

Válaszok **Dr. Fehér Attila** bírálatára.

Szeretném megköszönni Dr. Fehér Attilának, hogy elvállalta a bírálat fáradságos munkáját, az értekezés alapos, minden részletre kiterjedő elemzését és hogy rámutatott a dolgozatomban található hiányosságokra.

"...A dolgozatban nagyon sok az elírás, pontatlanság..."

A dolgozat formai kivitelezése során elkövetett elírásokra, pontatlanságokra és következetlenségekre nincs mentség, csupán elismerhetem a bíráló jogos kritikáját. A dolgozat írása során az angol nyelvű cikkek "visszafordítása" magyar nyelvre a vártnál jóval nagyobb gondot okozott a szerzőnek. Ez azonban csak mentegetőzés és a legtöbb amit tehetek, hogy elnézést kérek a bírálóktól az elkövetett formai hibákért, amelyek megnehezítették a dolgozat olvasását, bírálatát.

"... „A Felhasznált anyagok és módszerek” fejezet a jelölt teljesen kihagyta és e tekintetben egyszerűen a megjelent publikációkhoz irányítja az olvasót. Véleményem szerint ez nem szerencsés megoldás...."

A "Felhasznált anyagok és módszerek" fejezetet szándékosan hagytam ki, mivel úgy éreztem, hogy az alkalmazott technikák nagy száma miatt ez a fejezet indokolatlanul megnövelné a dolgozat terjedelmét. A másik indok az volt, hogy az általunk kidolgozott és használt LNA alapú kis RNS kimutató technológia, amely eltérően az általános használt molekuláris biológiai eljárásokkal szemben újszerű volt, számos technikai jellegű közleményünkben részletesen le lett írva. Ezen érvek ellenére elfogadom a kritikát, hogy a "Felhasznált anyagok és módszerek" fejezett hiánya megnehezíti a bírálatot, hiszen szükség esetén az eredeti publikációt, illetve az abban szereplő hivatkozást, kell kikeresni és fellapozni. Amennyiben lehetséges, akkor csatolni fogom a kért mellékletet, amely részletezi a legfontosabb specifikus módszereket.

Válaszok a bíráló szakmai megjegyzéseire és kérdéseire:

1. A 13. oldalon tett sommás állítás, miszerint „A természetben nem fordul elő DI RNS” természetesen nem igaz. Gondolom arra szertett volna utalni a jelölt, hogy önmagukban, helper vírus nélkül, nem fordulnak elő, nem replikálódnak ezek az RNS-ek az élőlényekben.

A növényi vírusokkal többféle szub-virális replikon társulhat. A szatellit RNS-ek nem mutatnak a gazda vírussal szekvencia azonosságot. Ezzel szemben a defektív interferáló (DI) RNS-ek a gazda genomról keletkeznek deléciók sorozatával. Tombusvírusok esetében vizsgálták DI RNS-ek jelenlétét természetes izolátumokban [1]. A megvizsgált 50 izolátum egyikében sem találtak DI RNS-t azonban satellite RNS-eket képesek voltak kimutatni. Más irodalmi adatok sem erősítik meg tombusvírus DI RNS-ek előfordulását természetes izolátumokban. Természetesen ez valóban nem jelenti azt, hogy tombusvírus DI RNS-ek nem létezhetnek természetes, szabadföldi, körülmények között csak azt, hogy jelenlétük nem volt kimutatható az eddig vizsgált izolátumokban. A tombusvírus DI RNS-ek viszont könnyen generálhatók laboratóriumi körülmények között egymást követő átfertőzések sorozatával. Egy másik, a Carmovírusok közé tartozó RNS vírus esetében leírtak természetes izolátumban előforduló DI RNS-t [2]. A kijelentés így valóban sarkos és túlságosan általánosító.

2. Az 5., 6., és 7. ábránon más-és-más az LNA oligók hibridizációs hőmérséklete (37, 42, illetve 45 °C) miatt, és mi az elfogadott, általánosan alkalmazható hőmérséklet, ha van ilyen?

