

dc_35_10

MTA Doktori Pályázat

Doktori értekezés

**VÍRUS-GAZDANÖVÉNY KÖLCSÖNHATÁS KOMPATIBILIS
KAPCSOLATOKBAN: TÁMADÁS, VÉDEKEZÉS, TÜNET KIALAKULÁS.**

Havelda Zoltán

Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont

Gödöllő, 2010

Tartalomjegyzék.

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS.....	5.old
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	8.old
2.1. A növényi vírusok általános leírása.....	8.old
2.2. A Tombusvírus család általános jellemzése.....	10.old
2.2.1 A Tombusvírusok genomszerveződése.....	11.old
2.2.2. Defektív interferáló RNS-ek.....	12.old
2.3. Az RNS csendesítés.....	15.old
2.3.1. A siRNS útvonal.....	15.old
2.3.2. A miRNS útvonal.....	18.old
2.3.3 A vírus kódolta RNS csendesítés gátló fehérjék.....	20.old
2.4 Vírusfertőzés okozta génexpressziós változások a növényben.....	21.old
3. FELHASZNÁLT ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	22.old
4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK.....	23.old
4.1 Kis RNS-ek hatékony és specifikus kimutatása LNA oligonukleotidokkal és a növényi miRNS-ek térbeli akkumulációjának vizsgálata.....	23.old
4.1.1 Az LNA próbák érzékenyebbek, mint a tradicionális DNS próbák.....	23.old
4.1.2. Az LNA próbák specifikusak.....	26.old
4.1.3. Az LNA oligók általánosan felhasználhatóak és gyorsabb munkavégzést tesznek lehetővé.....	27.old
4.1.4. Az LNA oligók érzékenységeinek vizsgálata <i>in situ</i> hibridizálás során...	29.old
4.1.5. Az LNA oligók specifikusságának vizsgálata <i>in situ</i> hibridizációs kísérletekben.....	31.old
4.1.6. Endogén miRNS-ek expressziós mintázatának vizsgálata <i>in situ</i> hibridizációval.....	32.old
4.2. Vírus fertőzés hatására kialakuló komplex térbeli változások a növény génexpressziós rendszerében.....	36.old
4.2.1. CMV fertőzött töksziklevelek vizsgálata.....	36.old
4.2.2. A "shut off" jelenség kialakulása a szisztémikusan fertőzött levelekben.....	38.old

4.2.3. A "shut off" jelenség kapcsolata a tünetek kialakulásával.....	42.old
4.2.4. A "shut off" jelenség kialakulásának molekuláris háttere.....	46.old
4.3. Az RNS csendesítés alapú védekezés rendszer szövet szintű működésének vizsgálata.....	49.old
4.3.1. Cym19Stop vírus a vad típusú vírussal megegyező hatékonysággal replikálódik a megfertőzött sejtekben.....	51.old
4.3.2. Vírus eredetű fehérjék felhalmozódása a Cym19Stop fertőzött szövetekben.....	52.old
4.4. DI RNS-ek tünet módosító hatásnak molekuláris analízise.....	55.old
4.4.1. A DI RNS jelenléte gátolja a vad típusú vírus elterjedését a szisztémikusan fertőzött levelekben.....	55.old
4.4.2. TBSV RNS és p19 fehérje felhalmozódás protoplasztokban DI RNS jelenlétében.....	57.old
4.4.3. A DI RNS jelenléte növeli a szabad vírus specifikus siRNS-ek jelenlétét.	59.old
4.4.4. A DI RNS nem képes a vírus felhalmozódást befolyásolni alacsony hőmérsékleten.....	63.old
4.4.5. A DI RNS jelenléte és a p19 hiánya által okozott vírus akkumuláció gátlás modellje.....	65.old
4.4.6. A DI RNS-ek specifikus tünet módosító hatása.....	67.old
4.4.7. A tünet befolyásolásért felelős régió lokalizálása a vírus genomikus RNS-én.....	72.old
4.4.8. A tünet befolyásolásért felelős régió lokalizálása a DI RNS-en.....	73.old
4.4.9. A vírus elterjedése a szisztémikus levelekben védő és nem-védő DI RNS-ek jelenlétében.....	74.old
4.4.10. Kiméra DI RNS-ek hatása a tünetek kifejlődésére.....	75.old
4.4.11. A DI RNS-ek tünet csökkentő hatásában szerepet játszó faktorok összefoglalása.....	79.old
4.5. A miR168 szerepe a vírus fertőzött növényekben.....	81.old
4.5.1. A miR168 indukciója általános jelenség a növény-vírus interakciókban.....	82.old
4.5.2. A miR168 indukciója térben átfed a vírus felhalmozódással és a prekursorának érés termékei fokozott akkumulációt mutatnak.....	83.old
4.5.3. A miR168 indukció vírusfertőzött növényekben általánosan kísért	

az AGO1 mRNS fokozott felhalmozódásával.....	85.old
4.5.4. Az AGO1 fehérje felhalmozódása gátolt a vírusfertőzött növényekben.....	87.old
4.5.5. A p19 RNS csendesítés szuppresszor eltávolítása a fertőzési folyamatból a miR168 indukció hiányát és fokozott AGO1 akkumulációt idéző elő.....	89.old
4.5.6. A p19 nem képes hatékonyan kötni a miR168-at.....	91.old
4.5.7. A p19 fehérje tranziens expressziója a miR168 akkumuláció fokozódását és párhuzamosan az AGO1 fehérje felhalmozódásának gátlását idézi elő.....	93.old
4.5.8. Azokban a mutánsokban, amelyekben a miR168 vezérelt kontroll vagy a transzlációs gátlás nem működik az AGO1 fehérje felhalmozódás gátlása sérült.....	95.old
4.5.9. A vírus indukálta miR168 felhalmozódás AGO1 fehérje szint reguláló hatásának modellje.....	97.old
5. ÖSSZEFOGLALÁS.....	99.old
6. FELHASZNÁLT IRODALOM.....	102.old
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	114.old
8. MELLÉKLETEK.....	115.old
8.1. A különböző miRNS-ek kimutatására tervezett LNA és DNS oligonukleotidok táblázata	115.old
8.2. Rövidítések jegyzéke.....	115.old
8.3. Az értekezéshez kapcsolódó publikációk listája.....	118.old
8.4. Az értekezéshez kapcsolódó publikációk első oldalainak másolata.....	121.old

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

BEVEZETÉS

A növényeket fertőző vírusok általában kisméretű örökítő anyagot hordoznak, egyszerű felépítésűek (csupán néhány fehérjét kódolnak) mégis súlyos gazdasági károkat képesek okozni. Kompatibilis vírus-gazda növény kapcsolatban a vírus képes replikálódni (örökítő anyagát sokszorosítani) az elsődlegesen fertőzött sejtekben és sejtről sejtre terjedni a növényi szövetben majd az edénynyaláb rendszer segítségével eljutni a növény távolabbi szöveteibe így kialakítva a szisztemikus (egész növényre kiterjedő) fertőzést. Mivel a vírusok obligát paraziták, ezért élelciklushoz fel kell használniuk a gazdasejt erőforrásait. A vírus fertőzés alapvetően átszabja a megfertőzött növény génexpressziós rendszerének működését. A fertőzés során egyes gének, pl. az általános stressz válaszokban szerepet játszó, kifejeződése indukálódik, míg más gének aktivitása lecsökken. A fertőzés hatására különböző szintű védekezési reakciók/stratégiák indukálódnak a növényben, de a legújabb eredmények alapján elmondható, hogy a vírusok is élnek olyan mechanizmusokkal, amelyek feladata a növényi védekező rendszer aktivitásnak gátlása.

A vírus fertőzés során kialakuló komplex molekuláris kölcsönhatások megváltoztatják a fertőzött növény metabolizmusát. Ezek a metabolikus változások alakítják ki a betegség tüneteket, amelyek jellegzetesek az adott vírus-növény interakcióra. A gazdasági károkat közvetlenül a kialakuló tünetek okozzák, amelyek a hozamot és a termés minőséget is befolyásolják. A megfertőződött növény gyógyítására már nincs mód, csak megelőzéssel lehet védekezni a vírus fertőzések ellen. A vírus-növény molekuláris interakció vizsgálata többféle szempontból is lehetőséget nyújt fontos tudományos területek vizsgálatára.

Vizsgálhatjuk tünet kialakulás molekuláris hátterét, amely ugyan napjainkban is vizsgált de részleteiben még nem ismert és rendkívül fontos a gazdasági károkozásban betöltött szerepe miatt. A kompatibilis gazdanövény-vírus kapcsolat tanulmányozása több szempontból is hasznos. Az interakció egyik partnere, a vírus, viszonylag egyszerű organizmus, amely megengedi a vírus genom irányított megváltoztatását a molekuláris biológia technológiai eszköztárával. A létrehozott mutáns vírusok felhasználásával analizálni lehet az egyes vírus fehérjék szerepét a vírusfertőzési folyamatokban. Egyes vírusok társult szubvirális molekulái (pl. defektív interferáló (DI) RNS-ek) fontos tünetmódosító hatással rendelkeznek. Ezekben az esetekben szintén nem ismertek pontosan azok a molekuláris

mechanizmusok, amelyekkel a szubvirális molekulák képesek a vírus felhalmozódást, illetve a tünetek kialakulását módosítani.

A vizsgálatunk tárgya lehet a növények által kifejlesztett védekezési mechanizmusok működésének megfigyelése. A növények a vírusfertőzések ellen kifejlesztettek egy általános védekezési stratégiát, mely bizonyos szempontból analóg az állati immunrendszerrel. A fő különbség az, hogy míg az immunrendszer a kórokozó fehérjéit támadja, addig a növényi védekezés, az RNS csendesítés, a betolakodó vírus RNS-ét azonosítja és bontja le. Ez a védekezési mechanizmus a gazdanövény védekezési rendszere által generált kis interferáló RNS-eken (small interfering (si) RNA) alapszik. A keletkezett vírus eredetű siRNS-ek határozzák meg a védekezési rendszer szekvencia specifikusságát amely, elsősorban a vírus RNS-ek hasításával gátolja a fertőző vírus felhalmozódást. A védekezési válasz molekuláris mechanizmusa hasonló és biokémiai szempontból nagyban átfedő egy, a növényekben jelenlevő, mikro RNS (micro(mi)RNA) alapú génszabályozási rendszerrel. A vírusok, hogy képesek legyenek ellenállni a siRNS alapú védekezési rendszernek, RNS csendesítést gátló fehérjéket kódolnak, amelyek aktivitása szintén nagymértékben (lehet) felelős a betegség tünetek kialakulásáért.

A kompatibilis vírus-gazdanövény kapcsolatok megfigyelése lehetőséget nyújt a növényi RNS csendesítés alapú védekezési rendszer és a vírusok által kifejlesztett RNS csendesítést gátló mechanizmusok vizsgálatára, amely magában rejtheti újszerű vírus ellenállósági eljárások kifejlesztésének ígéretét. A vírusok, életciklusok során, eltérő mértékben avatkoznak be a gazdanövény transzkripciós és transzlációs apparátusának működésébe. Ezeknek a vírus indukálta változásoknak a vizsgálata nemcsak a vírus életciklusának jobb megértését teszi lehethetővé, hanem ezen keresztül lehetőséget nyújt alapvető génszabályozási mechanizmusok felismerésére is.

CÉLKITŰZÉS

Munkánk során a betegség tünet kialakulás, illetve a növény-vírus kapcsolat során kialakuló védekezési-támadási mechanizmusok molekuláris hátterét vizsgáltuk. Továbbá kíváncsiak voltunk arra, hogy vajon van-e kapcsolat a két jelenség között.

Kutatásainkban a következő konkrét célokat tűztük ki:

- hatékony kis (si és mi) RNS detektáló rendszer kidolgozását
- vírus fertőzés indukálta mRNS és miRNS expressziós változások megfigyelését és ezek lehetséges szerepének vizsgálatát a tünet kialakulásban.
- az RNS csendesítés alapú védekezési rendszer szövet szintű működésének vizsgálatát
- DI RNS-ek tünet módosító hatásnak elemzését
- a miRNS-ek lehetséges szerepének vizsgálatát a vírushatás folyamatokban.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az irodalmi áttekintés fejezetben a növényi molekuláris virológiai és biológiai kutatásokat a dolgozat megértéséhez szükséges mélységben, a teljeség igénye nélkül, tekintem át. Azokat a kutatásainkat, amelyek a dolgozat tárgyát képezik ebben a fejezetben nem ismertetem. Az általános bevezetésben nem szereplő, azonban egyes fejezethez kapcsolódó speciális adatokat, irodalmi háttérrel az adott fejezetnél mutatom be.

2.1. A növényi vírusok általános leírása.

A jelenleg ismert 72 növényi vírusnemzetség több mint 500 vírushajt foglal magába (Hull, 2002). A növényi vírusok rendkívül változatosak, különböző a víruspartikulák alakja, eltérő a gazdakörük, más és más vektorok terjesztik őket (pl. rovarok, fonálférgek, gombák, pollen, mag vagy maga az ember (agrotechnika)), változatos a genomszerveződésük és a génexpressziós stratégiájuk. Az általuk okozott tünetek is sokfélék lehetnek, az alig észrevehetőtől, a gyűrűsfoltosságon keresztül, a megfertőzött növény teljes nekrozisáig. A növényi vírusok többnyire csak nukleinsavból és az azt körülvevő fehérjeburokból állnak. A nukleinsav lehet RNS vagy DNS, mindkettő lehet egy vagy kétszálú. Az eddig megismert növényi vírusok több mint 90%-át az egyszálú RNS vírusok alkotják. 77%-uk genomi RNS-e pozitív orientációjú (mRNS polaritású) vagyis ezeknek a vírusoknak a genomja mRNS-ként képes működni a vírusfertőzés során. A fertőzött sejtekben a vírusok a gazdanövény fehérjeszintetizáló rendszerét és a növény erőforrásait használják fel replikációs ciklusuk lebonyolításához. A növényi sejtbe bejutó mRNS-polaritású vírus RNS közvetlenül bekapcsolódik a fehérjeszintézisbe. A fehérjeszintézis során keletkező vírus eredetű RNS-függő RNS-polimeráz (RdRp), vagy más néven replikáz, a gazdafehérjével komplexet alkotva felismeri a pozitív RNS szál 3' végének speciális promóter elemét, és a pozitív szálal templátként használva elkezd a komplementer (negatív) szálak készítését. Az elkészült komplementer szálak szolgálnak templátul a nagy mennyiségű pozitív szál szintéziséhez (Buck, 1996). Ezek egy része becsomagolódik a vírus által kódolt köpenyfehérjébe. Az újonnan szintetizálódott vírusok (nem feltétlen virionként) először a szomszédos sejtekbe jutnak át sejtről-sejtre való mozgással, majd a növény szállítónyálábjain keresztül távolabbi szervekbe. Az eukarióta sejt fehérjeszintetizáló rendszere monocisztronos. Ez azt jelenti, hogy a translációt irányító mRNS egyetlen fehérje genetikai kódját (nyitott leolvasási keret, ORF) tartalmazza az 5' nem kódoló szakasz után. A vírus RNS-en kódolt gének száma azonban

egynél több. Az eddig megismert növényi vírusok genomja legalább négy-öt fehérjét kódol (Maia és mtsai., 1996), ezért a pozitív szálú RNS vírusoknak alkalmazkodniuk kellett az eukarióta transzlációs rendszerhez génjeik kifejezhetősége érdekében. A vírus RNS-en kódolt gének kifejeződése öt egymástól eltérő stratégia szerint történhet: (1) szubgenomi RNS-ken keresztül (2) osztott virális genommal (3) poliproteinen keresztül (4) átolvasható (leaky) stop kodonnal (5) olvasási keretváltással (Maia és mtsai., 1996). A természetben ezek a stratégiák az egyes vírusok esetében sokszor egymással kombinálódva fordulnak elő.

A pozitív szálú RNS vírusok által kódolt legáltalánosabb fehérjéket ismert vagy feltételezett funkciójuk alapján a következő csoportokba lehet sorolni.

Struktúrális fehérjék:

A növényi vírusok esetében ez, néhány ritka kivételtől eltekintve, csak a köpenyfehérjét (CP) jelenti, amelynek legismertebb funkciója a vírus részecske külső burkának létrehozása, amely védi az RNS genomot a sejtben lévő nukleázok hatása ellen. A vírusok köpenyfehérjéje sok esetben szerepet játszik az egyes vírusok sejtről-sejtre történő terjedésében valamint a hosszú távú mozgásban is (Carrington és mtsai., 1996).

Enzimek:

Az RNS vírusok legalapvetőbb funkciója a genom replikáció. Minden ismert, replikációképes vírus kódol egy vagy több fehérjét, mely a replikációjáért felelős. Általánosságban ezeket az enzimeket RNS-függő RNS-polimeráznak (RdRp, replikáz) nevezik. Sok esetben sikerült azonosítani a vírus sejtről-sejtre és a vaszkuláris rendszerben történő terjedéséért felelős vírus kódolta fehérjéket is (movement protein; MP). Ezeknek a fehérjéknek a jelenléte teszi lehetővé, hogy a vírus RNS-ek képesek átjutni az egyik sejtől a másikba, a sejteket összekötő plazmodezmákon keresztül (Tzfira és mtsai., 2000).

Vírusfertőzéskor a vírusok vektorok segítségével, vagy mechanikai sérülésen keresztül jutnak be a növényekbe. Replikációjuk után a fertőzés helyétől sejtről-sejtre történő mozgással eljutnak a növény vaszkuláris rendszerébe, ezen keresztül először a gyökérbe, majd a hajtáscsúcsba kerülnek. Innen kiindulva képesek az újonnan fejlődő levelek szállítóyalábjain keresztül kilépni a mezofil sejtekbe, és sejtről-sejtre történő mozgással meghódítják a szöveteket. Ez utóbbit nevezzük szisztémikus fertőzésnek (Hull, 2002).

Mesterséges fertőzéskor a növény alsóbb leveleit mechanikai sértésnek vetjük alá tisztított vírus vagy vírus RNS jelenlétében. Ezt a levelet nevezzük inokulált levélnek, a vírus innen kiindulva terjed el az egész növényben kialakítva a szisztémikus fertőzést. A kísérletek során a vírus fertőzéssel összevetendő egészséges növényeket szintén alávetjük mechanikai

sértésnek azonban a vírus jelenlétének hiányában. Ezeket növényeket nevezzük "mock" inokulált növényeknek.

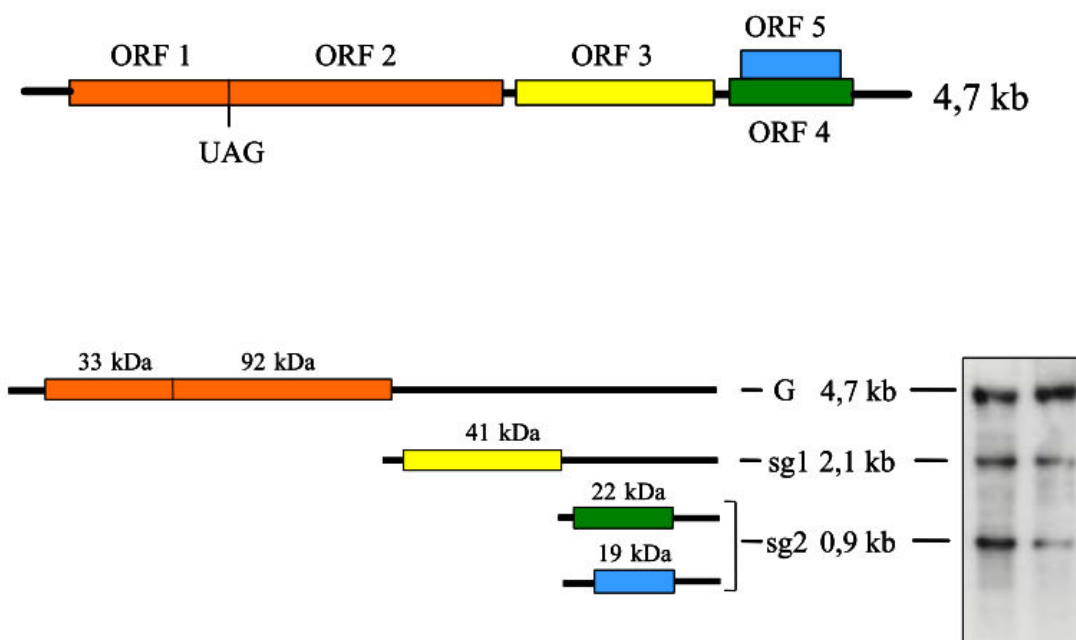
2.2. A Tombusvírus család általános jellemzése

A kísérleteink során számos különböző vírust használtunk, amelyek különböző vírus csoportokba tartoznak. Legfőbb modell vírusaink azonban a Tombusvírus család tagjai, amelyet példaként a bevezetőben részletesen bemutatok. A többi vírusról hely hiányában csak a legszükségesebb ismeretek találhatóak a konkrét vizsgálatoknál az EREDMÉNYEK és MEGVITATÁSUK fejezetben.

A tombusvírusok nevüket a paradicsom bokros törpülés vírus angol neve (tomato bushy stunt virus; TBSV; (Russo és mtsai., 1994)) után kapták. Számos gazdasági szempontból is fontos vírus tartozik ebbe a víruscsoportba. Ilyenek, például a paprikát, paradicsomot és tojásgyümölcsöt is fertőző paradicsom bokros törpülés vírus (TBSV), a rendkívül súlyos tüneteket okozó marokkói paprika vírus (Moroccan pepper virus; MPV). Terjedésük elsősorban a fertőzött talajjal történik, de eddig csak az uborka nekrosis vírusról (cucumber necrosis virus; CNV) írták le, hogy egy talajlakó gomba, az *Olpidium bornovanus* terjeszti vektorként (Kakani és mtsai., 2001). A tombusvírusok RNS genomja 30 nm átmérőjű ikozahedrális részecskébe (partikulába) csomagolódik be, amely 180 darab identikus köpenyfehérje alegységből épül fel. A pozitív szálú, osztatlan genomi RNS kb. 4700 bázis hosszú, és a víruspartikula tömegének 17%-át teszi ki. A vírus RNS-ének 5' végén nincs RNS-hez kötött fehérje, a 3' végen pedig nincs poly-(A) vég. Egyes pozitív szálú RNS vírusokra jellemző, hogy 3' végükön egy, a transzfer RNS-ekhez hasonló másodlagos szerkezetet tartalmaznak, ezt a szerkezetet a tombusvírusok esetében azonban nem lehet kimutatni. A cymbidium gyűrűsfoltosság vírus (cymbidium ringspot virus; CymRSV) genomi RNS 3' végén egy meghatározott RNS s másodlagos szerkezet volt kimutatható amely szükséges a vírus replikációjához (Havelda és Burgyan, 1995). A fertőzött sejtekben és a vírusrészecskékben a genomi RNS-en kívül még két kisebb szubgenomi RNS (sgRNS) van jelen. A sgRNS-ek a genomi RNS-ről keletkeznek, átíródásukat a sgRNS promóter régiói irányítják (Russo és mtsai., 1994; Johnston és Rochon, 1995) és a genomi RNS 3' végi utolsó 2100 (sg 1 RNS), illetve a 3' végi utolsó 900 (sg 2 RNS) bázisát tartalmazzák. A közölt tombusvírusok genomszerveződése megegyezik, vagyis genomjukon ugyanannyi, hasonló méretű nyílt leolvasási keret (open reading frame, ORF) található, azonos sorrendben, köztük rövid nem kódoló régiókkal (Russo és mtsai., 1994).

2.2.1 A Tombusvírusok genomszerveződése

A tombusvírusok 4,7 kb hosszú pozitív szálú, RNS genomja öt ORF-et tartalmaz (1. ábra).



1. ábra Tombusvírusok genomszerveződése. Az ábra jobb részén látható northern blot analízis a genomi (G) és szubgenomi (sg) RNS-eket mutatja. Próba: CymRSV cDNS random próba.

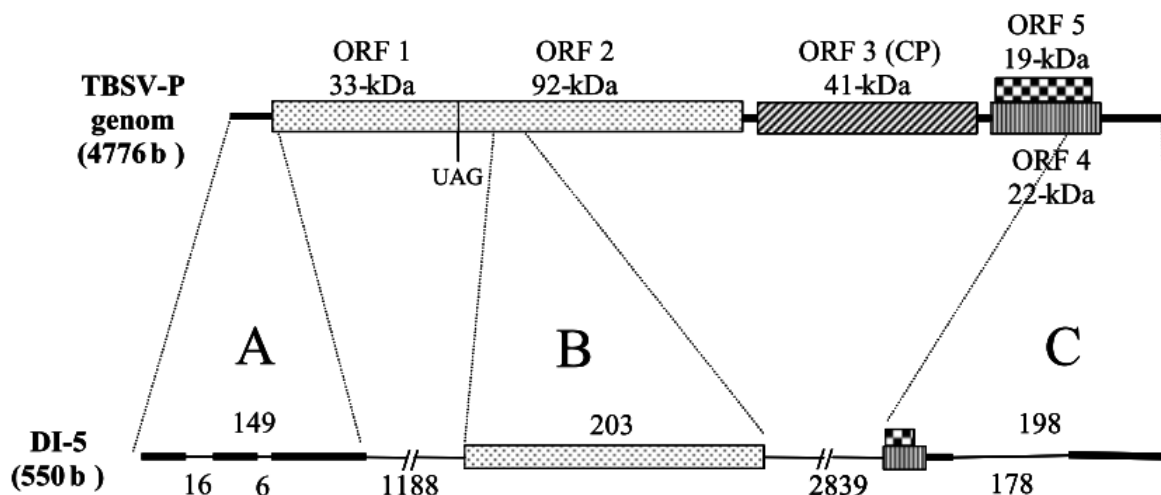
A tombusvírusok 5' végi rövid nem transzlálódó szakaszát (kb. 160 bázis hosszúságú) az első ORF követi, amely egy 33 kDa-os fehérjét kódol. Az ORF1 egy UAG (*amber*) stop kodonnal végződik, amelyet a riboszómák bizonyos gyakorisággal átolvashatnak és így folytathatják a fehérje-szintézist a következő UGA (*opal*) stop kodonig. Az átolvasás folyamán egy 92 kDa-os fehérje képződik (ORF2), amely transzlációs gyakorisága körülbelül az 5%-a a 33 kDa-os fehérjének (Scholthof és mtsai., 1995). Amennyiben egy stop kodont építettek be a CymRSV ORF1-be, amelynek hatására egy csonka 16 kDa fehérje szintetizálódott a 33 kDa fehérje helyett, vagy egy másik kísérletben az *amber* stop kodont kicserélték metionin kodonra, a vírus elvesztette a fertőző képességét (Dalmay és mtsai., 1993). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a 33 kDa fehérje jelenléte szükséges a replikációhoz, továbbá a 92 kDa fehérje önmagában nem elégséges a vírusreplikáció megindításához. Tehát az ORF1 és ORF2 együtt kódolják a vírusreplikációért felelős fehérjéket és a sikeres vírusreplikációhoz mind a két fehérjének jelen kell lennie. Szekvencia analízisek alapján feltételezik, hogy a 92 kDa-os

fehérje rendelkezik az RNS-függő RNS-polimeráz aktivitással (Hearne és mtsai., 1990), míg a 33 kDa-os fehérje pontos szerepe a replikációban nem tisztázott. A tombusvírus replikációs rendszert kiterjedten használják a vírus replikáció pontosabb molekuláris mechanizmusának megértésére (White és Nagy, 2004; Nagy és Pogany, 2006). Az ORF3, amely a sg1 RNS-ről íródik át, kódolja a köpenyfehérjét, amelynek mérete 41 kDa (Russo és mtsai., 1994). Köpenyfehérje mutáns vírus RNS-ek előállításával igazolták, hogy a köpenyfehérje gén nélkülözhető a vírus replikációjában és sejtről-sejtre terjedésében, azonban egyes gazdanövény-vírus kombináció esetén hatással lehet a vírus vaszkuláris rendszerben történő mozgására (Dalmay és mtsai., 1992; Dalmay és mtsai., 1993; Scholthof és mtsai., 1993). A sg2 RNS két fehérjét kódol, két egymást átfedő ORF-en keresztül. Az ORF4 egy 22 kDa-os membrán kötött fehérjét, míg az ORF5 egy abundáns, citoplazmatikus 19 kDa-os fehérjét kódol (Scholthof és mtsai., 1995). A két fehérje eltérő expressziós mintázatot mutat a fertőzött növényben (Scholthof és mtsai., 1995). Azok a mutációk, amelyek csak a tombusvírusok 22 kDa-os fehérje génjét érintették, megakadályozták a vírus elterjedését az inokulált levelekben, de nem érintették a replikációt fertőzött protoplasztokban (Rochon és Johnston, 1991; Dalmay és mtsai., 1993). Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a 22 kDa-os fehérje a vírus sejtről-sejtre történő terjedéséért felelős (movement protein; MP). A 19 kDa-os fehérje nem szükséges sem a vírus replikációjához sem a sejtről-sejtre történő mozgáshoz (Russo és mtsai., 1994). A 19 kDa-os fehérjének azonban fontos szerepe van a vírus által okozott nekrotikus tünetek kialakulásában (Rochon és Johnston, 1991; Dalmay és mtsai., 1993) (Scholthof és mtsai., 1995; Burgyan és mtsai., 2000). A tombusvírusok 19 kDa-os fehérjéről (p19) nemrég igazolták, hogy képes gátolni a vírus indukálta RNS csendesítést (Voinnet és mtsai., 1999). Az RNS csendesítés és a p19 működése a későbbi fejezetekben kerülnek bemutatásra.

2.2.2. Defektív interferáló RNS-ek.

A DI RNS-ek rövid (kb. 400-700 bázis hosszúságú), nem kódoló, önálló replikációra képtelen molekulák, melyek megsokszorozódását a gazdavírus replikáz enzime végzi, így kihasználják szülői vírust (sokszor helper vagy gazda vírusnak is nevezik a szülői vírust), mivel az segíti a DI RNS-ek replikációját. Defektív interferáló RNS-eket a TBSV (Hillman és mtsai., 1987), a CymRSV (Burgyan és mtsai., 1991), a CNV (Finnen és Rochon, 1993), a CIRV (Rubino és mtsai., 1995) és a TBSV-P (Szittyá és mtsai., 2000) tombusvírusoknál írtak le. A DI RNS-ek replikációjuk során visszaszorítják a gazdavírus replikációját mind

növényeken (Hillman és mtsai., 1987), mind protoplasztokban végzett kísérletekben (Jones és mtsai., 1990). A DI RNS-ek jelenléte a növényekben gyengíti a tünetek súlyosságát, a növények védettek a csúcs nekrozissal, majd az azt követő pusztulással szemben. A természetben nem fordul elő DI RNS. DI RNS mentes vírussal fertőzött növényekről kiindulva, többszöri passzálást követően DI RNS-ek keletkeznek *de novo* (Burgyan és mtsai., 1991; Knorr és mtsai., 1991; Finnen és Rochon, 1993). A tombusvírusok DI RNS-einek elsődleges szerkezetét megvizsgálva három konzervatív blokkot lehet azonosítani: az első a vírus genomikus RNS-ének 5' végéről (A), a második a polimeráz gén közepéről (B), a harmadik pedig a genomikus RNS 3' végéről (C) származik (Hillman és mtsai., 1987) (2. ábra).



2. ábra DI RNS szekvencia blokkjainak eredete és felépítése a TBSV-P DI-5 példáján (Szittyá és mtsai., 2000).

A DI RNS-re jellemző blokkok tartalmazzák mindazokat a cisz-aktív elemeket, melyek szükségesek a replikációjukhoz (Chang és mtsai., 1995; Havelda és mtsai., 1995). A tombusvírusok hasonló felépítése arra utal, hogy a replikációjukhoz szükséges cisz-aktív elemek általánosak a tombusvírusok körében. A CymRSV DI RNS-eit vizsgálva több különböző méretű DI RNS-t lehetett azonosítani (Burgyan és mtsai., 1991). Az erős másodlagos struktúrák elvesztése révén a hosszabb DI RNS-ből rövidebb alakulhat, azaz egy evolúciós sor állítható fel közöttük (Havelda és mtsai., 1997). Az átalakulást a replikáció szempontjából versenyképesebb, kisebb méretű molekulák keletkezése irányába ható

szelekció magyarázhatja (White és Morris, 1994). A DI RNS képződésének legáltalánosabban elfogadott nézete szerint a vírus polimeráz valamilyen oknál fogva (például az RNS-ek erős másodlagos szerkezettel rendelkező struktúrái miatt) nem képes átolvasni az új szál szintézise közben bizonyos részeket a templátul szolgáló molekulán. Így, az RNS egy részét átlépve, folytatja az írást ugyanazon molekula más pontján, vagy egy másik molekulán, létrehozva egy deléciós mutánst (copy choice modell) (White és Morris, 1999). A DI RNS-ek jelenléte a növényekben jelentős tünetcsökkenéssel jár együtt. A növények túlélnek a fertőzést, sokszor új levelek képződnek, mintegy kigyógyulnak a fertőzésből (recovery fenotípus; kigyógyulás). Széles körben elfogadott nézet szerint a DI RNS versenyzik a replikációhoz szükséges gazdavírus- és növényfaktorokért, ezért a vírus nem képes olyan hatékony replikációra, mint DI mentes esetben (Russo és mtsai., 1994). Más szerzők szerint a DI RNS képes specifikusan csökkenteni a vírus szubgenomikus 2 RNS felhalmozódását, így csökkentve a mozgásért felelős fehérje és a p19 fehérje mennyiségét, ami a replikációs komplexért való verseny mellett módosíthatja a tünetek kialakulását és a vírus mozgását (Scholthof és mtsai., 1995). Újabb eredmények alapján azt mondhatjuk, hogy a DI RNS-ek jelentős szerepet játszanak a genomi RNS felhalmozódásának csökkentésében az RNS csendesítési mechanizmus révén (lásd később).

2.3. Az RNS csendesítés

A többsejtű eukariota szervezetek bonyolult, térben és időben ellenőrzött, fejlődési program alapján fejlesztik ki a rájuk jellemző szerveket és szöveteket. A program lefutását elsősorban a szervezet genetikai információja szabályozza, de a fejlődés során szükség van a genomban található mobilis genetikai elemek aktivitásának és a külső környezeti tényezők hatásának ellenőrzésére is. Az eddig általánosan vizsgált transzkripciós faktoron alapuló génszabályozási mechanizmus mellett az utóbbi években fény derült egy új, nem kódoló RNS-eken alapuló, szabályozási módról, amely alapvetően új megközelítésbe helyezte az eukariota szervezetek génszabályozási mechanizmusát (Kidner és Martienssen, 2005; Kidner és mtsai., 2005; Baulcombe, 2004; Brodersen és Voinnet, 2006; Voinnet, 2008). Az eukariotákból leírt nem kódoló kis RNS-ek (kb. 21-25 nukleotid hosszúak) a legkülönbözőbb biológiai folyamatokban játszanak szerepet: fejlődésbiológiai jelenségek, heterokromatin kialakulás, vírusok elleni védekezés, mobilis genetikai elemek ellenőrzése, stb. A kis RNS-eknek alapvetően két csoportját különböztethetjük meg: a kis interferáló (small interfering RNS; siRNA) és mikró (micro RNA; miRNA) RNS-ek (Baulcombe, 2004).

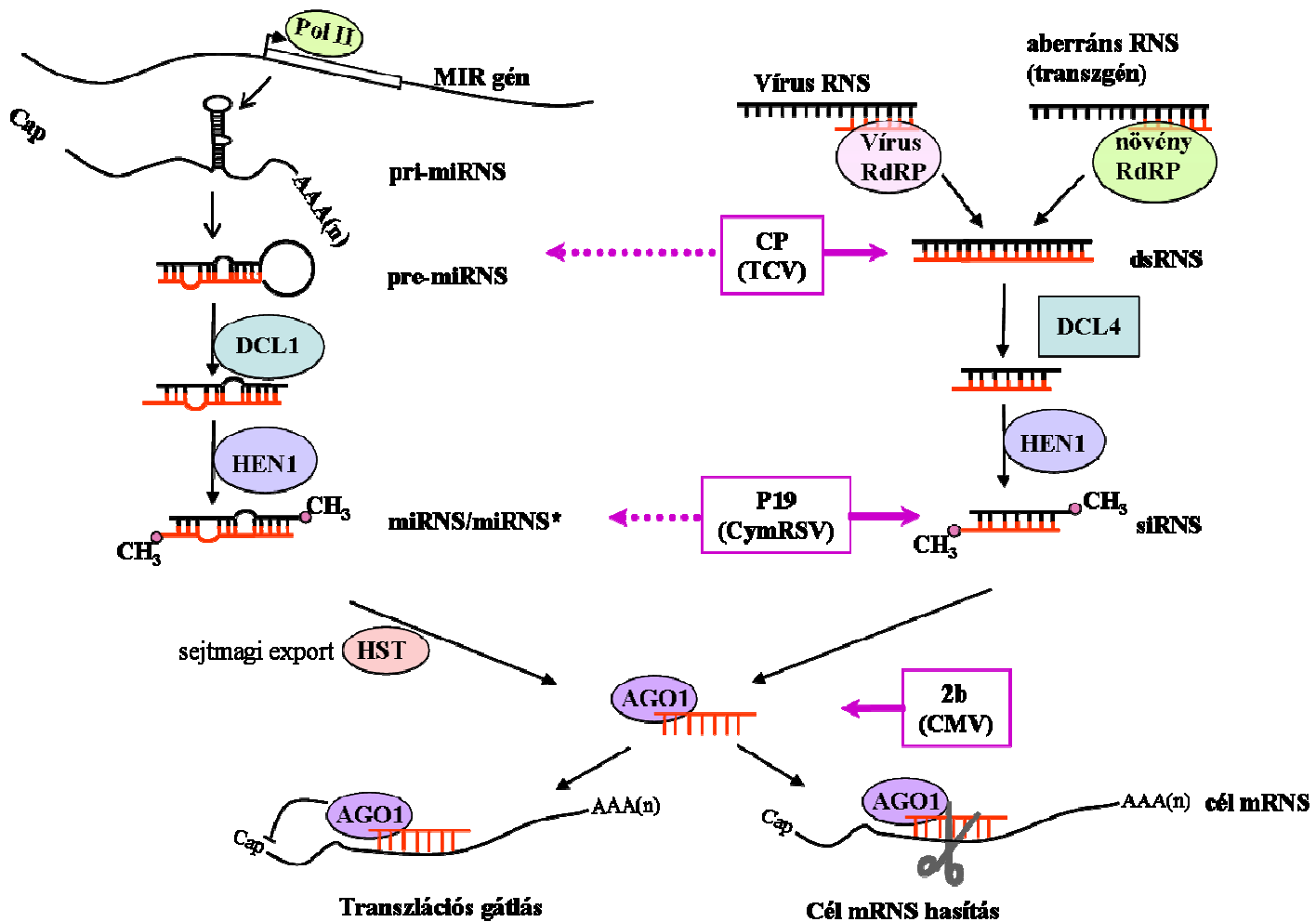
2.3.1. A siRNS útvonal

A siRNS-eken alapuló védelmi mechanizmus eukariotákban hosszabb dupla szálú (ds) dsRNS-ek jelenlétének hatására indukálódik. Az indukáló dsRNS forrása lehet a vírusok replikációja során kialakuló dsRNS intermedier, transzpozonokról származó dsRNS, illetve transzgénikus szervezetekben a transzgénről keletkező átfedő transzkriptumok alakíthatnak ki dsRNS-eket. A jelenség egyik első leírása a növényeknél történt. A pigmentációért felelős egyik gént termeltették transzgénikus petúnia növényekben erős promóter mögé helyezve, de meglepetésre az intenzívebb szín helyett kifehéredett foltokat kaptak a szíromleveleken, ahol a transzgén és az endogén génről származó mRNS szintje is erősen lecsökkent. Ezt a jelenséget ko-szuppressziónak, később géncsendesítésnek nevezték el (Napoli és mtsai., 1990)

Az indukáló dsRNS-t egy enzim komplex (DICER) felhasítja rövid 21 nukleotid hosszúságú siRNS-ekre. A siRNS-ek kémiai szerkezetére jellemző, hogy a 3' végén 2 bázis túlnyúlik és az 5' végükön foszfát csoportot tartalmaznak. A siRNS-ek egyik szála beépül a végrehajtó endonukleáz enzimkomplexbe (RISC), így biztosítva annak szekvencia specificitását. Az így aktivált RISC komplex felismer és elhasít minden a beépült szekvenciával homológiát mutató RNS-t (mRNS, vírus RNS stb)(Voinnet, 2008).

A RISC fő komponense az Argonaute fehérje (AGO), mely a cél mRNS-ek hasításáért felelős (Baumberger és Baulcombe, 2005). Az AGO egy 90-100-kD-os, ún. PAZ PIWI DOMAINS (PPD) fehérje (Carmell és mtsai., 2002). A PAZ domén nevét a fehérjecsoport 3 fő tagjáról (*Drosophila* P ELEMENT-INDUCED WIMPY TESTIS (PIWI), *Arabidopsis* ARGONAUTE1 (AGO1) és *Arabidopsis* ZWILLE (ZLL)) kapta. A PAZ domén az AGO fehérjén kívül a DICER-ben is megtalálható, PIWI doménnel azonban a DICER nem rendelkezik (Cerutti és mtsai., 2000). A PPD fehérjék közül sok rendelkezik RNáz-H aktivitással, mely az egyszálú RNS (ssRNS) molekulát hasítja a kisRNS-sel komplementer régióban. A funkcionális különbség kihangsúlyozására a PPD fehérjéket, a kettősszálú RNS-eket hasító DICER fehérjével szemben, SLICER-nek nevezték el. Az AGO változó N-terminális és konzervált C-terminális: PAZ, MID (middle, középső) és PIWI doménekből áll. A MID domén a kis RNS-ek 5' foszfátját, míg a PAZ domén a 3' véget köti (Song és mtsai., 2003). A PIWI domén az RNáz-H enzimekre jellemző térszerkezetet vesz fel, és endonukleáz aktivitással rendelkezik (Song és mtsai., 2004). *A. thaliana*-ban 10 AGO gént írtak le, melyek más-más funkcióval bírnak. Ezek közül a siRNS és miRNS útvonal egyik legfontosabb és legjobban jellemzett tagja az AGO1 (Vaucheret, 2008).

Az RISC által kettévágott mRNS-t a sejtben található exonukleázok lebontják. A folyamat eredményeképpen az adott mRNS specifikus degradációja a megfelelő gén expressziójának csökkenését eredményezi, ezért ezt a folyamatot poszt-transzkripcionális géncsendesítésnek (PTGS) vagy RNS csendesítésnek (RNA silencing) nevezzük (3. ábra). Magasabb rendű növényekben a sejtszintű PTGS-en kívül létezik egy az egész növényre kiterjedő szisztémikus PTGS is (Palauqui és mtsai., 1997; Voinnet és Baulcombe, 1997). Egyes kutatások azt feltételezték, hogy a sejtben indukált RNS csendesítés során képződött rövidebb, 21nt hosszú siRNS-ek szignál molekulaként viselkedve képesek lehetnek sejtről-sejtre és, a növény szállítószövet rendszerét kihasználva, hosszú távon is terjedni (Himber és mtsai., 2003).



3. ábra. Az RNS cendesítés folyamatai: siRNA és miRNA útvonal. A PolII által átírt kb. 1kb hosszú pri-miRNA transzkriptumot a DCL1 hasítja pre-miRNA-ekre, majd tovább miRNA/miRNA* duplex-re. A miRNA/miRNA* duplex-et a HEN1 metilálja, majd a HST segítségével jut a citoplazmába. A duplex egyik szála, az érett miRNA az AGO1-et tartalmazó RISC-be épül, míg a másik szál (miRNA* szál) lebomlik. A beépült miRNA határozza meg a RISC szekvenciaspecifitását. Növényekben az aktív RISC elsősorban a célszekvenciák hasításával, kisebb részük transzlációs gátlással szabályoz. A PTGS kiváltója egy kettősszálu (double strand; ds) RNS, amely lehet transzgén vagy vírus eredetű. A dsRNS-eket elsősorban a DCL4 enzimkomplex ismeri fel és darabolja siRNA-ekre. A képződött siRNA-ek beépülnek a RISC komplexbe, amely így a siRNA-ekkel homológ szekvenciákat elhasítja. A különböző vírusok által kódolt RNS cendesítés szuppresszor fehérjék (a tarlórépa satnyulás vírus köpenyfehérjéje (TCV-CP); a CymRV p19 fehérjéje; az Uborkamozzaik vírus 2b fehérjéje CMV-2b) különböző módokon képesek gátolni az RNS cendesítést.

