 RNase III involved in suppression of RNA silencing. *J Virol* 79: 7227-38

Kwak PB, Tomari Y (2012) The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nat Struct Mol Biol* 19: 145-51

Lakatos L, Csorba T, Pantaleo V, Chapman EJ, Carrington JC, Liu YP, Dolja VV, Calvino LF, Lopez-Moya JJ, Burgyan J (2006) Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J* 25: 2768-80

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

Lazzaretti D, Tournier I, Izaurralde E (2009) The C-terminal domains of human TNRC6A, TNRC6B, and TNRC6C silence bound transcripts independently of Argonaute proteins. *RNA*

Lee YS, Nakahara K, Pham JW, Kim K, He Z, Sontheimer EJ, Carthew RW (2004) Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell* 117: 69-81

Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120: 15-20

Li CF, Pontes O, El-Shami M, Henderson IR, Bernatavichute YV, Chan SW, Lagrange T, Pikaard CS, Jacobsen SE (2006) An ARGONAUTE4-containing nuclear processing center colocalized with Cajal bodies in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 126: 93-106

Li J, Yang Z, Yu B, Liu J, Chen X (2005a) Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 15: 1501-7

Li S, Liu L, Zhuang X, Yu Y, Liu X, Cui X, Ji L, Pan Z, Cao X, Mo B, Zhang F, Raikhel N, Jiang L, Chen X (2013) MicroRNAs inhibit the translation of target mRNAs on the endoplasmic reticulum in *Arabidopsis*. *Cell* 153: 562-74

Li W, Hilf ME, Webb SE, Baker CA, Adkins S (2008) Presence of P1b and absence of HC-Pro in Squash vein yellowing virus suggests a general feature of the genus *Ipomovirus* in the family *Potyviridae*. *Virus Res* 135: 213-9

Li Z, E CT, M CK, A TM, S LL, M PL (2005b) Effect of prolonged pressure on flowmotion: An Investigation Using an in vivo Rat Model. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 1: 597-600

Liang CY, Wang YB, Murota Y, Liu X, Smith D, Siomi MC, Liu QH (2015) TAF11 Assembles the RISC Loading Complex to Enhance RNAi Efficiency. *Molecular Cell* 59: 807-818

Lichner Z, Silhavy D, Burgyan J (2003) Double-stranded RNA-binding proteins could suppress RNA interference-mediated antiviral defences. *J Gen Virol* 84: 975-80

Li F, Xu DL, Abad J, Li RH (2012) Phylogenetic relationships of closely related potyviruses infecting sweet potato determined by genomic characterization of Sweet potato virus G and Sweet potato virus 2. *Virus Genes* 45: 118-125

Liu Q, Rand TA, Kalidas S, Du F, Kim HE, Smith DP, Wang X (2003) R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. *Science* 301: 1921-5

Liu QK, Wang F, Axtell MJ (2014) Analysis of Complementarity Requirements for Plant MicroRNA Targeting Using a *Nicotiana benthamiana* Quantitative Transient Assay. *Plant Cell* 26: 741-753

Liu QP, Feng Y, Zhu ZJ (2009) Dicer-like (DCL) proteins in plants. *Funct Integr Genomic* 9: 277-286

Llave C (2010) Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions. Trends Plant Sci 15: 701-7

Llave C, Kasschau KD, Carrington JC (2000) Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 13401-6

Llave C, Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC (2002) Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. Science 297: 2053-6

Lozsa 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: 4099-107

Lózsa Rita Bernadett (2011) *A Tobacco etch virus és a Carnation italian ringspot virus hatása a növényi és a vírus eredetű kis RNS-ek metilációjára.* Doktori Értekezés, ELTE, Biológiai Doktori Iskola

Lucy AP, Guo HS, Li WX, Ding SW (2000) Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. EMBO J 19: 1672-80

Ma PD, Liu JY, He HX, Yang MY, Li MN, Zhu XJ, Wang XZ (2009) A Viral Suppressor P1/HC-Pro Increases the GFP Gene Expression in Agrobacterium-mediated Transient Assay. Appl Biochem Biotech 158: 243-252

Mallory AC, Ely L, Smith TH, Marathe R, Anandalakshmi R, Fagard M, Vaucheret H, Pruss G, Bowman L, Vance VB (2001) HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. Plant Cell 13: 571-83