Ezek a kísérletek az LNA oligonukleotidok hibridizálási paramétereinek beállítását célozták. Az 5. ábrán az LNA oligonukleotidok hibridizálási hatékonyságát akartuk bemutatni a tradicionális DNS oligonukleotidokkal összevetve, ezért a DNS oligonukleotidok számára optimálási feltételek (37 °C) mellett hibridizáltunk. A 6. ábrán az LNA oligonukleotidok próbák specifikusságát vizsgáltuk olyan módosított LNA oligonukleotidot felhasználva, amely két eltérést hordozott a cél szekvenciához képest. A specificitás vizsgálatához itt megemeltük a hőmérsékletet (42 °C). A DNS oligonukleotid próba ezen a hőmérsékleten már gyakorlatilag nem adott jelet. A 6. ábrán a különböző eredetű forrásokból származó RNS minták esetleges nem specifikus hibridizációját vizsgáltuk. Mivel a hibridizálás jól működött 42 °C ezért feljebb emeltük 45 °C-ra a hőmérsékletet, hogy tovább fokozzuk a specificitást. A további kísérletek tapasztalata alapján 50 °C-ot javasoljuk a kiindulási hibridizálási hőmérsékletnek, de ettől akár 10 °C -kal plusz és mínusz irányba is el lehet térni a konkrét kísérlet igényei alapján.

3. Szintén ehhez, illetve az Anyag és módszer fejezet hiányához kapcsolódva: a 8. ábra címében koncentráció függést említ, de az ábrán próba mennyiségek (pmol) szerepelnek. Mik voltak az aktuális illetve optimális koncentrációk?

A 8. ábra címe pontatlan. A kísérletben egységnyi hibridizálási pufferbe (10 ml) tettünk 1 illetve 10 pmol mennyiségű jelölt próbát és összehasonlítottuk a kapott jeleket. A kísérlet célja annak a kimutatása volt, hogy a költséges LNA oligonukleotid próba mennyiségét a

tizedére csökkentve is lehet hatékonyan a miRNS-eket detektálni. Jelenleg 1-5 pmol próba használatát javasoljuk a cél RNS abundanciájától függően (10ml hibridizáló folyadékban).

4. A 34. oldalon az miRNS-ek kifejeződésének tér- és időbeli szabályozásával kapcsolatban jelzi, hogy ezt más csoportok is kimutatták párhuzamosan az általa végzett kísérletekkel, de ezeket nem diszkutálja. Miben rejlettek a párhuzamok illetve különbségek?

A különböző miRNS-ek térbeli kifejeződésének vizsgálatakor azt találtuk, hogy egyes miRNS-ek a szállítószöveti rendszerben halmozódnak fel, amely arra utal, hogy esetleg képesek mozogni a növényben így szabályozva a cél mRNS-eiket. A citált irodalmak erre, a miRNS-ek lehetséges nem sejt-autonóm aktivitására utaltak. Yoo és mtsai. háncs nedvből mutatták ki miRNS-ek jelenlétét [3]. Lin és mtsai. oltással mutatták ki hogy, a miR399 képes a transzgenikus miRNS túltermelő növényből átjutni a vad típusú növénybe [4]. Carlsbecker és mtsai. a gyökeret vizsgálva mutatták, hogy a miR165/166 képes szignálként viselkedni és az aktivitását a keletkezési helyétől távolabbi sejtekben kifejezteni [5].

5. A 35. oldalon említi egy mikroRNS in situ hibridizációs adatbázis felállításának megkezdését. Hogyan áll ez az adatbázis ma? Elérhető-e más laboratóriumok számára is?

Az adatbázis felállítása, sajnálatosan kezdeti stádiumban van és nem elérhető külső munkatársak számára. Eddig a legáltalánosabb konzervatív miRNS-ek expressziós mintázatát határoztuk meg, illetve elkezdtük egyes RNS interferencia mutánsok vizsgálatát is. Az anyagi források elapadásával és a kísérleteket végző kollega külföldre távozásával ezek munkák leálltak. Új pályázati forrás megszerzése esetén tudjuk csak folytatni a megkezdett munkát.