2.3.2. A miRNS útvonal

A miRNS-ek a siRNS-ekkel ellentétben olyan RNS prekursor (pre-miRNA) molekulákról keletkeznek, amelyek jellegzetes hajtúszerű másodlagos szerkezetet mutatnak (3. ábra). Napjainkban a növényekben, állatokban, ill. vírusokban leírt miRNS-ek száma 4000-re tehető, melyek a miRNS adatbázisban – miRBase: www.mirbase.org - hozzáférhetőek (Griffiths-Jones és mtsai., 2006). Egyre nyilvánvalóbbá válik az is, hogy a miRNS-eknek esszenciális szerepük van a különböző fejlődésszabályozási folyamatokban, ezek szabályozzák a fehérje-kódoló gének kb. 30%-át (Lewis és mtsai., 2005). Bioinformatikai adatok alapján a genomban található gének hozzávetőlegesen 1%-a kódol miRNS prekursorokat, mely szám megközelítőleg megegyezik a transzkripció faktorok számával (Lim és mtsai., 2003). Az azonosított miRNS-ek döntő többsége transzkripció faktorokat szabályoz. Az eddigi adatok azt mutatják, hogy a növényi miRNS-ek többsége konzervatív, vagyis ugyanaz a miRNS megtalálható különböző növénycsaládokban és a rokon miRNS-ek közt csak kismértékű eltérés mutatható ki. Előfordulnak azonban fajspecifikus miRNS-ek is (Sunkar és mtsai., 2005).

A miRNS-ek rövid, 21-24 nt hosszú nemkódoló RNS-ek, melyek a miRNS génekről (*MIR* gének) keletkeznek, általában saját promóterrel rendelkeznek és transzkripciójukat a fehérjekódoló génekhez hasonlóan az RNS polimeráz II végzi (Baulcombe, 2004; Herr és Baulcombe, 2004). A *MIR* gének transzkriptumai (pri-miRNS) kb. 1 kilobázis hosszúságúak, poliadeniláltak, 5' végi „cap”-et tartalmaznak és hajtúszerű másodlagos szerkezetet vesznek fel (pre-miRNS). Növényekben a pri-miRNS-ek és a pre-miRNS-ek egymást követő hasítását egyaránt a DICER-LIKE1 (DCL1) enzimkomplex végzi a sejtmagban (Park és mtsai., 2005). *A. thaliana*-ban négy DCL enzimet kódoló gén található, melyek közül a miRNS képződésben alapvetően a DCL1 vesz részt ((Xie és mtsai., 2004). A DCL1 egyedül is képes a pri-miRNS-ek és a pre-miRNS-ek hasítására, de pontos működéséhez mindkét esetben szükség van HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1) és SERRATE (SE) fehérjékre is (Dong és mtsai., 2008). A kihasadt miRNS-t (és siRNS-t) a HUA ENHANCER1 (HEN1) metilálja. A HEN1 egy S-adenosyl methionine (SAM)–függő metiltranszferáz, mely szintén rendelkezik dsRNS kötő doménnel és sejtmagi lokalizációs szignált tartalmaz. A HEN1 a miRNS/miRNS* duplex mindkét szálán a 3' végén lévő ribóz 2' hidroxil csoportját metilálja ((Yu és mtsai., 2005). A növények miRNS-einek citoplazmába történő transzportjában feltételezhetően az Exp5 ortológ HASTY (HST) játszik szerepet, bár HST hiányában sem figyelhető meg miRNS felhalmozódás a sejtmagban (Park és mtsai., 2005) A citoplazmába jutott miRNS/miRNS*

duplex miRNS szála növények és állatok esetében is beépül az RNS csendesítés végrehajtó komplexébe (RISC), míg a miRNS* szál lebomlik.

A miRNS-ek két fő módon szabályozhatják célgénjük kifejeződését: az mRNS-ek hasításával vagy transzlációs gátlásával. A végrehajtó enzimkomplex szekvencia specificitását mindkét esetben a RISC-be beépült miRNS-ek határozzák meg. Növényekben a miRNS-ek általában teljes vagy majdnem teljes komplementaritást mutatnak a cél mRNS-sel, mely a célszekvencia hasítását indukálja (Tang és mtsai., 2003). A miRNS felismerő hely általában az mRNS kódoló szakaszán található (Jones-Rhoades és Bartel, 2004). Mutációs vizsgálatokkal kimutatták, hogy a miRNS felismerő hely középső és 5' régiója felelős a biológiai aktivitásért, a 3' vég jelentősége kisebb (Parizotto és mtsai., 2004). A hasítás után az 5' hasítási termék 3' vége oligo-uridinálódik, amely a molekula gyors lebomlását eredményezi (Shen és Goodman, 2004). A 3' hasítási termék ezzel szemben lassabban bomlik le, amely lebontást az EXORIBONUCLEASE4 (XRN4) végzi 5'-3' irányban (Souret és mtsai., 2004). Az állati rendszerekhez hasonlóan, növényekben is találtak példát transzlációs gátlással történő szabályozásra. *A. thaliana*-ban például a miR172 által szabályozott *APETALA2* a célszekvencia hasítása mellett transzlációs gátlással is szabályozódik (Aukerman és Sakai, 2003). A transzlációs gátlás a legújabb megfigyelések alapján úgy tűnik, hogy a növényvilágban is meglehetősen elterjedt (Brodersen és mtsai., 2008). Az állati rendszerektől eltérően azonban itt a miRNS és célszekvenciája teljes komplementaritást mutat és a célszekvencia a kódoló régióban található.

Mind az állati, mind a növényi genomban több prekuzorról keletkezik hasonló miRNS, vagyis a miRNS-ek is géncsaládokat alkotnak. Az állati miRNS-ek sok, kicsi miRNS családba sorolhatók, míg a növényekben kevesebb a miRNS családok száma, viszont ezek a miRNS családok nagyobbak (Griffiths-Jones és mtsai., 2006). Az érett miRNS-ek egy része konzervált a rokon fajok közt, eltérő azonban az egyes fajokban a miRNS kópiák száma. A legújabb eredmények megmutatták, hogy a miRNS-ek kapcsolatban állhatnak környezeti stressz válaszokkal (Sunkar és Zhu, 2004; Sunkar és mtsai., 2007) és a miRNS képződés útvonalának megzavarásán keresztül vírus fertőzés esetén szerepet játszhatnak a tünetek kialakulásában (Chapman és mtsai., 2004). Ezek a mechanizmusok alapvetően befolyásolják a növények életjelenségeit és természetesen ezen keresztül hatással vannak a termesztett növényeink gazdaságilag fontos tulajdonságaira (termőképesség, stressztolerancia, a vírusfertőzés tüneteinek kialakulása stb.). A miRNS-ek vizsgálatánál problémát okoz, hogy nagyon rövidnek ezért hibridizációs eljárásokkal nehéz őket hatékonyan és specifikusan kimutatni.

2.3.3 A vírus kódolta RNS csendesítés gátló fehérjék.

A vírus-növény fegyverkezési versenyben az RNS csendesítés hatásának kiküszöbölésére sok vírus RNS csendesítés szuppresszor fehérjét fejlesztett ki (Brigneti és mtsai., 1998; Voinnet és mtsai., 1999; Dunoyer és mtsai., 2004; Burgyan, 2008). Az egyik legjobban jellemzett RNS csendesítés szuppresszor fehérje a tombusvírusok p19 fehérjéje. Sikerült *in vitro* kísérletek révén bebizonyítani, hogy a p19 fehérje 21bp hosszúságú dupla szálú siRNS-t köt, habár nem tartalmaz ismert dsRNS kötő domént (Silhavy és mtsai., 2002). A p19 egy olyan ds RNS kötő fehérje, amely az RNS-t a mérete alapján köti meg. Erős kölcsönhatásba lép a 18-20 bp hosszúságú dsRNS-sel (beleértve a 21-22bp méretű ds siRNS-ek 19-20bp hosszú kettős szálú részeit), de gyengébben köti a 17 vagy 21bp méretű kettős szálú RNS-t tartalmazó RNS-t (Vargason és mtsai., 2003). Röntgenkristallográfiai szerkezet tanulmányok bebizonyították, hogy a p19 fehérje homodimer formában a dsRNS végeivel lép kölcsönhatásba, és ez adja a kapcsolat méret és erősség specifikitását (Vargason és mtsai., 2003). Vírusfertőzött sejtekben a p19 fehérje megköti a vírus specifikus siRNS-ek döntő többségét, így megakadályozza a RISC komplex programozását (Lakatos és mtsai., 2004). Fertőzött szövetekben a vírus specifikus siRNS-ek főleg a p19 fehérje által kötött formában vannak jelen (Lakatos és mtsai., 2004), míg az RNS csendesítés szuppresszor mutáns vírus esetében a siRNS-ek egy része szabad formában van jelen. A p19-et nem kódoló CymRSV (Cym19Stop) fertőzés esetén a növény a fertőzésből kigyógyul, ún. „recovery” fenotípust és csökkent vírus felhalmozódást mutat (Szittyá és mtsai., 2002). Az elmúlt évben számos vírus RNS csendesítés szuppresszorának kezdték el feltárni a molekuláris működési mechanizmusát. Kiderült, hogy ezek a fehérjék az RNS csendesítés útvonalának különböző pontjain képesek beavatkozni (Brigneti és mtsai., 1998; Voinnet és mtsai., 1999; Dunoyer és mtsai., 2004; Burgyan, 2008) (3. ábra). Egyes fehérjék, mint a p19, képesek siRNS-t kötni és eliminálni a rendszerből, mások hosszú dupla szálú RNS-ek kötésével gátolhatják a mechanizmust (TCV CP; köpenyfehérje kódolja az RNS csendesítési funkciót), illetve létezik olyan stratégiai is ahol a szuppresszor az AGO1 fehérjével lép közvetlen kapcsolatba így gátolva annak aktivitását. A szuppresszorok molekuláris működési mechanizmusának részletei azonban még közelről sem ismertek pontosan, és további vizsgálatok szükségesek a különböző mechanizmusok minőségének, súlyának és elterjedtségének megértéséhez.

2.4. Vírusfertőzés okozta génexpressziós változások a növényben.

Vírusos fertőzés során a vírus az inokulált leveleken keresztül bejut a növénybe, intenzíven replikálódik, majd a szállítószövet-rendszeren keresztül elterjed az egész növényben (szisztemikus fertőzés). A fertőzés során az aktívan replikálódó vírus alapvetően megváltoztatja a növény transzkripciós és transzlációs rendszerét továbbá indukálja gazda növény védekező rendszereit (Whitham és mtsai., 2006). Ezen komplex változások eredőjeként alakulnak ki az adott növény-vírus interakcióra jellemző betegség tünetek. A gazdanövény génexpressziós rendszerének teljes analízise (microarray profiling) rengeteg információt szolgáltat a vírusos fertőzések drasztikus hatásairól (Golem és Culver, 2003; Whitham és mtsai., 2003; Marathe és mtsai., 2004; Senthil és mtsai., 2005). Ennek a technológiának a hátránya azonban, hogy nem képes megkülönböztetni a vírus replikáció által közvetlenül kiváltott, illetve a növény által indukált általános stressz és védekezési válaszok során történő változásokat. A vírusfertőzött növényi részek *in situ* hibridizációs vizsgálata nagyon hatékony eszköz arra, hogy összehasonlítsuk a vírus jelenlétét és néhány kiválasztott gazdagén expresszióját. Maule és munkatársai ezzel a technikával (Wang és Maule, 1995; Aranda és mtsai., 1996) Pea seed-borne mosaic vírus (PSbMV) fertőzött embriókban azt találták, hogy vannak olyan gének, melyek expressziója a vírusos fertőzés frontjában időlegesen aktiválódik (pl. *ubiquitin*, *HSP70*). Ezzel egy időben néhány gén mRNS-e a fertőzés frontjában teljesen eltűnt. Ezt a folyamatot gazdagén „shut-off”-nak nevezték el. A folyamatot több vírus esetében is leírták (Escaler és mtsai., 2000), ezért általánosnak tekintették, de tranziensnek bizonyult mert a vírus fertőzési frontjának előrehaladtával e gének expressziója közel normál szintre állt vissza. Ezek az adatok arra utaltak, hogy az aktív vírus replikáció maga felelős a "shut off" jelenség kialakulásáért. Érdekes módon a vírus fertőzés során, borsó embrióban, egyes gének (aktin, tubulin és hő sokk faktor) expressziója változatlan maradt (Aranda és mtsai., 1999; Escaler és mtsai., 2000; Escaler és mtsai., 2000).

3. FELHASZNÁLT ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleteink során nagyrészt az általános DNS, RNS és fehérje manipulációs eljárásokat használtuk, amelyek megtalálhatóak a széles körben használt különböző molekuláris biológiai módszerekkel foglalkozó kézikönyvekben. A kísérletek során használt, speciálisabb technikák részletezését sem tartalmazza ez a dolgozat, az érdeklődők számára ezek forrásai, illetve pontos leírásai, az eredeti publikációkban találhatóak meg. A dolgozat egy része egy új kis RNS detektálási rendszer kifejlesztését mutatja be, azonban a bemutatás itt is a technológia képességeinek és határainak leírására koncentrálna. Számos, a hatékony kis RNS kimutatás témakörében írt, metodikai publikációnk jelent meg, amely lehetővé teszi az érdeklődők számára a részletes protokollok elérését.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

4.1. Kis RNS-ek hatékony és specifikus kimutatása LNA oligonukleotidokkal és a növényi miRNS-ek térbeli akkumulációjának vizsgálata.

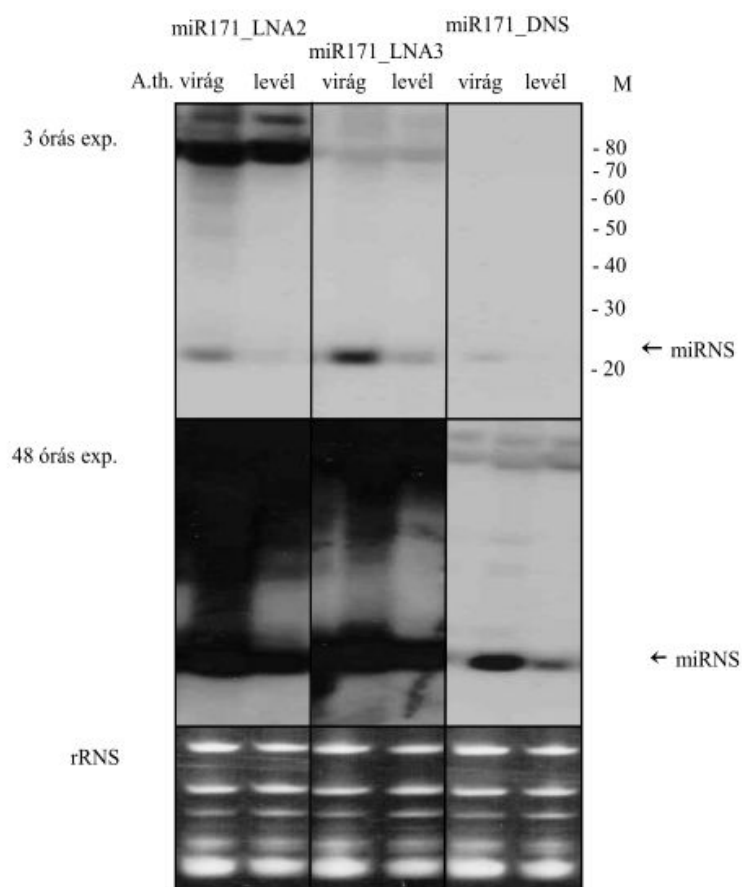
Kísérleteink központi kérdése volt a vírus fertőzések során kialakuló miRNS szintű változások vizsgálata. Ezekhez vizsgálatokhoz szükségünk volt egy új, kis RNS-t kimutató, technológia kifejlesztésére. A 20-24 nukleotid hosszúságú RNS molekulák kimutatása, kis méretüknél fogva, nehézséget okozott, ezért célkitűzéseink közül az első egy hatékony és megbízható miRNS detektálási rendszer kidolgozása volt. A miRNS-ek detektálására korábban általánosan DNS oligonukleotidokat használtak. A próbák rövidege és a DNS/RNS kapcsolat viszonylagos gyengesége miatt azonban a DNS alapú próbák hatékonysága és megbízhatósága erősen megkérdőjeleződött. A detektálás érzékenységének fokozása érdekében ún. „locked nucleic acid” (LNA)-módosított oligonukleotid próbákra alapuló rendszert dolgoztunk ki (Valoczi és mtsai., 2004; Varallyay és mtsai., 2007; Kauppinen és Havelda, 2008; Varallyay és mtsai., 2008). Az LNA-k biciklusos nagy affinitású RNS analógok, amelyekben a cukor-foszfát gerinc furanóz gyűrűje kémiaiilag az N-konformációba (3' - endo) kötött egy 2' - 4' metilén híd által. Ezen oligók nagy hőstabilitást mutatnak mind DNS-sel, mind RNS-sel történő hibridizálás esetén (Frieden és mtsai., 2003). Így DNS-hez történő hibridizálás esetén 1-8, RNS-hez történő hibridizálás esetén 2-10°C-kal emelhető az olvadási pont (T_m) minden beépített LNA monomerrel. Az LNA oligókkal végzett kísérletek megnövekedett érzékenységet és specifitást mutattak microarray kísérletekben (Tolstrup és mtsai., 2003).

4.1.1 Az LNA próbák érzékenyebbek mint a tradicionális DNS próbák.

Annak érdekében, hogy kihasználjuk az LNA oligók kedvező tulajdonságait, különböző növényi és állati miRNS-ek kimutatására terveztünk olyan LNA módosított oligókat, melyek eltérő mintázattal tartalmaztak módosított nukleotidokat (1. táblázat). Elsőként az *A. thaliana* miR171 kimutatására terveztünk olyan módosított oligonukleotidokat, melyekben minden második, ill. minden harmadik nukleotid volt LNA monomerre cserélve. Az oligonukleotidokat kisRNS northern blot segítségével vizsgálva az érett miRNS-ek mérettartományában, az LNA oligókkal történő hibridizálással jelentősen megnövekedett a jelintenzitás (4. ábra). Az LNA és a DNS oligó is mutat hibridizációs jelet magasabb

dc_35_10

mérettartományban, amely méret azonban nem egyezik meg a pre-miRNS 123 nt-os méretével, tehát feltételezhető, hogy nem specifikus jel. A háttér jel a miR171_LNA2 próbával volt különösen erős, mely a LNA módosítások magas fokának (50%) és az ebből adódó extrém magas LNA-RNS duplex stabilitásnak köszönhető. Ezzel szemben a miR171_LNA3 próba érzékenysége jelentősen megnövekedett a DNS próbához képest, viszont ez esetben a háttér gyenge volt. A miR171_LNA3 próbával hibridizált minták esetében 3 órás expozícióval kapott jelekhez hasonló, erős jeleket DNS próba esetén csak 48 órás expozíció esetén kaptunk.

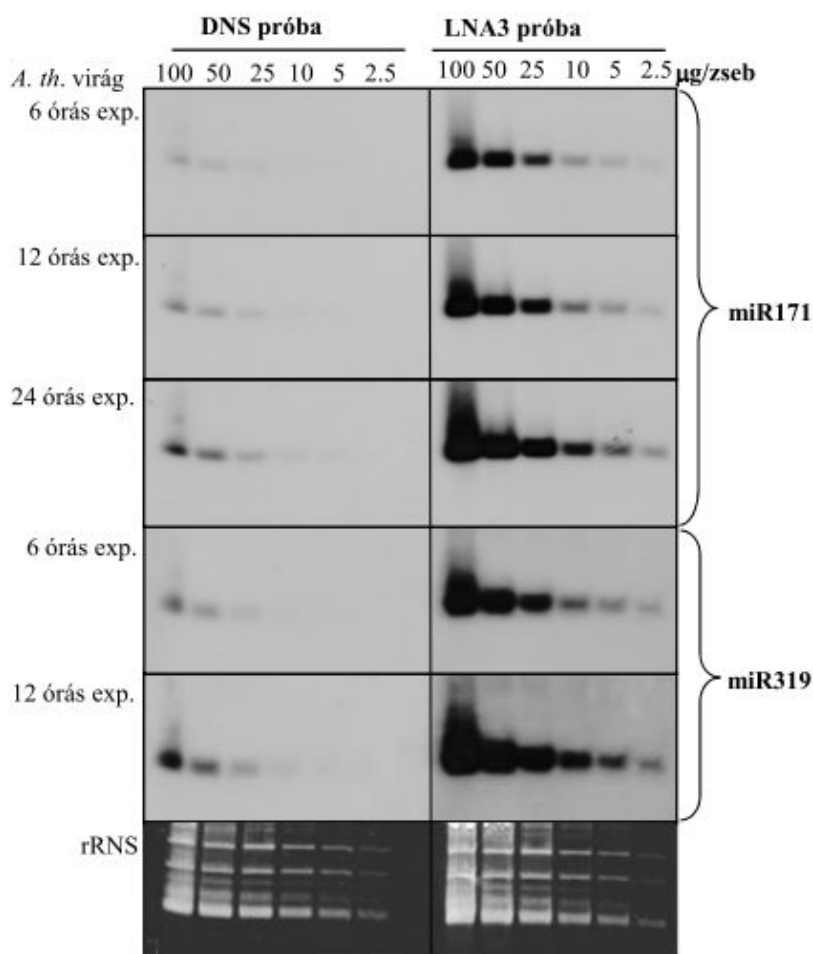


4. ábra. LNA2 és LNA3 próbák próbák összehasonlítása a DNS próbákkal kis RNS northern blot segítségével

A. thaliana virág és levél totál RNS kivonatait (40 µg/zseb) 12% denaturáló poliakrilamid gélen elválasztottuk 32P-jelölt miR171_LNA2, miR171_LNA3 and miR171_DNA próbákkal hibridizáltuk 37°C-on. Az ábra alsó részén mennyiségi kontrollként a rRNS-ek láthatók. M-molekula tömeg marker

Az irodalmi adatoknak megfelelően az LNA2 próbák olvadási pontja magasabb volt, mint az LNA3 próbáké. Az LNA2 próbák esetében az erős háttér miatt a hibridizálási és mosási körülmények további optimalizálására lenne szükség. Az LNA3 próbák ezzel szemben a hagyományos módszerrel felhasználhatóak, ezért a további kísérletekhez ezeket az oligókat használtuk.

Az LNA3 oligonukleotidok érzékenységét további northern blottok segítségével vizsgáltuk. Ehhez különböző mennyiségű (100 µg-tól 2,5 µg) *A. thaliana* virág RNS-t választottunk el, majd hibridizáltuk a miR171-re, ill. a miR319-re tervezett LNA3 és DNS próbákkal (5. ábra).



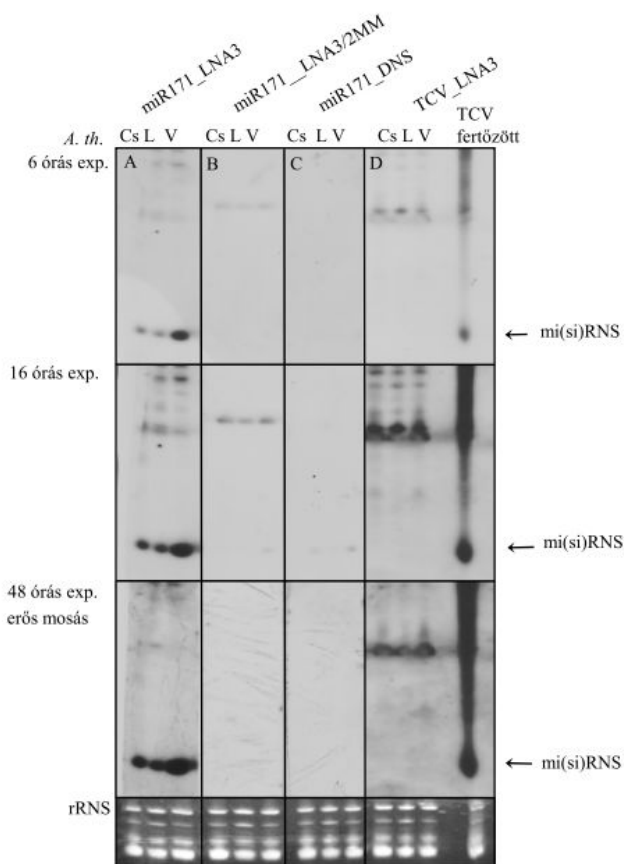
5. ábra. Az LNA3 módosított próbák összehasonlítása DNS próbákkal *A. thaliana* virág mintákon, miR171 és miR319 kimutatásával. 100-2,5 µg/zseb totál RNS kivonatot választottunk el 12%-os denaturáló akrilamid gélen és hibridizáltuk 37°C-on. Az ábra alsó részén mennyiségi kontrollként a rRNS-ek láthatók.

Az előző eredményekhez hasonlóan az érett miRNS-ek kimutathatósága jelentősen megnövekedett az LNA oligókkal, már 2,5 µg mintából is kimutatható volt a miRNS. Így a

hibridizálás érzékenysége átlagosan 10-szeresére növekedett a hasonló körülmények között hibridizált DNS oligókhoz képest.

4.1.2. Az LNA próbák specifikusak.

A megbízható miRNS detektálás előfeltétele, hogy a próba különbséget tudjon tenni közeli rokon miRNS-ek között, amelyek csupán két-három nukleotidban különböznek. A következőkben azt vizsgáltuk, hogy ezek az LNA próbák mennyire képesek egymáshoz nagyon hasonló, pl. azonos miRNS családba tartozó miRNS-ek elkülönítésére. Ehhez először a mosási és hibridizálási körülmények szigorításával próbálkoztunk. Hasonlóan a korábbi eredményeinkhez a miR171_LNA3 oligóval ebben az esetben is erős jeleket kaptunk, míg a DNS próbával és egy olyan LNA próbával, mely a miRNS felismerő hely közepén 2 nt eltérést tartalmazott (miR171_LNA3/2MM) alig volt kimutatható miRNS (6. ábra).

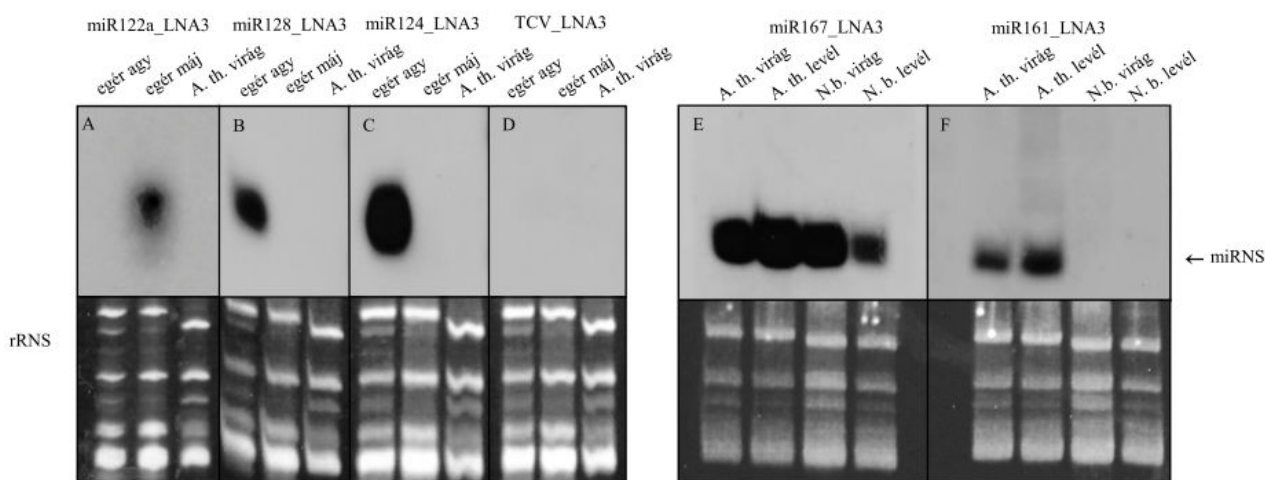


6. ábra. Az LNA oligók specifikusságának vizsgálata. *A. thaliana* csíranövény (CS), virág (V), levél (L) és TCV (Turnip crinkle virus) fertőzött levél 20 µg/zseb totál RNS kivonatát 12% SDS akrilamid gélen történő elválasztás után miR171_LNA3 (A), miR171_LNA3/2MM (B), miR171_DNA (C) és TCV_LNA3 (D) oligonukleotid próbákkal 42°C-on hibridizáltuk. Az erős mosás 0.1•SSC, 0.1% SDS-t tartalmazó oldatban történt 65°C-on kétszer 5 percig. Az ábra alsó részén mennyiségi kontrollként rRNS-ek láthatók.

Kontrollként egy, a tarlórépa göndörödés vírus (turnip crinkle virus, TCV) kimutatására tervezett LNA oligót (TCV_LNA3) használtunk, mellyel jól kimutatható volt a vírus eredetű siRNS, viszont a vírussal nem fertőzött mintákban nem volt aspecifikus jel (6. ábra). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az LNA próbák nem csupán miRNS-ek de siRNS-ek kimutatására is alkalmasak.

4.1.3. Az LNA oligók általánosan felhasználhatóak és gyorsabb munkavégzést tesznek lehetővé.

Ahhoz, hogy megtudjuk, hogy az LNA próbák univerzálisan felhasználhatóak-e megvizsgáltuk, hogy mennyire használhatók általánosan az LNA próbák. Egér agyból, májból, *A. thaliana* és *N. benthamiana* virágból és levélből kivont totál RNS kivonatot választottunk el, melyeket különböző miRNS-ekre tervezett próbákkal hibridizáltunk (1. táblázat). Az egér agy specifikus miR124_LNA3 és miR128_LNA3 próbákkal az egér agy mintákban kaptunk erős, specifikus jelet (nem volt aspecifikus jel az egér máj, ill. *A. thaliana* virág RNS kivonatok esetén) (7. ábra).

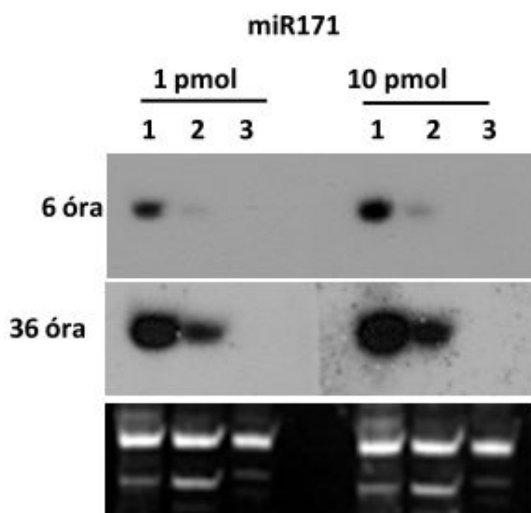


7. ábra Az LNA oligók specifikusságának vizsgálata egér, *A. thaliana* és *N. benthamiana* specifikus miRNS-ek kimutatására tervezett LNA oligók felhasználásával kis RNS northern blot segítségével.

(A–D) 20 µg/zebe egér agy, máj és *A. thaliana* virág totál RNS kivonatát 12% SDS akrilamid gélen történő elválasztás után hibridizáltuk 45°C-on miR122a_LNA3 (A), miR128_LNA3 (B), miR124_LNA3 (C) és negatív kontrollként TCV_LNA3 (D) próbákkal. (E–F) 20 µg/zebe *N. benthamiana* és *A. thaliana* virág és levél totál RNS kivonatát 12% SDS akrilamid gélen történő elválasztás után hibridizáltuk 45°C-on miR167_LNA3 (E) és miR161_LNA3 (F) próbákkal. Az ábrák alsó részén mennyiségi kontrollként a rRNS látható.

A máj specifikus miR122a_LNA3 oligóval csak az egér máj mintáknál kaptunk jelet (7. ábra). A negatív kontrollként használt vírus specifikus TCV_LNA3 próba ebben az esetben sem adott hátteret. A miR167 mind *A. thaliana*, mind *N. benthamiana* mintákból kimutatható volt, míg a miR161 csak *A. thaliana*-ban volt jelen (7. ábra).

Az LNA oligók hátránya, hogy drágábbak mint az általánosan használt DNS oligonukleotidok ezért megvizsgáltuk, hogy lehet-e az LNA módosított oligonukleotidok mennyiségét csökkenteni a jelölő reakcióban (Varallyay és mtsai., 2008). Adataink azt mutatták, hogy egy pmol LNA próba nagyságrendileg ugyanazt a jelerősséget eredményezi, mint tíz pmol jelölése, tehát a próbakészítés során az LNA módosított oligonukleotidok mennyiségét drasztikusan csökkenteni lehet (8. ábra).



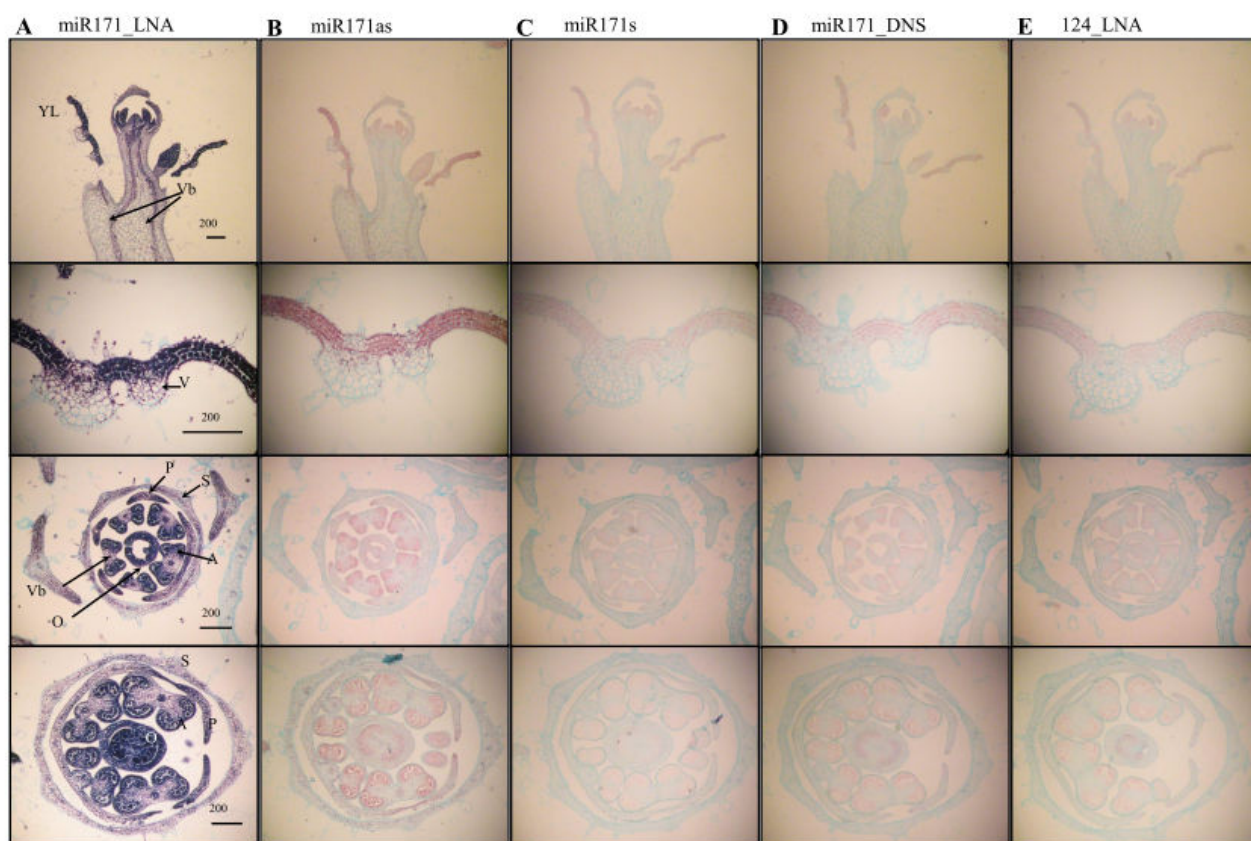
8. ábra. Az LNA próbák koncentrációjának hatásának vizsgálata a hibridizálás hatékonyságára. 10 µg totál RNS kivonat kivonatát 12% SDS akrilamid gélen történő elválasztás után hibridizáltuk 1 illetve 10 pmol miR171_LNA3 próbával. *A. thaliana* virág (1), levél (2) és egér máj (3). Az ábra alsó részén mennyiségi kontrollként rRNS-ek láthatók.

További kísérleteinkben az LNA alapú hibridizálás optimális körülményeit vizsgáltuk (Varallyay és mtsai., 2007). Az egyik legfontosabb eredményünk megmutatta, hogy akár egy órás hibridizálási procedúra is elégséges a sikeres miRNS detektáláshoz (9. ábra)

Az LNA próbák tehát alkalmasak kis RNS-ek specifikus és hatékony detektálására, lehetővé téve akár egy miRNS családba tartozó miRNS-ek elkülönítését. Az LNA próbák további előnye, hogy a jelölési reakciókban rendkívül kis mennyiségben kell őket felhasználni, használatuk drasztikusan lerövidíti a kis RNS kimutatási procedúrát. Az, hogy az LNA próbákkal kapott jelek specifikusak és a jelintenzitás a DNS próbákkal kapott jeleknek kb. 10-szerese, lehetőséget adott arra, hogy ezeket a próbákat *in situ* hibridizációs kísérletekben is alkalmazzuk.

A miRNS útvonalak megzavarása általában fejlődési rendellenességekkel jár (Palatnik és mtsai., 2003; Achard és mtsai., 2004; Laufs és mtsai., 2004; Mallory és mtsai., 2005; Chen, 2009). Az endogén miRNS-ek szintek a vírus fertőzések során is drasztikusan megváltozhatnak és ezek a változások döntő szerepet játszhatnak pl. a tünetek kialakulásában (Bazzini és mtsai., 2007). A vírus fertőzött növényben kialakuló miRNS szint változások pontos szerepének megértéhez elengedhetetlen ezen változások térbeli és időbeli paramétereinek meghatározása. Ezekhez a vizsgálatokhoz a miRNS-ek kimutatására egy LNA próba alapú *in situ* hibridizációs eljárást dolgoztunk ki (Valoczi és mtsai., 2006; Wheeler és mtsai., 2007; Havelda, 2008; Maule és Havelda, 2008).

Először az LNA próbákat az általánosan *in situ* hibridizáláshoz használt RNS próbákkal hasonlítottuk össze. Elkészítettük a miR171-nek egy tandem ismétlődést tartalmazó DNS klónját, melyről *in vitro* RNS-t tudtunk szintetizálni. Erről a DNS templátról *in vitro* transzkripcióval digoxigeninnel jelölt sense (miR171s) és antisense (miR171as) RNS próbákat készítettünk. Ezeket az RNS próbákat, illetve a 3' végükön digoxigeninnel jelölt miR171_LNA és miR171_DNS oligonukleotidokat használtuk fel *N. benthamiana* csúcs (10. ábra, első sor), levél (10. ábra, második sor) és virág (10. ábra, 3-4. sor) szövetek *in situ* hibridizálására. A mintákat paraffinba ágyazva fixáltuk, majd 10 µm-es egymást követő metszeteket készítettünk belőlük, melyeket a fenti próbákkal hibridizáltunk.

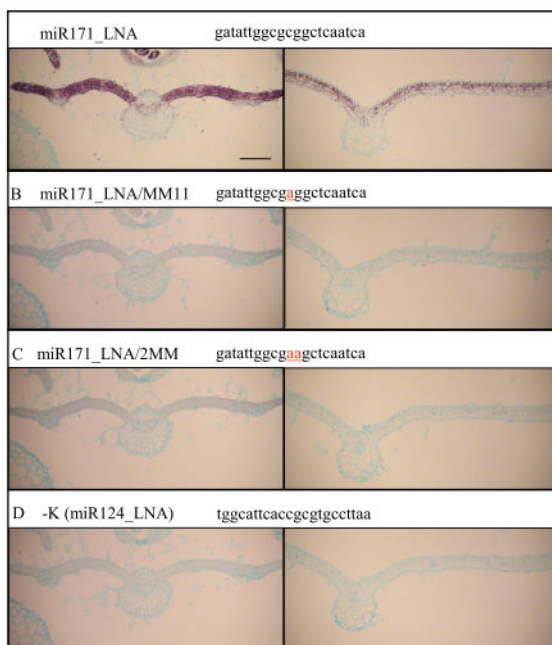


10. ábra Az LNA oligonukleotid és az RNS próbák összehasonlítása miRNS kimutatására *in situ* hibridizációval. *N. benthamiana* fejlődő virágzati csúcs hosszmetztét (első sor), fiatal levél keresztmetztét (második sor), fiatal virágok keresztmetztét (3. és 4. sor) miR171_LNA próbával (A), sense és antisense digoxigenin jelölt RNS próbákkal (B és C), DNS oligonukleotid próbával és negatív kontrollként az egér miR124_LNA oligonukleotid próbával hibridizáltuk. Vb – szállítószövet (vascular bundle); YL - fiatal levél (young leaf); O - magház (ovary); S – csésze (calyx, sepals); P – szirm (corolla, petals); A – porzó (anther); V – ér (vein). A méretvonal (A ábrán) 200 µm-t jelöl.

Bár a miR171_LNA (A) és a miR171as (RNS) (B) próbával minden szövettípus esetében hasonló expressziós mintázatot figyeltünk meg, az RNS próbával az LNA próbával hibridizált metszetek esetén kapott rendkívül erős jelintenzitással szemben alig volt kimutatható a miRNS. A miR171_DNS oligóval nem tudtunk miRNS-t kimutatni. Negatív kontrollként itt is a miR124_LNA (egér specifikus) próbát használtuk. Mindezek alapján tehát az LNA oligók *in situ* hibridizációs kísérletekben is nagyon hatékonyan tudják kimutatni a miRNS-eket.

4.1.5. Az LNA oligók specifikusságának vizsgálata *in situ* hibridizációs kísérletekben.

A következőkben azt vizsgáltuk meg, hogy az LNA oligók az *in situ* hibridizációs kísérletekben is a northern blot kísérletekben tapasztaltakhoz hasonlóan specifikusak-e. Ehhez *N. benthamiana* növények fiatal és idősebb leveleit az előző kísérlethez hasonlóan ágyztuk paraffinba és készítettünk 10 µm-es egymást követő metszeteket. Ezeket hibridizáltuk a már korábban ismertetett miR171_LNA (LNA3), az eltéréseket tartalmazó (miR171_LNA/MM11, miR171_LNA/2MM), és miR124_LNA egér próbákkal (1. táblázat). Az oligókat 3' végükön digoxigeninnel jelöltük. A tökéletesen komplementer miR171_LNA oligóval hibridizált minták esetén erős jeleket kaptunk a levélszövetben (11 ábra A).



11. ábra *N. benthamiana* levél keresztmetszetek *in situ* hibridizálása LNA oligonukleotidokkal.