Mallory AC, Hinze A, Tucker MR, Bouche N, Gascioli V, Elmayan T, Laressergues D, Jauvion V, Vaucheret H, Laux T (2009) Redundant and specific roles of the ARGONAUTE proteins AGO1 and ZLL in development and small RNA-directed gene silencing. PLoS Genet 5: e1000646

Mangwende T, Wang ML, Borth W, Hu J, Moore PH, Mirkov TE, Albert HH (2009) The P0 gene of Sugarcane yellow leaf virus encodes an RNA silencing suppressor with unique activities. Virology 384: 38-50

Mann KS, Johnson KN, Carroll BJ, Dietzgen RG (2016) Cytorhabdovirus P protein suppresses RISC-mediated cleavage and RNA silencing amplification in planta. Virology 490: 27-40

Matranga C, Tomari Y, Shin C, Bartel DP, Zamore PD (2005) Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. Cell 123: 607-20

Matzke MA, Primig M, Trnovsky J, Matzke AJM (1989) Reversible Methylation and Inactivation of Marker Genes in Sequentially Transformed Tobacco Plants. Embo Journal 8:

643-649

Mbanzibwa DR, Tian YP, Mukasa SB, Valkonen JPT (2009) Cassava Brown Streak Virus (Potyviridae) Encodes a Putative Maf/HAM1 Pyrophosphatase Implicated in Reduction of Mutations and a P1 Proteinase That Suppresses RNA Silencing but Contains No HC-Pro. *Journal of Virology* 83: 6934-6940

Melnyk CW, Molnar A, Baulcombe DC (2011) Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals. *EMBO J* 30: 3553-63

Merai Z, Kerenyi Z, Kertesz S, Magna M, Lakatos L, Silhavy D (2006) Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J Virol* 80: 5747-56

Merai Z, Kerenyi Z, Molnar A, Barta E, Valoczi A, Bisztray G, Havelda Z, Burgyan J, Silhavy D (2005) Aureusvirus P14 is an efficient RNA silencing suppressor that binds double-stranded RNAs without size specificity. *J Virol* 79: 7217-26

Mi SJ, Cai T, Hu YG, Chen Y, Hodges E, Ni FR, Wu L, Li S, Zhou H, Long CZ, Chen S, Hannon GJ, Qi YJ (2008) Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell* 133: 116-127

Mingot A, Valli A, Rodamilans B, San Leon D, Baulcombe DC, Garcia JA, Lopez-Moya JJ (2016) The P1N-PISPO trans-Frame Gene of Sweet Potato Feathery Mottle Potyvirus Is Produced during Virus Infection and Functions as an RNA Silencing Suppressor. *J Virol* 90: 3543-57

Miyoshi T, Takeuchi A, Siomi H, Siomi MC (2010) A direct role for Hsp90 in pre-RISC formation in *Drosophila*. *Nat Struct Mol Biol* 17: 1024-6

Mlotshwa S, Voinnet O, Mette MF, Matzke M, Vaucheret H, Ding SW, Pruss G, Vance VB (2002) RNA silencing and the mobile silencing signal. *Plant Cell* 14 Suppl: S289-301

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

Mourrain P, Beclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel JB, Jouette D, Lacombe AM, Nikic S, Picault N, Remoue K, Sanial M, Vo TA, Vaucheret H (2000) Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 101: 533-42

Mukasa SB, Rubaihayo PR, Valkonen JPT (2006) Interactions between a crinivirus, an ipomovirus and a potyvirus in coinfecting sweetpotato plants. *Plant Pathology* 55: 458-467
Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R (1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in Trans. *Plant Cell* 2: 279-289

Nyiko T, Sonkoly B, Merai Z, Benkovics AH, Silhavy D (2009) Plant upstream ORFs can trigger nonsense-mediated mRNA decay in a size-dependent manner. *Plant Molecular*

Biology 71: 367-378

Nykanen A, Haley B, Zamore PD (2001) ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107: 309-21

Parizotto EA, Dunoyer P, Rahm N, Himber C, Voinnet O (2004) In vivo investigation of the transcription, processing, endonucleolytic activity, and functional relevance of the spatial distribution of a plant miRNA. *Genes Dev* 18: 2237-42