6. A 39. oldalon a GapA mRNS kifejeződésének mintázatát a korai vírus fejlődési szakaszban is mutatni kellett volna, hiszen fontos következtetést von le belőle.

Az eredeti közleményben szerepel egy ábra, amelyben *in situ* hibridizálással vizsgáljuk a GapA mRNS kifejeződését a vírus fertőzés korai időpontjában. Ez az adat valóban kimaradt a dolgozatból, helyesebb lett volna bemutatni.

7. Mi alapján kerültek kiválasztásra a „shut off” jelenséggel kapcsolatban vizsgált gének (pl. 14. ábra)?

A gének egy részét (GapA, tubulin) már használták a vírusfertőzés indukálta shut-off jelenség vizsgálata során, ezért ezeket mint referencia géneket választottuk a kísérleteinkhez. A gének másik része stressz kapcsolt gének (HSP90, GST) és kíváncsiak voltunk, hogy ezeknek az általában stressz hatásokra indukciót mutató géneknek a kifejeződésére milyen hatással van a vírusfertőzés indukálta shut-off jelenség. A többi vizsgált általános háztartási gént önkényesen

választottuk ki. A kiválasztás során több olyan gént is vizsgáltunk, amelyeket általánosan használnak qPCR kísérletekben referencia géneként (Cph, Cox, H1e, Ef2, GapA, TubA). Az eredményeink megmutatták, hogy ezeknek a referencia géneknek a többsége a shut-off hatása alá esik, ezért használatuk qPCR kísérletekben (vírusfertőzött növényben) torzító hatású lehet.

8. Mi adhatja a „shut off” jelenség specifitását, azaz miért pont az adott gének kapcsolódnak ki? Vizsgálták-e a jelenséget Arabidopsisban, és ha igen ki tudtak-e mutatni közös szabályozási lépést (pl. azonos transzkripciós faktor) ezeknek a géneknek a szabályozásában? Szerepet játszhat-e a „shut off” jelenségben a kromatin-mediált géncsendesítés mechanizmusa?

Az eredményeink alapján a shut-off jelenség kialakulása függ az adott vírus-növény interakciótól. Arabidopsis esetében két vírust (crTMV, TCV) használva vizsgáltuk a shut-off kialakulását. Azt tapasztaltuk, hogy ezek a vírusok nem vagy nem markánsan képesek a shut-off jelenséget előidézni a vírusfertőzött növényben, ezért Arabidopsis-al további kísérleteket nem végeztünk. Azonban, *Nicotiana benthamiana* növényeket fertőztünk két erős shut-off jelenséget indukáló vírussal (crTMV, CymRSV) és egy nem indukáló vírussal (TCV) majd az ezeket a növényeket felhasználva genom szintű transzkriptom analízist végeztünk. Ezek a kísérletek és az adatok feldolgozása jelenleg is folynak. Az előzetes eredmények azt mutatják, hogy a shut-off jelenséget mutató növények esetében transzkripciós faktorok is érintettek, azonban ezek biológiai szerepének tisztázása a shut-off jelenség folyamatban még várat magára. Az RNS interferencia közvetített kromatin szintű módosítások valóban lehetnek okai a megfigyelt shut-off jelenségnek (főleg hogy az adataink alapján transzkripcionális szinten zajlik le a gátlási folyamat). Azonban kis RNS Northern blot segítségével nem sikerült olyan a cél mRNS-ekre specifikus kis RNS-eket kimutatni, amelyek transzkripcionális géncsendesítéshez vezethetnének. Ennek ellenére valamilyen kromatin szintű modifikáció eredményezheti a cél mRNS-ek eltűnését, ezért a jövőben tervezzük a shut-off-ot mutató gének metilációs mintázatának vizsgálatát.

9. Az 58. oldalon azt írja, hogy a DI RNS jelenléte nem szorítja vissza a p19 fehérje „mennyiségét”, ami nem egészen pontos, mert a p19 mennyiségét a vírus RNS mennyiségével együtt visszaszorítja, amit a 24. ábra B-része is mutat, a vírus RNS:p19 fehérje arány (feltehetően a p19 fehérje szintézis rátája) az ami valójában nem változik.