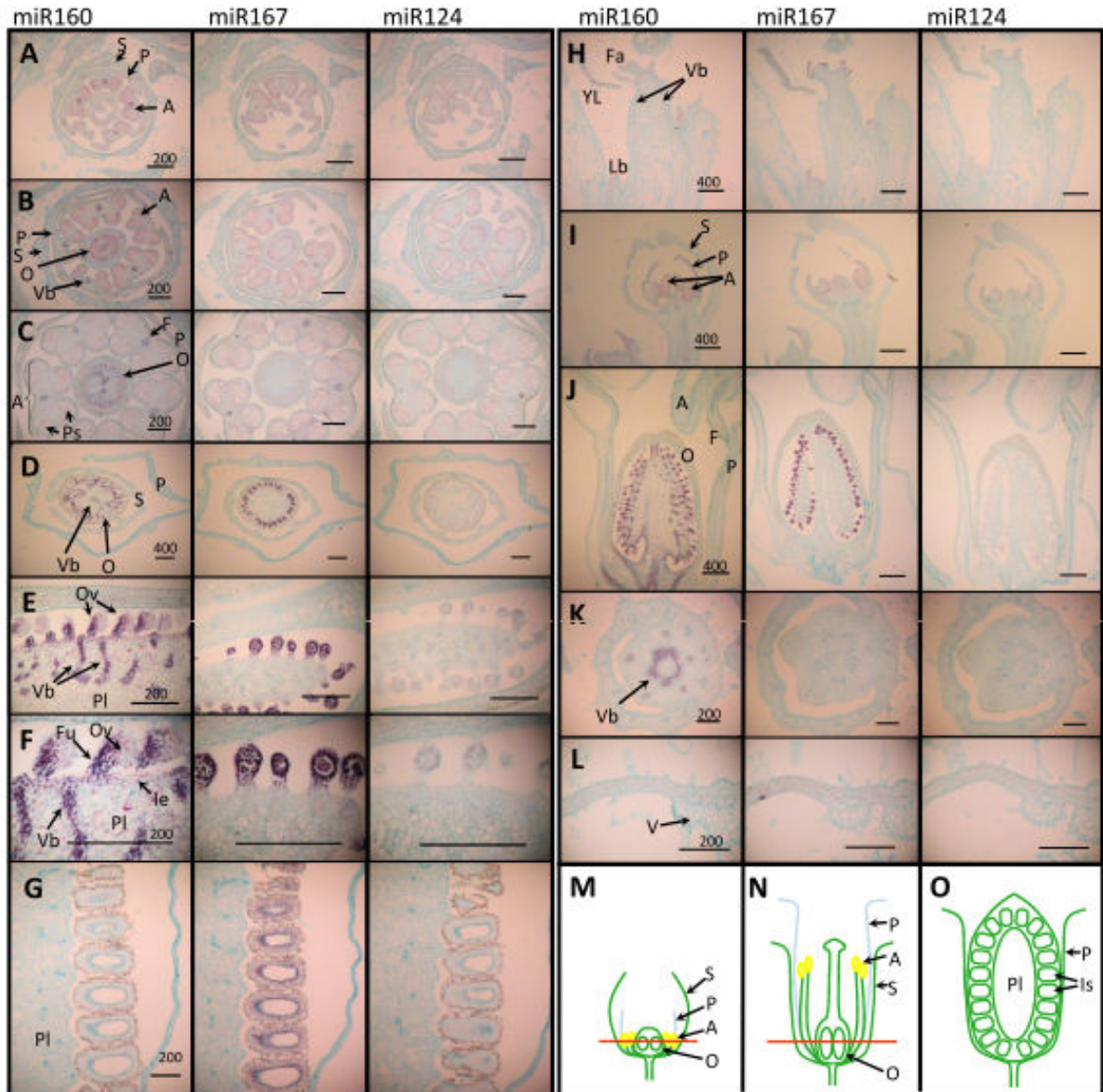
N. benthamiana levelek - fiatal (balra) és idősebb (jobbra) - keresztmetszeteinek hibridizálása 3'-DIG jelölt miR171_LNA (vad típusú) (A), miR171_LNA/MM11 (1 eltérést tartalmazó) (B), miR171_LNA/2MM (2 eltérést tartalmazó) (C) és negatív kontrollként miR124_LNA egér specifikus (D) oligonukleotid próbákkal. A piros betű a mismatch nukleotidokat, a sáv (A ábrán) 200 µm-t jelöl.

Ezzel szemben az eltéréseket tartalmazó oligókkal alig láthatóak voltak a jelek (11 ábra B-C). A northern blotnak megfelelően itt sem adott háttérrel a negatív kontrollként használt egér miR124_LNA oligó. Az LNA próbával tehát *in situ* hibridizálás során is hatékonyan lehet kimutatni miRNS-t és 1 nukleotid eltérés ebben az esetben is jelentősen csökkenti a hibridizációs jelet, vagyis a kapott jel specifikus.

4.1.6. Endogén miRNS-ek expressziós mintázatának vizsgálata *in situ* hibridizációval.

A "microRNA Registry database" (Griffiths-Jones és mtsai., 2006) felhasználásával konzervatív, a fejlődés szabályozásban résztvevő miRNS-eket választottunk ki, melyekre LNA próbákat terveztünk. Kiragadott példaként miR160 és miR167 kifejeződésének összehasonlítást mutatom be. Az auxin számos fejlődési folyamatért felelős, mint pl. az embrió organizáció, az új gyökérmerisztémák és szállítószövet-rendszer kialakítása, a sejtmegnyúlás és a csúcsdominancia szabályozása (Berleth és Sachs, 2001). Az auxin az Aux/IAA fehérjéken keresztül szabályozza a korai auxin-válasz géneket. Ezeknek a géneknek a promóter régiójában található Auxin-response element (AuxRE)-hez kötődnek az auxin válasz faktorok (auxin response factor, ARF), magas auxin koncentráció esetén homodimert, alacsony auxin koncentráció esetén az Aux/IAA fehérjékkel heterodimert alkotva. Így alacsony auxin koncentráció esetén a heterodimer gátolja a korai auxin-válasz gének transzkripcióját, magas auxin koncentráció esetén viszont ezek a gének átíródnak (Ulmasov és mtsai., 1999). Az *A. thaliana*-ban 23 ARF található, melyek közül a miR160 az ARF10-et, ARF16-ot és ARF17-et, a miR167 az ARF6-ot és ARF8-at szabályozza (Mallory és mtsai., 2005; Liu és mtsai., 2007).

A miR160 és miR167 akkumulációját *N. benthamiana* növényekben vizsgálva azt találtuk, hogy a fiatal, fejlődő szervekben, merisztémában ezek a miRNS-ek nagyon kis mennyiségben voltak jelen (12 ábra A-C, H). Ezzel szemben erős, egymástól jelentősen eltérő expressziót mutattak az idősebb virágokban (12 ábra D-F, J). A miR160 a magkezdemények alapi részénél, a funikuluszban, belső epidermiszben és a placenta szállítószöveiben akkumulálódott, míg a miR167 kizárólag a magkezdeményekben volt jelen. A virágok alsó részéről készült keresztmetszeten is jól megfigyelhető, hogy a virág edénynyalábjaiban csak a miR160 volt jelen (12. ábra K). A miR167 expresszió a fejlődő magoknál is megmaradt, míg a miR160 ebben a stádiumban nem volt kimutatható, mutatva az expresszió időbeli szabályozottságát (12. ábra G). Az expressziós vizsgálatokat *N. benthamiana* teszt növényeken több más miRNS-re is elvégeztük (ld: (Valoczi és mtsai., 2006)).

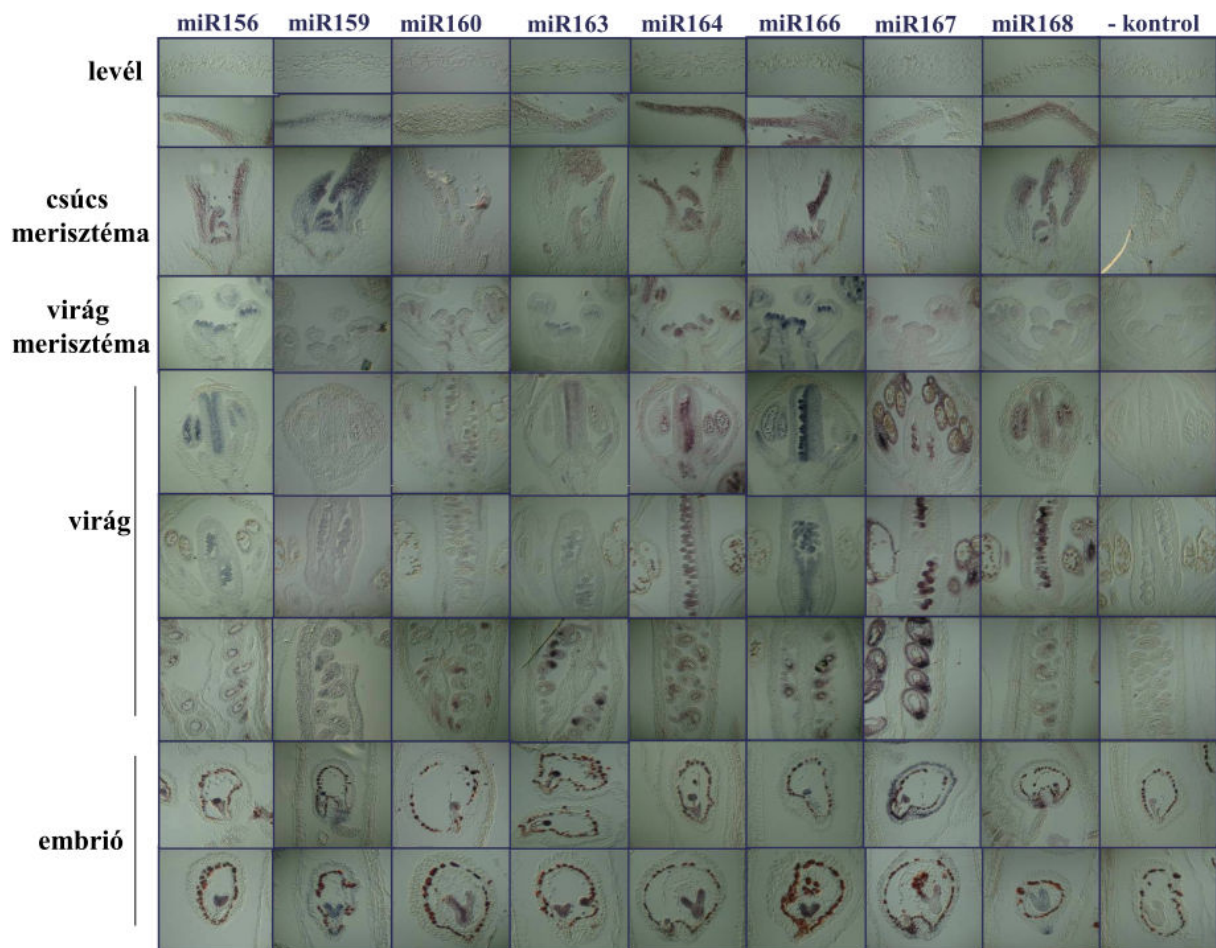


12. ábra miRNS akkumuláció *N. benthamiana*-ban, miR160 és miR167, ill. negatív kontrollként egér miR124 LNA próbákkal hibridizált szövetek vizsgálata. (A vizsgált miRNS-eket az oszlopok tetején tüntettük fel.) (A-B) fejlődő virág keresztmetszet, (C-D) magház keresztmetszet, (E-F) magház hosszmetset, (G) fejlődő termés hosszmetsete fejlődő magokkal, (H) csúcs hosszmetset, (I-J) fejlődő virág hosszmetset, (K) virág alapi részének keresztmetsete, (L) levél keresztmetset, (M-O) a virágfejlődés stádiumainak sematikus rajza, a piros vonal a metsetek helyét jelöli: (M) felel meg az (A-C) ábrákon látható metsetek fejlődési stádiumainak, (N) felel meg (D-F, J) és (O) felel meg a (G) ábrának.

Fa - virágzati csúcs (floral apex); Vb - szállítószövet (vascular bundle); YL - fiatal levél (young leaf), Lb - oldalmerisztéma (lateral bud), O - magház (ovary); Ov - magkezdemény (ovule);

S - csésze (calyx, sepals); P - szirm (corolla, petals); A - porzó (anther); Ps - portokfél (pollen sac); F - filament; Pl - placenta; Fu, funiculus; Ie - inner epidermis; V – ér (vein); Is - fejlődő mag (immature seeds). A méret vonalak az ábrán feltüntetett méretet jelölik µm-ben.

A miRNS *in situ* expressziós vizsgálataink megmutatták, hogy a miRNS-ek térben és időben szigorúan kontroláltan fejeződnek ki. Az általunk vizsgált miRNS-ek közül 7 jelen volt az edénynyálábokban. Érdekes módon a miR167, ellentétben a miR160-nal (amely azonos géncsalád tagjait szabályozza) egyáltalán nem volt kimutatható az edénynyálábokból. Mindez azt bizonyítja, hogy a miRNS-ek jelenléte a szállítószövetekben aktívan szabályozott. Bár ezek az eredmények nem adnak választ arra a kérdésre, hogy ezek a miRNS-ek a szállítószövetekben keletkeznek-e vagy csak szállítódnak, felmerül a lehetősége, hogy a miRNS-ek az edénynyálábokban mozogva irányítják a fejlődési folyamatokat. Ezen eredményeket velünk párhuzamosan más csoportok is kimutatták (Carlsbecker és mtsai., 2010; Yoo és mtsai., 2004; Lin és mtsai., 2008).



12. ábra *In situ* adatbázis létrehozása. A jelölt miRNS-ekre specifikus LNA próbákkal hibridizáltunk különböző eredetű és korú *A. thaliana* szöveteket és vizsgáltuk a kérdéses miRNS expressziós mintázatát.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy az általunk kidolgozott technológia az *in situ* hibridizációs vizsgálatoknál sikeresen alkalmazhatónak bizonyult, lehetővé téve a miRNS kifejeződés idő-

és térbeli finomtérképezését. A technológiát felhasználva, *A. thaliana* növényeket vizsgálva, elkezdtek egy miRNS *in situ* adatbázis felállítást (12. ábra illusztrálja a kezdeti lépéseket), amely nagyban hozzájárulhat majd kutatócsoportunk és más hasonló területen dolgozó csoportok további munkájához.

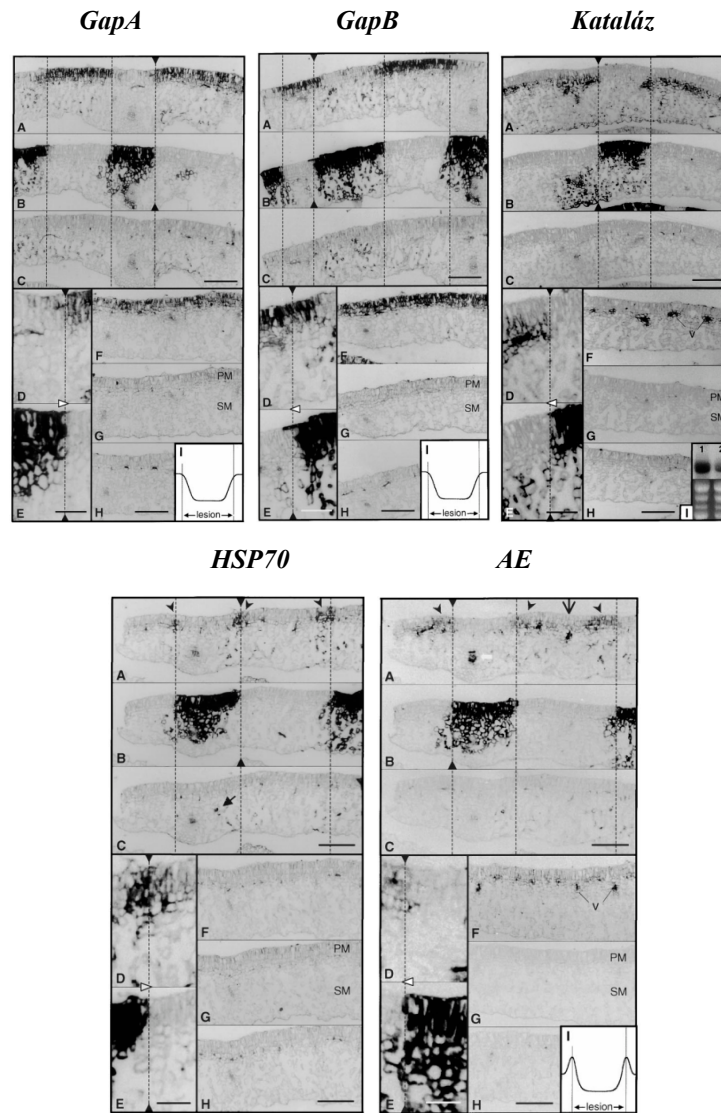
A hatékony detektálási rendszert lehetővé tette, hogy a miRNS-ek változását vírus fertőzött növényekben részletesen és megbízhatóan végezhessük mind northern blot hibridizációs eljárással mind *in situ* hibridizálással. Az általunk létrehozott LNA alapú detektálási rendszer általános eljárássá vált világszerte, és az erre az eljárásra épülő próbák megvásárolhatók/rendelhetők az Exiqon cégtől (<http://www.exiqon.com/>).

4.2. Vírus fertőzés hatására kialakuló komplex térbeli változások a növény génexpressziós rendszerében.

Ezen kísérleteinkben arra voltunk kíváncsiak, hogy vírus fertőzés esetén milyen változások alakulnak ki a növény expressziós rendszerében és ezek milyen viszonyban állnak a vírus felhalmozódásával. Arra is kerestük a választ, hogy ezek a génexpressziós változások, elsősorban a "shut off" jelenség kapcsolatban áll-e a vírus által okozott betegség tünetek kialakulásával. Kísérleteink során tovább vizsgáltuk a vírus indukálta "shut off" jelenség mechanizmusát eddig még nem vizsgált rendszerekben: uborka mozaik vírus fertőzött (CMV) tökszikleveleken kialakuló lokális léziókon (inokulált levelek) és különböző vírusokkal szisztemikusan fertőzött *N. benthamiana* és paradicsom növényeken.

4.2.1. CMV fertőzött töksziklevelek vizsgálata.

CMV inokulált tök szikleveleken a vírus fertőzés hatására határozott körvonalú, klorotikus, lokális léziók alakulnak ki. Ezek a léziók a levél felületén jól azonosíthatóak, nem nekrotizálódnak, így jól felhasználhatók génexpressziós és enzimaktivitási vizsgálatok elvégzéséhez. A vírus fertőzött növény metabolizmusát ezt a rendszert felhasználva vizsgálták úgy, hogy a lokális lézió különböző régióiban mérték különböző enzimek aktivitását (Tecsí és mtsai., 1996). Ezek a vizsgálatok az mutatták, hogy a lokális lézióban térben és időben szabályozottan metabolikus változások játszódnak le. Kísérleteinkben ezt a rendszert vizsgálva összekapcsoltuk a biokémia adatokat a lézióban lezajló génexpressziós változásokkal és vizsgáltuk más gének, illetve vírus eredetű termékek térbeli expresszióját. A kísérletek során a CMV fertőzött tök szikleveleken kialakuló lokális léziókat vizsgáltuk *in situ* hibridizáció felhasználásával. A vírus felhalmozódásának helyét a fertőzött szövetben, a CMV köpenyfehérjéje ellen készített ellenanyag felhasználásával, immunhisztokémiai eljárással azonosítottuk. A továbbiakban *in situ* hibridizálás módszerével, egymást követő metszetek felhasználásával, összehasonlítottuk a vírus és a választott gének mRNS-einek felhalmozódásnak egymáshoz viszonyított mintázatát (Havelda és Maule, 2000). Azt tapasztaltuk, hogy a lézió belsejében egyes gének, *glicerinaldehidfoszfát-dehidrogenáz A* és *B* (*GapA* és *B*), mRNS szintje erősen lecsökken (13. ábra). A *kataláz* mRNS-e szintén a kimutathatósági szint alá süllyedt a lézió belsejében, annak ellenére, hogy ez a gén, a vírus fertőzésre adott általános stressz válaszként, fokozott mRNS kifejeződést mutatott a fertőzött növény vírus által el nem foglalt területein.



13. ábra Endogén gének mRNS-einek akkumulációjának térbeli vizsgálata a CMV fertőzött tők sziklevelekben. (A vizsgált gének nevét az ábrák tetején tüntettük fel.) (A)-tól (C)-ig egymást követő CMV fertőzött szövetek *in situ* hibridizálása az endogén génre specifikus negatív szálú RNS próbával (A) vagy az endogén génre specifikus pozitív szálú RNS próbával (negatív kontrol) (C) vagy immunhisztokémia a vírus köpenyfehérjére specifikus antitest felhasználásával (B). A szaggatott vonal a lézió szélét jelöli az összehasonlítás megkönnyítésére. (D) és (E) 2.5X nagyítás a lézió széléről (fekete háromszögekkel jelölve a nagyított terület). (F)-tól (H)-ig egymást követő mock inokulált szövetek *in situ* hibridizálása az endogén génre specifikus negatív szálú RNS próbával (F) vagy az endogén génre specifikus pozitív szálú RNS próbával (negatív kontrol) (H) vagy immunhisztokémia a vírus köpenyfehérjére specifikus antitest felhasználásával (G). (I) Az előzőleg kimért enzิมaktivitási paraméterek a lézió keresztmetszetén ábrázolva. (Kivéve a kataláz mRNS kifejeződést mutató ábrát, ahol northern hibridizáció mutatja a kataláz mRNS szintjét vírus (1) illetve mock (2) inokulált szövetekben. Méret vonal 500 μm (kivéve (D) és (E) ahol 200 μm). PM: oszlopos parenchima, SM: szivacsos parenchima.

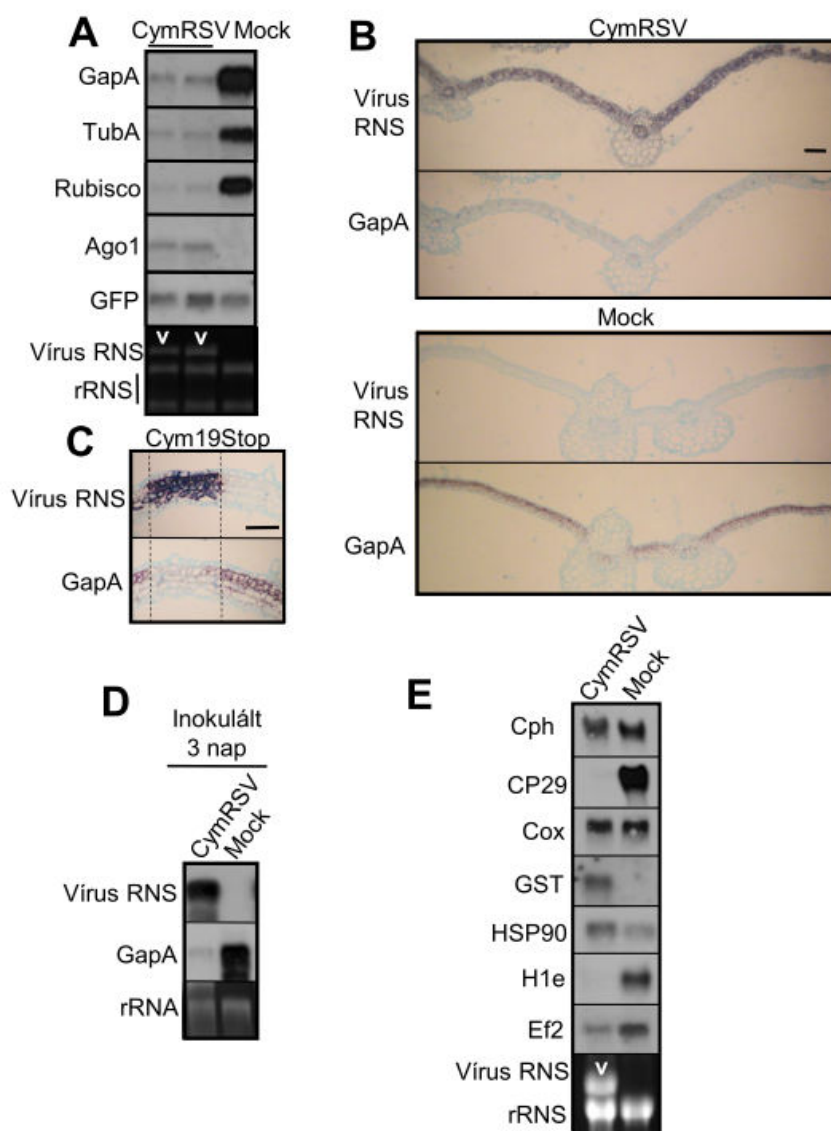
Az előzőleg közölt eredményekhez hasonlóan a *hő sokk fehérje-70* gén (*HSP70*) határozott mRNA indukciót mutatott a lézió szélein, ahol feltételezhetően az aktív vírusreplikáció zajlik (Escaler és mtsai., 2000). A legérdekesebb eredményeket az *NADP függő almasav enzim (AE)* gén expressziójának megfigyelésekor kaptunk. Ennek a génnek az expressziója a lézió belsejében gátlást mutatott (13. ábra), a lézió határán, illetve a lézió határán túlnyúlóan azonban az *AE* mRNA tranziens jellegű felhalmozódását mutatott. Ezek az eredmények az mutatták, hogy az *AE* mRNA indukciójaért nem önmagában a vírus replikáció felelős. Eredményeink szerint az előzőleg mért enzimaktivitási értékek (Tecsí és mtsai., 1996) jól korrelálnak a megfigyelt génexpressziós változásokkal. Azt tapasztaltuk, hogy a borsó rendszerben megfigyelt gén indukció és "shut off" jelenség hasonlóan megfigyelhető a CMV-tök sziklevél rendszerben. Ezek az adatok azt bizonyítják, hogy ezek a jelenségek vírus fertőzések általános kísérői lehetnek. Megfigyeltük azt is, hogy az indukciós változások lehetnek az egész növényre kiterjedőek (*kataláz* mRNA), illetve lokális jellegűek (*NADP AE* mRNA). Az mRNA indukció jelenléte a fertőzési területtől távolabb eső sejtekben olyan szignalizációs jelenségek jelenlétét mutatja meg, amelyek alapvető fontosságúak lehetnek gazda-patogén kölcsönhatásban.

4.2.2. A "shut off" jelenség kialakulása szisztémikusan fertőzött levelekben.

A shut-off jelenség vizsgálata során végzett kísérletek korábban borsó, illetve tök sziklevelekre koncentráltak és semmilyen információ nem állt rendelkezésre a "shut off" jelenség mögött húzódó molekuláris mechanizmus(ok)ról. Következő kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy vajon a "shut off" jelenség jelen van-e a szisztémikusan fertőzött szövetekben. Amennyiben igen, akkor választ szerettünk volna kapni arra a kérdésre, hogy ez a jelenség szerepet játszik-e a vírusfertőzés okozta tünetek kialakulásában és milyen molekuláris mechanizmusok állnak a jelenség mögött. Munkánk során *N. benthamiana* (GFP transzgenikus) és paradicsom növények, különböző vírusokkal szisztémikusan fertőzött szövegeteit használtuk fel endogén gének expressziójának vizsgálatához (Havelda és mtsai., 2008). Vírusos fertőzés után a növényeket klímakamrában tartottuk 16h fény/8h éjszaka periódus alkalmazásával, 21–22 °C-on (vagy 15°C-on, amikor a kísérletek alacsony hőmérsékletet igényeltek). A vírusos fertőzés a Cymbidium gyűrűsfoltosság vírus (Cymbidium ringspot virus – CymRSV), tarlórépa fodrosodás vírus (Turnip crinkle virus – TCV), lándzsás útifű mozaik vírus (Ribgrass mosaic virus – RMV), uborka mozaik vírus

(Cucumber mosaic virus – CMV Fny törzs), burgonya X-vírus (Potato virus X – PVX), dohány mozaik vírus (Tobacco mosaicvirus – TMV U1 törzs) tisztított virionjaival vagy fertőzött növények présnedvével történt.

Kísérleteinkhez négy fontos endogén gént választottunk ki, ezek 500-1000 nt hosszú darabjait klónoztunk és a vírusfertőzött növények szisztémikus leveleiből kivont RNS mintákat vetettük alá northern analízisnek. Mint azt az (14. ábra) mutatja három gazdagén: a GapA (a fotoszintézisben vesz részt), a Tub (a mikrotubuláris rendszer része) és a ribulóz-biszfoszfát-karboxiláz (Rubisco, ami a szén-dioxid fixációs folyamatokban vesz részt) mRNS-ének mennyisége drasztikus mértékben lecsökkent. A kontrollként használt GFP mRNS szintje változatlan maradt, ellentétben az Argonaute1 (Ago1, a géncsendesítést kialakító RNS degradáló enzimkomplex része) mRNS-sel, ami, ahogy az már ismert volt, aktiválódott. A fertőzés után hat nappal a GapA mRNS térbeli akkumulációját is megvizsgáltuk *in situ* hibridizációval CymRSV szisztémikusan fertőzött levelekben (14. ábra B). A kép jól mutatja, hogy ebben az időpontban a vírus RNS a levél minden sejtjében jelen van, viszont a GapA mRNS mindenhol hiányzik. A vírusfertőzés korábbi időpontjában készített metszeteinken azt figyeltük meg, hogy a GapA mRNS azokban a sejtekben tűnik el, ahol a vírus jelen van (nincs bemutatva). Ez az eredmény azt mutatta számunkra, hogy a GapA hiánya nem egy általános védekezési reakció része, hanem a vírus terjedésével közvetlenül függ össze. Az *in situ* metszetek részletes elemzése azt is megmutatta, hogy a vírus terjedési frontjában vannak olyan sejtek, ahol a vírus már nagy mennyiségben megjelenik, de a gazdagén mRNS szint még nem csökken. Ez az eredmény azt mutatja, hogy a „shut-off” kialakulásáért nem a fertőzési frontban lezajló vírusreplikáció a felelős. A p19 RNS csendesítés gátló fehérje fontos szerepet játszik a tünet kialakulásban (Szittyá és mtsai., 2002). A Cym19Stop egy rekombináns vírus, melyben nem termelődik a géncsendesítés szuppresszora (p19), aminek hatására a vírus lassabban és korlátozottabban tud elterjedni a növényben. *In situ* hibridizálás segítségével kimutattuk, hogy a Cym19Stop fertőzött szövetek is mutatják a „shut-off” jelenséget (14 ábra C) és az mRNS felhalmozódás gátlása nyilvánvaló volt az inokulált levelekben is (14 ábra D). Ezen eredmények azt mutatták, hogy az mRNS felhalmozódásának gátlása, illetve a vírus akkumuláció térben egybe esik, így valószínűsíthető, hogy a jelenségért egy vírus eredetű fehérje kell, hogy közvetlenül felelős legyen (ez azonban nem a p19 fehérje).

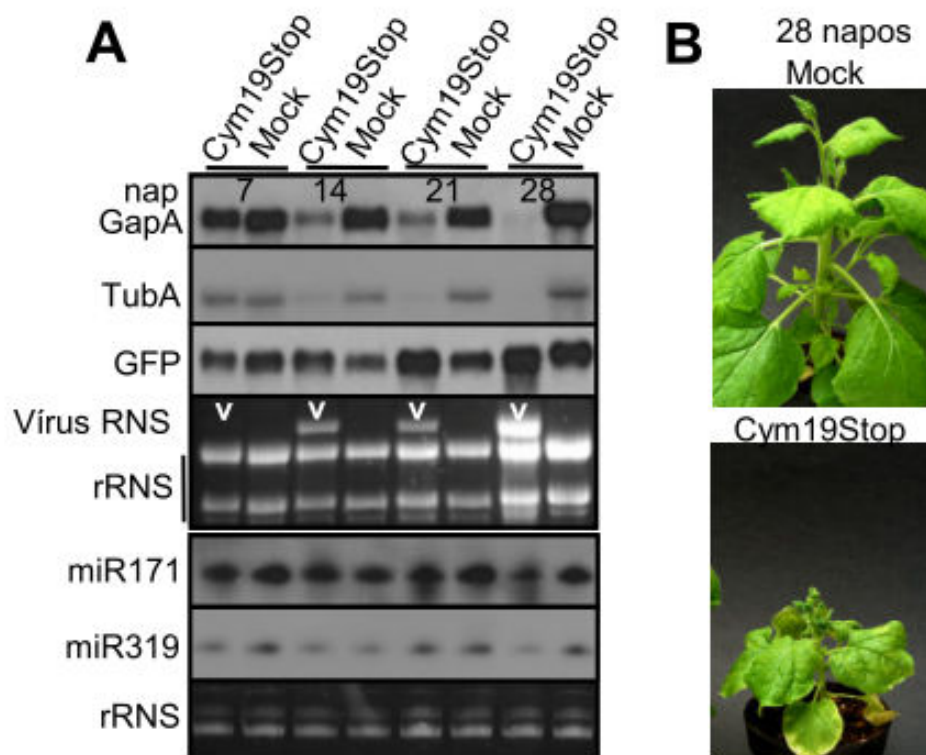


14. ábra A "shut-off" jelenség megjelenése az inokulált és szisztémikusan fertőzött *N. benthamiana* levelekben. (A) CymRSV fertőzött növények szisztémikus leveleiből (6 napos) és mock inokulált növények leveleiből készített RNS kivonat northern blot analízise. A használt próbák az ábrán vannak jelölve. Az ábra alsó részén mennyiségi kontrollként rRNS-ek láthatók. V; vírus genomikus RNS-e. (B) A GapA mRNS és CymRSV RNS felhalmozódásának *in situ* hibridizációs vizsgálata szisztémikusan fertőzött levelekben egymást követő metszetek felhasználásával. Méretarány= 200 μ m. (C) A GapA mRNS és Cym19Stop RNS felhalmozódásának *in situ* hibridizációs vizsgálata szisztémikusan fertőzött levelekben egymást követő metszetek felhasználásával. Szaggatott vonal jelzi a vírus felhalmozódás határát. Méretarány= 100 μ m. (D) CymRSV inokulált levelekből (3 napos) és mock inokulált levelekből készített RNS kivonat northern blot analízise. A használt próbák az ábrán vannak jelölve. Az ábra alsó részén mennyiségi kontrollként rRNS-ek láthatók. (E) CymRSV fertőzött növények szisztémikus leveleiből (5 napos) és mock inokulált növények leveleiből készített RNS kivonat northern blot analízise. A használt próbák az ábrán vannak jelölve. Cph; ciklofillin, CP29; kloroplaszt pigment-kötő fehérje, Cox; citokrom oxidáz I alegység, GST; glutation-S-transzferáz, HSP90; hő sokkfehérje 9, H1e; hiszton H1e és Ef2; elongációs faktor 2. Az ábra alsó részén mennyiségi kontrollként rRNS-ek láthatók. V; vírus genomikus RNS-e.

Részletes elemzésünk további három gént azonosított, melyek igen fontos folyamatokban (fotoszintézis, sejt biogenezis és transzláció) vesznek részt és a vírus jelenlétében mRNS-ük jelentős mértékben lecsökken (14 ábra E – CP29, H1e, Ef2). Más gének mRNS-einek szintje azonban nem mutatott változást (CPH, Cox), illetve indukciót mutatott (GST, HSP90), jelezve, hogy ez a jelenség speciálisan hat egyes célgének expressziójára.

A továbbiakban azt szeretnénk volna vizsgálni, hogy a gátolt mRNS felhalmozódás képes-e hosszabb ideig jelen lenni a vírus fertőzött szövetben vagy tranziens jelleget mutat, amint azt más rendszerekben (borsó-, tök sziklevél) tapasztaltuk. Erre a célra a CymRSV fertőzött szövet nem alkalmas mert, a fertőzést követő hatodik nap után megjelennek a nekrotikus tünetek alkalmatlanná téve a szöveteket a további kísérletekre. A siRNS alapú RNS csendesítési útvonal azonban erősen gátolt 15 °C-on, ezen a hőmérsékleten a Cym19Stop vírus, amely nem okoz nekrozist, képes nagy mennyiségben felhalmozódni és a fertőzött növény nem mutatja a kigyógyulás jelenségét, így ez a rendszer alkalmas arra, hogy benne időfüggést vizsgáljunk. Az ezen a hőmérsékleten sorozatosan vett Cym19Stop fertőzött mintákból azok, amelyek nagy mennyiségű vírus felhalmozódást mutattak (14, 21 és 28 napos) mind mutatta a GapA és TubA mRNS-ek felhalmozódásának gátlását (15. ábra). A GFP mRNS szint változatlan maradt, mutatva a folyamat specifikus jellegét. Ezen eredményeink azt mutatják, hogy a több, fontos „háztartási gén” esetében kialakuló gazdagén „shut-off” jelenség a vírusfertőzött növények szisztémikus leveleiben hosszú ideig folyamatosan megmarad.

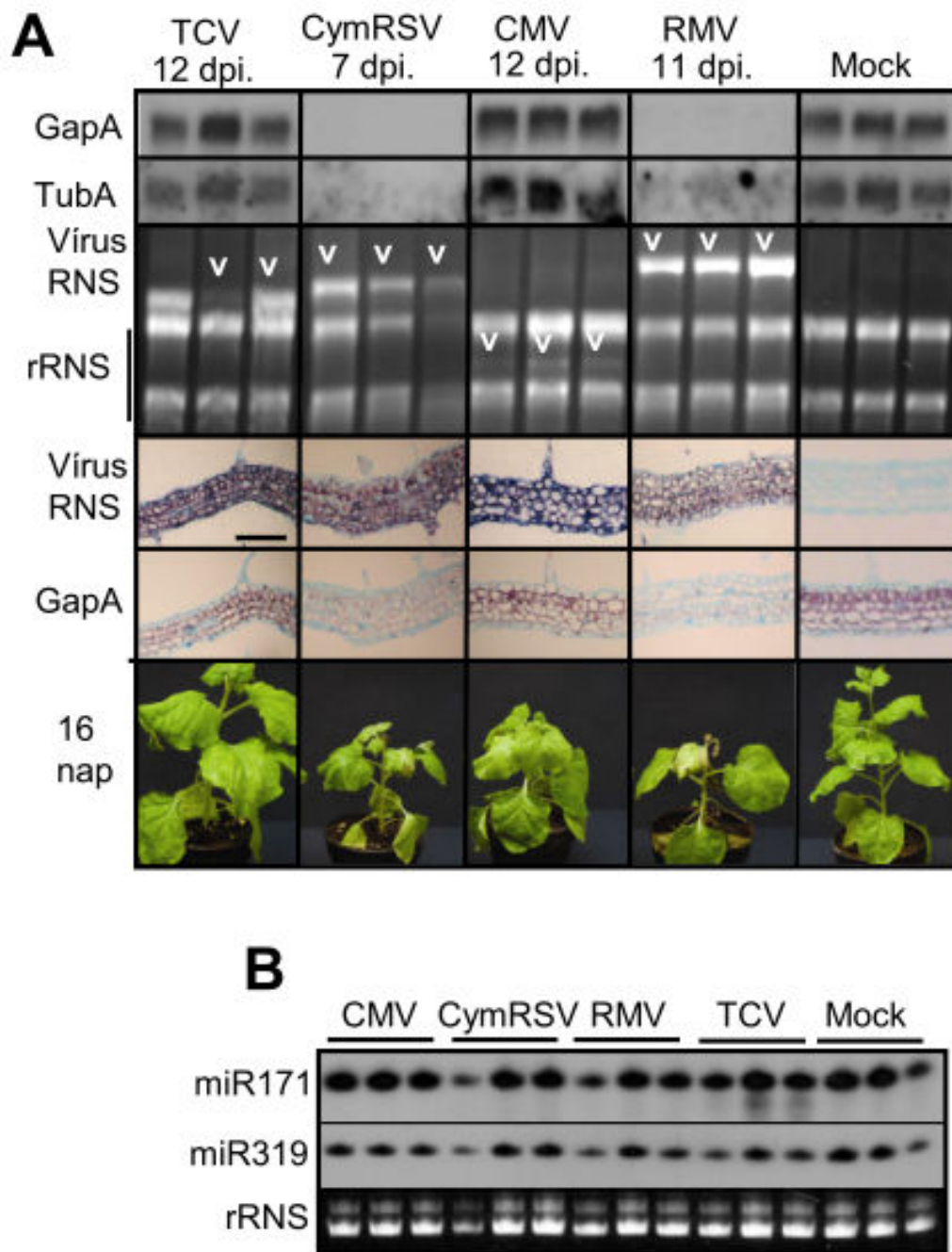
Mivel a miRNS-ek fontos reguláló molekulák és több esetben is feltételezik, hogy fontos szerepük van a vírusfertőzés okozta betegség tünetek kialakulásában (Kasschau és mtsai., 2003; Chapman és mtsai., 2004; Dunoyer és mtsai., 2004), ezért mi is megvizsgáltuk néhány konzervatív miRNS kifejeződését a vírusfertőzés során. A két vizsgált miRNS (miR171 és miR319) felhalmozódásában nem találtunk jelentős eltérést a vírus fertőzött és mock inokulált növény között. A vírus fertőzés tehát nem okoz általánosan csökkenést a miRNS-ek felhalmozódási szintjében. Ezek a kísérletek természetesen nem zárják ki annak a lehetőségét, hogy más miRNS-ek célzottan érintettek lehetnek a vírus fertőzött növényben.



15. ábra A gazdanövény mRNS-einek felhalmozódásának perzisztens gátlása szisztemikusan fertőzött *N. benthamiana* levelekben 15 °C-on. (A) GapA, TubA és GFP transzgen mRNS-einek felhalmozódása szisztemikusan fertőzött levelekben 7, 14, 21 és 28 napnál a fertőzés után. Az ábra alsó részén mennyiségi kontrollként rRNS-ek láthatók. V; vírus genomikus RNS-e. Az ábra alsó részén a miR171 és miR319 miRNS-ek felhalmozódása látható vírusfertőzött és mock inokulált mintákban. A miRNS-ek kimutatása LNA próbákkal történt. Az ábra alsó részén mennyiségi kontrollként rRNS-ek láthatók. (B) A Cym19Stop fertőzés hatására kialakuló betegség tünetek 15 °C-on 28 napnál.

4.2.3. A "shut off" jelenség kapcsolata a tünetek kialakulásával.

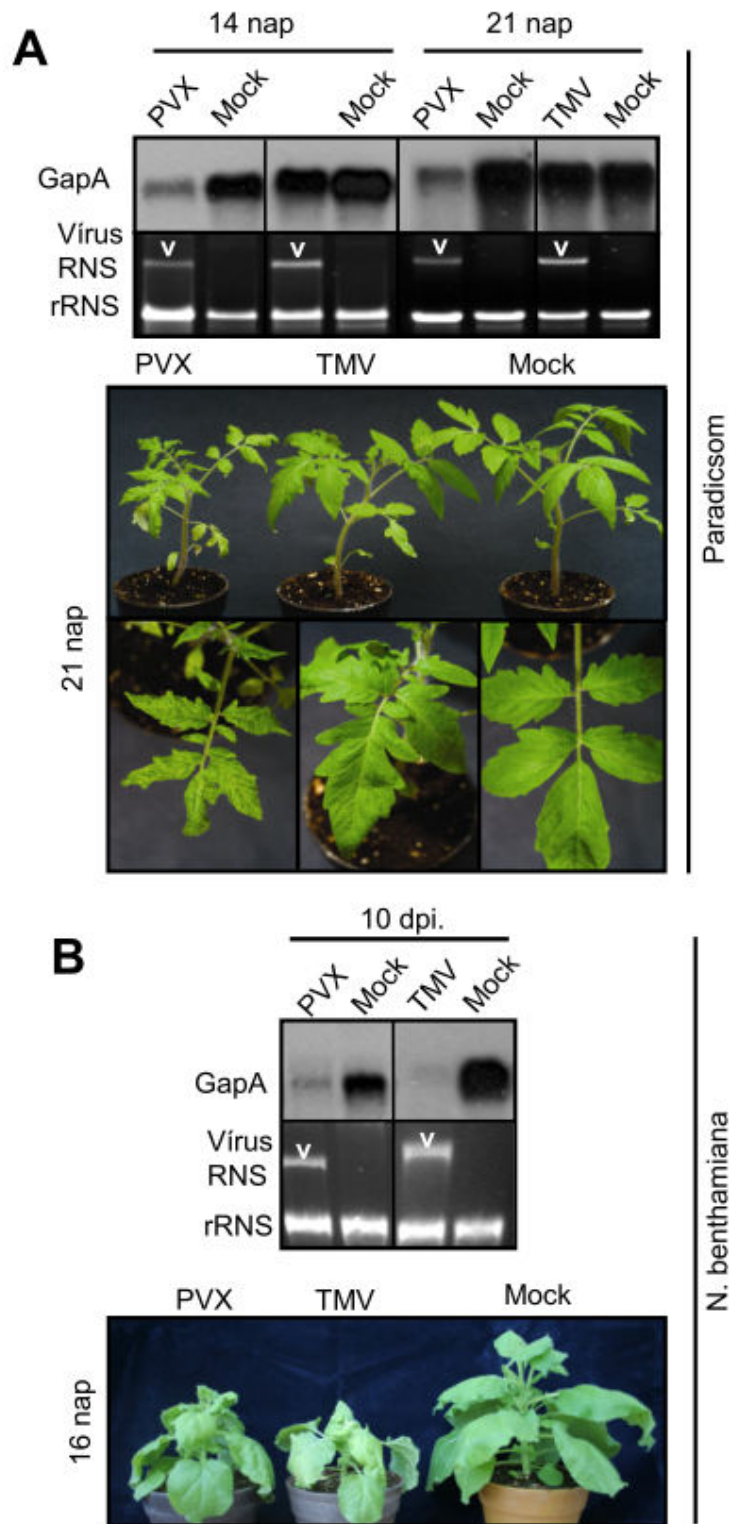
Előző következtetéseink alapján a „shut-off” folyamata a fertőzött növényekben folyamatos hiányt tart fenn a növény számára igen fontos „háztartási” génekből, ezért elképzelhetőnek tartottuk, hogy a folyamat és a tünetek súlyosságának kialakulása összefüggésben vannak egymással. A következő kérdésünk az volt, hogy vajon van-e kapcsolat a tünet kialakulása és a gazda mRNS szabályozás között? Ahhoz, hogy választ kapjunk erre a kérdésre *N. benthamiana* növényeket különböző vírusokkal fertőztünk, melyek e tesztnövényen különböző súlyosságú tüneteket okoznak. Kísérleteink eredményeit a 16. ábra mutatja.