Park JE, Heo I, Tian Y, Simanshu DK, Chang H, Jee D, Patel DJ, Kim VN (2011) Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature* 475: 201-5

Patel PH, Barbee SA, Blankenship JT (2016) GW-Bodies and P-Bodies Constitute Two Separate Pools of Sequestered Non-Translating RNAs. *PLoS One* 11: e0150291

Perez-Canamas M, Hernandez C (2015) Key importance of small RNA binding for the activity of a glycine-tryptophan (GW) motif-containing viral suppressor of RNA silencing. *J Biol Chem* 290: 3106-20

Pfaff J, Meister G (2013) Argonaute and GW182 proteins: an effective alliance in gene silencing. *Biochem Soc Trans* 41: 855-60

Pfeffer S, Dunoyer P, Heim F, Richards KE, Jonard G, Ziegler-Graff V (2002) P0 of beet western yellows virus is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *Journal of Virology* 76: 6815-6824

Pham JW, Pellino JL, Lee YS, Carthew RW, Sontheimer EJ (2004) A Dicer-2-dependent 80s complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. *Cell* 117: 83-94

Qiu W, Park JW, Scholthof HB (2002) Tombusvirus P19-mediated suppression of virus-induced gene silencing is controlled by genetic and dosage features that influence pathogenicity. *Mol Plant Microbe Interact* 15: 269-80

Qiu XG, Wong G, Audet J, Bello A, Fernando L, Alimonti JB, Fausther-Bovendo H, Wei HY, Aviles J, Hiatt E, Johnson A, Morton J, Swope K, Bohorov O, Bohorova N, Goodman C, Kim D, Pauly MH, Velasco J, Pettitt J et al. (2014) Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. *Nature* 514: 47-+

Qu F, Ren T, Morris TJ (2003) The coat protein of turnip crinkle virus suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step. *J Virol* 77: 511-22

Rajagopalan R, Vaucheret H, Trejo J, Bartel DP (2006) A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* 20: 3407-25

Ren B, Guo Y, Gao F, Zhou P, Wu F, Meng Z, Wei C, Li Y (2010) Multiple functions of Rice dwarf phyto-reovirus Pns10 in suppressing systemic RNA silencing. *J Virol* 84: 12914-23

Ren G, Chen X, Yu B (2012) Uridylation of miRNAs by hen1 suppressor1 in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 22: 695-700

Renovell A, Carmen Vives M, Ruiz-Ruiz S, Navarro L, Moreno P, Guerri J (2012) The

Citrus leaf blotch virus movement protein acts as silencing suppressor. *Virus Genes* 44: 131-140

Rivas FV, Tolia NH, Song JJ, Aragon JP, Liu J, Hannon GJ, Joshua-Tor L (2005) Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat Struct Mol Biol* 12: 340-9

Rodamilans B, Valli A, Mingot A, San Leon D, Baulcombe D, Lopez-Moya JJ, Garcia JA (2015) RNA Polymerase Slippage as a Mechanism for the Production of Frameshift Gene Products in Plant Viruses of the Potyviridae Family. *Journal of Virology* 89: 6965-6967

Ruby JG, Jan C, Player C, Axtell MJ, Lee W, Nusbaum C, Ge H, Bartel DP (2006) Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in *C. elegans*. *Cell* 127: 1193-207

Ruiz-Ferrer V, Boskovic J, Alfonso C, Rivas G, Llorca O, Lopez-Abella D, Lopez-Moya JJ (2005) Structural analysis of tobacco etch potyvirus HC-pro oligomers involved in aphid transmission. *J Virol* 79: 3758-65

Russo M BJ, Martelli GP. (1994) Molecular biology of tombusviridae. *Adv Virus Res*: 381-428.