Valóban, a p19 fehérje és a vírus genomikus RNS-ének aránya nem változik DI RNS jelenlétében illetve hiányában.

10. Több helyen, így a 25. ábrán (58. oldal) is, kvantitatív következtetéseket von le *in situ* hibridizációs kísérletek eredményeiből pl. a vírus RNS-ek felszaporodására. Miért ez volt a legmegfelelőbb megközelítés erre a problémára?

A DI RNS-ek jelenléte a vírusfertőzött növényben a vírus terjedésének gátlását, a vírus mozaikos felhalmozódását idézi elő. Az általános mintavételi eljárás, a fertőzött levelek begyűjtése, ezért nem ad módot a sejtszintű változások nyomon követésére. Ezt a problémát az *in situ* hibridizációs eljárás használatával lehet megkerülni. A kísérleteink során, szükségessé vált kvantitatív következtetések levonása az *in situ* hibridizációs kísérletekből. Az *in situ* hibridizációt valóban nem fogadják el valós kvantitatív eljárásként. Azonban a kísérletek jellege miatt kénytelenek voltunk ezt a rendszert használni, hogy legalább durva kvantitatív becslést tegyünk. Ehhez az *in situ* hibridizáció technológia során a szignál előhívás során különböző egymást követő időpontokban leállítottuk a reakciót és szignál kialakulás dinamikáját hasonlítottuk össze az egy lemezen található különböző minták között. Ezt a bírálók elfogadták mint becslést a kvantitatív jellegre.

11. A 26. ábrán (60. oldal) a relatív siRNS/p19 arány számszerűsítése bátor vállalkozás két eltérő érzékenységű megközelítéssel (Western blot, Northern hibridizáció) kapott jelintenzitás alapján. Pontosabb lett volna az ábrán az értékeket pusztán a detektált jelek intenzitásának az arányaként feltüntetni, ami a tényleges helyzet. Ebből természetesen lehet következtetni az siRNA/p19 arányban meglévő relatív különbségekre.

A 26. ábrán egy közelítő arányt próbáltunk megadni a relatív siRNS/p19 felhalmozódásra. A mintákat homogenizáltuk, egyik feléből RNS kivonatot, másik feléből fehérje preparátumot készítettünk így a minták összevethetőek voltak. A mintákat azonos kísérleti eljárásban (Northern blot és Western blot) analizáltuk. A kialakuló jelek erősségét denzitométerrel meghatároztuk és ezek aránya (tehát az érték valóban a kapott jelek intenzitásának az aránya) adott egy relatív számot, ami tükrözte a siRNS/p19 megközelítő arányát.

12. A 30-31. ábrákon (64-65. oldal) 15° C-on 7 nappal a fertőzés után a DI RNS mennyisége jóval kisebb (ellentétben a szöveggel, ahol azt állítja, hogy a DI RNS-ek minden hőmérsékleten és időpontban nagy mennyiségben halmozódtak fel), mint a magasabb hőmérsékleteken, de a genomi RNS mennyisége mégis csökken. Mi ennek a magyarázata? Nem lehet ennek a csökkent kezdeti DI RNS mennyiségnek a következménye, hogy a vírus felhalmozódása ezen a hőmérsékleten csak átmenetileg gátlődik? Annál is inkább, mert a 24. ábrán a transzfektált protoplasztok esetében szintén az látható, hogy a korai (24 órás) időpontban a DI RNS szintje alacsonyabb 15 °C-on a többi hőmérséklettel összevetve, szemben a későbbi (48 órás) időponttal, és a genomi RNS szintje is hasonlóan változik, mint a 30. ábrán a teljes növények esetében.