16. ábra A gazdanövény mRNS-einek felhalmozódásának vizsgálata különböző vírusokkal szisztémikusan fertőzött levelekben. (A) A GapA, a Tub mRNS-ek Northern analízise (felső 3 panel; Az ábra alsó részén mennyiségi kontrollként rRNS-ek láthatók. V; vírus genomikus RNS-e.), a vírus RNS és a GapA mRNS-ek *in situ* analízise (középső két panel) és a fertőzött *N. benthamiana* növények képe (alsó panel) különböző vírusfertőzések során. (B) miRNS-ek felhalmozódása az (A) panelben bemutatott vírusfertőzött és mock inokulált mintákban. Az LNA próbák miR171-re és miR319-ra specifikusak. Az ábra alsó részén mennyiségi kontrollként rRNS-ek láthatók.

A CymRSV esetében a „shut-off” jelenség kialakul, a növényből eltűnik a GapA és a Tub mRNS. Az *in situ* hibridizációt mutató panelen jól látszik, hogy a vírus a levélben mindenütt jelen van, a GapA mRNS viszont mindenhol hiányzik. A vírusfertőzés tünetei ebben az esetben nagyon súlyosak, a növények nagy része hamar nekrotizálódik, és 7-10 nappal a fertőzés után el is pusztul. Ugyanezen növényfajt TMV-vel fertőzve nagyon hasonló képet kapunk. A vírus megjelenése a GapA mRNS eltűnésével jár együtt és a növényen súlyos tünetek jelentkeznek. Ezzel ellentétben a CMV és a TCV vírusfertőzéskor egészen más tapasztalunk. Annak ellenére, hogy az *in situ* hibridizációs képeken jól látszik, hogy a vírus a levél egész keresztmetszetében jelen van, sem a GapA, sem a Tub mRNS nem tűnik el. A növényeket vizsgálva pedig nem tapasztalunk súlyos tüneteket. A miRNS akkumulációt vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a vizsgált miRNS-ek szintje egyik vírus fertőzése esetén sem változik jelentősen (16 ábra B).

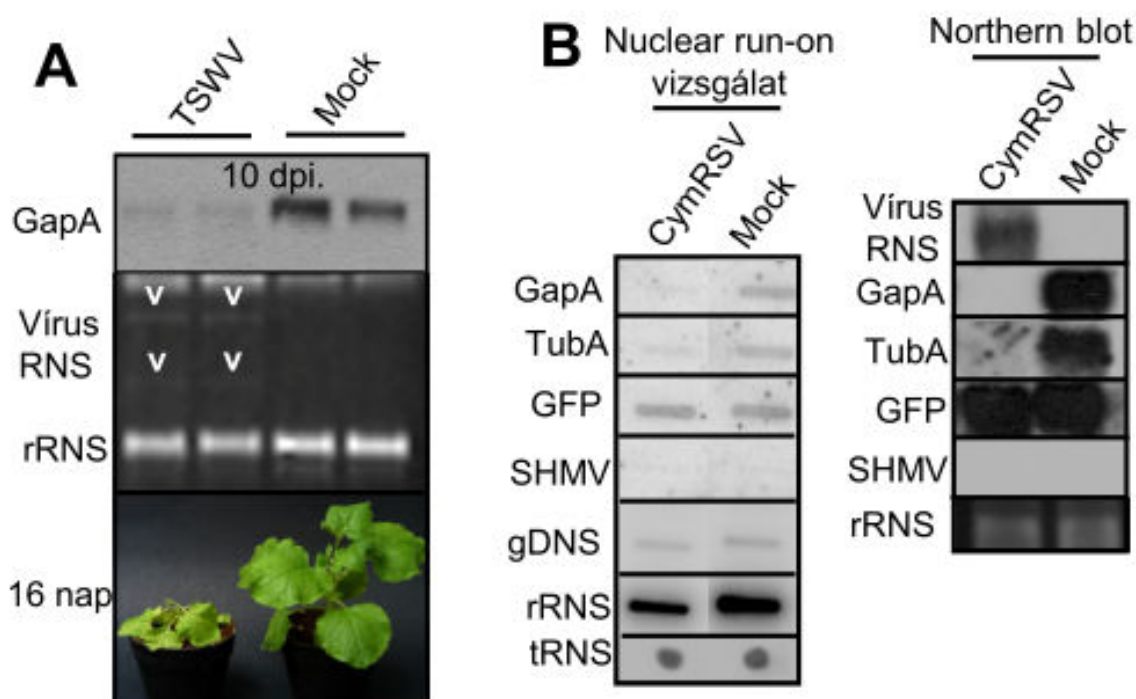
Annak eldöntésére, hogy a jelenség vajon más növényen is megmutatkozik-e *N. benthamiana* és *Solanum lycopersicum* növényeket fertőztünk TMV-vel és PVX-szel. *S. lycopersicum* növényen csak a PVX esetében alakul ki „shut-off”, miközben a növények erős tüneteket mutatnak (17. ábra A). A TMV a paradicsomon nem okoz súlyos tüneteket és a northern analízis azt mutatja, hogy a „shut-off” jelenség itt nem jelenik meg. Ezzel ellentétben *N. benthamiana*-n mindkét vírus súlyos tüneteket és „shut-off-ot” okoz (17. ábra B). Ezek az eredmények az mutatják, hogy a vírus indukálta mRNS kifejeződés gátlás más növényekre is jellemző. Továbbá ezek az eredmények azt is alátámasztják, hogy ennek a jelenségnek genetikai meghatározottsága is van, hiszen ugyanaz a vírus (TMV) az egyik növényen (*N. benthamiana*) igen, míg a másikon (*S. lycopersicum*) nem képes a „shut-off” jelenséget előidézni. A gazdagén „shut-off” jelenség megjelenése ebben a kísérletben is együtt járt a tünetek súlyosságának fokozódásával, ami arra utal, hogy a jelenség a vírusfertőzés tüneteinek kialakulásának egyik fontos összetevője lehet.



17. ábra A GapA mRNS szint változásának vizsgálata különböző gazda-vírus kapcsolatokban. (A) A GapA mRNS akkumulációja PVX és TMV fertőzött *S. lycopersicon* levelekben a fertőzést követő 14. és 21. napon. Az ábra alsó részén mennyiségi kontrollként rRNS-ek láthatók. V; vírus genomikus RNS-e. A fertőzések hatására kialakult betegség tünetek (alsó panel). (B) A GapA mRNS akkumulációja PVX és TMV fertőzött *N. benthamiana* levelekben a fertőzést követő 10. napon. Az ábra alsó részén mennyiségi kontrollként rRNS-ek láthatók. V; vírus genomikus RNS-e. A fertőzések hatására kialakult betegség tünetek (alsó panel).

4.2.4. A "shut off" jelenség kialakulásának molekuláris háttere.

Amikor egy vírus megfertőzi a növényt, a növényben aktiválódik természetes védekezési folyamata, az RNS csendesítés. Ennek során a vírus replikációkor ideiglenesen keletkező kétszálú RNS-ek kis 21-25nt hosszúságú siRNS-ekre darabolódnak, melyek egyik szála beépül egy RN-áz aktivitással bíró RISC komplexbe. A RISC komplex minden olyan mRNS-t elbont, mellyel a beépült siRNS homológiát mutat. Mivel a „shut-off” jelenségnél mi is a mRNS-ek hiányát tapasztaltuk felmerült a lehetőség, hogy a vírus eredetű siRNS-ek véletlenszerűen homológiát mutathatnak endogén génekkel, így indukálhatják azok lebomlását. Esetünkben azonban nem a géncsökkentés a felelős a jelenségért, mert a „shut-off” 15°C-on is változatlanul megjelenik, ahol a vírus indukálta géncsökkentés folyamata nem aktív (Szittyá és mtsai., 2003), és egymástól szekvenciálisan teljesen különböző vírusok esetében is ugyanúgy megjelenik. Egyes állati vírusok képesek előidézni a gazda szervezet génjeinek transzkripcionális gátlását. A Rift valley haemorrhagic láz vírus (Bunyaviridae család) NSs fehérjeje képes megakadályozni a TFIIH transzkripció faktor alegységeinek összeépülését (Le May és mtsai., 2004). Kísérleteinkben azt találtuk, hogy a paradicsom bronzfoltosság vírus (TSWV), amely ugyanebbe a vírus családba tartozik, indukálja "shut-off" jelenséget *N. benthamiana* teszt növényeken (18. ábra A). Ez a megfigyelés fölvetette annak a lehetőségét, hogy a növényi vírusok esetleg szintén a célgének transzkripcionális gátlásán keresztül indukálják a "shut-off" jelenséget. Ahhoz, hogy megválaszoljuk azt a kérdést, hogy a „shut-off” jelenség a citoplazmában, vagy már a sejtmagban, transzkripció szinten jelenik-e meg „run-on” transzkripció kísérleteket végeztünk (18. ábra B). Ezen kísérleteknél a vírusfertőzött növények szisztémikus leveleiből sejtmagot tisztítottunk, majd a mag kivonathoz radioaktív nukleotidokat adtunk hozzá. Az ekkor keletkező radioaktív transzkriptumokat tartalmazó próbával ismert endogén gének PCR termékeit tartalmazó membránokat hibridizáltunk. Eredményeink azt mutatták, hogy GapA, Tub mRNS keletkezése a sejtmagban erősen gátolt. Ezek szerint a „shut-off” jelenség a sejtmagban, transzkripció szinten alakul ki. A pontos mechanizmus, amely felelős a sejtmagi transzkripció gátlásért jelenleg még nem ismert.



18. ábra GapA, TubA és GFP gének sejtmagi "run on" analízise szisztémikusan fertőzött levelekben. (A) A GapA mRNS akkumulációja TSWV fertőzött *N. benthamiana* levelekben a fertőzést követő 10. napon. Az ábra középső részén mennyiségi kontrollként rRNS-ek láthatók. V; vírus genomikus RNS-e. A fertőzések hatására kialakult betegség tünetek (alsó panel). (B) CymRSV fertőzött levelek (6 napos) és mock inokulált levelek sejtmagi "run-on" analízise. A baloldali panel mutatja a "run-on" alízis eredményét. Egyenlő mennyiségű, a különböző cél géneket reprezentáló, DNS minta lett a membránokra feljuttatva. A membránokat vírus fertőzött és mock inokulált növényekből származó mintákból származó radioaktívan jelölt "run-on" transzkriptumokkal hibridizáltuk. Tisztított genomikus DNS (gDNS), riboszomális RNS (rRNS) és transzfer RNS (tRNS) specifikus DNS próbák szolgáltak technikai kontrollként. Nem specifikus DNS (SHMV) volt a negatív kontroll. A baloldali panel, a "run-on" analízis során felhasznált minták northern blot analízisét mutatja. Az ábra alsó részén mennyiségi kontrollként rRNS-ek láthatók.

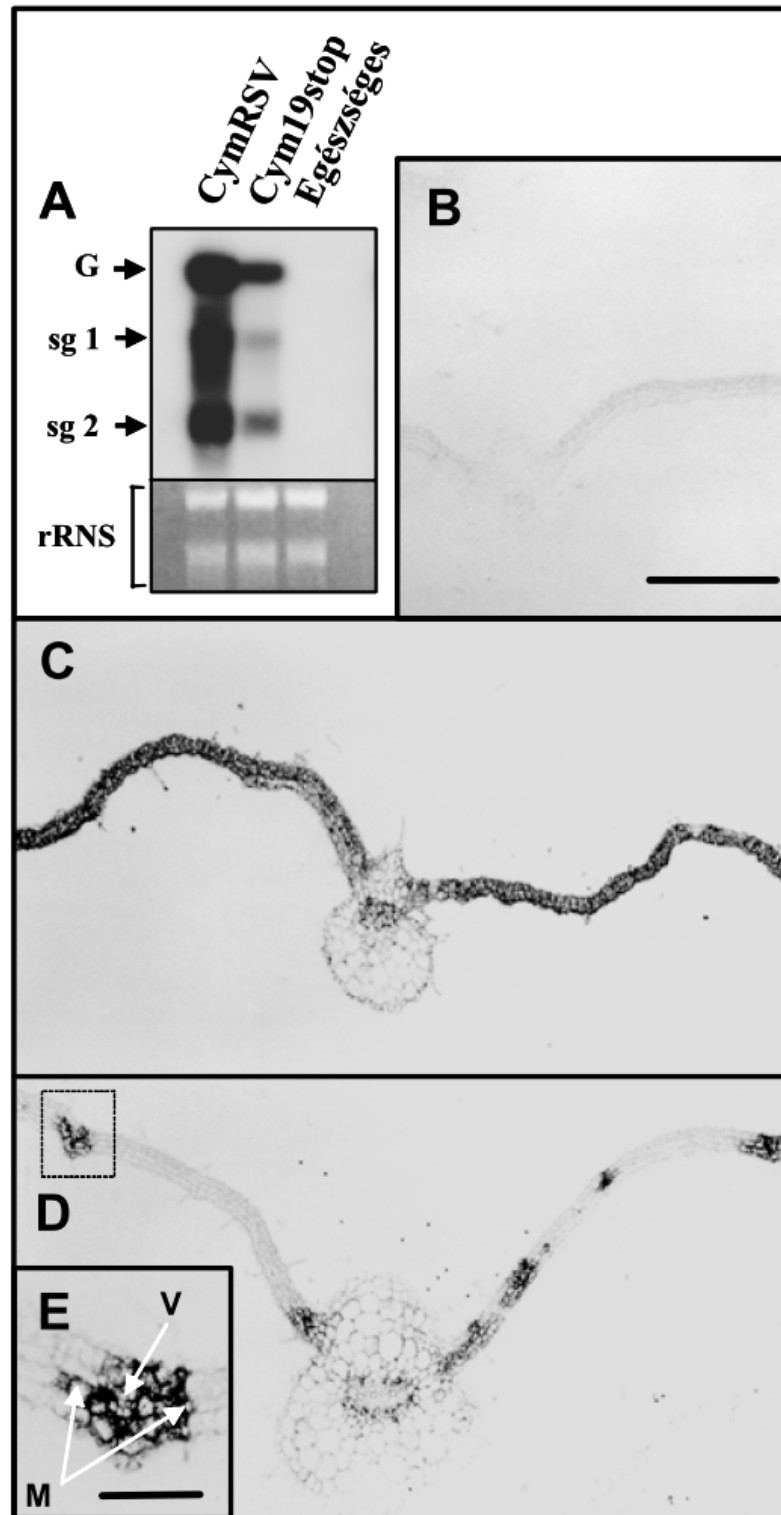
A „shut-off” jelenséget szisztémikus (egész növényre kiterjedő) vírusfertőzés esetén vizsgálva azt állapíthatjuk meg, hogy egyes vírusok (Tombusvirus és Tobamovirus nemzetségbe tartozók) képesek míg, más vírusok (Carmovirus és Cucumovirus nemzetségbe tartozók) nem képesek a gazda mRNS-ek hatékony leszállítására. Kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy a "shut-off" jelenség megjelenése függ a különböző gazda-vírus kapcsolatokról. A jelenség molekuláris mechanizmusát vizsgáló kísérleteink azt is megmutatták, hogy a „shut-off” jelenség nem a géncsendesítés mechanizmusán keresztül hat, hanem a sejtmagban, transzkripció szinten történik. A különböző gazda-vírus kapcsolatok vizsgálata kapcsolatot

dc_35_10

mutatott ki a tünetek súlyossága és a „shut-off” jelenség mértéke között. Megmutattuk, hogy a szisztémikusan fertőzött levelekben az endogén génekre ható "shut-off" jelenég perzisztens módon fennmaradhat ezzel súlyos mRNS deficienciát hoz létre a gazdanövényben. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a „shut-off” jelenség a tünet kialakulás fontos komponense lehet bizonyos növény-vírus kapcsolatokban.

4.3. Az RNS csendesítés alapú védekezési rendszer szövetszintű működésének vizsgálata.

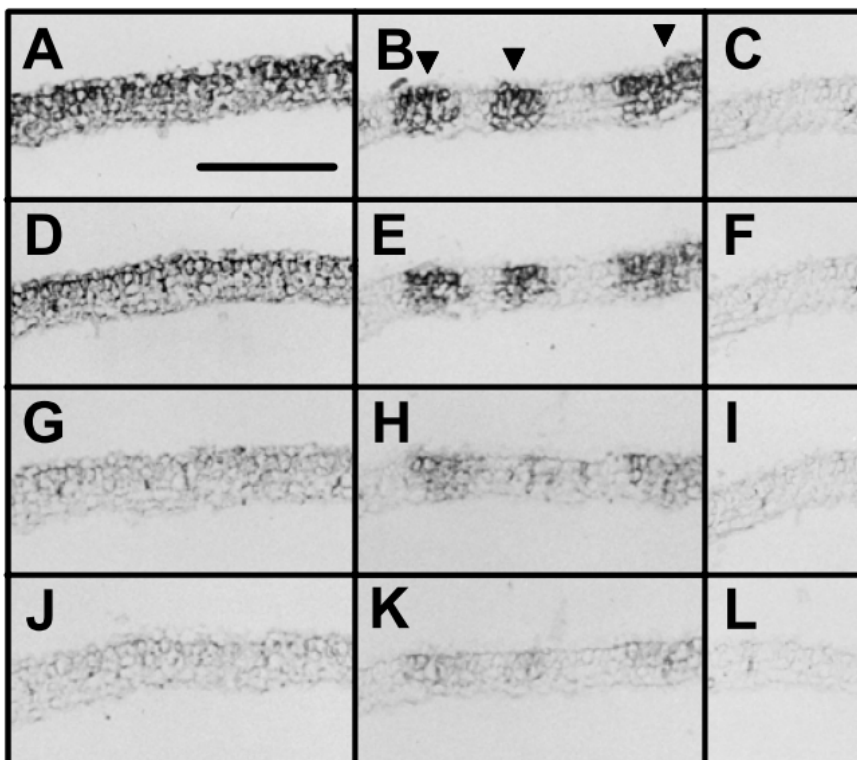
A CymRSV RNS csendesítést gátló fehérjéje (p19) fontos tünet meghatározó fehérje, hiszen hiányában a fertőzött (Cym19Stop) növény enyhe, főként levéldeformációs, nekrotizis mentes tüneteket mutat, majd később kialakul az ún. kigyógyulási fenotípus, azaz a növény kinövi a kezdeti betegség tüneteket és majdnem tünetmentessé válik (Szittyá és mtsai., 2002). A vad típusú vírus ezzel ellentétben a növény csúcsnekrotizisát, majd ezt követően teljes pusztulását okozza. A Cym19Stop fertőzésre szintén jellemző, hogy a fertőzött növényben a vírus genomikus RNS-ének akkumulációja gátolt a vad típusú vírus felhalmozódásával összevetve (Szittyá és mtsai., 2002). A következő kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy a p19 hiánya hogyan befolyásolja a vírus felhalmozódást és elterjedését a fertőzött növényben (Havelda és mtsai., 2003). Korábbi kísérletek bebizonyították, hogy a CymRSV és a Cym19Stop mutáns vírus protoplasztokban azonos mértékben képes replikálódni (Silhavy és mtsai., 2002), szisztémikusan fertőzött levelekben azonban a két vírus mennyisége jelentősen eltér egymástól (Silhavy és mtsai., 2002). A CymRSV és a Cym19Stop mutáns szisztémikus levelekben történő térbeli elterjedésének vizsgálatára *in situ* hibridizációs kísérleteket végeztünk. *N. benthamiana* növényeket fertőztünk CymRSV és Cym19Stop vírusokkal (24 °C), majd hét nappal a fertőzés után a szisztémikusan fertőzött leveleket paraffinba ágyaztuk és a belőlük készült keresztmetszeteket *in situ* hibridizációnak és immunohisztokémiának vetettük alá. A mintavétel időpontjában az RNS mintákban nyilvánvaló volt a Cym19Stop vírusra jellemző csökkent genomikus RNS felhalmozódás (19. ábra). A vad típusú vírus ebben az időpontban a levél összes szövetében és sejtjében jól látható, mutatva a sikeres szisztémikus fertőzés létrejöttét. Ezzel szöges ellentétben a Cym19stop vírussal fertőzött szisztémikus levelekben a vírus korlátozott elterjedést mutat, jellemzően csak az erekben és az azt körülvevő szövetekben látható, nem képes a fertőzött növény szisztémikus leveleiben teljes egészében elterjedni.



19. ábra CymRSV és Cym19Stop vírus RNS felhalmozódása a szisztemikus levelekben 7 nappal a fertőzés után. (A) Northern blot analízis vírus specifikus próbával. G–genomi RNS, sg–szubgenomi RNS, rRNS–riboszómális RNS-ek; (B-E) Szisztemikus levelek *in situ* hibridizációja. (B) Egészséges növény szöve; (C) CymRSV-vel fertőzött szövet; (D) Cym19stop-pal fertőzött szövet; (E) Háromszoros nagyítása egy érnek és környékének (D kép bekeretezett rész). V–szállítószövet, M–mezofil szövet; méretjelző vonal a B képen 400 μm (C-D).

4.3.1. Cym19Stop vírus a vad típusú vírussal megegyező hatékonysággal replikálódik a megfertőzött sejtekben.

Annak eldöntésére, hogy a RNS csendesítés szuppresszor mutáns vírus a megfertőzött sejtekben hasonló hatékonysággal halmozódik-e fel, mint a vad típusú vírus, egymást követő metszetek *in situ* hibridizációját végeztük el. Abból a célból, hogy az *in situ* hibridizálás során kialakuló jelekből mennyiségi következtetéseket vonhassunk le a színreakciót a telítettség különböző időpontjaiban állítottuk le (20, 40, 90, 180 perc). A kísérlet azt mutatja, hogy a CymRSV és Cym19stop vírussal fertőzött sejtek hasonló színintenzitást adnak az összes vizsgált időpontban, ami azt jelenti, hogy a sejtek közel azonos mennyiségű vírus RNS-t tartalmaznak (20. ábra).



20. ábra Vírus RNS-ek felhalmozódásának vizsgálata *in situ* hibridizációval 7 nappal a fertőzés után szisztémikus levelekben. (A,D,G és J) CymRSV-vel fertőzött szövet egymást követő metszetei; (B,E,H és K) Cym19Stop-val fertőzött szövet egymást követő metszetei; (C,F,I és L) egészséges szövet egymást követő metszetei; A színreakció leállítása 20. (J,K és L), 40. (G,H és I), 90. (D,E, és F) és 180. (A,B és C) percben. A háromszögek a B képen a Cym19Stop vírus felhalmozódását mutatják. Méretjelző vonal az A képen 250 μ m (A-L).

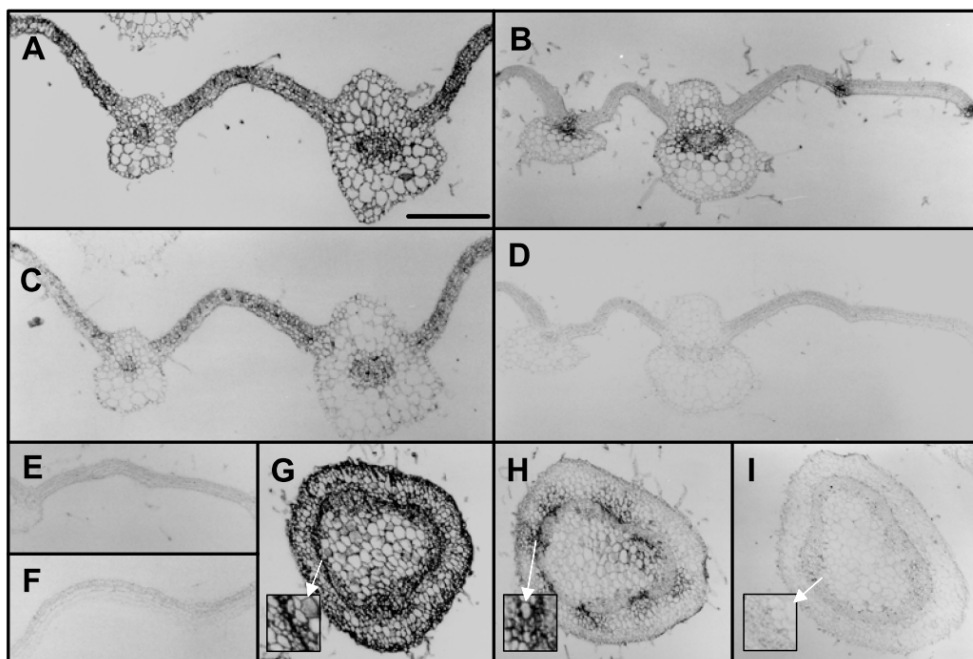
Tehát, ha a sejt megfertőződött, akkor a vad típusú és a mutáns vírus is hasonló hatékonysággal képes replikálódni benne. Ez az eredmény összhangban áll a korábban

tapasztaltakkal, mely szerint protoplaszt transzfekció esetén a CymRSV és a Cym19stop vírus hasonló mértékben halmozódik fel a sejtekben (Silhavy és mtsai., 2002).

A szisztémikusan fertőzött levelek *in situ* hibridizációja alapján azt mondhatjuk, hogy az RNS csendesítés szuppresszor mutáns vírus hosszútávon hasonló hatékonysággal tud mozogni a növényben és eljut a szisztémikus levelekbe (nincs bemutatva). Négy nappal a fertőzés után mindkét vírus eljut a mezofil sejtekbe, de onnan tovább mozogni csak a vad típusú vírus tud, amíg a p19 mutáns vírus mozgása a továbbiakban gátolt.

4.3.2. Vírus eredetű fehérjék felhalmozódása a Cym19Stop fertőzött szövetekben.

Az eddigi kísérletekben a vírus RNS-ek felhalmozódását vizsgáltuk a növény leveleiben. A továbbiakban immunohisztokémiát alkalmaztunk annak kiderítésére, hogy a mutáns vírussal történt fertőzés esetén a vírusfehérjék hol, és milyen mértékben találhatók a szövetekben. A 21. ábrán a virális köpenyfehérje (CP) és p19 fehérje levélszövetbeli elhelyezkedése látható.

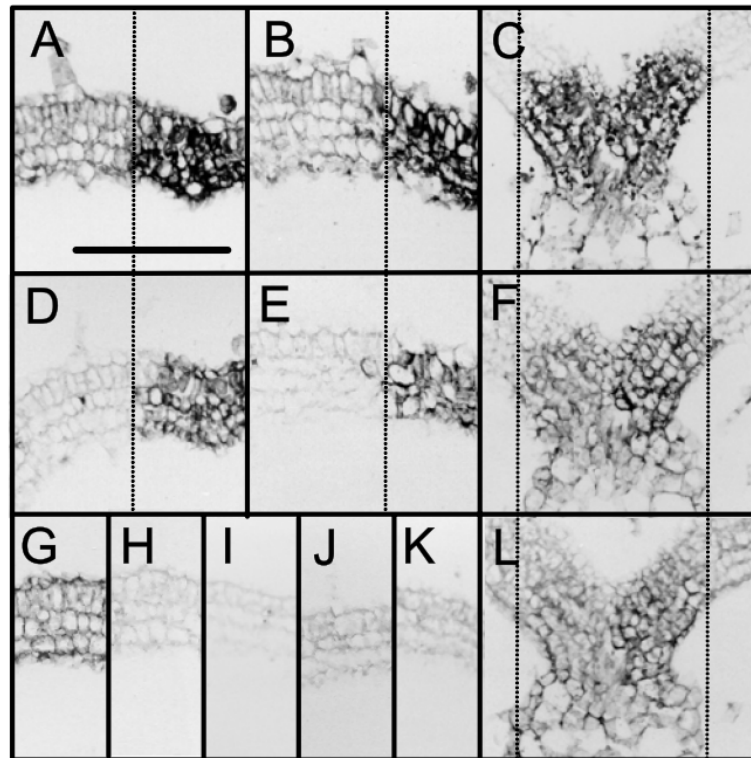


21. ábra CP és p19 fehérjék akkumulációja 7 nappal a fertőzés után. CymRSV-vel (A), Cym19Stop-pal (B) fertőzött, valamint egészséges szisztémikus levelek (E) immunokémiája anti-CP antitesttel (1:5000). CymRSV-vel (C), Cym19stop-pal (D) fertőzött, valamint egészséges szisztémikus levelek (F) immunokémiája anti-p19 antitesttel (1:2000). CymRSV-vel (G), Cym19stop-val (H) fertőzött, valamint egészséges növények szárkeresztmetszetének (I) immunokémiája anti-CP antitesttel (1:5000). Méretjelző vonal az A képen 400 μ m (A-I). A G, H és I képen látható bekeretezett képek a nyíllal jelölt CymRSV, Cym19stop által fertőzött és egészséges szövetek háromszoros nagyításai.

A CymRSV-vel fertőzött levelekben a CP mindenütt nagy mennyiségben jelen van a szisztémikus levelekben, míg Cym19Stop-pal történt fertőzés esetén a CP elterjedése az erekre és azok környezetére korlátozódik.

Kontroll kísérletként elvégeztük az egymás utáni metszetek hibridizálását p19 fehérje elleni ellenanyaggal. Ahogy várható volt, a vad típusú vírussal fertőzött növény leveleiben a p19 fehérje jelen volt az egész levélben, míg a mutáns vírussal fertőzött növény leveleiben nem lehetett kimutatni. A levéllemezen kívül más szövetben is szeretnénk volna megvizsgálni a vírus jelenlétét, ezért szár keresztmetszeteket készítettünk a fertőzött növényekből az inokulált és szisztémikus levelek közötti szárrészből. A vírus jelenlétét anti-CP antitesttel mutattuk ki. Hasonlóan a levél keresztmetszetekhez, a CymRSV-vel fertőzött növények száraiban a CP egyenletesen, nagy mennyiségben halmozódott fel, míg Cym19Stop esetében a köpenyfehérje jelenléte az erekre és közvetlen környezetükre korlátozódott (21. ábra). Habár a Cym19Stop az erekből a mezofil sejtek felé történő elterjedése gátolt, az erekben és a környezetükben lévő sejtekben nagy mennyiségben van jelen. A mutáns vírus tehát képes felhasználni a növény szállítórendszerét a hosszútávú mozgáshoz, hogy eljusson a fertőzés helyétől a távolabb lévő szövetekbe, szövetekbe is. A vírus rövidtávú mozgási fehérjéje és a RNS csendesítés szuppresszor fehérjéje egyaránt a szubgenomikus 2 RNS-ről transzlálódik két egymásba ágyazott ORF-ről. Megvizsgáltuk, hogy a Cym19Stop vírusban lévő mutáció befolyásolja-e az MP expresszióját, amely a vírus csökkent sejtről-sejtre való terjedését eredményezheti. Mivel az MP a vírus sejtről-sejtre való mozgásáért felelős, a fertőzés után öt nappal mintákat vettünk a növények szisztémikusan fertőzött leveleiből, hogy megállapíthassuk a fertőzési frontban a MP felhalmozódását. Egymást követő metszeteket hibridizáltunk MP és CP elleni ellenanyaggal (anti-MP és anti-CP) (22. ábra). A CymRSV és Cym19Stop vírus által fertőzött szövetekben az MP felhalmozódása nem mutat jelentős különbséget. Az egymást követő metszetek azt mutatják, hogy a CP és az MP együtt lokalizálódik mind a vad típusú vírus, mind a p19 mutáns vírus által fertőzött levelekben.

Annak megállapítására, hogy a p19 képes-e vírusfertőzési front elé mozogni, s így kifejteni szuppresszor hatását, egymás utáni metszeten vizsgáltuk a p19 fehérje elterjedési mintázatát a vírus RNS és CP fehérje megjelenéséhez képest. 5 nappal a vad típusú vírussal történt fertőzés után ágyaztuk paraffinba a szisztémikus leveleket, majd *in situ* hibridizációt és immunohisztokémiát végeztünk vírus RNS próbával, anti-CP és anti-p19 antitesttel. A 22. ábrán a pontozott vonalak a vírus fertőzési frontját mutatják a szisztémikus levelekben. Jól látható, hogy a vírus RNS, a CP és a p19 fehérje egy helyen lokalizálódik, nincs különbség a térbeli elterjedésükben (C,F és L).



22. ábra CP, MP és p19 fehérje felhalmozódása szisztémikus levelekben 5 nappal a fertőzés után. Egymás utáni metszetek immunohisztokémiája CymRSV-vel fertőzött levelekben anti-CP antitest (A) és anti-MP antitest (D) felhasználásával. Egymás utáni metszetek immunohisztokémiája Cym19Stop-pal fertőzött levelekben anti-CP antitest (B) és anti-MP antitest (E) felhasználásával. A pontozott vonal a fertőzési frontot mutatja. Egészséges levelek kontroll hibridizálása anti-CP antitesttel (G) és anti-MP antitesttel (H). p19 fehérje azonos elterjedése a CP-vel és vírus RNS-sel (C,F és L). CymRSV-vel fertőzött szisztémikus levelek egymás utáni metszeteinek *in situ* analízise (C), mely a vírus specifikus RNS-t mutatja ki, és immunohisztokémiája anti-p19 antitesttel (F), ill. anti-CP antitesttel (L). A pontozott vonal a fertőzési frontot mutatja. I, J és K kép egészséges levelek kontroll hibridizálása az előbbi próbákkal. Méretjelző vonal az A képen 200 μm (A-L).

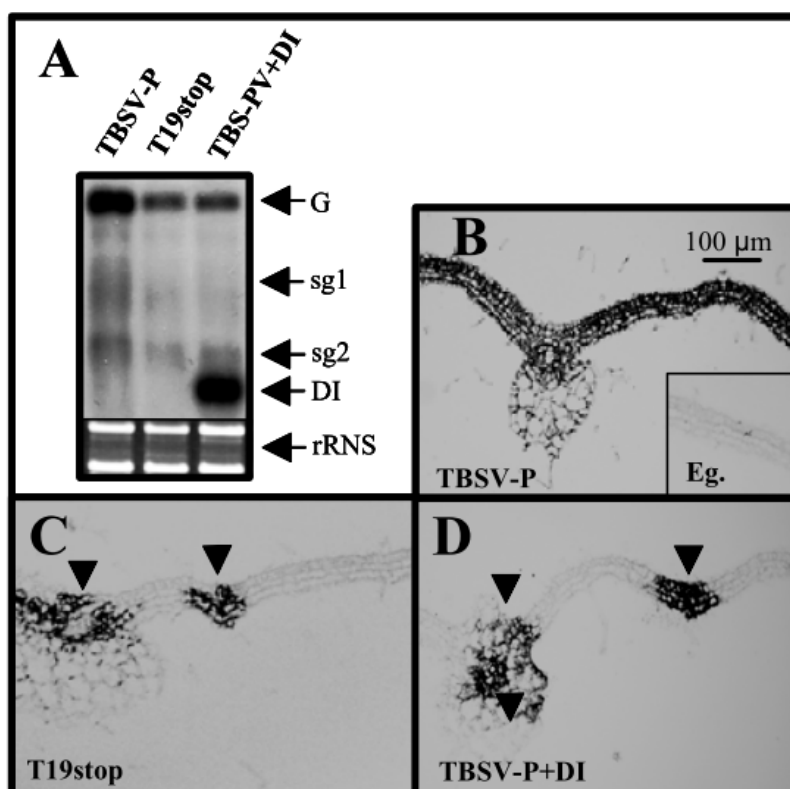
A kísérletből kiderül, hogy a p19 fehérje nem képes a fertőzési front elé kerülni, tehát a p19 fehérje azokban a sejtekben fejti ki hatását, melyet a vírus meg tudott fertőzni, replikálódik benne, és itt képes megakadályozni a mobil szignál képződését vagy kibocsátását a sejtéből. Ezek a kísérletek összhangban állnak a korábbi megfigyelésekkel, ahol a p19 fehérje megakadályozta a transzgen indukálta szisztémikus RNS csendesítést (Silhavy és mtsai., 2002).

4.4. DI RNS-ek tünetmódosító hatásnak molekuláris analízise.

A DI RNS-ek jelenléte a fertőzött növényben hasonló betegség tünetek kialakulásához vezet mint amelyet a Cym19Stop mutáns fertőzéskor tapasztaltunk. Ebben az esetben a DI RNS-ek felhalmozódásával párhuzamosan a vad típusú vírus genomikus RNS-ének mennyisége drasztikus csökkenést mutat, elmarad a nekrotikus reakció és a növényen kigyógyulásszerű tüneteket jelennek meg. Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy a DI RNS-ek hogyan képesek a vírus replikációját és a tünetek kialakulását befolyásolni. Kísérleteinkben egy másik tombusvírus rendszert használtunk, a paradicsom bokros törpülés vírust (Tomato bushy stunt tombusvirus; TBSV), ennek p19 defektív mutáns változatát (T19Stop) és TBSV fertőzés során keletkező DI RNS-t (Szittya és mtsai., 2000).

4.4.1. A DI RNS jelenléte gátolja a vad típusú vírus elterjedését a szisztémikusan fertőzött levelekben.

Ha TBSV-P és TBSV-P DI-5 plazmidről *in vitro* RNS transzkriptumot készítünk és *N. benthamiana* dohánynövényeket velük együtt fertőzzük, akkor a fertőzött növények 6-7 nappal a fertőzés után az első szisztémikus levelükön intenzív tüneteket mutatnak: a levelek szélei bepöndörödnek, erősen meghajlanak, jellegzetes mintázat jelenik meg rajtuk. A vad típusú vírussal történt fertőzéssel ellentétben csúcsnekrózis és a növény pusztulása nem tapasztalható. Tizennégy nappal a fertőzés után a növények kezdenek kigyógyulni, hasonlóan a p19 mutáns vírus (T19Stop) fertőzéséhez, kigyógyuló fenotípus alakul ki. A genomi RNS mennyisége jelentős mértékben csökken a csak vad típusú vírussal fertőzött növények vírusszintjéhez képest, hasonlóan, mint a T19Stop esetében (23. ábra).



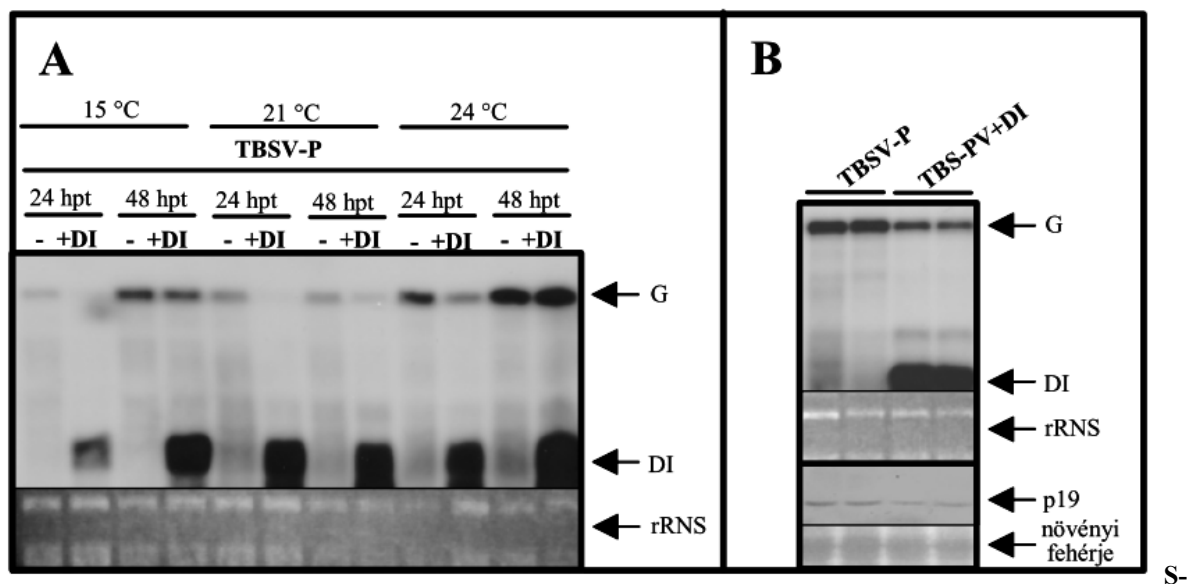
23. ábra Vírus és DI RNS felhalmozódás az első szisztemikus levelekben 7 nappal a fertőzés után. (A) TBSV-P, T19Stop és TBSV-P+DI RNS-sel fertőzött növények Northern blot analízise, próba: vírus 3' vége, random próba. G–genomi RNS, sg– szubgenomi RNS, DI–DI RNS, rRNS– riboszómális RNS. (B–D) Szisztemikus levelek keresztmetszetének *in situ* hibridizációja 7 nappal a fertőzés után. Próba: digoxigenin-11-UTP-vel jelölt negatív szálú CP RNS. (B) TBSV-P-vel fertőzött szövet; a kis kép egészséges szövet kontroll hibridizációja. (C) T19Stop-pal fertőzött szövet. (D) TBSV-P+DI RNS-sel fertőzött szövet. Méretjelző vonal a B képen 100 µm (B–D). A fekete háromszögek a vírusfertőzés helyeit jelzik.

A DI RNS rendkívül nagy mennyiségben jelenik meg a növény szisztemikus leveleiben. A tünetcsökkenés pontosabb megértéséhez *in situ* hibridizációs kísérletet végeztünk a DI RNS-sel együtt fertőzött növények első szisztemikus leveleinek felhasználásával. Hét nappal a fertőzés után a szisztemikus leveleket paraffinba ágyasztuk, majd levélkeresztmetszeteket készítettünk. Próbaként a vírus köpenyfehérjét kódoló RNS-sel homológ RNS próbát használtunk, mely csak a vírus RNS-hez hibridizál, mivel a DI RNS nem tartalmaz szekvenciadarabot a CP régióból. A TBSV-P vírus homogén, az egész levélre kiterjedő elterjedést mutat a szisztemikus levélben, hasonlóan a CymRSV-hoz, ami a általános fertőzésre utal (23. ábra). TBSV-P + DI RNS-sel történt fertőzés esetén azonban a vírus csökkent elterjedést mutat a levelekben. Jellemzően a levél ereiben és azok közvetlen környezetében kaptunk hibridizációs jelet. Ez a szisztemikus levelekben történő elterjedési mintázat nagymértékben hasonlít a p19 mutáns vírussal történt fertőzésekre, azonban ebben

az esetben a DI RNS mellett a vad típusú vírus van jelen és p19 fehérje expressziója detektálható.

4.4.2. TBSV RNS és p19 fehérje felhalmozódás protoplasztokban DI RNS jelenlétében.

Korábbi munkák azt mutatták, hogy a DI RNS egy sejt szinten csökkenti a genomi RNS felhalmozódását (Jones és mtsai., 1990; Qiu és mtsai., 2001). *N. benthamiana* mezofil protoplasztokat fertőztünk TBSV-P és TBSV-P DI-5 transzkriptumokkal és megvizsgáltuk az általunk használt rendszerben a felhalmozódott RNS-ek mennyiségét. Mivel a p19 mutáns vírusról (Cym19Stop) bebizonyították, hogy szöveti szinten hőmérsékletfüggő, de egy sejt szinten hőmérséklet független a replikációja (Szittyá és mtsai., 2003), a transzfektált protoplasztokat 15, 21 és 24 °C-on tartottuk. Ha molárisan azonos mennyiségű genomi és DI RNS-sel transzfektáljuk a protoplasztokat, akkor 24 órával a fertőzés után a genomi RNS alacsonyabb szintű felhalmozódást mutat a csak vírussal történt fertőzéshez képest. Negyvennyolc órával a fertőzés után azonban ez a visszaszorulás kevésbé kifejezett, a genomi RNS szintje megemelkedik (24. ábra).