Sakai J, Mori M, Morishita T, Tanaka M, Hanada K, Usugi T, Nishiguchi M (1997) Complete nucleotide sequence and genome organization of sweet potato feathery mottle virus (S strain) genomic RNA: the large coding region of the P1 gene. *Arch Virol* 142: 1553-62

Schaad MC, Jensen PE, Carrington JC (1997) Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *EMBO J* 16: 4049-59

Schirle NT, MacRae IJ (2012) The crystal structure of human Argonaute2. *Science* 336: 1037-40

Schnettler E, Hemmes H, Huisman R, Goldbach R, Prins M, Kormelink R (2010) Diverging affinity of tospovirus RNA silencing suppressor proteins, NSs, for various RNA duplex molecules. *J Virol* 84: 11542-54

Scholthof HB (2007) Heterologous expression of viral RNA interference suppressors: RISC management. *Plant Physiology* 145: 1110-1117

Schwab R, Palatnik JF, Riester M, Schommer C, Schmid M, Weigel D (2005) Specific effects of MicroRNAs on the plant transcriptome. *Developmental Cell* 8: 517-527

Schwach F, Vaistij FE, Jones L, Baulcombe DC (2005) An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by potato virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. *Plant Physiol* 138: 1842-52

Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115: 199-208

Schwarz DS, Hutvagner G, Haley B, Zamore PD (2002) Evidence that siRNAs function as

guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways. *Mol Cell* 10: 537-48

Sen GL, Blau HM (2005) Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nature Cell Biology* 7: 633-U28

Silhavy D, Burgyan J (2004) Effects and side-effects of viral RNA silencing suppressors on short RNAs. *Trends Plant Sci* 9: 76-83

Silhavy D, Molnar A, Lucioli A, Szittya G, Hornyik C, Tavazza M, Burgyan J (2002) A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J* 21: 3070-80

Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L (2004) Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305: 1434-7

Starega-Roslan J, Witkos TM, Galka-Marciniak P, Krzyzosiak WJ (2015) Sequence features of *Drosophila* and *Dicer* cleavage sites affect the complexity of isomiRs. *Int J Mol Sci* 16: 8110-27

Swarts DC, Makarova K, Wang Y, Nakanishi K, Ketting RF, Koonin EV, Patel DJ, van der Oost J (2014) The evolutionary journey of Argonaute proteins. *Nat Struct Mol Biol* 21: 743-53

Szabó EZ, Kemeny L, Lakatos L (2014) Deletion series of the P1 protein of the Sweet potato mild mottle virus identifies the shortest fully functional RNA silencing suppressor domain. *Acta Biologica Szegediensis* 58 163-166.

Szabó EZ, Manczinger M, Goblos A, Kemeny L, Lakatos L (2012) Switching on RNA silencing suppressor activity by restoring argonaute binding to a viral protein. *J Virol* 86: 8324-7

Szittya G, Molnar A, Silhavy D, Hornyik C, Burgyan J (2002) Short defective interfering RNAs of tombusviruses are not targeted but trigger post-transcriptional gene silencing against their helper virus. *Plant Cell* 14: 359-72

Szittya G, Silhavy D, Molnar A, Havelda Z, Lovas A, Lakatos L, Banfalvi Z, Burgyan J (2003) Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *EMBO J* 22: 633-40

Takimoto K, Wakiyama M, Yokoyama S (2009) Mammalian GW182 contains multiple Argonaute-binding sites and functions in microRNA-mediated translational repression. *RNA* 15: 1078-89

Tang G, Reinhart BJ, Bartel DP, Zamore PD (2003) A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev* 17: 49-63

Tang GL, Galili G (2004) Using RNAi to improve plant nutritional value: from mechanism to application. *Trends Biotechnol* 22: 463-469

Tenllado F, Barajas D, Vargas M, Atencio FA, Gonzalez-Jara P, Diaz-Ruiz JR (2003)

Transient expression of homologous hairpin RNA causes interference with plant virus infection and is overcome by a virus encoded suppressor of gene silencing. *Mol Plant Microbe Interact* 16: 149-58

Terzi LC, Simpson GG (2009) Arabidopsis RNA immunoprecipitation. *Plant J* 59: 163-8

Thomas CL, Leh V, Lederer C, Maule AJ (2003) Turnip crinkle virus coat protein mediates suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Virology* 306: 33-41

Till S, Ladurner AG (2007) RNA Pol IV plays catch with Argonaute 4. *Cell* 131: 643-5