Valóban 15 °C-on, vírusfertőzött növényben és transzfektált protoplasztban, a kezdeti időpontban kevesebb DI RNS felhalmozódását lehet detektálni mint magasabb

hőmérsékleten. Az elgondolásunk az, hogy a vírus replikációhoz szükséges faktorokért történő versengésnél is nagyobb szerepet játszik a DI RNS-ek p19 gátló hatása (p19 fehérje telítése siRNS-ekkel). 15 °C-on a siRNS alapú RNS csendesítés erősen gátolt a növényekben, ezért a DI RNS-ek p19 keresztüli aktivitása nem érvényesül. Azonban, a replikációs faktorkért való versengés miatt lehetséges az, hogy ezen a hőmérsékleten korai időpontban (még a nem hatékony DI RNS felhalmozódás ellenére is), a DI RNS-ek képesek visszaszorítani a genomikus RNS mennyiségét. A 15 °C-on vett korai mintáknál megfigyelt csökkent DI RNS felhalmozódáshoz szintén az RNS csendesítés aktivitásának a hiánya vezethet. Szittyá és mtsai. kimutatták, hogy a DI RNS-ek képesek hatékonyan indukálni az RNS csendesítést a fertőzött növényben, azonban ez nem képes hatékonyan támadni őket, ami előnyt nyújthat DI RNS-ek felhalmozódásának a vírus genomikus RNS-ével szemben [6]. Mivel 15 °C-on a siRNS alapú RNS csendesítés erősen gátolt a DI RNS-ek ezen előnye sem érvényesül, így eltérés keletkezhet a DI RNS/genomikus RNS arányban. A fertőzés előrehaladásával a DI RNS-ek képesek 15 °C-on is nagy mennyiségben felhalmozódni, ennek ellenére mégsem képesek megakadályozni a vírus elterjedését a növényben.

13. Több bemutatott kísérleti eredmény is azt bizonyítja, hogy a DI RNS védő hatása elsősorban nem a vírus replikáció szintjén, hanem jelentős mértékben a fehérje szinten nyilvánul meg, ugyanakkor a p19 fehérjének ebben nincs közvetlen szerepe. De mi a helyzet a tünet megjelenéséért szintén felelős p33 fehérjével? A DI RNS kölcsönhat-e a p33 fehérjével, befolyásolja-e annak szintjét és/vagy a p19-vel való kölcsönhatását?

Egyes esetekben, ha egy tombusvírust heterológ DI RNS (másik tombusvírusról keletkezett DI RNS) jelenlétben használunk fel fertőzéshez, akkor esetenként a heterológ DI RNS annak ellenére nem képes a növényt megvédeni a nekrozistól, hogy vírus genomikus RNS-ének felhalmozódását gátolja. Különböző tombusvírus kimérákat és heterológ DI RNS-eket felhasználva sikerült megmutatni, hogy a genom 5' része, a p33 kódoló részt is beleértve, határozza meg hogy a heterológ DI RNS védő vagy nem védő hatású. Ez az eredmény arra utal, hogy az egyes DI RNS-ek esetleg kapcsolódhatnak a p33-as fehérjéhez ezzel meggátolva a nekrozis kialakulást, míg más heterológ DI RNS-ek erre nem képesek. Burgyán és mtsai. szerint, közvetett vagy közvetlen lehetséges interakció a p19 és p33 között felelős lehet a nekrotikus tünetek kialakulásáért [7]. Lehetséges, hogy a védő DI RNS-ek ezt az interakciót akadályozzák meg. Ez az interakció azonban csak hipotetikus, és kísérletekkel még nem lett bizonyítva.

14. A DI RNS-ek hatására elmaradó tüneteket okozhatja-e a „shut off” jelenség valamilyen szintű gátlása?

A DI RNS-ek jelenlétében, hasonlóan a p19 defektív vírus fertőzéséhez, elsősorban a vírus elterjedése gátolt a növényben. A vírus csak foltokban, mozaikosan, főleg az erek és környékén jelenik meg a növényben, míg a vad típusú vírus az egész növényt gyakorlatilag egyenletesen előzönlí. Mivel a shut-off jelenség csak ott alakul ki ahol a vírus jelen van, a DI RNS-t tartalmazó növényekben a mRNS hiány sokkal kisebb lefedettséggel jelentkezik, ezért valószínűsíthető, hogy többek között a korlátozottan jelentkező shut-off jelenség is hozzájárul az enyhébb tünetek kialakulásához.