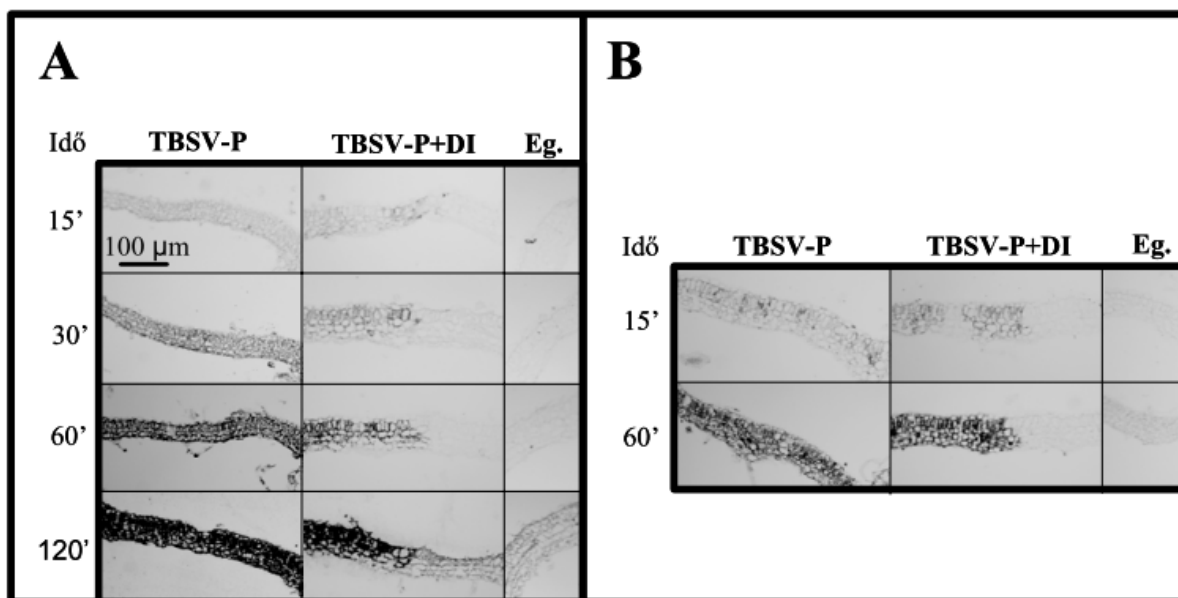


24. ábra Vírus RNS-ek és a p19 fehérje felhalmozódásának vizsgálata TBSV-P és TBSV-P+DI

RNS-el transzfektált protoplasztokban. (A) A genomi RNS felhalmozódásának vizsgálata protoplasztokban különböző hőmérsékleteken. Próba: TBSV-P DI5 random próba, G–genomi RNS, DI–DI RNS, rRNS–riboszómális RNS. (B) p19 felhalmozódás TBSV-P és TBSV-P+DI RNS-sel transzfektált protoplasztokban.

Ez a megfigyelés minden vizsgált hőmérsékletre jellemző. Megfigyelésünk összhangban van korábbi TBSV eredményekkel, ahol DI RNS jelenlétében a TBSV genomi RNS szint csökkent felhalmozódást mutat (Jones és mtsai., 1990), de hosszabb ideig vizsgálva a genomi RNS mennyiségét, kísérleteink nagyobb mértékű helper vírus replikációt mutatnak, csaknem annyi vírus halmozódik fel a sejtekben, mint a csak helper vírussal transzfektált protoplasztok esetén. Emellett azt tapasztaltuk, hogy 24 órával a fertőzés után körülbelül a genomi RNS szintnek megfelelő p19 fehérje mennyiség képződik a protoplasztokban DI RNS jelenlétében (24. ábra), tehát a DI RNS jelenléte nem szorítja vissza a p19 fehérje mennyiségét.

A vírus felhalmozódásának mértékét megvizsgáltuk TBSV-P+DI és TBSV-P-vel való fertőzés során szisztémikus levelekben, 7 nappal a fertőzés után. A levelekből egymás utáni metszeteket készítettünk, majd a CP kódoló régióját felismerő negatív szálú próbát használva *in situ* hibridizációt végeztünk. A jel intenzitásából eredő félreértelmezések elkerülése miatt a színreakciót különböző időpontokban állítottuk le (15, 30, 60, 120 perc), mielőtt elérte volna a telítési szintet (25. ábra). A kísérlet azt mutatja, hogy a TBSV-P és TBSV-P+DI RNS-sel fertőzött sejtek hasonló színintenzitást adnak az összes vizsgált időpontban, ami azt jelenti, hogy a sejtekben közel azonos mennyiségű genomikus RNS halmozódik fel.



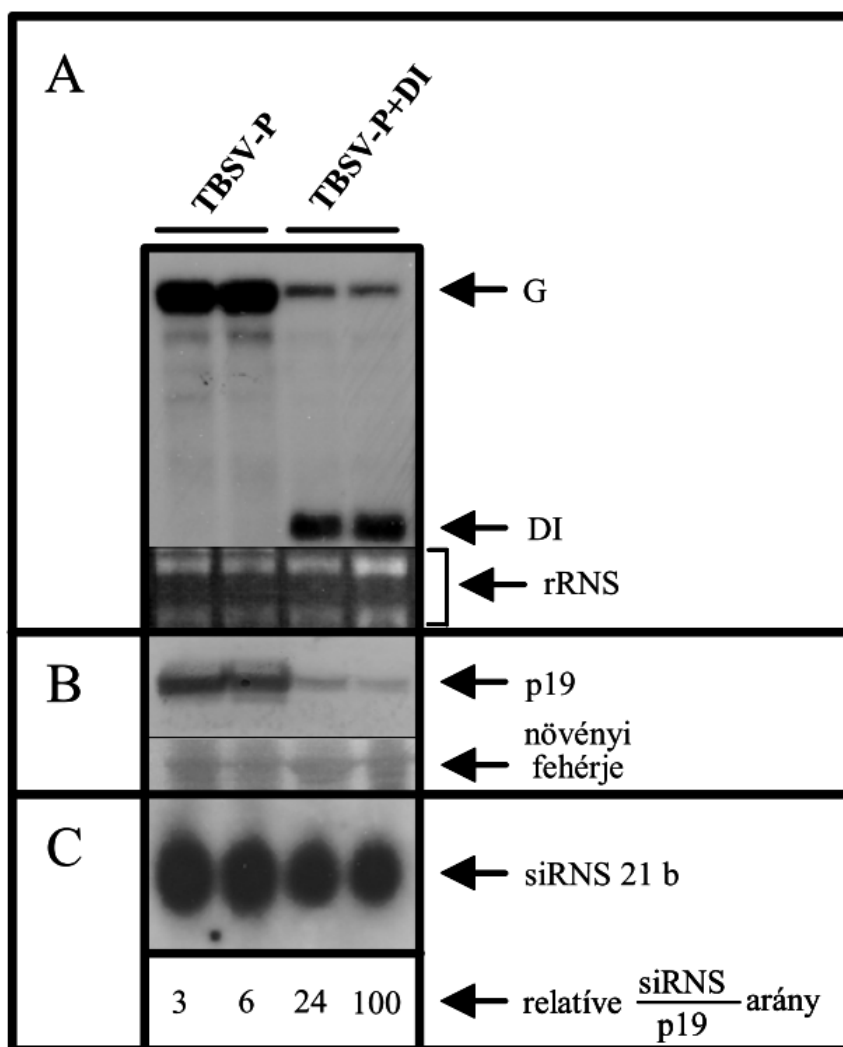
25. ábra Vírus RNS és p19 fehérje felhalmozódás szisztémikus levelekben 7 nappal a fertőzés után. (A) Egymás utáni metszetek *in situ* hibridizációja a vírus RNS CP régióját felismerő próbával. A színreakciót a jelölt időpontokban állítottuk le. (B) Egymás utáni metszetek immunokémiája anti-p19 antitesttel. A színreakciót a jelölt időpontokban állítottuk le. Méretjelző vonal az A képen 100 µm (A és B). Eg.–egészséges szövet kontroll hibridizációja.

Mivel a DI RNS-sel történő együttfertőzés a p19 mutáns vírus által okozott fenotípusra nagymértékben hasonlít, megvizsgáltuk a p19 fehérje felhalmozódását a szövetekben.

A p19 fehérje mennyiségét hét nappal a fertőzés után beágyazott szisztémikus levelek egymás utáni metszeteinek immunhisztokémiai festésével vizsgáltuk. A színreakciót különböző időpontokban leállítottuk, mielőtt elérte volna a telítési szintet (25. ábra). Az immunkémiai vizsgálat alapján azonos színintenzitást tapasztaltunk a TBSV-P-vel és TBSV-P+DI RNS-sel fertőzött növények szöveteiben, vagyis a p19 fehérje hasonló mennyiségben van jelen a megfertőzött sejtekben.

4.4.3. A DI RNS jelenléte növeli a szabad vírus specifikus siRNS-ek jelenlétét.

Ha tombusvírus fertőzéskor DI RNS is részt vesz a fertőzésben, akkor a növények kigyógyuló fenotípust mutatnak, mely nagymértékben hasonlít a p19 mutáns vírus által okozott tünetekhez, de ebben az esetben p19 PTGS szupresszor jelen van a fertőzéskor. Mivel a p19 mutáns vírus esetében létrejött tünetcsökkenés az aktiválódó PTGS következménye ezért megvizsgáltuk a DI RNS-ek és a PTGS lehetséges kapcsolatát. A siRNS-ek a RNS csendesítés jelzőmolekulái, ezért kíváncsiak voltunk a DI RNS-ekkel fertőzött növényekben a vírusspecifikus siRNS-ek és a RNS csendesítés szupresszor fehérje (p19) felhalmozódására. Korábbi eredmények azt bizonyították, hogy a p19 fehérje PTGS szupresszor hatása a siRNS-ek megkötésén alapul, és függ a fehérje mennyiségétől (Silhavy és mtsai., 2002; Lakatos és mtsai., 2004), ezért a siRNS/p19 fehérje arányát szerettük volna meghatározni. TBSV-P és TBSV-P + TBSV-P DI-5 RNS-sel fertőztünk *N. benthamiana* növényeket, majd 7 nappal a fertőzés után extrakciós pufferben dörzsöltük el az első szisztémikus leveleket. A mintákat két részre osztottuk, egyik részét RNS, másik részét fehérje analízishez használtuk fel. A Northern blot analízis azt mutatta, hogy a DI RNS nagy mennyiségben felszaporodott a növényben, míg a helper vírus replikációja erősen lecsökkent a TBSV-P-vel történt fertőzéshez képest (26. ábra). Próbaként a vírus teljes cDNS klónjáról származó random DNS próbát használtunk a hibridizáláshoz. Emellett megállapítottuk ugyanezen mintákban lévő siRNS felhalmozódásának mértékét is. Próbaként a TBSV-P teljes hosszúságú, radioaktívan jelölt, pozitív szálú RNS-ét használtuk fel (26. ábra).

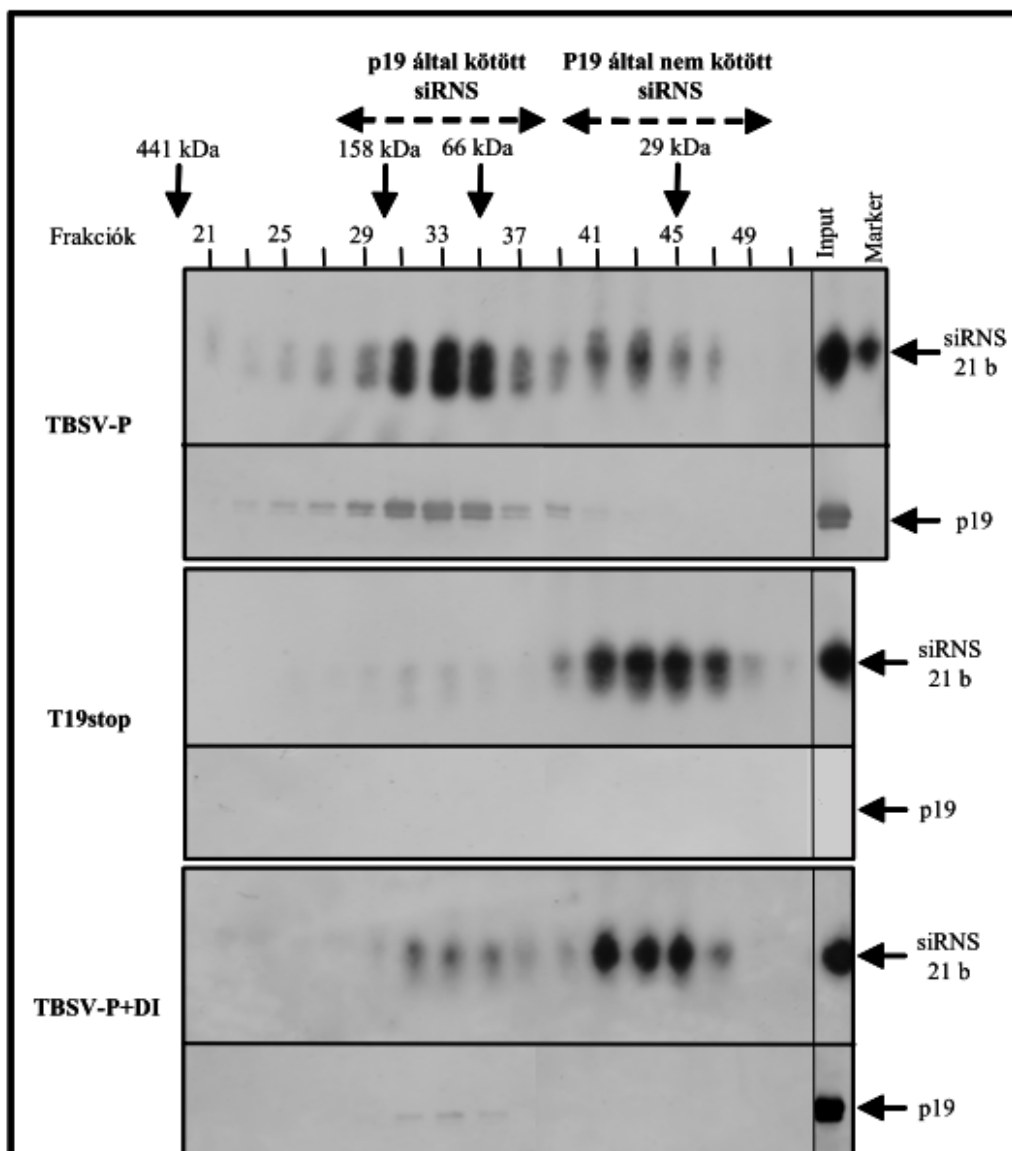


26. ábra Vírus specifikus siRNA és p19 fehérje felhalmozódás a szisztémikus levelekben 7 nappal a fertőzés után. (A) Vírus és DI RNS azonosítása Northern blot analízissel. Próba: TBSV-P cDNS-ről készült random próba (B) p19 fehérje azonosítása Western blot analízissel. (C) Vírus specifikus siRNA-ek kimutatása. Próba: TBSV-P pozitív szálú, radioaktívan jelölt RNS. G–genomi RNS, sg–szubgenomi RNS, DI–DI RNS-ek, rRNS–riboszómális RNS.

A DI RNS-sel együtt fertőzött növényekben közel azonos mennyiségű vírus specifikus siRNA halmozódik fel, mint a TBSV-P vel fertőzött növényekben, de a genomi RNS szintje sokkal alacsonyabb. A minták Western blot analízisével arra kerestük a választ, hogyan alakul a p19 fehérje mennyisége a fertőzött növényekben (26. ábra). Megállapítható, hogy a p19 mennyisége jelentős mértékben csökken a DI RNS-sel együtt fertőzött növényekben. Ez a csökkenés közel azonos a genomi RNS szintjének csökkenésével. Vagyis megállapíthatjuk, hogy a DI RNS jelenléte jelentős mértékben megemeli a vírus specifikus siRNA-ek mennyiségét a genomi RNS és a p19 fehérje szintjéhez képest. A siRNA/p19 arány nagyobb a DI RNS-sel fertőzött növények szisztémikus leveleiben. Ebből arra következtethetünk, hogy a

vírus specifikus siRNS-ek egy része valószínűleg nem kötött a p19 fehérje által, hasonlóan a Cym19stop-pal fertőzött növényekhez (Lakatos és mtsai., 2004).

A megemelkedett siRNS mennyiség előidézhetheti szabad siRNS-ek jelenlétét a növényben. Ennek eldöntésére TBSV-P, T19Stop és TBSV-P+TBSV-P DI-5 RNS-sel fertőzött növények szisztémikus leveleiből készítettünk homogenizátumot. Ezeket gélfiltrációs oszlopra tettük, majd méret alapján elválasztottuk a bennük lévő molekulákat ahogy ezt előzőleg CymRSV-ra leírták (Lakatos és mtsai., 2004).

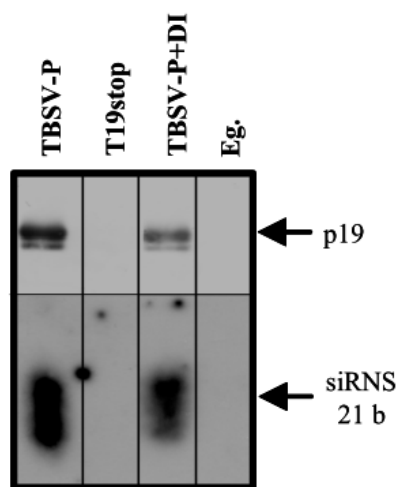


27. ábra TBSV-P, T19stop és TBSV-P+DI RNS-sel fertőzött növényekből készült homogenizátumok gélfiltrációja. Az összegyűjtött frakciókat vírus specifikus siRNS (felső panelek) és p19 fehérje (alsó panelek) jelenlétére teszteltük Northern és Western blot analízissel. Próba: radioaktívan jelölt TBSV-P vírus pozitív szálú RNS. Marker: γ -ATP-vel jelölt szintetikus 21 bázis hosszú RNS oligo. Input: oszlopra felvitt kiindulási minta. A p19 által kötött, ill. nem kötött siRNS tartalmú frakciók a felső ábra tetején feltüntetve.

A frakciókat vírus specifikus siRNS-ek és p19 fehérje jelenlétére teszteltük. A TBSV-P-vel fertőzött növényben a p19 fehérje és a siRNS-ek ugyanazokban a frakciókban jelennek meg, csak kevés siRNS látható az alacsonyabb molekulatömegű frakciókban, melyek a p19 fehérje által nem kötött szabad siRNS-ek (27. ábra).

Ezzel ellentétben a T19Stop-pal fertőzött növényekben a siRNS-ek az alacsonyabb molekulatömegű frakciókban jelennek meg, szabad siRNS-ek, hiszen a mutáns vírus nem képes a p19 RNS csendesítés szuppresszor fehérje termelésére. DI RNS jelenlétében ki tudunk mutatni p19 fehérje által kötött siRNS-eket, de a siRNS-ek nagyobb része az alacsonyabb molekulatömegű frakciókban (szabad siRNS) jelent meg.

A DI RNS-ek szisztémikus levelekben történő nagy mennyiségű felhalmozódása befolyásolhatja az RNS csendesítés szuppresszor fehérje által megkötendő siRNS mennyiségét. Ennek a lehetőségnek kizárására immunprecipitációt hajtottunk végre TBSV-P, T19stop és TBSV-P+TBSV-P DI-5 RNS-sel fertőzött növények kivonataiból. Az immunprecipitátumokat két részre osztottuk, a minta egyik felében a siRNS felhalmozódását vizsgáltuk Northern analízissel, míg a másik felét p19 fehérje azonosítására használtuk fel Western blot analízis segítségével (28. ábra).



28. ábra TBSV-P, T19stop és TBSV-P+DI RNS-sel fertőzött növényekből készült homogenizátumok immunoprecipitációja anti-p19 antitesttel. A precipitátumokat vírus specifikus siRNS (alsó panelek) és p19 fehérje (felső panelek) jelenlétére teszteltük Northern és Western blot analízissel. Próba: radioaktívan jelölt TBSV-P vírus pozitív szálú RNS. Eg.–egészséges növény homogenizátumából készült kontroll.

A kísérlet azt bizonyítja, hogy a DI RNS nem befolyásolja szignifikánsan a p19 fehérje siRNS kötő képességét, mivel a siRNS mennyisége a p19 fehérje mennyiségéhez viszonyítva közel azonos a TBSV-P-vel és a TBSV-P+DI RNS-sel együtt fertőzött növényi kivonatokban.

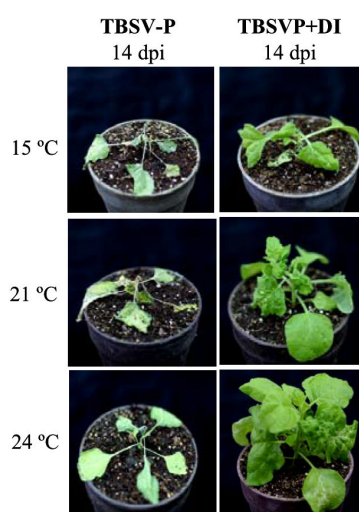
Mint ahogy várható volt, nem tudtunk kimutatni p19 fehérjét és hozzá kapcsolódó siRNS-t a T19stop-pal fertőzött növények kivonatából.

Eredményeink azt mutatják, hogy a DI RNS-sel történt együtt fertőzés esetében a képződött nagy mennyiségű siRNS telíti a p19 fehérjét, és szabad vírus specifikus siRNS-ek halmozódnak fel a növény szöveiben, hasonlóan, az RNS csendesítés szuppresszor mutáns vírussal fertőzött növények szisztémikus leveleiben felhalmozódó szabad vírus specifikus siRNS-ekhez.

4.4.4. A DI RNS nem képes a vírus felhalmozódást befolyásolni alacsony hőmérsékleten.

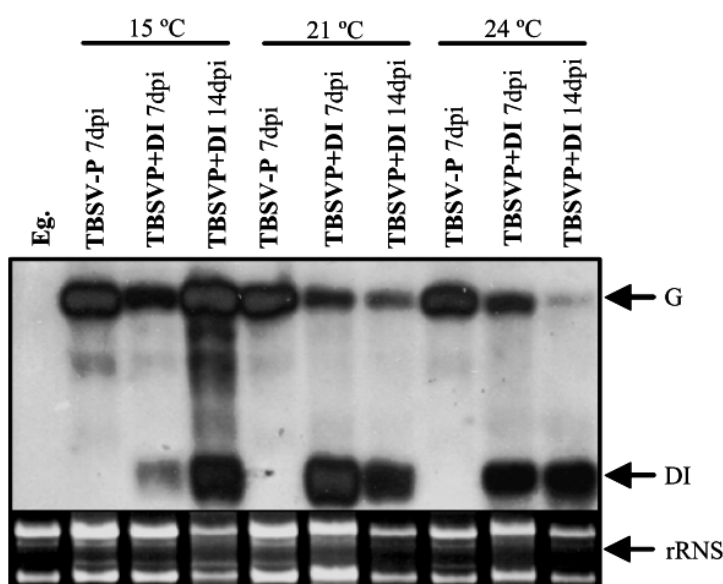
Korábbi munkákból kiderült, hogy az alacsony hőmérséklet (15 °C) erősen gátolja, a magasabb hőmérséklet (24 °C) viszont elősegíti a PTGS működését a növényekben (Szittya és mtsai., 2003). Ezek szerint ha a DI RNS a PTGS-en keresztül fejti ki hatását, akkor alacsony hőmérsékleten nem képes nagymértékben befolyásolni a vírusfertőzést, hiszen ott a PTGS kevésbé aktív. Feltételezésünk vizsgálatára *N. benthamiana* növényeket fertőztünk TBSV-P és TBSV-P+TBSV-P DI-5 RNS-sel. A növényeket 15, 21 és 24 °C-on tartottuk, majd 7 és 14 nappal a fertőzés után mintákat szedtünk a szisztémikus levelekből Northern blot analízishez és *in situ* hibridizációhoz.

A TBSV-P-vel fertőzött növények általános nekروزist mutattak minden vizsgált hőmérsékleten, ami a korábbi munkákból várható volt. A TBSV-P+DI RNS-sel együtt fertőzött növények azonban jelentős különbséget mutattak a kifejlődött tünetek tekintetében a vizsgált hőmérsékleteken (29. ábra).



29. ábra TBSV-P és TBSV-P+DI fertőzött növények tünetei 14 nappal a fertőzés után 15, 21 és 24 °C-on.

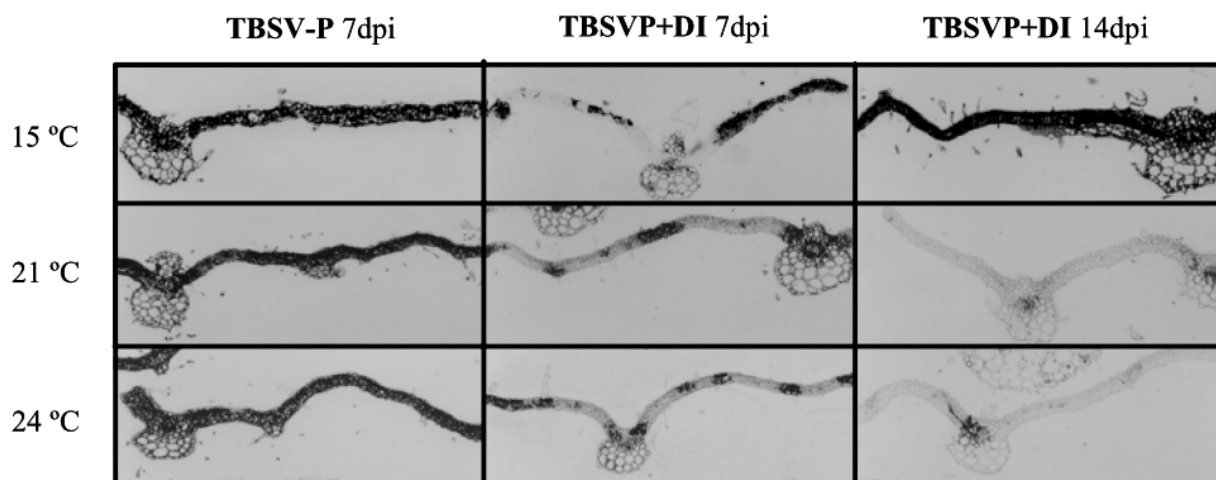
21 és 24°C-on a DI RNS jelenlétében a növényeken kigyógyuló fenotípus jelent meg. A legkifejezettebb recovery fenotípust 24 °C-on figyeltük meg. Ezzel ellentétben a 15 °C-on tartott TBSV-P+DI RNS-sel fertőzött növények esetében erős nekrotikus tünetek fejlődtek, melyeket legtöbb esetben a növények pusztulása követett, jelezve, hogy a DI RNS közvetített védelmi rendszer nem működik a növényben. A Northern blot analízis azt mutatja, hogy a DI RNS-sel együtt fertőzött növények szisztémikus leveleiben 7 nappal a fertőzés után csökken a genomi RNS szint mindhárom hőmérsékleten, bár kis különbség észrevehető a csökkenés mértékében (30. ábra).



30. ábra A hőmérséklet hatása a TBSV-P+DI RNS-sel együttfertőzött növényekre. TBSV-P-vel és TBSV-P+DI RNS-sel fertőzött növények Northern blot analízise. Próba: DI cDNS-ről készített random próba. A hőmérsékletek az ábra tetején feltüntetve. G–genomi RNS, sg–szubgenomi RNS, DI–DI RNS, rRNS–riboszómális RNS, Eg.–egészséges növény kontroll hibridizálása.

14 nappal a fertőzés után a genomi RNS felhalmozódásában jelentős különbségek figyelhetők meg. 15 °C-on a helper vírus mennyisége a DI RNS-sel együtt fertőzött és a vad típusú vírussal fertőzött növényekben közel azonos mértékű. 21 °C-on jelentősen kevesebb genomi RNS látható a DI RNS-t tartalmazó növényekben, míg 24 °C-on a vírus alig mutatható ki a szisztémikus levelekből. A DI RNS-ek minden hőmérsékleten és minden időpontban nagy mennyiségben halmozódtak fel.

Az *in situ* hibridizációs kísérletek azt mutatták, hogy a genomi RNS szint összhangban van a vírus elterjedésének mértékével (31. ábra).



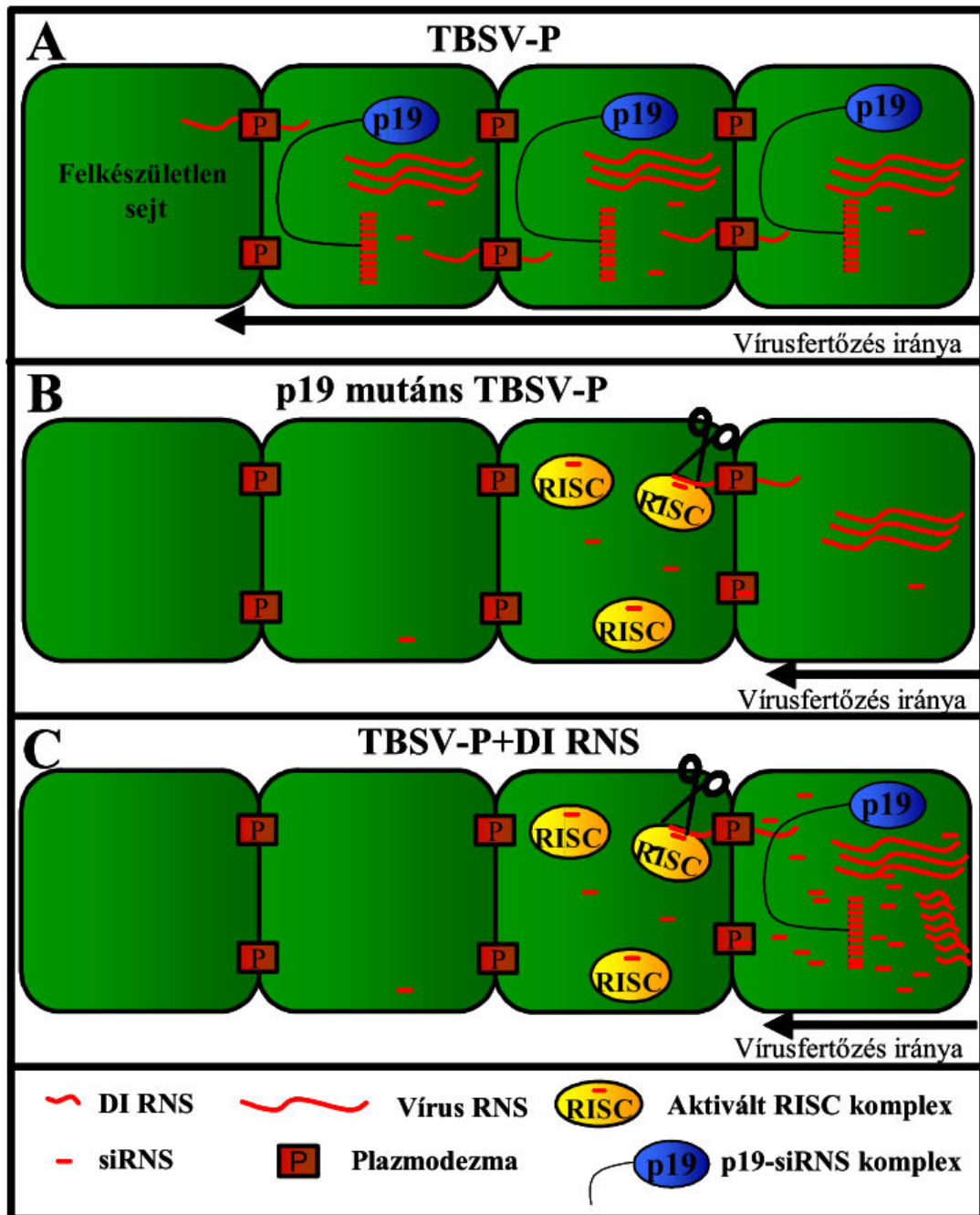
31. ábra A TBSV-P vírus genomi RNS-ének térbeli elterjedése 7 és 14 nappal a fertőzés után a szisztemikus levelekben különböző hőmérsékleteken. Próba: a vírus CP régióját kimutató negatív szálú digoxigenin-11-UTP-vel jelölt RNS.

Próbaként a vírus CP-t kódoló RNS régiójához hibridizáló RNS próbát használtunk. A TBSV-P a vizsgált hőmérsékleteken képes volt az egész szisztemikus levélben elterjedni. A TBSV-P+DI RNS-sel együtt fertőzött növények szisztemikus leveleiben a vírus elterjedése az erekre és azok környezetére korlátozódott. A fertőzés előrehaladtával (14 dpi) 15 °C-on a vírus azonban képes volt a szisztemikus levelekben kilépni az erekből, onnan kiindulva pedig az egész levéllemezben elterjedni. Ez az elterjedési mintázat nagymértékben hasonlít a p19 mutáns CymRSV vírus (Cym19stop) hőmérséklet függő inváziójára (Szittyá és mtsai., 2003). 21 és 24°C-on ezzel ellentétben a vírus elterjedése DI RNS jelenlétében az erek környezetére korlátozódott. Ezek az eredmények tovább erősítik a PTGS szerepét a DI RNS közvetített tünetcsökkenés kialakításában.

4.4.5. A DI RNS jelenléte és a p19 hiánya által okozott vírus akkumuláció gátlás modellje.

Kísérleteink alapján olyan modell felállítását javasoljuk, melyben a korábban azonosított faktorok mellett az RNS csendesítés is központi szerepet játszik a DI RNS közvetített tünetcsökkenés mechanizmusában (32. ábra). Ez alapján a vírussal fertőzött növényben, a vírus a sejtbe történő belépése után replikálódik, a transzlálódó p19 fehérje megköti a PTGS által létrehozott siRNS-eket, melyek így nem tudnak kijutni a fertőzött

sejtből. A vírus ezután egy olyan nem fertőzött sejtbe léphet be, amely nem készült fel a vírus inváziójára, nincs benne vírus specifikus siRNS, a vírus ebben a sejtben is nagymértékben szaporodhat kihasználva a gazdasejt replikációs és transzlációs rendszerét.



32. ábra Modell az RNS csendesítés szerepének bemutatására a DI RNS közvetített tünetcsökkenésben.

A p19 szuppresszor mutáns vírussal történő fertőzés esetén a mutáns vírus szintén nagymértékben képes replikálódni az elsődlegesen megfertőzött sejtekben. Az RNS csendesítés siRNS-eket hoz létre a vírusból, de a p19 fehérje hiánya miatt ezek a siRNS-ek szabad formában jelennek meg a sejtben. Ezek az RNS-ek képesek a plazmodezmákon

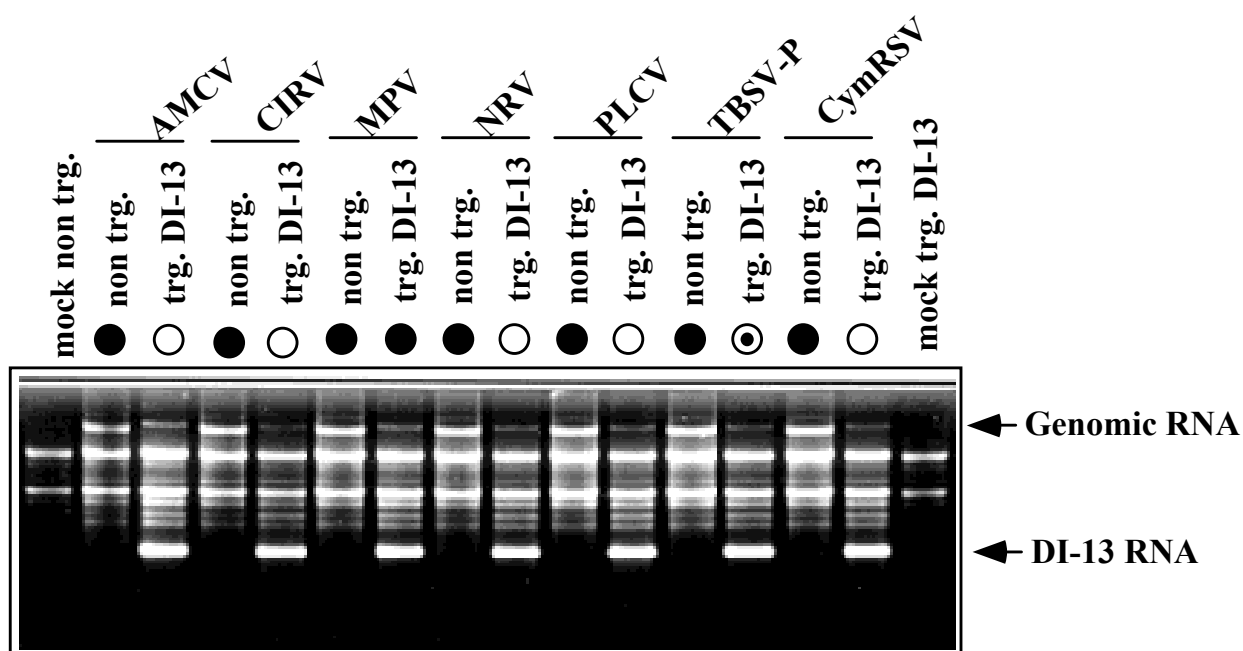
keresztül kijutni a fertőzött sejtől a vírus fertőzési frontja elé. Ez a vírus specifikus siRNS képes beépülni azokba a RISC komplexekbe, melyek a meg nem fertőzött sejtekben találhatóak, így „élesítve” azokat, szekvenciaspecifitást adva a degradációt végrehajtó molekuláknak. A belépő vírust az aktivált komplex lebontja, mielőtt elkezdődhetne a vírus replikációja. DI RNS jelenlétében a megfertőzött sejtekben jelentős mennyiségű vad típusú vírus RNS és p19 fehérje halmozódik fel. Mivel a DI RNS gyenge célpontja az RNS csendesítésnek (Szittyá és mtsai., 2002), nagy mennyiségben halmozódik fel a sejtben, és jelentős extra forrást biztosít a vírus eredetű siRNS-ek képzéséhez, túltelítve a p19 fehérje siRNS kötő kapacitását. A szabad siRNS-ek a p19 mutáns vírushoz hasonló folyamat révén elősegítik a vírus fertőzési frontja előtti sejtek felkészülését a vírus elleni védelemre. A korábban leírt DI RNS tünetváltoztatásával kapcsolatos kompetíciós elmélet (Russo és mtsai., 1994) tovább erősítheti a PTGS alapú védelmi rendszert, mivel a vírusfertőzés korai szakaszában kevesebb virális fehérje jelenlétét tételezi fel, ami elősegíti a védekező rendszer működését.

Modellünk működésének alapja, hogy feltételezi a siRNS-ek nem sejt autonóm aktivitását vagyis mobilitását a sejtek között. A szakirodalom legújabb eredményei alátámasztják ezeket az elképzeléseket (Dunoyer és mtsai., 2010 ; Molnar és mtsai., 2010).

4.4.6. A DI RNS-ek specifikus tünet módosító hatása

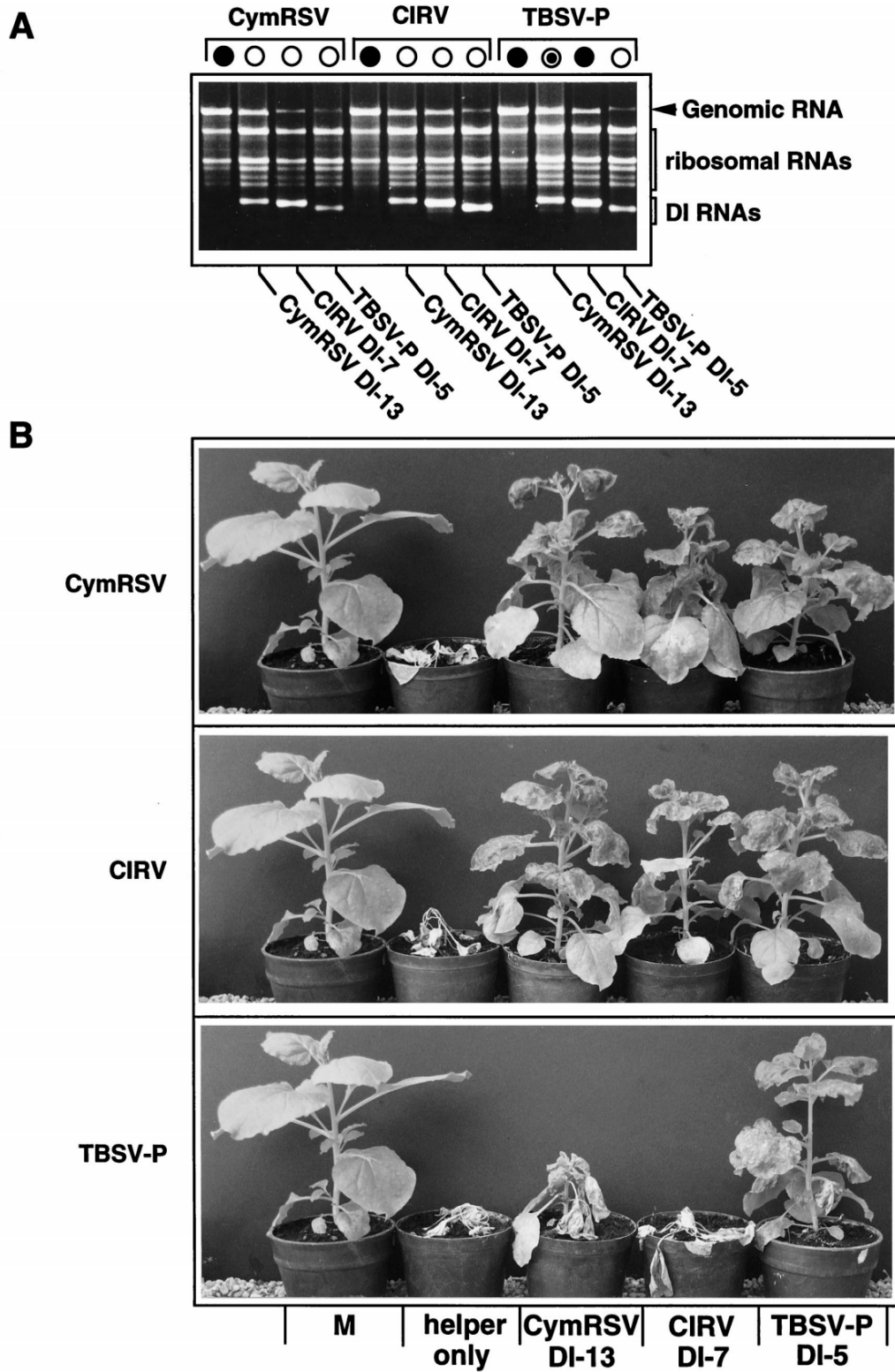
A DI RNS-ek tünet módosító hatásának jobb megértése céljából további vizsgálatokat végeztünk abból a célból, hogy megvizsgáljuk, vajon a CymRSV DI RNS védelmet biztosít-e más tombuvírusokkal szemben. A rendelkezésünkre álló 7 különböző tombusvírussal olyan transzgenikus növényeket fertőztünk, amelyek CymRSV biológiailag aktív DI RNS-ét fejezte ki (Kollar és mtsai., 1993) (33. ábra). A kísérlet során vizsgáltuk a DI RNS-ek replikációját és a kialakuló tüneteket. A vizsgálatba bevont Tombusvírusok közül csak kettő (Maroccan pepper virus (MPV) és TBSV-P) ellen nem mutattak rezisztenciát a DI RNS-t expresszáló transzgenikus növények annak ellenére, hogy ez a két vírus is hatékonyan amplifikálta a növény által expresszált DI RNS-t és a gazda vírus genomikus RNS-ének akkumulációja is visszaszorult. A többi vírus fertőzése esetén (Artichoke mottled crinkle virus (AMCV), Carnation Italian ringspot virus (CIRV), Pelargonium leaf curl virus (PLCV), Neckar river virus (NRV) a jellegzetes enyhe betegség tünetek fejlődtek ki. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a DI RNS-en alapuló rezisztencia nem csupán a gazda vírus akkumulációjának gátlásából fakad, hanem ehhez más vírus produktumokkal való specifikus kölcsönhatás is

csatlakozik. Ez a kölcsönhatás azonban specifikusabb mint, a vírus replikáció és csak a viszonylag közelebbi kapcsolatban álló vírusok között jön létre.