Till S, Lejeune E, Thermann R, Bortfeld M, Hothorn M, Enderle D, Heinrich C, Hentze MW, Ladurner AG (2007) A conserved motif in Argonaute-interacting proteins mediates functional interactions through the Argonaute PIWI domain. *Nat Struct Mol Biol* 14: 897-903

Tkaczuk KL, Obarska A, Bujnicki JM (2006) Molecular phylogenetics and comparative modeling of HEN1, a methyltransferase involved in plant microRNA biogenesis. *BMC Evol Biol* 6: 6

Tomari Y, Du T, Haley B, Schwarz DS, Bennett R, Cook HA, Koppetsch BS, Theurkauf WE, Zamore PD (2004) RISC assembly defects in the *Drosophila* RNAi mutant armitage. *Cell* 116: 831-41

Trinks D, Rajeswaran R, Shivaprasad PV, Akbergenov R, Oakeley EJ, Veluthambi K, Hohn T, Pooggin MM (2005) Suppression of RNA silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with transactivation of host genes. *J Virol* 79: 2517-27

Tu B, Liu L, Xu C, Zhai J, Li S, Lopez MA, Zhao Y, Yu Y, Ramachandran V, Ren G, Yu B, Li S, Meyers BC, Mo B, Chen X (2015) Distinct and cooperative activities of HESO1 and URT1 nucleotidyl transferases in microRNA turnover in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* 11: e1005119

Tugume AK, Mukasa SB, Valkonen JP (2008) Natural wild hosts of sweet potato feathery mottle virus show spatial differences in virus incidence and virus-like diseases in Uganda. *Phytopathology* 98: 640-52

Urcuqui-Inchima S, Haenni AL, Bernardi F (2001) Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Res* 74: 157-75

Valli A, Lopez-Moya JJ, Garcia JA (2007) Recombination and gene duplication in the evolutionary diversification of P1 proteins in the family Potyviridae. *J Gen Virol* 88: 1016-28

Valli A, Martin-Hernandez AM, Lopez-Moya JJ, Garcia JA (2006) RNA silencing suppression by a second copy of the P1 serine protease of Cucumber vein yellowing ipomovirus, a member of the family Potyviridae that lacks the cysteine protease HCPro. *J Virol* 80: 10055-63

van Rij RP, Saleh MC, Berry B, Foo C, Houk A, Antoniewski C, Andino R (2006) The RNA silencing endonuclease Argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in *Drosophila*

melanogaster. *Genes Dev* 20: 2985-95

VandenHeuvel JFJM, Bruyere A, Hogenhout A, ZieglerGraff V, Brault V, Verbeek M, VanderWilk F, Richards K (1997) The N-terminal region of the luteovirus readthrough domain determines virus binding to Buchnera GroEL and is essential for virus persistence in the aphid. *Journal of Virology* 71: 7258-7265

Varallyay E, Havelda Z (2013) Unrelated viral suppressors of RNA silencing mediate the control of ARGONAUTE1 level. *Molecular Plant Pathology* 14: 567-575

Varallyay E, Olah E, Havelda Z (2014) Independent parallel functions of p19 plant viral suppressor of RNA silencing required for effective suppressor activity. *Nucleic Acids Res* 42: 599-608

Varallyay E, Valoczi A, Agyi A, Burgyan J, Havelda Z (2010) Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation. *Embo Journal* 29: 3507-3519

Vargason JM, Szittyá G, Burgyan J, Hall TM (2003) Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell* 115: 799-811

Vasale JJ, Gu W, Thivierge C, Batista PJ, Claycomb JM, Youngman EM, Duchaine TF, Mello CC, Conte D, Jr. (2010) Sequential rounds of RNA-dependent RNA transcription drive endogenous small-RNA biogenesis in the ERGO-1/Argonaute pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 3582-7

Vaucheret H (2008) Plant ARGONAUTES. *Trends Plant Sci* 13: 350-8

Vaucheret H (2009) AGO1 homeostasis involves differential production of 21-nt and 22-nt miR168 species by MIR168a and MIR168b. *PLoS One* 4: e6442

Vaucheret H, Mallory AC, Bartel DP (2006) AGO1 homeostasis entails coexpression of MIR168 and AGO1 and preferential stabilization of miR168 by AGO1. *Mol Cell* 22: 129-36