15. A 83. oldalon nem ártott volna hivatkozni arra, hogy miért szolgálhat a virág pozitív kontrollként az miR168 RNS érése kapcsán.

A virág RNS kontrollként választásának az oka csupán az, hogy virágban magas szinten jelenik meg a miR168, míg a nem fertőzött levelekben csak gyengén detektálható. A vírusfertőzés során a levelében a miR168 felhalmozódása a virággal összevethető szintre nő. A virág eredetű RNS így praktikus kontrollként szolgált a mikro RNS prekursorának érésének vizsgálatokor.

16. A 49. ábra B részén (94. oldal) a miR168 szint lényegesen magasabb a GFP-t tartalmazó, mint az üres vektorral transzformált növényekben. Mi ennek az oka?

Azt figyeltük meg, hogy ha üres binerás plazmid helyett, olyan bináris konstrukciót használunk, amely fehérjét termel (GFP vagy vírus eredetű köpenyfehérje) akkor az agroinfiltrált növényben a miR168 szintje kissé megemelkedik. Ennek az okát nem tudjuk. A növény talán stresszként érzékeli a nagy mennyiségű idegen fehérje termelődését és a miR168 indukció ennek az eredményeként következik be. Mivel ez konzekvensen előfordult, a mostani kísérleteinkben már csak fehérjét expresszáló konstrukciókat használunk kontrollként.

17. Az 50. ábrán (96. oldal) a C-panelen, a zll mutánsban, mivel a zll mutációval érintett AGO10 fehérje az AGO1 transláció negatív regulátora, megemelkedett AGO1 fehérje szintet várnék, viszont az ábra alapján ez inkább alacsonyabb. Kifejeződik-e nem fertőzött levélben az AGO10 fehérje és gátolja-e ott az AGO1 translációt?

Az ábrán található különböző paneleken megjelenő jelek csak a panelen belül összevethetőek, mivel ezek független kísérletek, meglehetősen nagy technikai szórással. Mallory és mtsai. leírták, hogy az AGO10 az AGO1 negatív regulátora, amely translációs szinten hat [8]. Kimutatták, hogy hipomorf AGO1 mutánsok aktivitása helyreállt az AGO10 (zll-3) mutáns háttérben és ez az AGO1 fehérje szint megnövekedésével járt együtt. A zll-3 növényekben mi

a vírusfertőzés hatására kialakuló AGO1 fehérje felhalmozódást vizsgáltuk és egyelőre nincs adatunk arról, hogy az AGO10/miR168 rendszer hogyan befolyásolja az AGO1 translációs szabályozását normál körülmények között.

18. Szintén ehhez kapcsolódva, a C panelen mutatott fertőzött és mock kezelt minták fehérje mennyiségében nagyon nagy az eltérés, amit a Ponceau festés és az aktin western is jól mutat. Az ábrából egyértelműen úgy tűnik, hogy ha egyforma lenne a fehérje mennyiség, akkor az AGO1 fehérje szintje jóval magasabb lenne a fertőzött, mint a mock mintában, ami jól tükrözné az AGO1 mRNS szintekben meglévő különbséget, azaz a translációs gátlás alól való felszabadulást. Van-e arra adat, hogy vírus fertőzés hatására levelekben az AGO10 transzkript és fehérje szintje is megnő, és így tudja a megnövekedett AGO1 transzkript mennyiség translációját gátolni?

A panelen látható mennyiségi különbség oka, hogy zll-3 növények rendkívül fenotípusosak (kicsik, nehezen nőnek, torzok) így nehéz őket felnevelni, fertőzni és megfelelő mennyiségű anyagot belőlük preparálni. Nem publikált eredményeink szerint vírusfertőzés hatására az AGO10 mRNS expressziója megnő vírusfertőzés hatására és feltehetően így képes a megnövekedett AGO1 mRNS szint translációját gátolni. A fehérje szintről antitest hiányában nincs adatunk.