33. ábra. CymRSV-vel fertőzött DI-13 RNS-t expresszáló transzgenikus (trg.) és nemtranszgenikus növények RNS kivonatainak EtBr-al festett agaróz gelelektroforézises képe. A fekete ● nekrotikus, a fehér ○ gyengített tüneteket mutató növényt jelez.

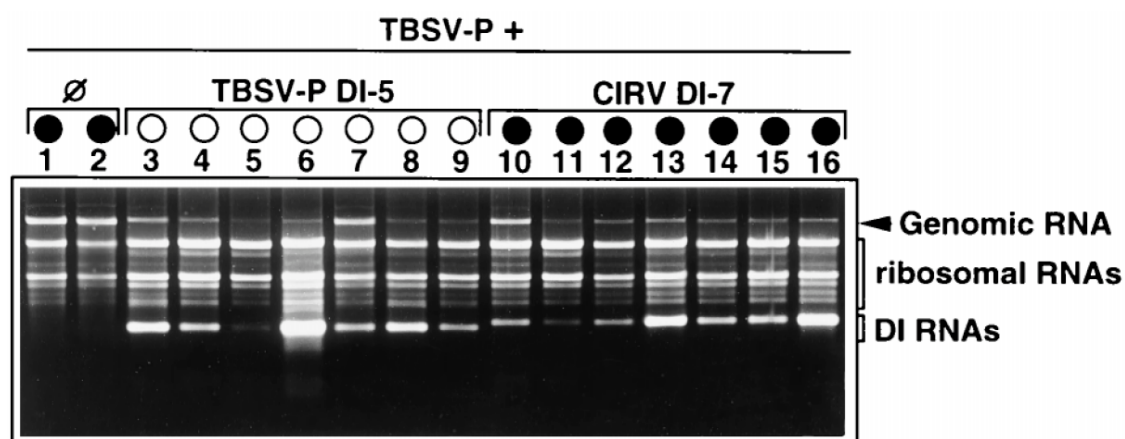
A DI RNS tünetgyengítő hatásának, illetve hatásmechanizmusának jobb megértése érdekében további vizsgálatokat végeztünk, vajon ha különböző gazda vírusokat (CymRSV, CIRV, TBSV-P) saját (homológ), vagy egy másik vírus DI RNS-ével (heterológ) együtt fertőzzük, megkapjuk-e minden esetben a védőhatást vagy sem. Mint az elvárható volt az előbbi eredményekből, mindhárom vírus replikálta mind a három DI RNS-t (34. ábra A). Mind a három DI képes volt arra, hogy védettséget biztosítson a CymRSV és a CIRV vírusokkal fertőzött növényben, azonban a TBSV-P okozta nekrosis ellen csak a saját homológ DI RNS-e volt képes megvédeni a növényeket (34 ábra B). Ez az eredmény ismételt arra utalt, hogy a DI RNS tünet módosító hatása nem csupán vírus akkumuláció visszaszorításán alapul.



34. ábra .CymRSV, CIRV, TBSV-P és homológ és heterológ DI RNS-ekkel fertőzött növények vizsgálata.

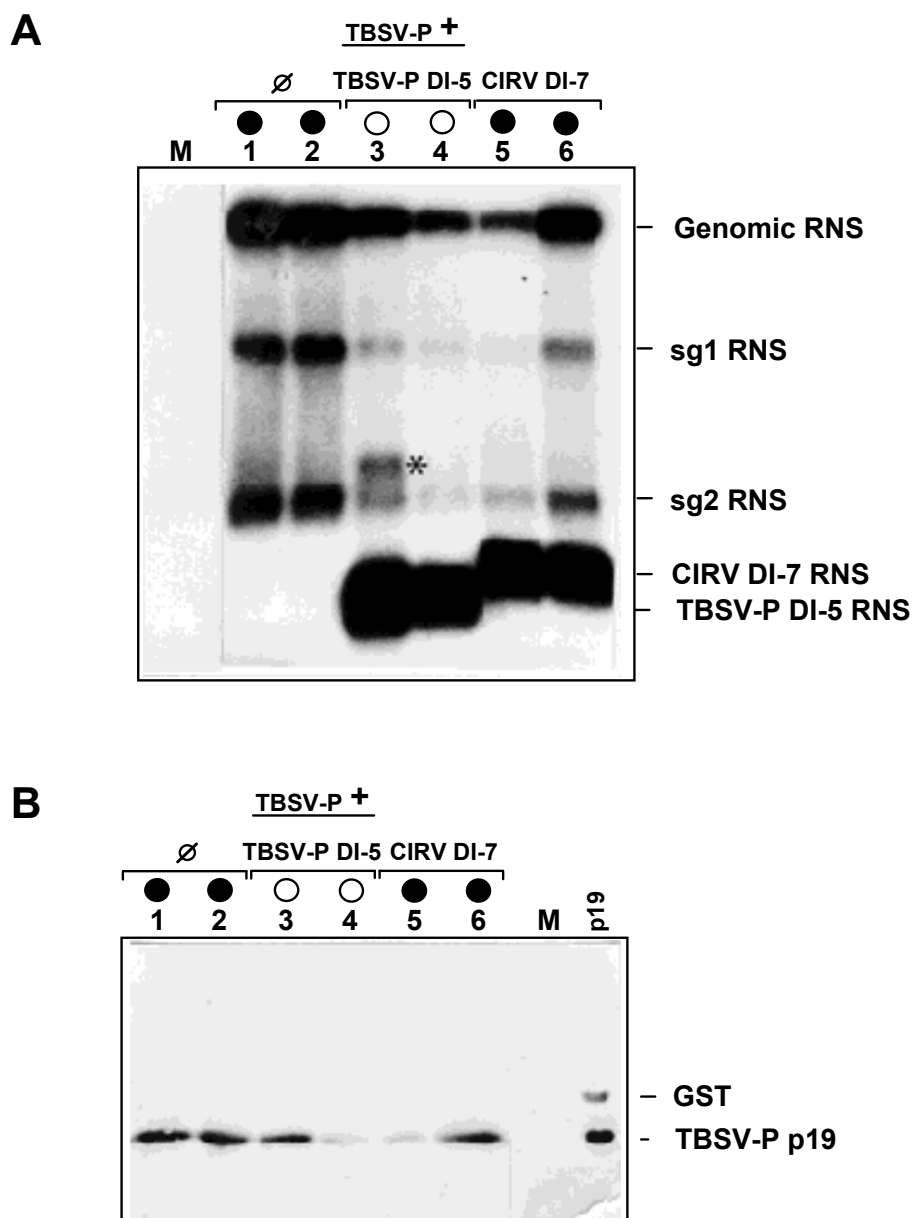
(A) RNS kivonatok. (B) Vírus és DI RNS-ek okozta tünetek. A fekete ● nekrotikus, a fehér ○ gyengített tüneteket mutató növényt jelez.

Mint azt már korábban láthattuk a vírus kódolta p19 fehérjének kulcs szerepe van a Tombusvírusok okozta nekrotikus tünetek kialakulásában. Egy másik kutatócsoport által végzett munka alapján valószínűsítették, hogy a TBSVDI RNS-e specifikusan gátolja a p19 expresszióját és ez magyarázza a nekrosis elmaradását TBSV fertőzött növényekben, ha a DI RNS is jelen van a (Scholthof és mtsai., 1995). Ahhoz, hogy saját kísérleti rendszerünkben is megvizsgáljuk ezt a kérdést, TBSV-P-vel együtt fertőztünk *N. benthamiana* növényeket homológ (TBSV-P DI-5) és heterológ (CIRV DI-7) DI RNS-ekkel. A homológ és heterológ DI RNS-ek hasonlóan replikálódtak a TBSV-P jelenlétében és bizonyos variabilitást mutatva, de mindkét DI RNS (TBSV-P DI-5 és CIRV DI-7) hasonló módon gátolta a gazda vírus genomikus RNS-ének felhalmozódását (35. ábra és 36. ábra A).



35. ábra. DI és genomikus RNS-ek felhalmozódása, valamint a tünetek alakulása TBSV-P és homológ (DI-5) vagy heterológ (DI-7) DI RNS együttfertőzése esetében. A fekete kör ● nekrotikus a fehér ○ gyengített tüneteket mutató növényt jelez.

A TBSV-P DI-5 jelenlétében minden esetben védettek voltak a növények, azonban a CIRV DI-5 jelenlétében minden esetben teljes mértékben nekrotizálódtak a növények. Amennyiben megvizsgáltuk ugyanezen növényekben a p19 fehérje szintjét, megállapíthattuk, hogy azokban a növényekben, ahol a DI RNS-ek csökkentették a genomikus RNS felhalmozódást ott kevesebb p19 fehérje volt jelen, de a növények nekrotizálódása nem mutatott közvetlen összefüggést a p19 fehérje mennyiségével (36. ábra B).

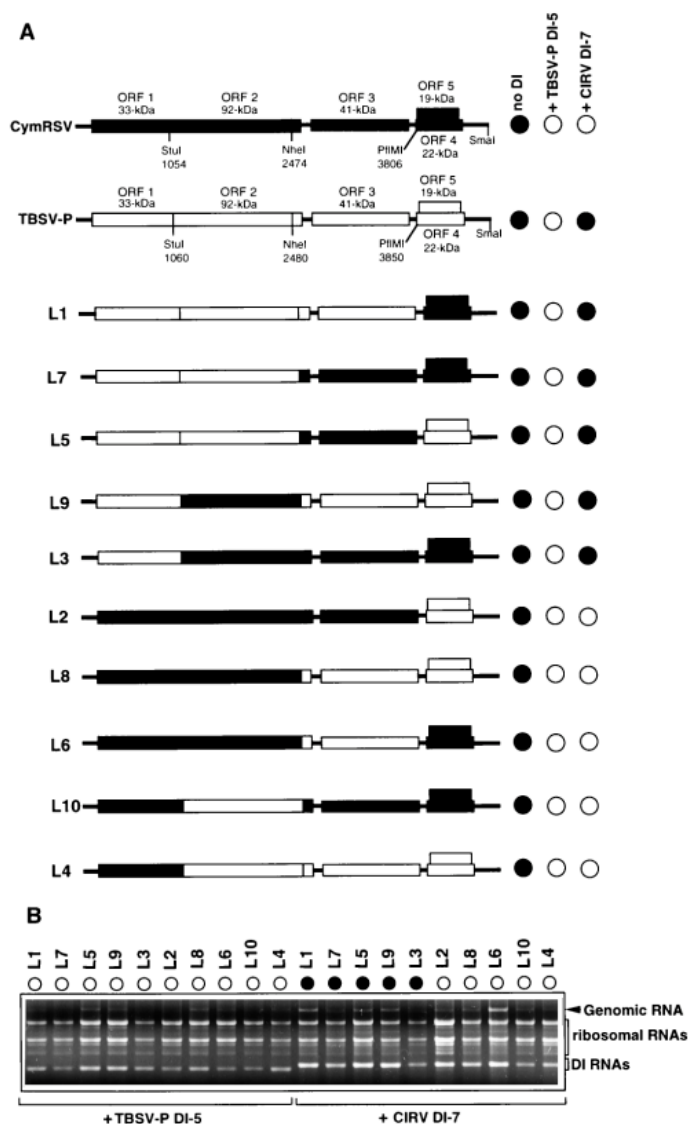


36. ábra. DI és genomikus RNS-ek felhalmozódása (A), valamint a p19 fehérje akkumulációjának Western analízise, TBSV-P és homológ (DI-5) vagy heterológ (DI-7) DI RNS együttfertőzése esetén. A fekete körök a nekrotizist a fehér körök a gyengített tüneteket jelzik. M, vírussal nem fertőzött növény fehérje kivonata; p19 baktériumban termelt CymRSV p19 fehérje, GST a termelt fúziós fehérje. * jelöli a TBSV-P DI-5 dimer formáját.

A CIRV DI-7 heterológ DI RNS esetében a TBSV-P minden esetben nekrotizálta a növényt függetlenül attól, hogy több vagy kevesebb p19 fehérjét tudtunk detektálni. Ezzel ellentétben a TBSV-P DI-5 mindenesetben megvédte a növényeket még akkor is, ha viszonylag nagyobb mennyiségű p19 fehérje halmozódott fel. Ezek az eredményeinkarra utalnak, hogy a DI RNS-ek a védő hatásukat nem elsősorban a p19 fehérje specifikus gátlásával érik el.

4.4.7. A tünet befolyásolásért felelős régió lokalizálása a vírus genomikus RNS-én.

A következőekben azt vizsgáltuk meg, hogy vajon azonosíthatunk egy régiót a vírus genomikus RNS-én amely felelős a különböző DI RNS-ek jelenlétéhez köthető eltérő tünet kialakulásért. A kérdés eldöntéshez olyan CymRSV/TBSV-P kiméra vírusokat hoztunk létre ahol az egyes nyitott leolvasási kereteket felcseréltük (37. ábra) ahogy ezt előzőleg már leírták (Burgyan és mtsai., 1996).



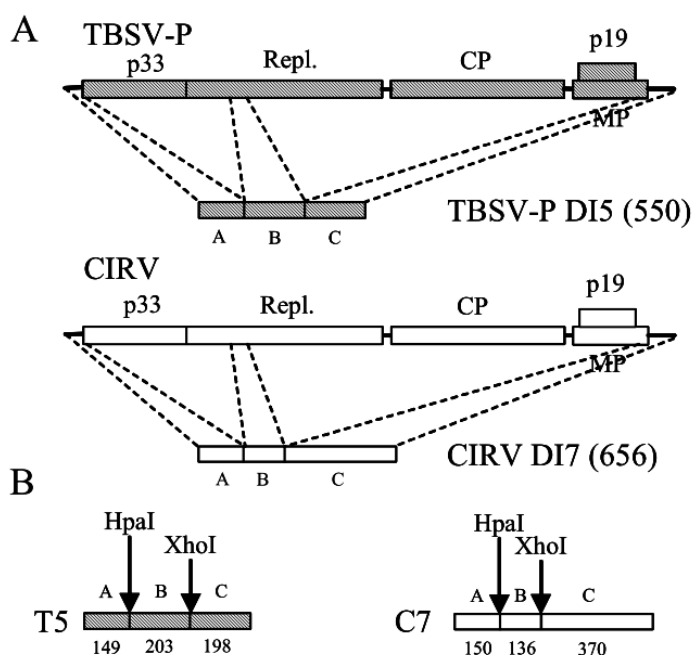
37. ábra Vírus RNS felhalmozódás és tünet kialakulás CIRV/TBSV-P kimérák fertőzött *N. benthamiana* növényeken TBSV-P DI-5 illetve CIRV DI-7 jelenlétében. (A) Az egyes kimérák fertőzése során kialakuló tünetek TBSV-P DI-5 illetve CIRV DI-7 jelenlétében. ● és ○ szimbólumok a csúcsnekrozis kialakulását, vagy elmaradását jelképezik. (B) A kimérák genomikus RNS-ének felhalmozódása a fertőzések során.

Mivel a CIRV DI-7 jelenléte képes volt megvédeni a CymRSV de a TBSV-P fertőzött növényeket nem, ezért reméltük, hogy ezen kimérák felhasználásával azonosíthatjuk a tünet módosításért felelős genomi régiót.

Eredményeink megmutatták, hogy azok a kimérák amelyek a TBSV-P 5' nem kódoló régióját és az első ORF-ét tartalmazták CIRV DI-7 jelenlétében a növények nekروزisát okozták. A genomikus RNS-ek akkumulációja bizonyos szórást mutatott azonban nem volt közvetlen összefüggés kimutatható a nekروزis és genomikus RNS felhalmozódási szintje között. Ezen eredmények szerint a vírus 5' vége meghatározó szerepet játszik abban, hogy egy meghatározott DI RNS védő illetve nem védő funkciót tölt be a fertőzésben.

4.4.8. A tünet befolyásolásért felelős régió lokalizálása a DI RNS-en.

TBSV-P vírust és védő illetve nem-védő DI RNS-t felhasználva lehetőség nyílik a védőhatás térképezésére (elsődleges szerkezethez való rendelésre) a DI RNS-en belül. Ha TBSV-P vírussal együtt fertőzve TBSV-P DI-5 DI RNS-t használtuk fel védő DI-ként, a növényeken tünetcsökkenés tapasztalható, túléljük a fertőzést. TBSV-P és CIRV DI-7 együtt fertőzésekor a növények csúcsnekروزist szenvednek, végül az egész növény elpusztul, vagyis a CIRV DI-7 nem-védő DI RNS-ként viselkedik. Annak megállapítására, hogy az eltérő tünetfejlődésért a DI RNS mely része felelős, kimérákat hoztunk létre a TBSV-P DI-5 és CIRV DI-7 RNS-esekből. A kimérák készítését lehetővé teszi a DI RNS-ek szekvenciájának és felépítésének nagyfokú hasonlósága. A blokkok, mint származási egységek cseréjéhez in vitro mutagenézis segítségével restriktációs endonukleáz hasítóhelyeket építettünk be a blokkok határszekvenciájára mindkét DI RNS-be (38. ábra).



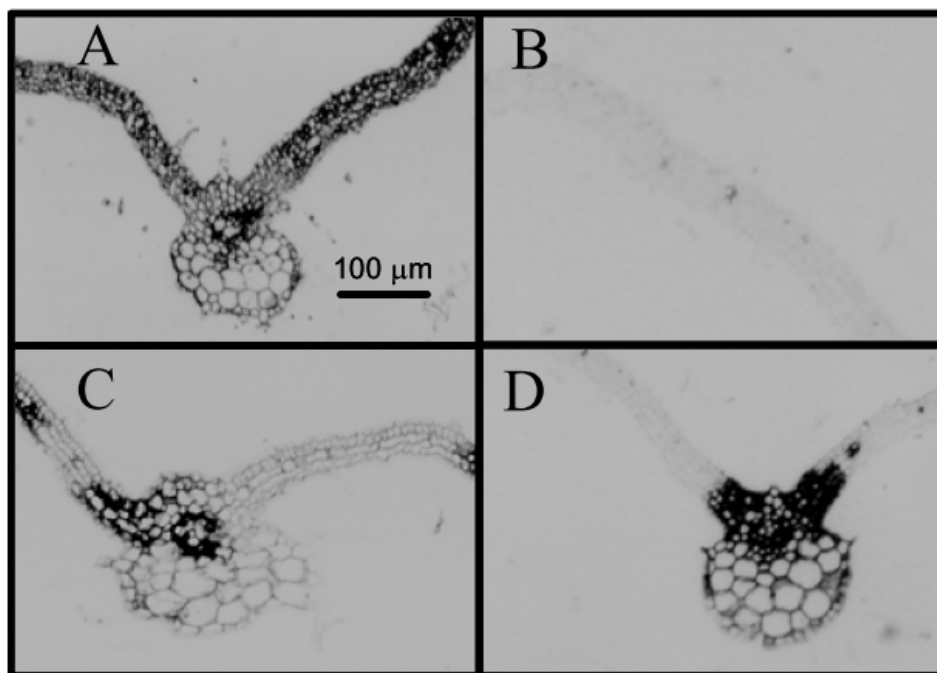
38. ábra A kiindulási DI RNS-ek eredete és szerkezete (A) A gazda vírusok genomszerveződése és DI RNS-eik eredete. (B) *In vitro* mutagenézissel beépített hasítóhelyek elhelyezkedése a DI RNS-ekben.

Az A és B blokk közé HpaI, a B és C blokk határára pedig XhoI hasítóhelyet építettünk. A restrikciós endonukleáz hasítóhelyek beépítésével jöttek létre a TBSV-P DI-5 (T5) és CIRV DI-7 (C7) mutagenizált változatai. A hasítóhelyeket felhasználva kicseréltük a DI RNS-ek blokkjait. A TBSV-P és a mutáns, vagy kiméra DI RNS-ek *in vitro* transzkriptumait használtuk fel *N. benthamiana* növények fertőzéséhez. A T5 és C7 DI-ok hasonló fertőzési képet okoztak, mint a szülői DI RNS-eik, azaz a T5 védő DI-ként működött, megakadályozta a csúcsnekrózist, míg a C7 DI RNS jelenlétében a növények csúcsnekrózist szenvedtek, majd elpusztultak.

4.4.9. A vírus elterjedése a szisztémikus levelekben védő és nem-védő DI RNS-ek jelenlétében.

A DI RNS-ek védő és nem-védő hatásának oka lehet a vírus és DI RNS-ek szisztémikus levelekben történő különböző elterjedése. Ennek vizsgálatára *in situ* hibridizációs kísérleteket végeztünk 5 nappal a fertőzés után beágyazott szisztémikus levelekkel. A fertőzést 21 °C-on végeztük TBSV-P, T5 és C7 *in vitro* transzkriptum felhasználásával. A vírus detektálására vírus specifikus RNS próbát használtunk, mely a vírus köpenyfehérjét kódoló régiójához hibridizál, vagyis a DI RNS-t nem ismeri fel. A TBSV-P vírussal fertőzött növény

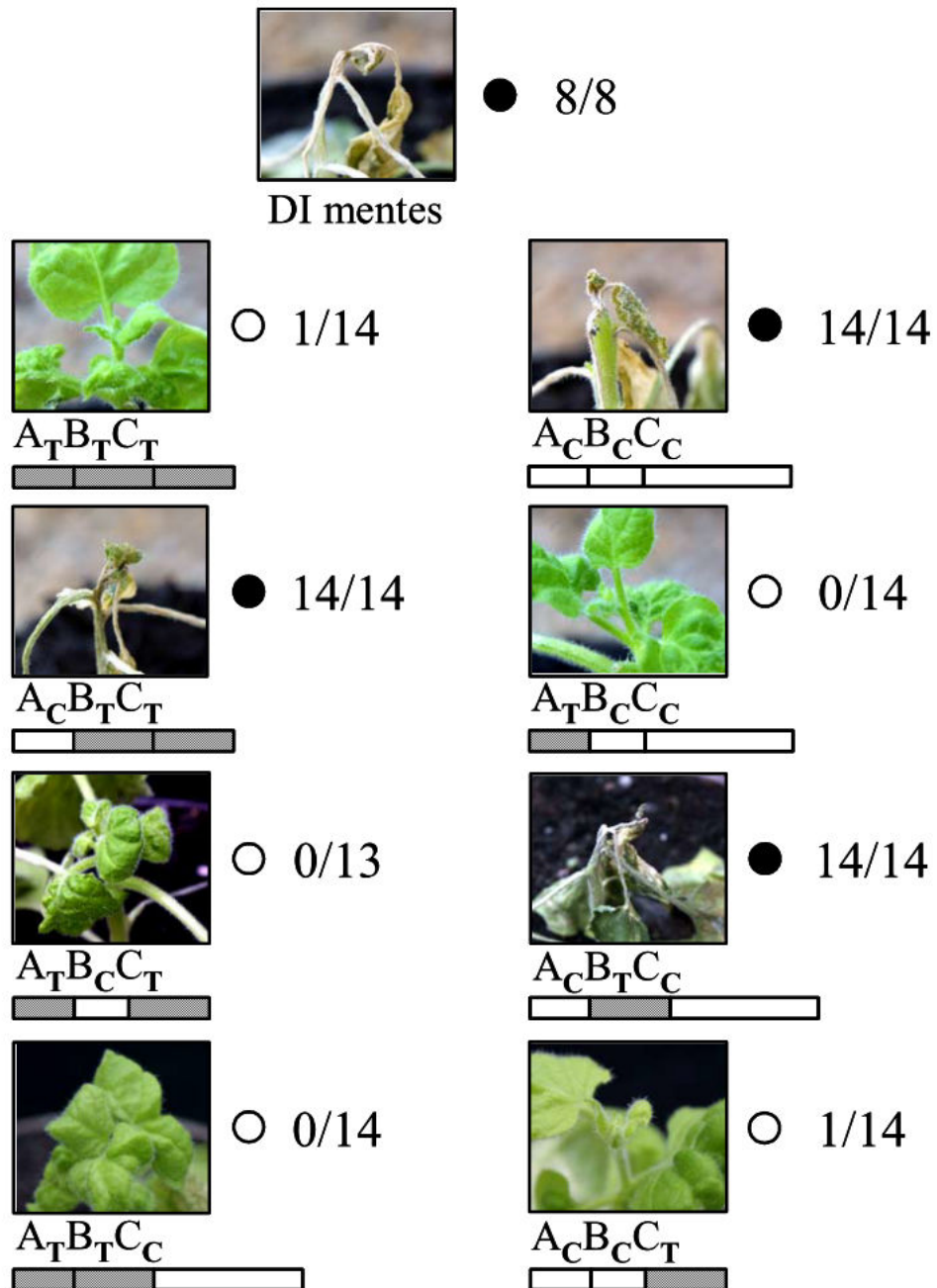
szisztémikus leveleiben a vírus nagy mennyiségben replikálódott, az egész levéllemezben szétterjedt, hasonlóan a korábbi eredményekhez (39. ábra). Ha a fertőzéskor DI RNS is jelen volt, akkor a vírus nem volt képes a szisztémikus levelekben elterjedni, megjelenése az erekre és azok környezetére korlátozódott. Azokban a sejtekben azonban, ahol jelen volt, jól replikálódott. A csökkent mértékű vírus elterjedést nem befolyásolta a DI RNS védő, vagy nem-védő tulajdonsága, vagyis nem a vírus térben korlátozott elterjedése felelős a csúcsnekrózis kialakulásáért.



39. ábra A fertőzés után 5 nappal beágyazott levelek *in situ* hibridizációja. (A) TBSV-P-vel fertőzött szövet. (B) Egészséges szövet kontroll hibridizációja. (C) TBSV-P+T5 RNS-sel fertőzött szövet. (D) TBSV-P+C7 RNS-sel fertőzött szövet. Próba: a vírus CP régióját kimutató jelölt RNS. Méretjelző vonal az A képen 100 μm (A-D).

4.4.10. Kiméra DI RNS-ek hatása a tünetek kifejlődésére.

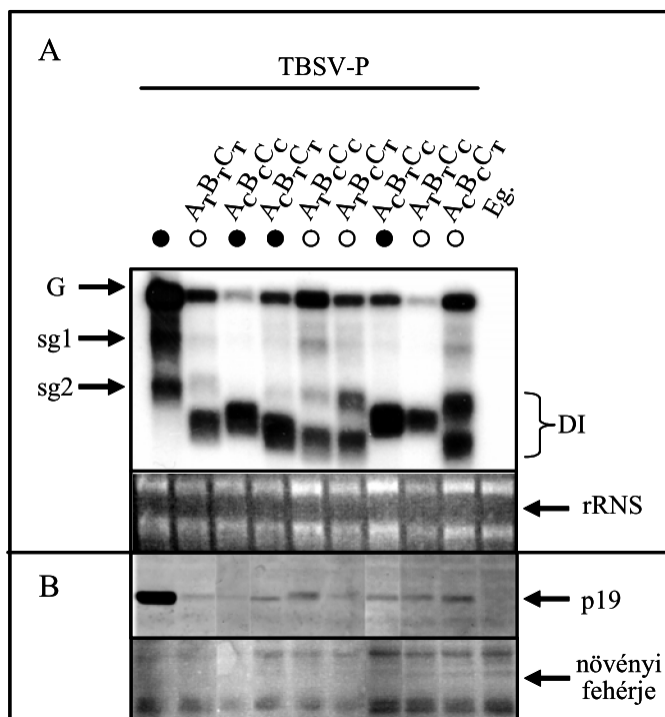
Két független kísérletben 14 dohánynövényt fertőztünk TBSV-P és a kiméra DI RNS konstrukciók *in vitro* RNS transzkriptumával 21 °C-on. A szisztémikus levelekből 5 nappal a fertőzés után össznukleinsavat vontunk ki, majd 12 nappal a fertőzés után készítettünk képet a kifejlődött tünetekről. (40. ábra).



40. ábra A kiméra DI RNS-ek szerkezete és a növényeken fejlődött tünetek. A ● és ○ szimbólumok a csúcsnekrózis kialakulását, vagy elmaradását jelképezik. A képek melletti számok a csúcsnekrózist szenvedett növények/összes inokulált növény arányát mutatják.

A kiméra DIRNS-ek biológiailag aktívak voltak és nagy mennyiségben halmozódtak fel a növény szöveteiben. Az eltérő „A” blokkot tartalmazó kimérák megváltoztatták fertőzési tulajdonságaikat. Az a kiméra, mely a T5 DI ($A_T B_T C_T$) „A” blokkját tartalmazta ($A_T B_C C_C$) tünetcsökkenést idézett elő a fertőzött növényben, míg a C7 DI ($A_C B_C C_C$) „A” blokkját

tartalmazó kiméra ($A_C B_T C_T$) jelenléte nem tudta megakadályozni a csúcsnekrózist. Ez az eredmény arra mutat rá, hogy a DI RNS „A” blokkja kiemelt szerepet játszik a tünetek kifejlődésének módosításában. A „B” blokk cseréje a védő és nem-védő DI RNS-ek között semleges hatású volt. A kimérák megtartották a szülői DI RNS-re jellemző tünetfejlődést. Az $A_T B_C C_T$ kiméra jelenlétében a tünetek erősségének csökkenése következett be, míg az $A_C B_T C_C$ kiméra nem tudta megakadályozni a csúcsnekrózist, majd a növény teljes pusztulását. A DI RNS „C” blokk szerepének vizsgálatára kicseréltük a T5 és C7 DI-ok „C” blokkjait. Nem várt eredményként azt tapasztaltuk, hogy az $A_C B_C C_T$ és $A_T B_T C_C$ kiméra DI RNS-ek jelenlétében történt fertőzés egyaránt jellegzetes tünetcsökkenést mutat a vad típusú fertőzés tüneteivel képest. Egyik esetben sem tapasztaltunk csúcsnekrózist. Ez az eredmény meglepő, hiszen azok az eddig vizsgált kimérák, melyek a C7 DI „A” blokkját tartalmazták, nem tudták megakadályozni a növény csúcsnekrózist és elpusztulását. Ezek után megvizsgáltuk a növények szisztémikus leveleiben felhalmozódott vírus és DI RNS-ek, valamint a p19 fehérje mennyiségét, hogy könnyebben értelmezhesük a kiméra DI RNS-ek jelenlétében kifejlődött tüneteket. Öt nappal a fertőzés után a szisztémikus levelekből mintákat szedtünk és össznukleinsav kivonáshoz homogenizáltuk a szöveteket. A homogenizátumot két részre osztottuk, egyik részéből össznukleinsavat vontunk ki és Northern blot-ot készítettünk belőle, másik részét pedig Western blot készítéshez használtuk fel. Így a növényekből kivont RNS és p19 fehérje mennyisége összehasonlítható a mintákban. A Northern blot analízis azt mutatta, hogy az összes kiméra jól replikálódott a helper vírus segítségével, és jelentős mértékben csökkent a genomi RNS szint a növényekben a TBSV-P-vel történt fertőzéshez képest (41 ábra A).



41. ábra TBSV-P és TBSV-P+DI RNS-ekkel inokulált növények Northern és Western blot analízise. (A) Vírus RNS-ek kimutatása a fertőzött növényekből. A fertőzéshez használt kimérák a kép felett láthatók. G–genomi RNS, sg–szubgenomi RNS, DI–DI RNS-ek, Eg.–egészséges növény kontroll hibridizációja. **(B)** p19 fehérje kimutatása a fertőzött növényekből. A minták sorrendje megegyezik az A ábrán láthatóval.

Nem sikerült kimutatni közvetlen összefüggést a vírus RNS felhalmozódási szintje és a csúcsnekrózis kialakulása között. Például a $A_C B_T C_C$ kiméra jelenlétében jelentős mértékben visszacsorult a helper vírus mennyisége, a növények azonban csúcsnekrózist szenvedtek. A $A_A T B_C C_C$ kimérával történt együtt fertőzéskor a vírus viszonylag nagy mennyiségben jelen volt a növény szöveteiben, mégsem történt csúcsnekrózis, a növény jellegzetes, DI RNS jelenlétére jellemző fenotípust mutatott. A fertőzéskor nem csak a fertőzéshez felhasznált DI RNS jelenhet meg a növényben, hanem *de novo* keletkezett DI RNS-ek is befolyásolhatják a tünetek kifejlődését. Ennek kizárására reverz transzkriptáz-polimeráz láncreakciót (RT-PCR) végeztünk a növényekből kivont össznukleinsav kivonatokból. Az amplifikált DI RNS-ek eredetét méret, restrikciós endonuklázal történt hasítás és szekvencia analízis segítségével azonosítottuk (nincs bemutatva). Megállapítottuk, hogy a teszt növényekben csak a fertőzéshez használt kiméra DI RNS volt jelen, a gazda vírus genomjáról *de novo* keletkezett DI RNS-ek nem befolyásolták a tünetek kifejlődését. Korábbi munkákból kiderült, hogy a tombusvírusok p19 fehérjéje fontos szerepet játszik a vírusfertőzött növény tüneteinek kifejlődésében és a nekrotikus válaszreakció kialakításában. Laboratóriumunkban végzett kísérletek azt bizonyították, hogy a p19 fehérje közel azonos

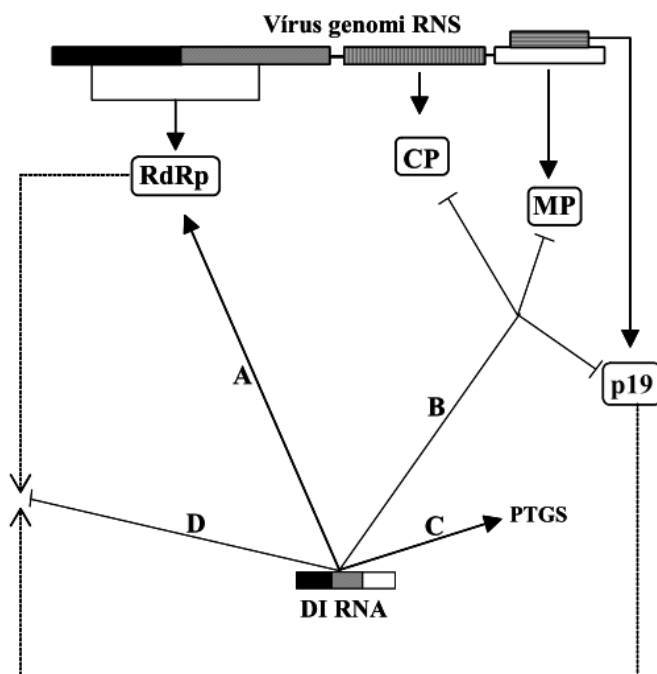
mértékben halmozódik fel a növény szöveteiben védő és nem-védő DI RNS jelenlétében. A kiméra DI RNS-ek jelenlétében is megvizsgáltuk a p19 fehérje felhalmozódásának mértékét (41. ábra B). A DI RNS-sel történt együtt fertőzés esetén a p19 fehérje mennyisége jelentős mértékben csökkent a vad típusú vírussal fertőzött növények p19 fehérje szintjéhez képest. A Western blot eredmények azt igazolták, hogy nincs összefüggés a kiméra DI RNS-ekkel fertőzött növények p19 fehérje szintje és a csúcsnekrozis kialakulása között.

Kiméra DI RNS-ek segítségével sikerült rámutatnunk arra, hogy a tünetek kialakításában a legfontosabb faktor a DI RNS „A” blokkja. Ezt az eredményt alátámasztja az is, hogy a szülői DI RNS-ek között szekvencia szinten a legkisebb hasonlóság ebben a blokkban van. Az $A_C B_C C_T$ védő jellege viszont arra utal, hogy a DI RNS szekvenciájának más része képes befolyásolni az A blokk hatását. Eredményeink azt jelzik, hogy nem az „A” blokk elsődleges szerkezete felelős közvetlenül a DI RNS-ek tünetmódosító hatásáért, hanem valószínűleg e régió specifikus másodlagos szerkezete játszik döntő szerepet a tünetek kialakításában. A másodlagos szerkezet kialakítását befolyásolhatja a DI RNS komplex másodlagos szerkezete, ami a DI RNS-t felépítő blokkok szekvenciájától függ. A nekrotikus tünetek kialakulásához a p19 és p33 fehérje közvetett, vagy közvetlen kölcsönhatása szükséges (Burgyan és mtsai., 2000), a DI RNS a komplex másodlagos szerkezete révén befolyásolhatja ezt a feltételezett kölcsönhatást, meggátolhatja a csúcsnekrozist, vagy indifferens.

4.4.11. A DI RNS-ek tünet csökkentő hatásában szerepet játszó faktorok összefoglalása.

Korábbi munkákat és a kísérleteinket alapul véve a 42. ábrán látható modellt vázolhatjuk fel a DI RNS-ek tünetmódosító hatásának összefoglalására. A legszélesebb körben elfogadott nézet szerint a DI RNS-ek, mint szubvirális molekulák, tünetmódosító hatásukat úgy érik el, hogy a replikációjukhoz szükséges limitált cisz- és transz faktorokért (pl. RdRp) versengve a gazda vírussal csökkentik azok relatív mennyiségét a növényben (A). Kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy a replikációs komplexért történő versengés valóban kissé lelassítja a vírus genomikus RNS-ének felhalmozódást azonban ez a hatás csak időleges és nem elsődleges oka a gátolt vírus akkumulációnak. TBSV-vel fertőzött növényekkel végzett kísérletek azt mutatták, hogy a DI RNS képes szelektíven gátolni a szubgenomikus RNS-ek szintézisét (Jones és mtsai., 1990), ezáltal a sgRNS-eken kódolt fehérjék relatív mennyiségét (B). Ebben az esetben a virális genomi RNS és a róla transzlálódó RdRp mennyisége kevésbé drámai módon csökken (Scholthof és mtsai., 1995d). A mi adataink nem támasztották alá ennek a jelenségnek a drasztikus hatását, de lehetséges, hogy a fertőzés kezdeti stádiumában

ennek a jelenségnek is van hatása a DI RNS módosította tünetek kialakulására. A vírus és a DI RNS kiválthatja a az RNS csenedesítés (PTGS; post-transcriptional gene silencing) bekapcsolódását, mely



42. ábra Feltételezett faktorok, melyek befolyásolják a DI RNS tünetmódosító hatását. A tombusvírus genomi RNS sematikus ábrázolása, a transzlálódó fehérjék: RdRp–RNS függő RNS polimeráz; CP–köpenyfehérje; MP–rövidtávú mozgásért felelős fehérje; p19– RNS csenedesítés (PTGS) szuppresszor fehérje. A szaggatott vonal feltételezett vírus fehérjék közti kölcsönhatást jelképez.

megpróbálja csökkenteni a patogén mennyiségét a megfertőzött sejtekben és felkészül a szisztemikus RNS csenedesítés révén a vírus elterjedésére. A DI RNS-ek hatékonyan kiváltják a PTGS bekapcsolódását, nagy mennyiségben képződik róluk vírus specifikus siRNA, de rossz célpontjai a PTGS-nek (Szittyá és mtsai., 2002). Eredményeink azt igazolták, hogy a DI RNS-ről képződő nagy mennyiségű siRNA mintegy „tölti” a p19 fehérjét, így szabad siRNA-ek jelennek meg a növényben, amelyek elősegítik a nem fertőzött sejtek felkészülését a vírus inváziójára (C). A vírusfehérjék (p19, p33) között közvetett, vagy közvetlen fehérje-fehérje kapcsolat révén nekrotikus tünetek fejlődnek a növényeken (Burgyan és mtsai., 2000) ezt a kapcsolatot a DI RNS jelenlétével megakadályozhatja. A védő DI RNS-ek képesek megakadályozni ezt a kölcsönhatást, míg a nem-védő DI RNS-ek nem, habár nagy mennyiségben szaporodnak fel a növényben, nem tudják megakadályozni a fertőzött növények pusztulását.

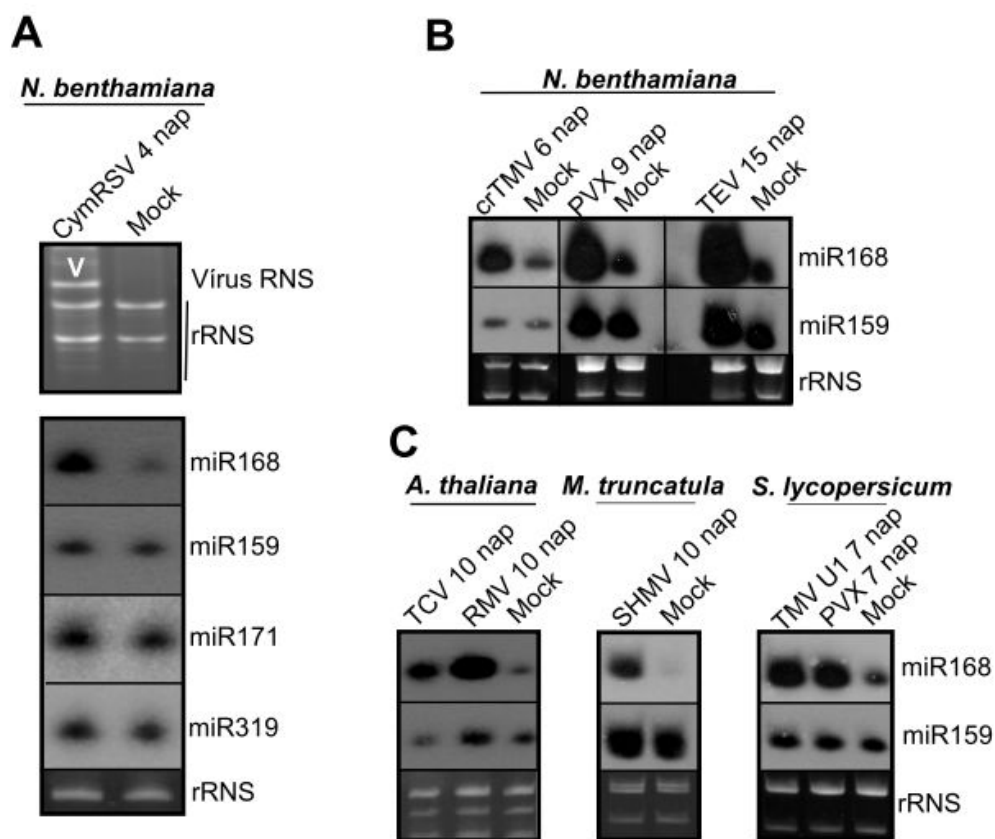
4.5. A miR168 szerepe a vírus fertőzött növényekben.

A miRNS és siRNS alapú RNS csendesítés központi végrehajtó komplexének kulcsmolekulája az AGO1 fehérje. Az AGO1 fehérjét kódoló mRNS maga is egy mikro RNS, a miR168, szabályozása alatt áll (Rhoades és mtsai., 2002; Vaucheret és mtsai., 2004). Ennek a mikro RNS-enek a felismerő helye az *AGO1* mRNS 5' részén, de már a kódoló régióban található. Előző munkák megmutatták, hogy a MIR168 és az AGO1 génnek transzkripcionálisan együtt szabályozódnak és a AGO1 fehérje képes poszt-transzkripcionális szinten stabilizálni a miR168-at (Vaucheret és mtsai., 2006). A legújabb eredmények szerint AGO1 eredetű siRNS-ek is szerepet játszhatnak a az AGO1 gén poszttranszkripcionális szabályozásában (Vaucheret, 2009). Az AGO1 fehérjének expressziója tehát rendkívül finom és visszacsatolásokon alapuló szabályozási hálózat által vezérelt. Affinitási eljárással tisztított AGO1 fehérje vizsgálata kimutatta, hogy ez a fehérje képes miRNS-eket megkötni és a miRNS-nek megfelelő cél mRNS hasítását előidézni (Baumberger és Baulcombe, 2005; Qi és mtsai., 2005; Mi és mtsai., 2008). Az AGO1 fehérje azonban vírus eredetű siRNS-eket is képes kötni és ezen keresztül részt vesz az RNS csendesítés alapú növényi védekező rendszer működésében (Zhang és mtsai., 2006). Ezt a szerepét tovább erősítették azok a megfigyelések, amelyek leírták, hogy a CymRSV eredetű siRNS-ek és az endogén miRNS-ek együtt frakcionálódnak egy, az AGO1 fehérjét tartalmazó, fehérje (feltehetően a RISC) komplexszel (Csorba és mtsai., 2007; Pantaleo és mtsai., 2007). A CMV 2b RNS csendesítés gátló fehérjéje úgy működik, hogy közvetlenül kapcsolódik a siRNS-el töltött AGO1 fehérjével és gátolja annak hasítási aktivitást (Zhang és mtsai., 2006). A poleovírusok P0 RNS csendesítés gátló fehérjéje pedig az AGO1 fehérje célzott lebomlást idézi elő (Csorba és mtsai., ; Pazhouhandeh és mtsai., 2006; Baumberger és mtsai., 2007; Bortolamiol és mtsai., 2007). Ezek az eredmények és az tény, hogy *ago1* hipomorf mutánsok fokozott fogékonyságot mutattak egyes vírusokkal szemben (Morel és mtsai., 2002) rámutattak arra, hogy az AGO1 fehérjének fontos szerepe van a növény vírusokkal szembeni védekezési mechanizmusában. A *ago1* hipomorf mutánsok szintén fokozott fogékonyságot mutattak a fertőzés során egy TCV köpenyfehérje mutáns vírussal szemben (ez a mutáns nem mutat RNS csendesítést gátló aktivitást) (Qu és mtsai., 2008). A növényi vírusok fertőzése gyakran együtt jár az endogén miRNS-ek szintjében történő változásokkal (Bazzini és mtsai., 2007; Csorba és mtsai., 2007). Kimutatták, hogy a miRNS és a cél mRNS szintjében történő változásokért a növényi vírusok által kódolt RNS csendesítést gátló fehérjék felelősek elsősorban (Kasschau és mtsai., 2003; Dunoyer és mtsai., 2004; Zhang és mtsai., 2006). Vírus fertőzött növények vizsgálata kimutatta, hogy a

miR168 és a *AGO1* mRNS kifejeződése együttesen indukálódik (Zhang és mtsai., 2006; Csorba és mtsai., 2007; Havelda és mtsai., 2008).