Webster LC, Zhang K, Chance B, Ayene I, Culp JS, Huang WJ, Wu FY, Ricciardi RP (1991) Conversion of the E1A Cys4 zinc finger to a nonfunctional His2,Cys2 zinc finger by a single point mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 9989-93

Viguera E, Canceill D, Ehrlich SD (2001) Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation. *EMBO J* 20: 2587-95

Villani ME, Morgun B, Brunetti P, Marusic C, Lombardi R, Pisoni I, Bacci C, Desiderio A, Benvenuto E, Donini M (2009) Plant pharming of a full-sized, tumour-targeting antibody using different expression strategies. *Plant Biotechnology Journal* 7: 59-72

Voinnet O, Lederer C, Baulcombe DC (2000) A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* 103: 157-67

Voinnet O, Pinto YM, Baulcombe DC (1999) Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14147-52

Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J* 33: 949-56

Wang XB, Wu Q, Ito T, Cillo F, Li WX, Chen X, Yu JL, Ding SW (2010) RNAi-mediated viral immunity requires amplification of virus-derived siRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 484-9

Zipprich JT, Bhattacharyya S, Mathys H, Filipowicz W (2009) Importance of the C-terminal domain of the human GW182 protein TNRC6C for translational repression. *RNA*

Xie Z, Johansen LK, Gustafson AM, Kasschau KD, Lellis AD, Zilberman D, Jacobsen SE, Carrington JC (2004) Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol* 2: E104

Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC (2003) Negative feedback regulation of Dicer-Like1 in *Arabidopsis* by microRNA-guided mRNA degradation. *Curr Biol* 13: 784-9

Yigit E, Batista PJ, Bei YX, Pang KM, Chen CCG, Tolia NH, Joshua-Tor L, Mitani S, Simard MJ, Mello CC (2006) Analysis of the *C-elegans* argonaute family reveals that distinct argonautes act sequentially during RNAi. *Cell* 127: 747-757

Yu B, Chapman EJ, Yang Z, Carrington JC, Chen X (2006) Transgenically expressed viral RNA silencing suppressors interfere with microRNA methylation in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* 580: 3117-20

Yu B, Yang ZY, Li JJ, Minakhina S, Yang MC, Padgett RW, Steward R, Chen XM (2005) Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science* 307: 932-935

Yuan YR, Pei Y, Ma JB, Kuryavyi V, Zhadina M, Meister G, Chen HY, Dauter Z, Tuschl T, Patel DJ (2005) Crystal structure of A-aeolicus Argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Molecular Cell* 19: 405-419

Zamore PD (2002) Ancient pathways programmed by small RNAs. *Science* 296: 1265-9

Zamore PD (2004) Plant RNAi: How a viral silencing suppressor inactivates siRNA. *Curr Biol* 14: R198-200

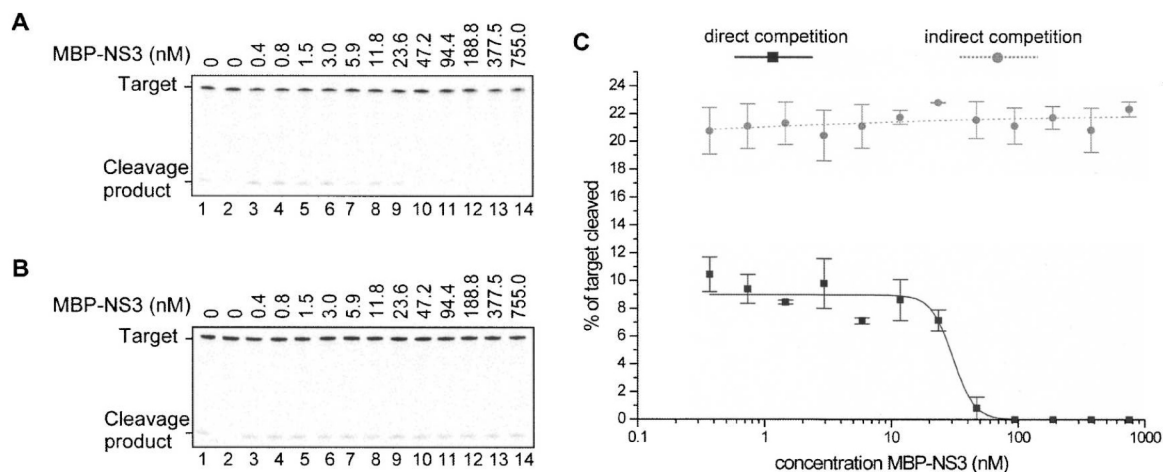
Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP (2000) RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101: 25-33