19. Végezetül egy általános kérdés: miRNS/AGO rendszer a növényi egyedfejlődés szabályozásában is alapvető szerepet játszik. Véleménye szerint az evolúció során mi volt ennek a rendszernek az elsődleges funkciója: az élősködő RNS-ekkel, vírusokkal szembeni védekezés vagy a génkifejeződés szabályozása?

Az RNS csendesítés a miRNS szabályozáson keresztül nélkülözhetetlen szerepet játszik a növényi fejlődésbiológiai folyamatokban, míg a siRNS útvonalon keresztül elsősorban invazív nukleinsavak (vírusok, transzpozonok) elleni védekezés valósul meg. Ez a két útvonal nagyban átfed, pl. az AGO1 fehérje mindkét útvonalban központi szerepet játszik, de léteznek különbségek is. Tehát az evolúció során elsősorban az RNS csendesítés siRNS útvonala specializálódott az élősködő RNS-ekkel szembeni védekezésre. Ennek az útvonalnak a másodlagos jellegét tükrözi az, hogy míg hidegben a siRNS útvonal erősen gátolt - nincs rá szükség az alapvető életfolyamatokban - addig a miRNS útvonal továbbra is működőképes. A miR168 mediált AGO1 mRNS szabályozás nélkülözhetetlen szerepet tölt be a növény fejlődésében, a miR168 túltermelése, hiánya vagy miR168 szabályozás gátolt AGO1 mRNS kifejezése transzgenikus növényben súlyos fenotípusos elváltozásokat okoz [9]. Mivel a legtöbb miRNS aktivitása az AGO1 fehérjén keresztül történik ezért érthető ennek a rendszernek az érzékenysége. Az AGO1 fehérje azonban a siRNS alapú vírus ellenállóság kulcs molekulája is. Vírusfertőzött növényekben nagyon gyakran megnő az AGO1 mRNS

szintje, fokozandó a növény ellenálló képességét. A megnövelt AGO1 szint által kialakult fokozott ellenállóság csökkentésére alakulhatott ki az evolúció során, egyes növényi vírusok esetén, a miR168 indukció képessége, ami a legújabb adataink szerint a különböző vírus eredetű RNS csendesítés gátló fehérjékhez köthető. Tehát a vírusok a miR168 elsődleges génszabályozási funkcióját használják ki az AGO1 gátlás kiváltására.

Hivatkozások

1. Celix, A., E. Rodriguez-Cerezo, and F. Garcia-Arenal, *New satellite RNAs, but no DI RNAs, are found in natural populations of tomato bushy stunt tobravirus*. Virology, 1997. **239**(2): p. 277-84.
2. Li, X.H., et al., *Turnip crinkle virus defective interfering RNAs intensify viral symptoms and are generated de novo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(23): p. 9173-7.
3. Yoo, B.C., et al., *A systemic small RNA signaling system in plants*. Plant Cell, 2004. **16**(8): p. 1979-2000.
4. Lin, S.I., et al., *Regulatory network of microRNA399 and PHO2 by systemic signaling*. Plant Physiol, 2008. **147**(2): p. 732-46.
5. Carlsbecker, A., et al., *Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate*. Nature. **465**(7296): p. 316-21.
6. Szittya, G., et al., *Short defective interfering RNAs of tobamoviruses are not targeted but trigger post-transcriptional gene silencing against their helper virus*. Plant Cell, 2002. **14**(2): p. 359-72.
7. Burgyn, J., et al., *The ORF1 products of tobamoviruses play a crucial role in lethal necrosis of virus-infected plants*. J Virol, 2000. **74**(23): p. 10873-81.
8. Mallory, A.C., et al., *Redundant and specific roles of the ARGONAUTE proteins AGO1 and ZLL in development and small RNA-directed gene silencing*. PLoS Genet, 2009. **5**(9): p. e1000646.
9. Mallory, A. and H. Vaucheret, *Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins*. Plant Cell. **22**(12): p. 3879-89.

Gödöllő, 2011. Október 24.

Tisztelettel,



Havelda Zoltán