4.5.1. A miR168 indukciója általános jelenség a növény-vírus interakciókban.

A jól karakterizált *N. benthamiana*-CymRSV rendszert felhasználva megvizsgáltuk a miR168 és más endogén miRNS-ek felhalmozódását. Négy nappal a fertőzés után más endogén miRNS-ekkel összehasonlítva miR168 indukciót tapasztalhatunk (43. ábra A). Ez az eredmény azt jelzi, hogy a miR168 indukció egy specifikus, közvetlenül a vírusfertőzés által kiváltott folyamat.



43. ábra. A miR168 szint emelkedése általános jelenség a növény-vírus interakciókban. RNS kivonatok kis RNS northern blot analízise LNA próbákkal (az ábrán jelezve). (A) CymRSV fertőzött *N. benthamiana* (B) Különböző nem rokon vírusokkal fertőzött *N. benthamiana* (C) Különböző növény-vírus interakciók. Az ábrák alsó részén mennyiségi kontrollként rRNS-ek láthatók.

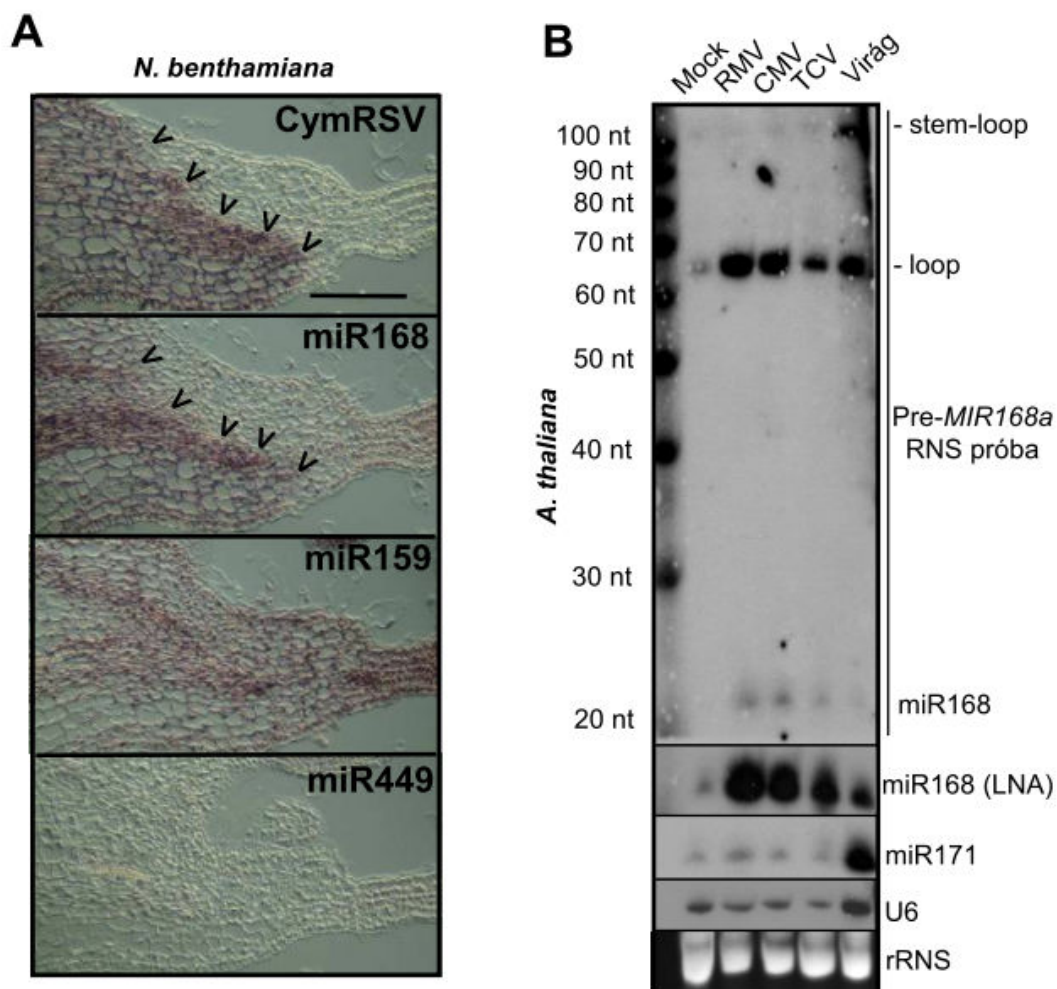
Hasonló eredményeket kaptunk, amikor a *N. benthamiana* teszt növényeket keresztes virágúakat fertőző dohánymozaik vírussal (crTMV), PVX-el és a dohány karcolatos (tobacco

etch potyvirus ; TEV) vírussal fertőztük (43. ábra B). Minden esetben a miR168 szint markáns megugrását találtuk, míg a miR159 szintje jelentősen nem változott. A TEV fertőzés mutatott eltérést ebből a szempontból, mert itt a miR159 felhalmozódást is tapasztaltunk ahogy ezt már előzőleg leírták (Bazzini és mtsai., 2007). A továbbiakban különböző eltérő növény (*A. thaliana*, *Medicago truncatula* és *Solanum lycopersicum*) - vírus (TCV, RMV, SHMV, TMV-U1 és PVX) interakciókat vizsgáltunk a miR168 speciális indukciójára. Azt tapasztaltuk hogy a vírusfertőzés során a miR168 expressziója drasztikusan megnőtt, míg más endogén miRNS-ek szintje a vírusfertőzés során nem változott (43. ábra C). Ezek az eredményeink megmutatták, hogy eltérő növény-vírus interakciókban, függetlenül attól, hogy milyen az adott vírus általános hatása az endogén miRNS-ek szintjére, mindig határozott és erőteljes miR168 indukciót tapasztaltunk. A jelenség általános megjelenéséből arra következtethetünk, hogy a gazdanövény-vírus interakcióban fontos szerepet játszik.

4.5.2. A miR168 indukciója térben átfed a vírus felhalmozódással, prekursorának éréstermékei fokozott akkumulációt mutatnak.

Mivel a miR168 akkumuláció általánosan jelen volt a vírus fertőzött növényekben kíváncsiak voltunk arra, hogy ez a jelenség térben hogyan viszonyul a vírus felhalmozódáshoz. Ebből a célból CymRSV fertőzött fiatal szisztemikus *N. benthamiana* levelében *in situ* hibridizációval megvizsgáltuk a miR168 és vírus RNS relatív akkumulációját (44. ábra A). Azt tapasztaltuk, hogy a miR168 expresszió és a vírus RNS akkumuláció térben átfed. A miR159 felhalmozódást vizsgálva nem kaptunk semmilyen eltérést a vírus által elfoglalt és a még nem fertőzött szövet részek között mutatva, hogy a miR168 indukció specifikus a vírus jelenlétére. A megnövekedett miR168 szintért több molekuláris mechanizmus is felelős lehet a vírusfertőzött növényekben. Ezek közé tartozik a miR168 megnövekedett stabilitása, a MIR168a prekursor fokozott expressziója, illetve a miR168 prekursor RNS hatékonyabb érése. A legújabb szakirodalom szerint van olyan miRNS (miR164a), amelynek transzkripciója vírus fertőzés hatására fokozódott (Bazzini és mtsai., 2009). Hogy megvizsgáljuk a miR168 prekursorának mennyiségét vírusfertőzött növényekben northern blot analízist végeztünk miR168 prekursor specifikus RNS próbával.

Mivel a miR168a prekursora nem ismert *N. benthamiana*-ból ezért mock inokulált és vírus fertőzött *A. thaliana* növényeket használtunk fel a kísérletekben. Kontroll RNS-ként *A. thaliana* virágból kivont mintát használtunk fel.



44. ábra A miR168 kifejeződésének vizsgálata vírusfertőzött növényekben. (A) CymRSV fertőzött *N. benthamiana* levél *in situ* hibridizációs vizsgálata LNA oligok (miR168 és miR159) és vírus specifikus RNS próba felhasználásával. Az egymást követő levél keresztbemetszek egy fiatal CymRSV szisztemikus levél alapi részéről származnak. A sötét lila szín mutatja a cél RNS felhalmozódást a jelzéseknek megfelelően. A nyilak a vírus fertőzés frontjára mutatnak. Egy csirke specifikus LNA oligot (miR449) használtunk negatív kontrollként a technikai háttér detektálására. A méret vonal - 100µm. (B) *A. thaliana* virágból, mock inokulált és különböző vírusfertőzött szövetekből származó RNS kivonat polyakrilamid gélen történő elválasztása és az azt követő northern blot analízise. A használt RNS próba az *A. thaliana* MIR168a prekurzorral komplementer (felső panel). A membránt lemosás után használtuk további hibridizálási kísérletekben miR168 és miR171 LNA és U6 specifikus DNS próbákat felhasználva. Az ábra alsó részén mennyiségi kontrollként rRNS-ek láthatók.

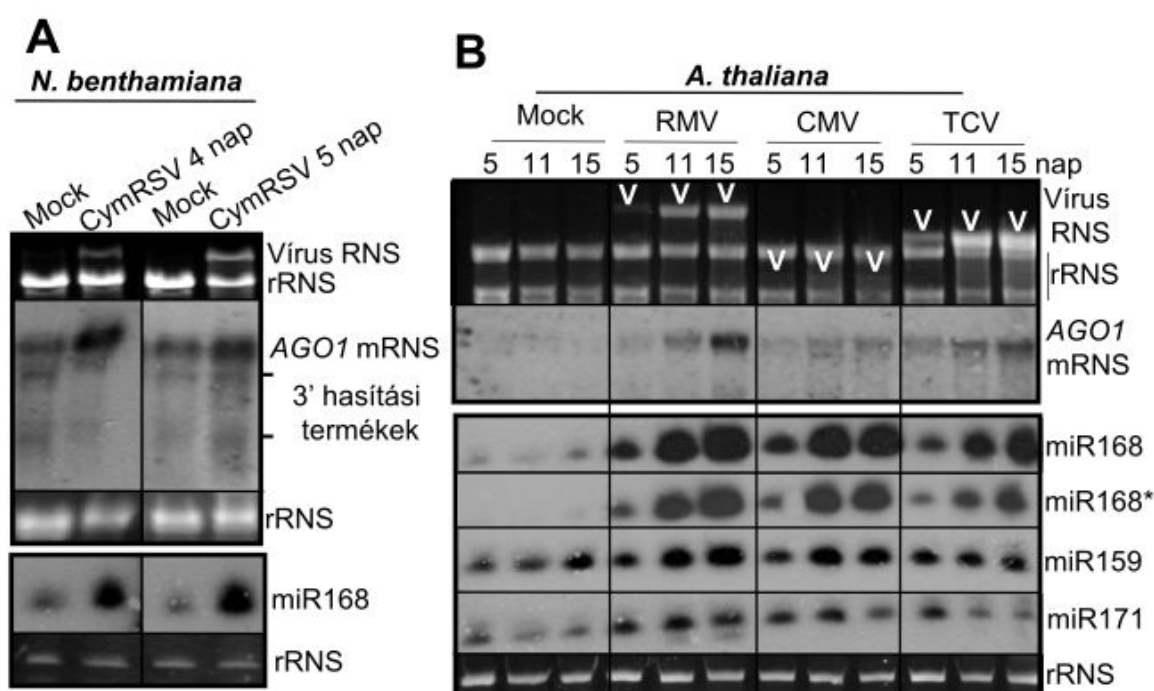
Mintáinkban a szakirodalomban már leírt köztes prekurzor termékeket (Vaucheret és mtsai., 2006) a 104 nukleotid hosszúságú "stem-loop" és a 64 nukleotid hosszúságú "loop" szekvenciákat (44. ábra B) detektáltuk. Kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy a vírus fertőzött szövetekben a "loop" köztestermék mennyisége drasztikusan megnő. Meglepetésünkre a "stem-loop" köztestermék nem mutatott fokozott kifejeződés vírus fertőzött szövetekben. A

virágból kivont RNS (nem fertőzött növény) ezzel szemben magasabb "stem-loop" köztestermék akkumulációt mutatott, de ez nem párosult arányosan magasabb "loop" köztestermék és érett miR168 akkumulációval. A TCV fertőzött növényben például kevesebb "loop" köztestermék van jelen mint a virágból készített mintában, ez azonban mégis magasabb érett miR168 kifejeződéssel társul. Ez a megfigyelés arra utal, hogy vírusfertőzött növényben a miR168 prekursor érése hatékonyabb, mint normál esetben a virágban.

Egy másik lehetőség, hogy a vírusok által kódolt RNS csendesítés szuppresszorok interfeárlnak az érett miRNS-ek stabilitásával. Ebben az esetben azonban azt várnánk, hogy nem csak a miR168, hanem a többi miRNS mennyisége is drasztikusan megnövekszik. További kísérleteink csakugyan kimutatták, hogy pl. a p19 nem képes hatékonyan kötni az érett miR168-at (lásd később).

4.5.3. A miR168 indukció vírusfertőzött növényekben általánosan együtt jár az AGO1 mRNS fokozott felhalmozódásával.

Több publikáció is leírta hogy a miR168-al párhuzamosan az *AGO1* mRNS is indukálódhat a vírusfertőzött növényekben (Zhang és mtsai., 2006; Csorba és mtsai., 2007; Havelda és mtsai., 2008). Ennek ellenőrzésére megvizsgáltuk az *AGO1* mRNS és a miR168 relatív expresszióját *N. benthamiana*-ban a fertőzést követő 4. és 5. napon olyan próbát használva, amely az *AGO1*mRNS miR168 felismerő helyétől a 3' vég irányába mutató régióra specifikus. A vírusfertőzött kivonatokat megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az *AGO1* mRNS miR168 vezérelt hasításából származó lehetséges hasítási termékek nem halmozódtak fel, annak ellenére, hogy a miR168 és az *AGO1* mRNS is fokozott expressziót mutatott (45. ábra).



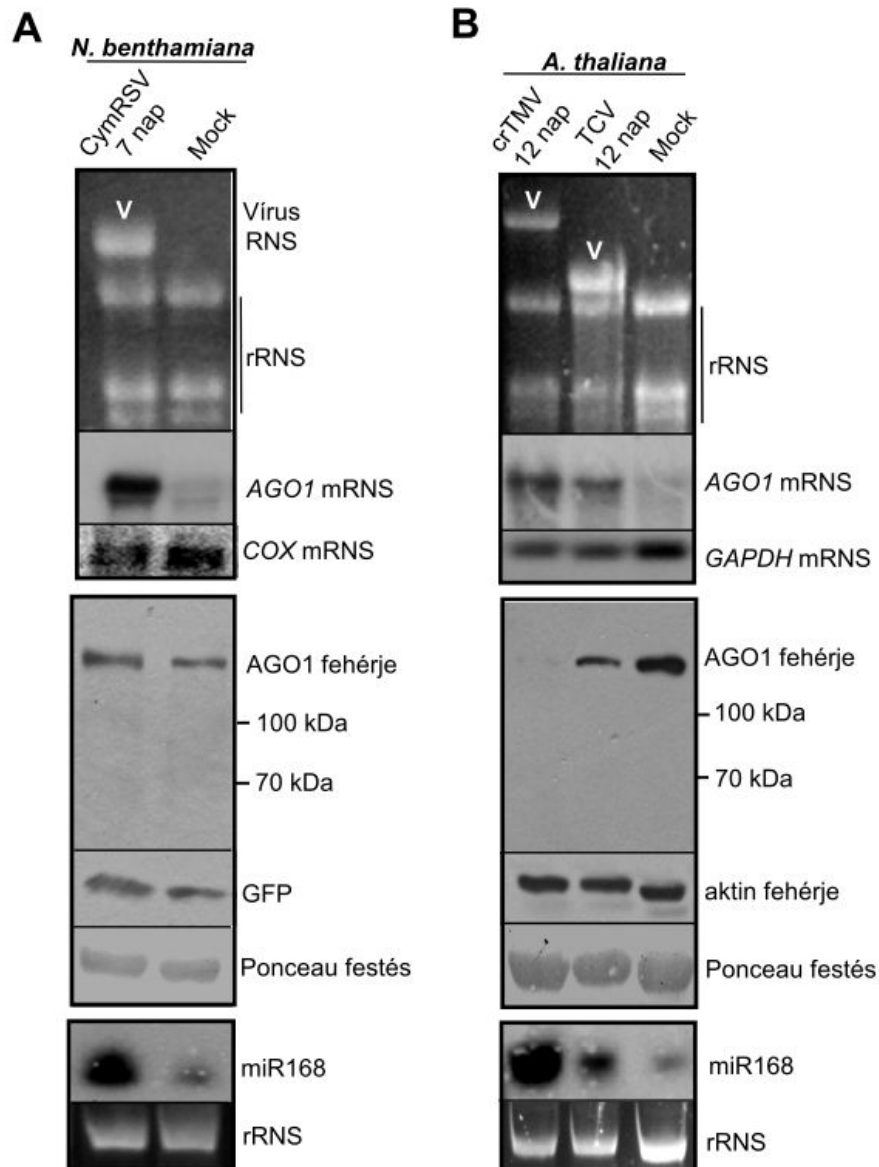
45. ábra Az *AGO1* mRNS fokozott felhalmozódását a miR168 fokozott akkumulációja kíséri. (A) CymRSV fertőzött *N. benthamiana* növények northern blot analízise *AGO1* mRNS és miRNS akkumulációra nézve. Az *AGO1* mRNS-t detektáló próba a miR168 felismerő helyétől a 3' vég irányába mutató régióra specifikus. A miR168 LNA próbával lett kimutatva. A lehetséges 3' vég hasítási termékek felhalmozódásának pozíciója az ábrán van jelölve. (B) Különböző vírusokkal fertőzött *A. thaliana* növények northern blot analízise *AGO1* mRNS-re és különböző miRNS-ekre. Az *AGO1* mRNS-t detektáló próba a miR168 felismerő helyétől a 3' vég irányába mutató régióra specifikus. A miRNS-ek detektálására LNA próbákat használtunk.

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a vírus fertőzés során bekövetkező fokozott miR168 akkumuláció nem, vagy csak nagyon gyenge hatásfokkal, idézi elő az *AGO1* mRNS hasítást. Ez az eredmény alapvetően meglepő, mert eddig a miR168 által vezérelt *AGO1* mRNS gátlása, mint egy hasítási mechanizmus volt ismert (Vaucheret és mtsai., 2004; Mallory és Vaucheret, 2009). Hasonló eredményeket kaptunk RMV, CMV és TCV fertőzött *A. thaliana*-ban is. Egymást követő időpontokban vett minták felhasználásával kimutattuk, hogy a vírus infekció előrehaladását minden esetben párhuzamosan kíséri az *AGO1* mRNS és miR168 fokozódó expressziója (45. ábra). Azt tapasztaltuk, hogy a miR168* szintén fokozott akkumulációt mutatott vírus fertőzött növényekben. Megvizsgáltuk a miR168* felhalmozódás biológiai hátterét, és azt találtuk, hogy a magas miR168* akkumuláció normális a miR168 érése során, mivel a csillagszál nagy mennyiségben van jelen a nem fertőzött egészséges szövetekben is (nincs bemutatva). Más miRNS-ek, mint pl. miR159 és miR171, akkumulációja nem, vagy csak kissé változott a fertőzött növényekben. Az *AGO1* mRNS és a miR168 együttes

felhalmozódása megvározható az előzőleg leírt megfigyeléssel, miszerint az *AGO1* mRNS és a miR168 expressziója egy ko-expressziós mechanizmus által szabályozott (Vaucheret és mtsai., 2006). Sem *N.benthamiana*, sem *A. thaliana* növényekben nem tudtuk kimutatni a lehetséges miR168 hasítási termékek felhalmozódását, még olyan mintákban sem, ahol az *AGO1* mRNS drasztikus mértékben halmozódott fel (pl. RMV fertőzés a 15. napon). Ugyan nem tudjuk kizárni, hogy a 3' vég hasítási termékek nagyon gyors lebomlást mutatnak és ezért nem vagyunk képesek kimutatni őket, de az eredményeink azt sugallják, hogy miR168 vezérelt *AGO1* mRNS hasítás nem működik hatékonyan a vírusfertőzött növényekben.

4.5.4. Az *AGO1* fehérje felhalmozódása gátolt a vírusfertőzött növényekben.

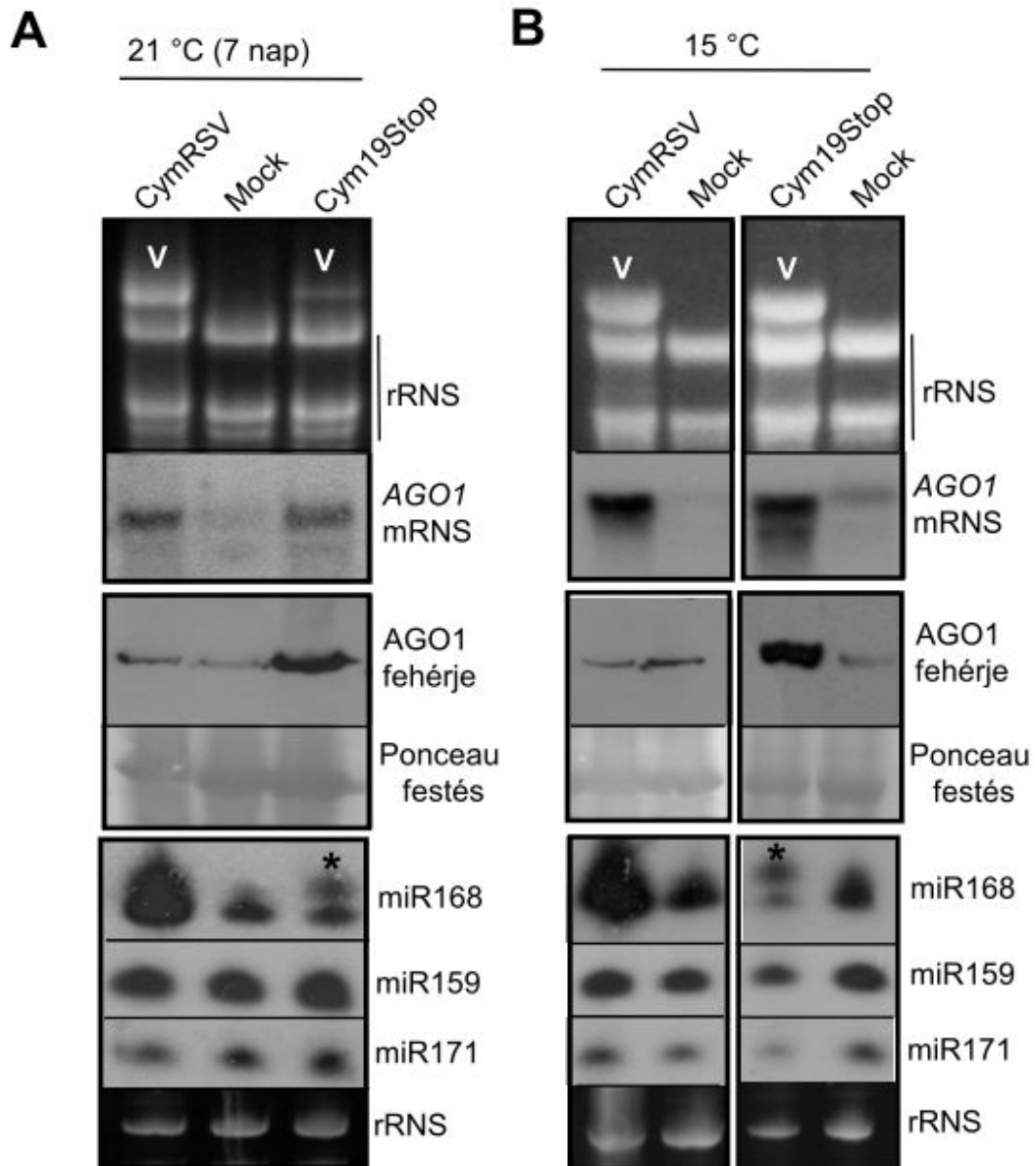
A miRNS-ek nemcsak a cél mRNS hasítását képesek előidézni a növényekben, hanem egyre több adat mutatja, hogy képesek a mRNS transzlációját is befolyásolni (Beauclair és mtsai., 2010; Aukerman és Sakai, 2003; Chen, 2004; Brodersen és mtsai., 2008; Dugas és Bartel, 2008). Mi is megvizsgáltuk az *AGO1* fehérje szintjét a miR168 és *AGO1* mRNS szintjéhez viszonyítva vírusfertőzött növényekben. Először CymRSV fertőzött szisztémikus leveleket használtunk fel a kísérleteinkben. A kísérletekhez a növényi mintákat homogenizáltuk, majd két részre osztottuk, fehérje, illetve RNS analízisre, így biztosítani tudtuk az RNS és fehérje minták közvetlen összehasonlíthatóságát. Azt tapasztaltuk, hogy a vírus fertőzött növényekben az *AGO1* fehérje szint változatlan maradt annak ellenére, hogy az *AGO1* mRNS akkumulációja jelentősen megemelkedett (46. ábra A). A mintákban ismét tapasztaltuk a miR168 erős indukcióját. Hasonló, illetve még drasztikusabb eredményeket kaptunk vírusfertőzött *A. thaliana* estében is. Ebben a kísérletben crTMV és TCV fertőzött *A. thaliana* növényeket vizsgáltunk meg *AGO1* fehérje, miR168 és *AGO1* mRNS akkumulációjára (46. ábra B). A kísérletek megmutatták, hogy az *AGO1* mRNS indukció ellenére az *AGO1* fehérje szint nem emelkedett, sőt csökkenést mutatott, a vírusfertőzött növényekben. Az *AGO1* fehérje szint gátlása különösen hatékony volt a crTMV fertőzés esetén. A mintákban a miR168 szint szintén indukciót mutatott.



46. ábra Az AGO1 fehérje gátolt felhalmozódása vírusfertőzött növényekben. Szisztémikusan fertőzött *N. benthamiana* és *A. thaliana* növények homogenizált leveleiből készült mintákat kettéosztottunk RNS illetve fehérje analízisre. A megfelelő mintákat megvizsgáltuk AGO1 fehérje *AGO1* mRNS és miR168 felhalmozódására. (A) CymRSV fertőzött GFP transzgénikus *N. benthamiana* növények northern blot analízise (felső panel). AGO1 és GFP fehérje felhalmozódásának vizsgálata western blottal (középső panel). Kis RNS northern blot miR168 specifikus LNA próbával (alsó panel). (B) crTMV és TCV fertőzött *A. thaliana* növények northern blot analízise (felső panel). AGO1 és aktin fehérje felhalmozódásának vizsgálata western blottal (középső panel). Kis RNS northern blot miR168 specifikus LNA próbával (alsó panel).

4.5.5. A p19 RNS csendesítés szuppresszor eltávolítása a fertőzési folyamatból a miR168 indukció hiányát és fokozott AGO1 akkumulációt idéz elő.

A vírusok RNS csendesítés szuppresszorai fontos meghatározói a tünet kialakulásnak és gyakran interfeerálnak az endogén miRNS-ek működésével (Kasschau és mtsai., 2003; Dunoyer és mtsai., 2004; Zhang és mtsai., 2006). Mivel a CymRSV által kódolt RNS csendesítés szuppresszor, p19, szintén fontos tünet meghatározó fehérje (Scholthof és mtsai., 1995; Burgyn és mtsai., 2000) és képes kis RNS-eket fizikailag megkötni (Silhavy és mtsai., 2002), feltételeztük, hogy szerepet játszhat a megfigyelt miR168 indukcióban. Ennek eldöntésére Cym19Stop fertőzött *N. benthamina* növényeket vizsgáltunk meg az AGO1 fehérje, a miR168 és az *AGO1* mRNS akkumulációjára (47 ábra A). CymRSV és Cym19Stop fertőzött növények (21 °C) szisztemikus leveleit vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a mock inokulált növényekkel összevetve az *AGO1* mRNS szintje mindkét fertőzésben megközelítően azonos mértékben indukálódott. Ezzel ellentétben, míg CymRSV fertőzött növényekben az AGO1 fehérje szintje változatlan maradt, a Cym19Stop növényekben az AGO1 mRNS indukciót az AGO1 fehérjének erőteljes felhalmozódása kísérte. Ezek az eredmények azt mutatták, hogy a p19 központi szerepet játszhat az AGO1 fehérje szint szabályozásában. Kis RNS northern blottal vizsgálva a miR168 akkumulációját ugyaezekben a fertőzésekben azt mutattuk ki, hogy a CymRSV fertőzéssel, ahol miR168 erős indukciót mutat, szöges ellentétben, a Cym19Stop fertőzött növényekben a 21 nukleotid hosszúságú miR168 szintje nem változott (47 ábra). Csupán egy enyhe emelkedését figyeltük meg egy magasabb molekulatömegű miR168 változatnak, amely biológiai szerepe és kompetenciája egyelőre nem ismert. A legújabb eredmények alapján ez a hosszabb miR168 változat a MIR168b prekursorról keletkezhet (Vaucheret, 2009), azonban az AGO1 fehérje felhalmozódására láthatólag nincs jelentős hatása. A miR171 és miR159 szintje a mintákban gyakorlatilag változatlan maradt.



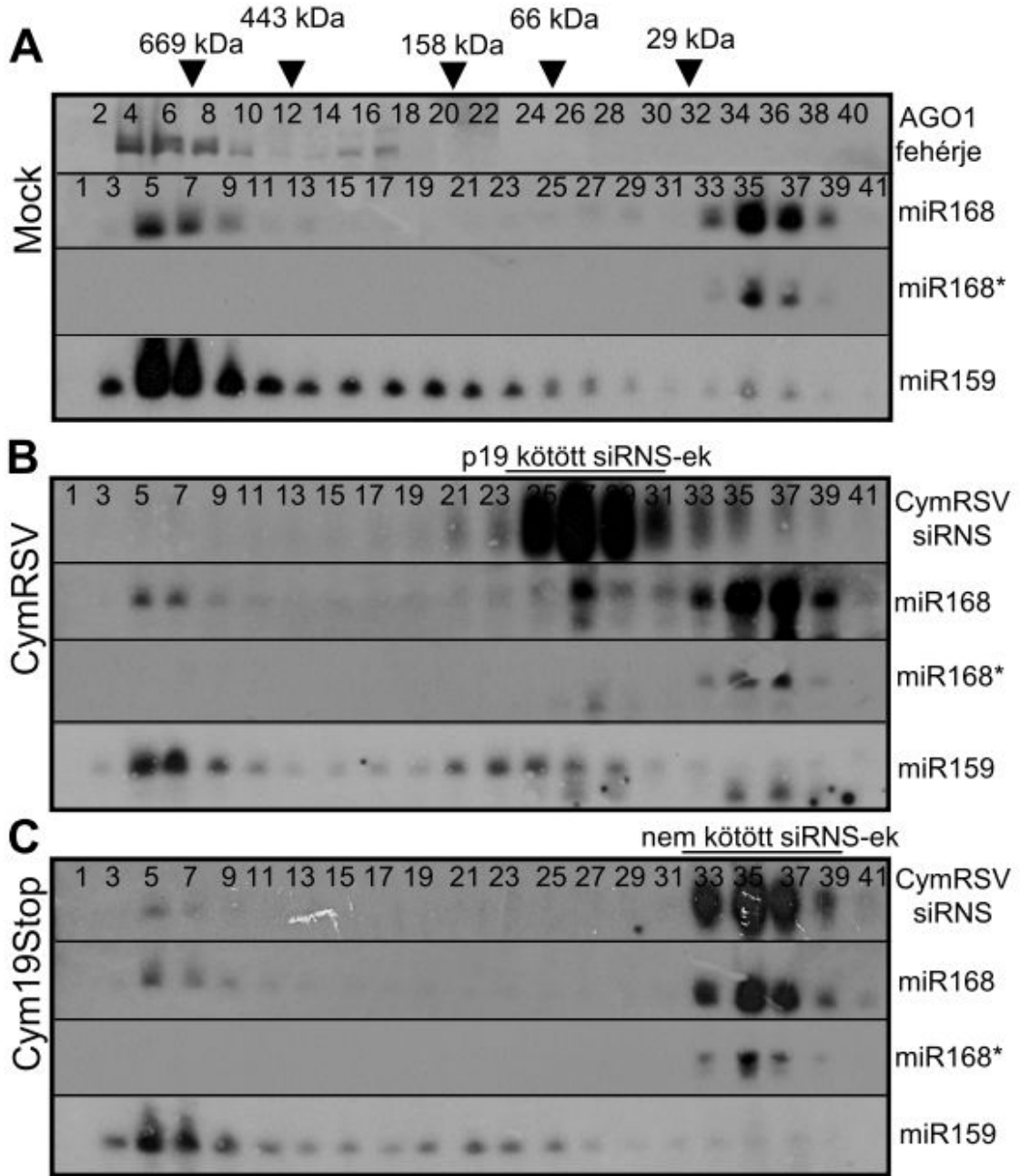
47. ábra A p19 fehérje felelős a miR168 indukciójáért. Szisztemikusan fertőzött *N. benthamiana* és *A. thaliana* növények homogenizált leveleiből készült mintákat kettéosztottuk RNS, illetve fehérje analízisre. A megfelelő mintákat megvizsgáltuk AGO1 fehérje, *AGO1* mRNA és miR168 felhalmozódására. (A) 21 °C-on szedett minták. (B) 15 °C-on szedett minták. A CymRSV fertőzött mintákat 20 nappal a Cym19Stop mintákat 25 nappal a fertőzés után szedtük, hogy elérjék a vad típusú vírusra jellemző felhalmozódási szintet. * jelzi a hosszabb miR168 akkumulációját.

21 °C-on a Cym19Stop fertőzés esetén a genomikus RNS akkumulációja erősen gátolt, amely esetleg magyarázatot adhat a miR168 indukció elmaradására. Annak érdekében, hogy ezt a lehetőséget kizárjuk, végrehajtottuk ugyanezeket a fertőzéseket 15°C-on. Ezen a

hőmérsékleten az RNS csendesítés működése gátolt ezért a Cym19Stop vírus képes vad típusú vírus szintjére felhalmozódni és elmarad a kigyógyulás jelensége is (Szittyá és mtsai., 2003). Eredményeink megerősítették, hogy a Cym19Stop nagy mértékű felhalmozódása során sem indukálódik 21 nukleotid hosszúságú miR168 expressziója (47. ábra B). Előző eredményeinkkel összhangban azt tapasztaltuk, hogy a CymRSV és mock inokulált mintákkal összehasonlítva Cym19Stop fertőzés esetén az AGO1 fehérje szintje drasztikusan megugrik. Ezek az eredmények tehát megmutatták a p19 központi szerepét az AGO1 fehérje felhalmozódás szabályozásában.

4.5.6. A p19 nem képes hatékonyan kötni a miR168-at.

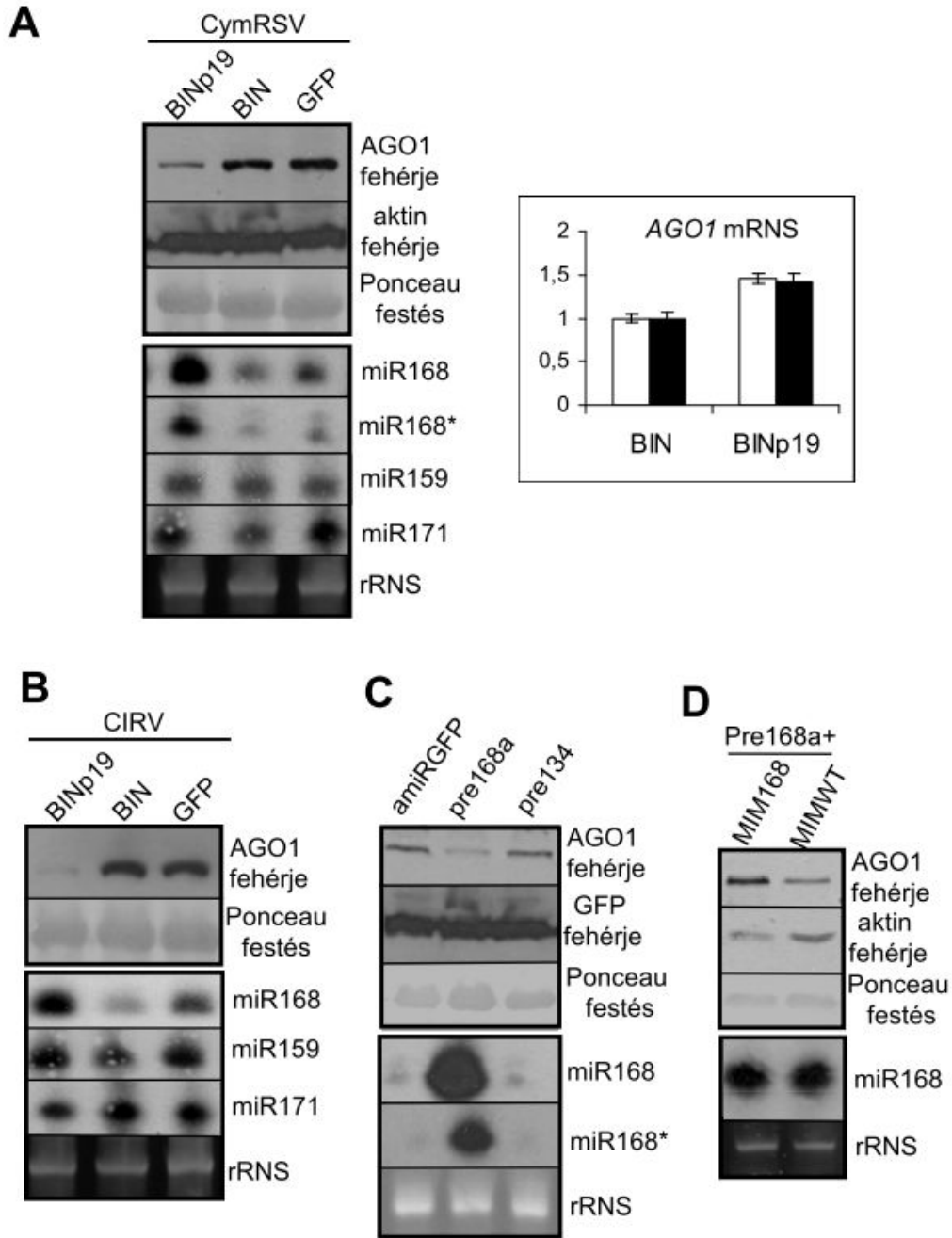
A p19 az RNS csendesítés közbülső lépését gátolja siRNS-ek megkötésével (Lakatos és mtsai., 2006). Gélfiltrációs kísérletekkel (Lakatos és mtsai., 2006) ellenőriztük, hogy vajon a p19 kis RNS kötő képessége hatással van-e a miR168 aktivitására és/vagy stabilitására. Azt találtuk, hogy mock inokulált növényből készült kivonatokban a miR168 és miR168* egyaránt a fehérjék által nem kötött kis RNS-eknek megfelelő molekulatömeg tartományban eluálódott (33-39 frakciók) (48. ábra A). Meghatároztunk egy nagy molekula tömegű, miR168-at tartalmazó, komplexet, amely az AGO1 fehérjékkal ko-frakcionálódott arra utalva, hogy ezek AGO1 kötött miR168 molekulák (670 kDa; 4-9 frakciók). A miR168-al ellentétben a miR159 döntő többsége az AGO1 tartalmazó frakciókban volt jelen és nem volt jelentős mennyiségben detektálható nem kötött formában. Ezek az eredmények megerősítenek egy előzőleg közölt elképzelést, miszerint a miR168-as miRNS AGO1 fehérjéhez való kapcsolódása nem hatékony (Vaucheret és mtsai., 2006). A CymRSV fertőzött növényekből készített minták analízise azt mutatta, hogy a p19 kötött siRNS-eket tartalmazó frakciók (24-28) csak igen kis mennyiségű miR168-at tartalmaznak (27 frakció) és a miR168 döntő része szabad állapotban fordult elő (33-39 frakciók) (48. ábra B). A Cym19Stop fertőzött növények vizsgálata pedig feltárta, hogy a nem kötött miR168 és miR168* együtt mozog a nem kötött, vírus eredetű siRNS-ekkel (33-39 frakciók) (48. ábra C). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a p19 fehérje nem képes hatékonyan megkötni a miR168-at és így interferálni a biológiai aktivitásával. Az eredmények arra is rámutatnak, hogy a fokozott miR168 felhalmozódás nem a p19 fehérje miRNS kötő/stabilizáló hatása miatt következik be.



48. ábra A p19 fehérje kis RNS kötő képessége nem befolyásolja a miR168 aktivitást. A fertőzött (7 napos) és mock inokulált növényekből készített nyers kivonatok alkotó elemeit molekulatömeg alapján elválasztottuk gélszűrő oszlop felhasználásával. (A) mock inokulált, (B) CymRSV-, (C) Cym19Stop fertőzött minták. A páros számú frakciókat az AGO1 fehérje kimutatására használtuk fel, míg a páratlan számú frakciók szolgáltak a miR168, miR168* és miR159 jelenlétének kimutatására (LNA próba felhasználásával). A vírus specifikus siRNS-eket RNS próbával mutattuk ki. A CymRSV fertőzött minták analízise mutatja a p19 kötött siRNS-ek felhalmozódást (B).

4.5.7. A p19 fehérje tranziens expressziója a miR168 akumuláció fokozódását és párhuzamosan az AGO1 fehérje felhalmozódásának gátlását idézi elő.