Zeng Y, Yi R, Cullen BR (2005) Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *Embo Journal* 24: 138-148

Zhang X, Yuan YR, Pei Y, Lin SS, Tuschl T, Patel DJ, Chua NH (2006) Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev* 20: 3255-68

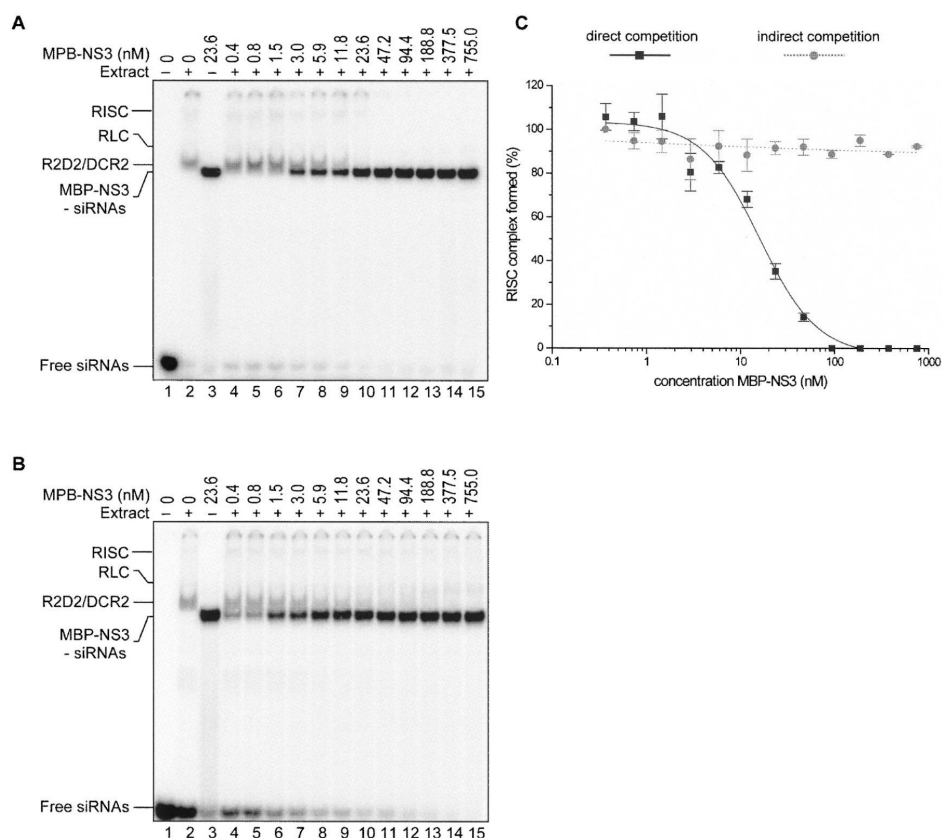
Zhang X, Zhang X, Singh J, Li D, Qu F (2012) Temperature-dependent survival of Turnip crinkle virus-infected arabidopsis plants relies on an RNA silencing-based defense that requires dcl2, AGO2, and HEN1. J Virol 86: 6847-54

10. FÜGGELÉK



Függelék 1. ábra Az RHBV NS3 a direkt kompetíciós megközelítésben gátolja a siRNS indukálta RNS silencing-et

Direkt kompetíciós kísérlet (A). Indirekt kompetíciós kísérlet (B). Az alkalmazott NS3 koncentráció függvényében ábrázoltuk a taret RNS vágás hatékonyságát



Függelék 2. ábra Az NS3 hatása a silencing komplexek képződésére

Reprezentatív direkt (A) és indirekt kompetitív (B) kísérlet bemutatása A képződött RISC mennyiségének ábrázolása a direkt (négyzetek) és az indirekt rendszerben (körök) 3 ismételtsben.