A p19 nyilvánvaló szerepe a miR168 indukció létrehozásában vírus fertőzött növényekben azt sugallta, hogy ez a fehérje közvetlenül felelős a jelenségért. Ennek az elképzelésnek az igazolására, a p19 fehérjét bináris plazmidról kifejező agrobakterium szuszpenziót fecskendő segítségével *N. benthamiana* levelekbe jutattunk (infiltráltuk) majd 3-4 nap után vizsgáltuk az ektopikus p19 fehérje felhalmozódás hatására létrejövő változásokat a levélben. Azt találtuk, hogy a p19 fehérje tranziens expressziója kiváltotta a miR168 specifikus indukcióját, amelyet párhuzamosan az AGO1 fehérje mennyiségének csökkenése kísért (49. ábra A). Valósídejű PCR vizsgálat megmutatta hogy az infiltrált levélben ahol a p19 hatására az AGO1 fehérje mennyiségének csökkenését tapasztaltuk az *AGO1* mRNS szintje nem csökkent, hanem inkább emelkedett kissé a kontroll, nem specifikus agroinfiltrációval összevetve. A valósídejű PCR vizsgálat azt is megmutatta, hogy az AGO1 mRNS teljes hosszúságú formában voltak jelen (a használt oligonukleotidok közre fogták a miRNS felismerő helyet az mRNS-en). Ezek, és az előző eredményeink arra utaltak, hogy p19 indukálta miR168 többlet az *AGO1* mRNS transzlációs gátlásával kontrolálja az AGO1 fehérje felhalmozódást. Egy másik tombusvírus (CIRV; (Vargason és mtsai., 2003)) p19 fehérjéjének tranziens expressziója megmutatta, hogy ez a fehérje hasonlóan indukálja a miR168 specifikus indukcióját, amelyet párhuzamosan az AGO1 fehérje mennyiségének csökkenése kísért (49. ábra B). Ezek az adatok azt mutatják, hogy a tombusvírus család tagjai által kódolt p19 RNS csendesítés szuppresszorok általánosan képesek a miR168 specifikus indukciójára. Annak tesztelésére, hogy a miR168 közvetlenül felelős az AGO1 fehérje felhalmozódásának gátlására agrobakterium infiltráció segítségével tranziensen expresszáltuk a *MIR168a* prekurzort. A *MIR168a* prekurzor ektopikus kifejeződése hatására akumulálódó érett miR168 közvetlenül is előidézte AGO1 fehérje felhalmozódásának gátlását (49. ábra C) mutatva, hogy a fokozott miR168 expresszó felelős a jelenségért. Az általunk leírt jelenség további megerősítéseként elkészítettük a miR168 "target mimicry" konstrukcióját, amely képes gátolni az érett miRNS működését (Franco-Zorrilla és mtsai., 2007). A "target mimicry" konstrukció és *MIR168a* prekurzor együttes tranziens expressziója feltárta, hogy miR168 aktivitás gátlása az AGO1 fehérje fokozottabb felhalmozódásához vezet (49. ábra D) Ezek a kísérleteink megmutatták, hogy a p19 által kiváltott miR168 felhalmozódás közvetlenül felelős az AGO1 fehérje akumulációjának gátlásáért.

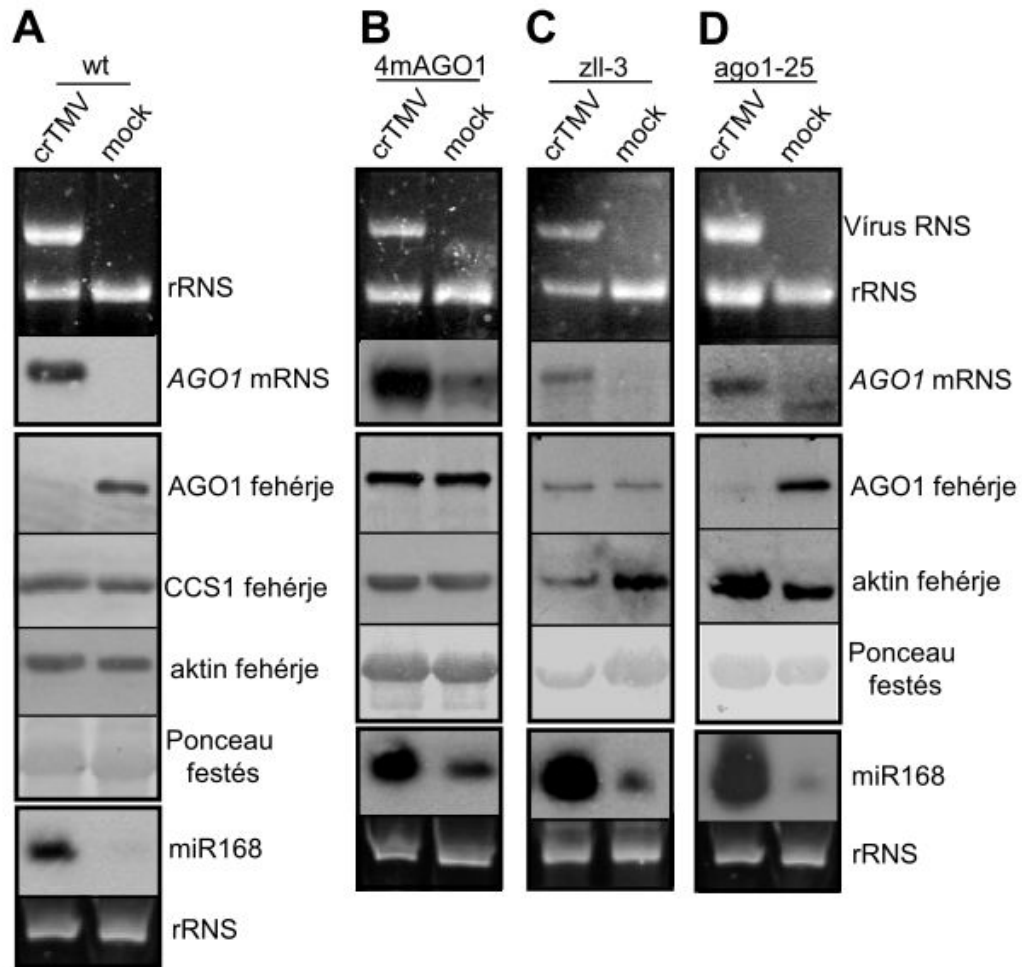


49. ábra A miR168 közvetlenül felelős az AGO1 fehérje felhalmozódásának kontrolljáért. Agrobaktérium közvetített tranzies expressziós vizsgálatok *N. benthamiana* levelekben. Az endogén AGO1 fehérje felhalmozódását detektáltuk az infiltrált levelekben. (A) P19-et (BINp19), üres (BIN) és GFP-t expresszáló bináris vektorokat használtunk az infiltrációs kísérletekhez. A levelekből tisztított RNS mintákban LNA próbák segítségével megvizsgáltuk miR168, miR168*, miR159 és miR171 szinteket. Valósídejű RT-PCR mutatja az *AGO1* mRNS felhalmozódását. Fehér oszlop jelzi azoknak az oligonukleotidok a használatát amelyek közé fogták a miRNS felismerő helyet az mRNS-en. Fekete oszlop jelzi a hasítási helytől 3' vég pozícióban található oligonukleotidok használatát. (B) AGO1 akkumuláció a CIRV p19-et tranziensen kifejező levelekben. (C) A *MIR168a* (pre168) tranziens expressziójának hatása az AGO1 fehérje szintre (pre134; negatív kontroll). (D) A "target mimicry" konstrukció (MIM168) és *MIR168a* (pre168) prekursor együttes tranziens expressziója (MIMWT; negatív kontroll).

4.5.8. Azokban a mutánsokban, amelyekben a miR168 vezérelt kontroll vagy a transzlációs gátlás nem működik az AGO1 fehérje felhalmozódás gátlása sérült.

A következőekben olyan mutáns növényeket vizsgáltunk, amelyek gátoltak a miR168 miRNS aktivitásában. A 4mAGO1 mutánsban az AGO1 gén olyan csendes mutációkat hordoz (négy mutáció a miR168 felismerő helyen; (Vaucheret és mtsai., 2004; Vaucheret és mtsai., 2006)) amely elrontja a miRNS mRNS kapcsolatot. A zll-3(Moussian és mtsai., 1998) mutáns sérült az ZWILLE/PINHEAD/AGO10 (AGO10), az ago1-25(Morel és mtsai., 2002) (hipomorf) mutáns pedig az AGO1 működésében. Ezekben a kísérleteinkben nem tudtuk használni a CymRSV-t, mivel ez a vírus nem fertőzi a *A. thaliana* növényeket, amelyekből a mutánsok rendelkezésre álltak. A crTMV használtunk az a *A. thaliana* mutánsok fertőzésre, mivel erről a vírusról előzőleg kimutattuk, hogy rendkívül erőteljes AGO1 fehérje felhalmozódás gátlást idéz elő *A. thaliana*-ban.

Ebben a kísérlet sorozatban arra is rákérdeztünk, hogy vajon a vírus fertőzés hatására kialakuló AGO1 represszió specifikus jelenség-e vagy más miRNS által transzlációs gátlás által vezérelt fehérje felhalmozódása is megváltozik. Ebből a célból megvizsgáltuk a réz chaperone superoxid dismutáz (CCS1) felhalmozódását, amelynek mRNS-éről kimutatták, hogy a miR398 miRNS általi szabályozásában a transzlációs kontrol is szerepet játszik. Azt tapasztaltuk, hogy a CCS1 szintjében nem következett be változás a crTMV fertőzés hatására jelezve, hogy az AGO1 fehérje repressziója specifikus jelenség és nem egy általánosan fokozott transzlációs aktivitás eredménye (50. ábra A).



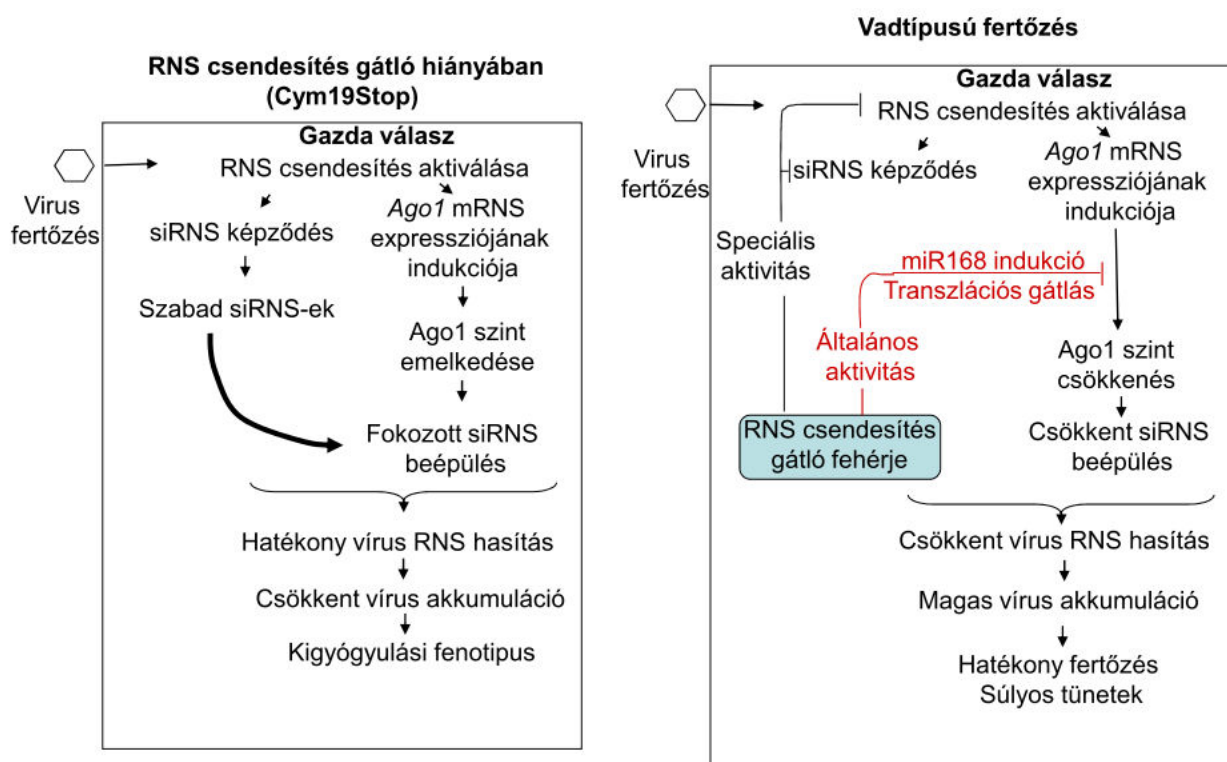
50. ábra. Az AGO1 fehérje szint változás crTMV fertőzött mutáns és vad típusú *A. thaliana*-ban. A felső panelek az AGO1 mRNA northern, a középső panelek a minták western míg az alsó panelek a miR168 northern analízist mutatják. (A) A CCS1 és AGO1 fehérje felhalmozódása vad típusú *A. thaliana*-ban. AGO1 felhalmozódása 4mAGO1 (B) zll-3 (C) és ago1-25 (D) mutáns *A. thaliana* növényekben.

Az AGO1 specifikus repressziója a crTMV-t tartalmazó növényekben arra utalt, hogy a fertőzés által indukált miR168 indukció közvetlenül felelős a jelenségért. Ezt a lehetőséget vizsgáltuk meg a 4mAGO1 növények crTMV-vel történő fertőzésével. Ezekben a mutánsokban az AGO1 fehérje repressziója gátolt volt annak ellenére, hogy miR168 felhalmozódás nagy mértékben megnőtt (50. ábra B). Az eredmények megerősítették elképzelésünket, hogy a miR168 közvetlenül részt az AGO1 fehérje felhalmozódás szabályozásában, mivel a korrekt miR168 felismerőhely megváltoztatása AGO1 represszió gátlásához vezetett. Ezzel ellentétben az AGO1 mutációt hordozó növény (ago1-25) vírus fertőzésénél azt tapasztaltuk, hogy nem mutatta az AGO1 represszió gátlását jelezve, hogy az AGO1 fehérje önmaga nem részese ennek a szabályozó körnek (50. ábra D).

Előzőleg kimutatták, hogy az AGO10 képes translációs aktivitást kiváltani az *AGO1* mRNS-en (Mallory és mtsai., 2009). Az AGO10 szintén felelős egyes miRNS-ek által vezérelt translációs kontrollért (Brodersen és mtsai., 2008). Amennyiben az *zll-3* mutánst (AGO10 funkcióban mutáns) crTMV-vel fertőztük szintén az AGO1 represszió gátlását tapasztaltuk (50. ábra C). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy vírus fertőzések által indukált miR168 akkumuláció az *AGO1* mRNS translációs gátlást idézi elő, melyért feltehetően az AGO10 aktivitása a felelős.

4.5.9. A vírus indukálta miR168 felhalmozódás AGO1 fehérje szint reguláló hatásának modellje.

A kísérleteink során kapott eredményeink alapján kidogoztunk egy modellt. A vírus fertőzés során a növény védekező rendszere felismeri az invazív RNS (és fehérjék) jelenlétét és aktiválja a védekezési rendszerét. A növény egyik legfontosabb elsődleges védekezési rendszere az RNS csendesítés mechanizmusa. A fertőzés során aktiválódó RNS csendesítési rendszer elkezd a vírus specifikus siRNS-ek előállítását, amelyek - az RNS csendesítés központi végrehajtó fehérjéjébe - az AGO1 fehérjébe (és más hasonló faktorokba) épülve a vírus RNS hasításával akadályozzák a vírus inváziót. A növény, hogy a vírus fertőzés során az RNS csendesítés határfokát fokozza, indukálja a az *AGO1* mRNS fokozott expresszióját. Amennyiben a vírus nem képes ezt a védekezési reakciót gátolni, ez a reakció jelentős végrehajtó AGO1 fehérje többlethez és hatékony vírus eliminációhoz vezet (pl Cym19Stop fertőzés (51 ábra)). A sikeres fertőzés érdekében a vírusok egy ellenlépést alkalmaznak, amely egy endogén miRNS expressziójának fokozásán alapul. Ez a miRNS a miR168 amelynek cél mRNS-e az AGO1 fehérjét kódolja. A különböző vírusokkal fertőzött növények egységesen mutatják a miR168 fokozott felhalmozódását, ami az összes vizsgált esetben együtt járt az AGO1 gátolt felhalmozódásával. A vírusok közvetlen hatására bekövetkező miR168 indukciót alátámasztja a CymRSV fertőzés során leírt jelenség, mely megmutatta, hogy a miR168 és vírus RNS felhalmozódás a fertőzött szövetekben térben átfed. Tombusvírusok esetén ki tudtuk mutatni, hogy a p19 RNS csendesítés szuppresszor fehérje közvetlenül felelős a miR168 indukcióért és az azt követő AGO1 represszióért. Az endogén miR168 szint megváltoztatásával tehát a vírusok el tudják érni, hogy a növény védekező rendszere által vezérelt AGO1 szint emelkedés ne valósuljon meg, teret adva a hatékony vírus replikációnak és elterjedésnek.



51. ábra A miR168 alapú vírus mediált védekezési reakció modellje.

Az eredményeink szintén megmutatták, hogy ez a szabályozás elsősorban a miR168 által végrehajtott transzlációs gátláson alapul, amit elsőként irtunk le az *AGO1* mRNS szabályozására.

Feltételezésünk szerint ez a jelenség rendkívül általános, mivel a miR168 indukciót az eddig vizsgálat összes növény-vírus interakcióban tapasztaltuk. Az eredményeink arra utalnak, hogy a vírusoknak egyszerre több szinten kell támadniuk az RNS csendesítés mechanizmusát a hatékony fertőzés érdekében. A p19 RNS csendesítés szuppresszor például, a jól ismert siRNS kötő aktivitásán kívül, képes modulálni a miR168 szintjét is, előidézve az AGO1 fehérje felhalmozódás kontrollját. A jövőben megválaszolendő kérdések közé tartozik annak az eldöntése, hogy vajon a p19 vezérelt miR168 indukció kapcsolatban van-e a fehérje RNS csendesítési aktivitásával, illetve a többi vírus esetében is az RNS csendesítés szuppresszorok felelősek-e a miR168 indukcióért?

5. ÖSSZEFOGLALÁS

1. Kifejlesztettünk egy módosított oligonukleotidokon alapuló (LNA) rendkívül hatékony és specifikus kis RNS detektálási rendszert, megoldva ezzel számos technikai nehézséget a mi- és siRNS-ek kimutatása kapcsán. A rendszer általánosan használható mind northern blot mind *in situ* hibridizációs eljárásokban növényi, illetve állati rendszerekben. Az általunk kidolgozott LNA alapú detektálási technika az utóbbi években világszerte elterjedté vált.

2. LNA próbák segítségével *in situ* hibridizációs vizsgálatokkal növényi miRNS-ek felhalmozódását vizsgáltuk különböző szövetekben. Vizsgálataink megmutatták, hogy a miRNS-ek térben és időben szigorúan kontrolláltan fejeződnek ki és általános jelenlétük az edénynyaláb rendszerben nem sejt-autonóm aktivitásukra utal.

3. *In situ* hibridizálási kísérletekkel kimutattuk, hogy a "shut off" jelenség megfigyelhető a CMV-tők sziklevél rendszerben. Eredményeink azt is megmutatták, hogy az előzőleg mások által mért enzimaktivitási értékek jól korrelálnak a megfelelő gének expressziós változásaival. Egyes gének mRNS-einek indukciójának kimutatásával a fertőzési területtől távolabb eső sejtekben olyan szignalizációs jelenségek jelenlétét írtuk le, amelyek alapvető fontosságúak lehetnek gazda-patogén kölcsönhatásban.

4. Kimutattuk, hogy az eddig csak inokulált leveleken megfigyelt "shut off" jelenség a vírus fertőzött növények szisztémikus levelein is kialakulhat. Bizonyítottuk, hogy a szisztémikusan fertőzött levelekben az endogén génekre ható "shut-off" jelenség perzisztens módon fennmaradhat, ezzel súlyos mRNS deficienciát hozva létre a gazdanövényben.

5. Eredményeink azt is megmutatták, hogy egyes vírusok (Tombusvirus és Tobamovirus nemzetségbe tartozók) képesek míg, más vírusok (Carmovirus és Cucumovirus nemzetségbe tartozók) nem képesek a gazda mRNS-ek hatékony leszállályozására a szisztémikus levelekben. A különböző gazda-vírus kapcsolatok vizsgálatával összefüggést mutattunk ki a tünetek súlyossága és a „shut-off” jelenség mértéke között, ami arra utal, hogy ez a jelenség a tünet kialakulás fontos komponense lehet bizonyos növény-vírus kapcsolatokban.

6. A szisztemikus levelekben kialakuló "shut off" jelenség molekuláris mechanizmusát vizsgáló kísérleteink azt mutatták, hogy a jelenségért a célgénnek sejtmagi transzkripciójának gátlása felelős.

7. Kimutattuk, hogy a RNS csendesítés szuppresszor hiányának hatására a növény képes a vírus lokalizációjára az edénynyaláb rendszerben és az azt körülvevő szövetekben, de nem képes befolyásolni a mutáns vírus sejt szintű replikációját.

8. Feltártuk, hogy a defektív interferáló (DI) RNS-ek a p19 fehérje siRNS-el történő telítésével, a p19 defektív mutáns vírus fertőzéséhez hasonlóan, képesek gátolni vírus elterjedését a fertőzött szövetekben.

9. A Tombusvírus családon belül védő és nem védő DI RNS-eket azonosítottunk és meghatároztuk az ezért felelős régiókat a genomikus és DI RNS-eken. Ezek az eredményeink azt mutatják, hogy a genomikus RNS felhalmozódásának gátlásán kívül - ami szükséges a DI RNS-ek védő hatásához - egyéb speciális faktorok is részt vesznek a DI RNS-ek által indukált tünet gyengítésben.

10. Kimutattuk, hogy eltérő növény-vírus interakciókban, tekintet nélkül az adott vírus általános hatásától az endogén miRNS-ek szintjére, mindig határozott és erőteljes miR168 indukciót tapasztaltunk és, hogy a miR168 expresszió és a vírus RNS akkumuláció térben átfed egymással.

11. Kísérleteink megmutatták, hogy a vírusfertőzéseket követő általánosan előforduló *AGO1* mRNS indukció ellenére az AGO1 fehérje szint nem emelkedett, sőt csökkenést mutatott, a vírusfertőzött növényekben. Kimutattuk, hogy az AGO1 fehérje felhalmozódásának gátlásáért közvetlenül a vírusfertőzés által indukált miR168 akkumuláció felelős.

12. Megállapítottuk, hogy a tombusvírusok által kódolt p19 RNS csendesítés szuppresszorok, a jól ismert siRNS kötő aktivitáson kívül, felelősek a miR168 indukcióért és ezen keresztül az AGO1 fehérje felhalmozódásának kontrolljáért. Az eredményeink arra utalnak, hogy a vírusoknak a hatékony fertőzés érdekében egyszerre több szinten kell támadniuk az RNS csendesítés mechanizmusát.

13. Az eredményeink szintén megmutatták, hogy a vírus indukálta miR168 akkumuláció az *AGO1* mRNS transzlációs gátlását idézi elő. Ez alapján elsőként írtuk le, hogy az RNS csendesítés központi molekulája, az AGO1, a miR168 közvetített transzlációs gátlással is szabályozódhat.

6. FELHASZNÁLT IRODALOM

- Achard P, Herr A, Baulcombe DC, Harberd NP** (2004) Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development* **131**: 3357-3365
- Aranda MA, Escaler M, Thomas CL, Maule AJ** (1999) A heat shock transcription factor in pea is differentially controlled by heat and virus replication. *Plant J* **20**: 153-161
- Aranda MA, Escaler M, Wang D, Maule AJ** (1996) Induction of HSP70 and polyubiquitin expression associated with plant virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 15289-15293
- Aukerman MJ, Sakai H** (2003) Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes. *Plant Cell* **15**: 2730-2741
- Baulcombe D** (2004) RNA silencing in plants. *Nature* **431**: 356-363
- Baumberger N, Baulcombe DC** (2005) Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 11928-11933
- Baumberger N, Tsai CH, Lie M, Havecker E, Baulcombe DC** (2007) The Polerovirus silencing suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation. *Curr Biol* **17**: 1609-1614
- Bazzini AA, Almasia NI, Manacorda CA, Mongelli VC, Conti G, Maroniche GA, Rodriguez MC, Distefano AJ, Hopp HE, del Vas M, Asurmendi S** (2009) Virus infection elevates transcriptional activity of miR164a promoter in plants. *BMC Plant Biol* **9**: 152
- Bazzini AA, Hopp HE, Beachy RN, Asurmendi S** (2007) Infection and coaccumulation of tobacco mosaic virus proteins alter microRNA levels, correlating with symptom and plant development. *Proc Natl Acad Sci U S A*
- Beauclair L, Yu A, Bouche N** (2010) microRNA-directed cleavage and translational repression of the copper chaperone for superoxide dismutase mRNA in Arabidopsis. *Plant J* **62**: 454-462
- Berleth T, Sachs T** (2001) Plant morphogenesis: long-distance coordination and local patterning. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 57-62
- Bortolamiol D, Pazhouhandeh M, Marrocco K, Genschik P, Ziegler-Graff V** (2007) The Polerovirus F box protein P0 targets ARGONAUTE1 to suppress RNA silencing. *Curr Biol* **17**: 1615-1621

- 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**: 6739-6746
- 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**: 1185-1190
- Brodersen P, Voinnet O** (2006) The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet* **22**: 268-280
- Buck KW** (1996) Comparison of the replication of positive-stranded RNA viruses of plants and animals. *Adv Virus Res* **47**: 159-251
- Burgyan J** (2008) Role of silencing suppressor proteins. *Methods Mol Biol* **451**: 69-79
- Burgyan J, Hornyik C, Szittya G, Silhavy D, Bisztray G** (2000) The ORF1 products of tombusviruses play a crucial role in lethal necrosis of virus-infected plants. *J Virol* **74**: 10873-10881
- Burgyan J, Rubino L, Russo M** (1991) De novo generation of cymbidium ringspot virus defective interfering RNA. *J Gen Virol* **72 (Pt 3)**: 505-509
- 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)**: 1967-1974
- Carlsbecker A, Lee JY, Roberts CJ, Dettmer J, Lehesranta S, Zhou J, Lindgren O, Moreno-Risueno MA, Vaten A, Thitamadee S, Campilho A, Sebastian J, Bowman JL, Helariutta Y, Benfey PN** Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature* **465**: 316-321
- Carmell MA, Xuan Z, Zhang MQ, Hannon GJ** (2002) The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev* **16**: 2733-2742
- Carrington JC, Kasschau KD, Mahajan SK, Schaad MC** (1996) Cell-to-Cell and Long-Distance Transport of Viruses in Plants. *Plant Cell* **8**: 1669-1681
- Cerutti L, Mian N, Bateman A** (2000) Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends Biochem Sci* **25**: 481-482
- Chang YC, Borja M, Scholthof HB, Jackson AO, Morris TJ** (1995) Host effects and sequences essential for accumulation of defective interfering RNAs of cucumber necrosis and tomato bushy stunt tombusviruses. *Virology* **210**: 41-53

- 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**: 1179-1186
- Chen X** (2004) A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. *Science* **303**: 2022-2025
- Chen X** (2009) Small RNAs and their roles in plant development. *Annu Rev Cell Dev Biol* **25**: 21-44
- 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 siRNA and miRNA mediated pathways. *J Virol*
- 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**: 11768-11780
- Csorba T, Lozsa R, Hutvagner G, Burgyan J** Polerovirus protein P0 prevents the assembly of small RNA-containing RISC complexes and leads to degradation of ARGONAUTE1. *Plant J* **62**: 463-472
- Dalmay T, Rubino L, Burgyan J, Kollar A, Russo M** (1993) Functional analysis of cymbidium ringspot virus genome. *Virology* **194**: 697-704
- Dalmay T, Rubino L, Burgyan J, Russo M** (1992) Replication and movement of a coat protein mutant of cymbidium ringspot tobravirus. *Mol Plant Microbe Interact* **5**: 379-383
- 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**: 9970-9975
- Dugas DV, Bartel B** (2008) Sucrose induction of Arabidopsis miR398 represses two Cu/Zn superoxide dismutases. *Plant Mol Biol* **67**: 403-417
- 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**: 1235-1250
- Dunoyer P, Schott G, Himber C, Meyer D, Takeda A, Carrington JC, Voinnet O** Small RNA duplexes function as mobile silencing signals between plant cells. *Science* **328**: 912-916

- Escaler M, Aranda M, Roberts IM, Thomas C, Maule AJ** (2000) A comparison between virus replication and abiotic stress (heat) as modifiers of host gene expression in pea. *Molecular Plant Pathology* **1**: 159-167
- Escaler M, Aranda MA, Thomas CL, Maule AJ** (2000) Pea embryonic tissues show common responses to the replication of a wide range of viruses. *Virology* **267**: 318-325
- Finnen RL, Rochon DM** (1993) Sequence and structure of defective interfering RNAs associated with cucumber necrosis virus infections. *J Gen Virol* **74 (Pt 8)**: 1715-1720
- Franco-Zorrilla JM, Valli A, Todesco M, Mateos I, Puga MI, Rubio-Somoza I, Leyva A, Weigel D, Garcia JA, Paz-Ares J** (2007) Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nat Genet* **39**: 1033-1037
- Frieden M, Christensen SM, Mikkelsen ND, Rosenbohm C, Thruue CA, Westergaard M, Hansen HF, Orum H, Koch T** (2003) Expanding the design horizon of antisense oligonucleotides with alpha-L-LNA. *Nucleic Acids Res* **31**: 6365-6372
- Golem S, Culver JN** (2003) Tobacco mosaic virus induced alterations in the gene expression profile of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 681-688
- Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ** (2006) miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* **34**: D140-144
- Havelda z** (2008) In situ detection of miRNAs using LNA probes. *Plant microRNA Protocols*. Humana Press, Methods in Molecular Biology (Edited by Pamela Green and Blake Meyers) In press.
- Havelda Z, Burgyan J** (1995) 3' Terminal putative stem-loop structure required for the accumulation of cymbidium ringspot viral RNA. *Virology* **214**: 269-272
- Havelda Z, Dalmay T, Burgyan J** (1995) Localization of cis-acting sequences essential for cymbidium ringspot tombusvirus defective interfering RNA replication. *J Gen Virol* **76 (Pt 9)**: 2311-2316
- Havelda Z, Dalmay T, Burgyan J** (1997) Secondary structure-dependent evolution of Cymbidium ringspot virus defective interfering RNA. *J Gen Virol* **78 (Pt 6)**: 1227-1234
- 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**: 6082-6086

- Havelda Z, Maule AJ** (2000) Complex spatial responses to cucumber mosaic virus infection in susceptible *Cucurbita pepo* cotyledons. *Plant Cell* **12**: 1975-1986
- Havelda Z, Varallyay E, Valoczi A, Burgyan J** (2008) Plant virus infection-induced persistent host gene downregulation in systemically infected leaves. *Plant J* **55**: 278-288
- Hearne PQ, Knorr DA, Hillman BI, Morris TJ** (1990) The complete genome structure and synthesis of infectious RNA from clones of tomato bushy stunt virus. *Virology* **177**: 141-151
- Herr AJ, Baulcombe DC** (2004) RNA silencing pathways in plants. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **69**: 363-370
- Hillman BI, Carrington JC, Morris TJ** (1987) A defective interfering RNA that contains a mosaic of a plant virus genome. *Cell* **51**: 427-433
- 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**: 4523-4533
- Hull R** (2002) *Plant Virology*. Academic Press, London
- Johnston JC, Rochon DM** (1995) Deletion analysis of the promoter for the cucumber necrosis virus 0.9-kb subgenomic RNA. *Virology* **214**: 100-109
- Jones RW, Jackson AO, Morris TJ** (1990) Defective-interfering RNAs and elevated temperatures inhibit replication of tomato bushy stunt virus in inoculated protoplasts. *Virology* **176**: 539-545
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP** (2004) Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell* **14**: 787-799
- Kakani K, Sgro JY, Rochon D** (2001) Identification of specific cucumber necrosis virus coat protein amino acids affecting fungus transmission and zoospore attachment. *J Virol* **75**: 5576-5583
- Kasschau KD, Xie Z, Allen E, Llave C, Chapman EJ, Krizan KA, Carrington JC** (2003) P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. *Dev Cell* **4**: 205-217
- Kauppinen S, Havelda Z** (2008) Detection of siRNAs and miRNAs. *Methods Mol Biol* **451**: 217-227
- Kidner CA, Martienssen RA** (2005) The developmental role of microRNA in plants. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 38-44

- Knorr DA, Mullin RH, Hearne PQ, Morris TJ** (1991) De novo generation of defective interfering RNAs of tomato bushy stunt virus by high multiplicity passage. *Virology* **181**: 193-202
- Kollar A, Dalmay T, Burgyan J** (1993) Defective interfering RNA-mediated resistance against cymbidium ringspot tobravirus in transgenic plants. *Virology* **193**: 313-318
- 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**: 2768-2780
- Lakatos L, Szittya G, Silhavy D, Burgyan J** (2004) Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tobraviruses. *Embo J* **23**: 876-884
- Laufs P, Peaucelle A, Morin H, Traas J** (2004) MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in Arabidopsis meristems. *Development* **131**: 4311-4322
- Le May N, Dubaele S, Proietti De Santis L, Billecocq A, Bouloy M, Egly JM** (2004) TFIIF transcription factor, a target for the Rift Valley hemorrhagic fever virus. *Cell* **116**: 541-550
- 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
- Lim LP, Glasner ME, Yekta S, Burge CB, Bartel DP** (2003) Vertebrate microRNA genes. *Science* **299**: 1540
- Lin SI, Chiang SF, Lin WY, Chen JW, Tseng CY, Wu PC, Chiou TJ** (2008) Regulatory network of microRNA399 and PHO2 by systemic signaling. *Plant Physiol* **147**: 732-746
- Liu PP, Montgomery TA, Fahlgren N, Kasschau KD, Nonogaki H, Carrington JC** (2007) Repression of AUXIN RESPONSE FACTOR10 by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages. *Plant J*
- Maia IG, Seron K, Haenni AL, Bernardi F** (1996) Gene expression from viral RNA genomes. *Plant Mol Biol* **32**: 367-391
- Mallory AC, Bartel DP, Bartel B** (2005) MicroRNA-directed regulation of Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *Plant Cell* **17**: 1360-1375

- Mallory AC, Hinze A, Tucker MR, Bouche N, Gasciolli V, Elmayan T, Lauressergues 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
- Mallory AC, Vaucheret H** (2009) ARGONAUTE 1 homeostasis invokes the coordinate action of the microRNA and siRNA pathways. *EMBO Rep* **10**: 521-526
- Marathe R, Guan Z, Anandalakshmi R, Zhao H, Dinesh-Kumar SP** (2004) Study of *Arabidopsis thaliana* resistome in response to cucumber mosaic virus infection using whole genome microarray. *Plant Mol Biol* **55**: 501-520
- Maule AJ, Havelda Z** (2008) In situ detection of plant viruses and virus-specific products. *Methods Mol Biol* **451**: 201-216
- Mi S, Cai T, Hu Y, Chen Y, Hodges E, Ni F, Wu L, Li S, Zhou H, Long C, Chen S, Hannon GJ, Qi Y** (2008) Sorting of small RNAs into *Arabidopsis* argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell* **133**: 116-127
- Molnar A, Melnyk CW, Bassett A, Hardcastle TJ, Dunn R, Baulcombe DC** Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science* **328**: 872-875
- Morel JB, Godon C, Mourrain P, Beclin C, Boutet S, Feuerbach F, Proux F, Vaucheret H** (2002) Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *Plant Cell* **14**: 629-639
- Moussian B, Schoof H, Haecker A, Jurgens G, Laux T** (1998) Role of the ZWILLE gene in the regulation of central shoot meristem cell fate during *Arabidopsis* embryogenesis. *Embo J* **17**: 1799-1809
- Nagy PD, Pogany J** (2006) Yeast as a model host to dissect functions of viral and host factors in tombusvirus replication. *Virology* **344**: 211-220
- 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
- Palatnik JF, Allen E, Wu X, Schommer C, Schwab R, Carrington JC, Weigel D** (2003) Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* **425**: 257-263
- Palauqui JC, Elmayan T, Pollien JM, Vaucheret H** (1997) Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *Embo J* **16**: 4738-4745

- Pantaleo V, Szittyá G, Burgyan J** (2007) Molecular bases of viral RNA targeting by viral small interfering RNA-programmed RISC. *J Virol* **81**: 3797-3806
- 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**: 2237-2242
- Park MY, Wu G, Gonzalez-Sulser A, Vaucheret H, Poethig RS** (2005) Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 3691-3696
- Pazhouhandeh M, Dieterle M, Marrocco K, Lechner E, Berry B, Brault V, Hemmer O, Kretsch T, Richards KE, Genschik P, Ziegler-Graff V** (2006) F-box-like domain in the polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 1994-1999
- Qi Y, Denli AM, Hannon GJ** (2005) Biochemical specialization within Arabidopsis RNA silencing pathways. *Mol Cell* **19**: 421-428
- Qiu W, Park JW, Jackson AO, Scholthof HB** (2001) Retention of a small replicase gene segment in tomato bushy stunt virus defective RNAs inhibits their helper-mediated trans-accumulation. *Virology* **281**: 51-60
- Qu F, Ye X, Morris TJ** (2008) Arabidopsis DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 14732-14737
- Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP** (2002) Prediction of plant microRNA targets. *Cell* **110**: 513-520
- Rochon DM, Johnston JC** (1991) Infectious transcripts from cloned cucumber necrosis virus cDNA: evidence for a bifunctional subgenomic mRNA. *Virology* **181**: 656-665
- Rubino L, Burgyan J, Russo M** (1995) Molecular cloning and complete nucleotide sequence of carnation Italian ringspot tombusvirus genomic and defective interfering RNAs. *Arch Virol* **140**: 2027-2039
- Russo M, Burgyan J, Martelli GP** (1994) Molecular biology of tombusviridae. *Adv Virus Res* **44**: 381-428
- Scholthof HB, Scholthof KB, Jackson AO** (1995) Identification of tomato bushy stunt virus host-specific symptom determinants by expression of individual genes from a potato virus X vector. *Plant Cell* **7**: 1157-1172
- Scholthof HB, Scholthof KB, Kikkert M, Jackson AO** (1995) Tomato bushy stunt virus spread is regulated by two nested genes that function in cell-to-cell movement and host-dependent systemic invasion. *Virology* **213**: 425-438

- Scholthof K, Scholthof HB, Jackson AO** (1993) Control of Plant Virus Diseases by Pathogen-Derived Resistance in Transgenic Plants. *Plant Physiol* **102**: 7-12
- Scholthof KB, Scholthof HB, Jackson AO** (1995) The effect of defective interfering RNAs on the accumulation of tomato bushy stunt virus proteins and implications for disease attenuation. *Virology* **211**: 324-328
- Scholthof KB, Scholthof HB, Jackson AO** (1995) The tomato bushy stunt virus replicase proteins are coordinately expressed and membrane associated. *Virology* **208**: 365-369
- Senthil G, Liu H, Puram VG, Clark A, Stromberg A, Goodin MM** (2005) Specific and common changes in *Nicotiana benthamiana* gene expression in response to infection by enveloped viruses. *J Gen Virol* **86**: 2615-2625
- Shen B, Goodman HM** (2004) Uridine addition after microRNA-directed cleavage. *Science* **306**: 997
- 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**: 3070-3080
- Song JJ, Liu J, Tolia NH, Schneiderman J, Smith SK, Martienssen RA, Hannon GJ, Joshua-Tor L** (2003) The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol* **10**: 1026-1032
- Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L** (2004) Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* **305**: 1434-1437
- Souret FF, Kastenmayer JP, Green PJ** (2004) AtXRN4 degrades mRNA in *Arabidopsis* and its substrates include selected miRNA targets. *Mol Cell* **15**: 173-183
- Sunkar R, Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK** (2007) Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends Plant Sci*
- Sunkar R, Girke T, Jain PK, Zhu JK** (2005) Cloning and characterization of microRNAs from rice. *Plant Cell* **17**: 1397-1411
- Sunkar R, Zhu JK** (2004) Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 2001-2019
- 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**: 359-372
- Szittya G, Salamon P, Burgyan J** (2000) The complete nucleotide sequence and synthesis of infectious RNA of genomic and defective interfering RNAs of TBSV-P. *Virus Res* **69**: 131-136

- Szittyá G, Silhavy D, Molnár 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**: 633-640
- Tang G, Reinhart BJ, Bartel DP, Zamore PD** (2003) A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev* **17**: 49-63
- Tecsi LI, Smith AM, Maule AJ, Leegood RC** (1996) A Spatial Analysis of Physiological Changes Associated with Infection of Cotyledons of Marrow Plants with Cucumber Mosaic Virus. *Plant Physiol* **111**: 975-985
- Tolstrup N, Nielsen PS, Kolberg JG, Frankel AM, Vissing H, Kauppinen S** (2003) OligoDesign: Optimal design of LNA (locked nucleic acid) oligonucleotide capture probes for gene expression profiling. *Nucleic Acids Res* **31**: 3758-3762
- Tzfira T, Rhee Y, Chen MH, Kunik T, Citovsky V** (2000) Nucleic acid transport in plant-microbe interactions: the molecules that walk through the walls. *Annu Rev Microbiol* **54**: 187-219
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ** (1999) Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *Plant J* **19**: 309-319
- Valoczi A, Hornyik C, Varga N, Burgyan J, Kauppinen S, Havelda Z** (2004) Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res* **32**: e175
- Valoczi A, Varallyay E, Kauppinen S, Burgyan J, Havelda Z** (2006) Spatio-temporal accumulation of microRNAs is highly coordinated in developing plant tissues. *Plant J* **47**: 140-151
- Varallyay E, Burgyan J, Havelda Z** (2007) Detection of microRNAs by Northern blot analyses using LNA probes. *Methods* **43**: 140-145
- Varallyay E, Burgyan J, Havelda Z** (2008) MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probe. *Nature Protocols* **2007.528**: 190-196
- Vargason JM, Szittyá G, Burgyan J, Tanaka Hall TM** (2003) Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell* **115**: 799-811
- Vaucheret H** (2008) Plant ARGONAUTES. *Trends Plant Sci* **13**: 350-358
- 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**: 129-136

- Vaucheret H, Vazquez F, Crete P, Bartel DP** (2004) The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes Dev* **18**: 1187-1197
- Voinnet O** (2008) Post-transcriptional RNA silencing in plant-microbe interactions: a touch of robustness and versatility. *Curr Opin Plant Biol* **11**: 464-470
- Voinnet O, Baulcombe DC** (1997) Systemic signalling in gene silencing. *Nature* **389**: 553
- 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**: 14147-14152
- Wang D, Maule AJ** (1995) Inhibition of host gene expression associated with plant virus replication. *Science* **267**: 229-231
- Wheeler G, Valoczi A, Havelda Z, Dalmay T** (2007) In situ detection of animal and plant microRNAs. *DNA Cell Biol* **26**: 251-255
- White KA, Morris TJ** (1994) Nonhomologous RNA recombination in tombusviruses: generation and evolution of defective interfering RNAs by stepwise deletions. *J Virol* **68**: 14-24
- White KA, Morris TJ** (1999) Defective and defective interfering RNAs of monopartite plus-strand RNA plant viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **239**: 1-17
- White KA, Nagy PD** (2004) Advances in the molecular biology of tombusviruses: gene expression, genome replication, and recombination. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **78**: 187-226
- Whitham SA, Quan S, Chang HS, Cooper B, Estes B, Zhu T, Wang X, Hou YM** (2003) Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant J* **33**: 271-283
- Whitham SA, Yang C, Goodin MM** (2006) Global impact: elucidating plant responses to viral infection. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 1207-1215
- 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
- Yoo BC, Kragler F, Varkonyi-Gasic E, Haywood V, Archer-Evans S, Lee YM, Lough TJ, Lucas WJ** (2004) A systemic small RNA signaling system in plants. *Plant Cell* **16**: 1979-2000
- Yu B, Yang Z, Li J, Minakhina S, Yang M, Padgett RW, Steward R, Chen X** (2005) Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science* **307**: 932-935

dc_35_10

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**: 3255-3268

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Kutatásaimat főként a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézetében (MBK) végeztem. Az intézet főigazgatói közül elsősorban Dr. Balázs Ervinnek szeretnék köszönetet mondani, aki szakdolgozóként irányított majd kutatóként is befogadott az MBK-ba. Köszönöm Dr. Nagy Ferenc volt és Dr. Kiss György Botond jelenlegi főigazgatóknak, hogy lehetőséget biztosítottak munkám elvégzéséhez.

Külön köszönettel tartozom Dr. Burgyán Józsefnek, aki PhD témavezetőm is volt, a lelkiismeretes irányításért, tanácsért és a sok segítségért, amit munkám során tőle kaptam.

Külföldön töltött éveim témavezetője, Dr. Andrew Maule szintén sokat segített abban, hogy új szemlélettel tekinthessek az általam végzett kutatásokra.

Szeretnék köszönetet mondani az összes kollegának, akikkel az évek során együtt dolgoztam, különösen azoknak a fiatal kutatóknak, akik szorosan velem dolgoztak és segítettek ennek a dolgozatnak a létrejöttében, Dr. Hornyik Csabának, Dr. Válóczy Annának és Ágyi Ákosnak.

Felmérhetetlenül sokat segített Szigeti Anikó és Kósa Árpádné Erzsike és Csákányné Tolnai Hajnalka asszisztensek hatékony és megbízható munkája a laboratóriumi munkák sikeres végrehajtásában.

Végül szeretnék köszönetet mondani szűkebb és tágabb családomnak. A legnagyobb köszönet feleségemet Várallyay Évát illeti, aki nemcsak a mindennapokban vesz körül szeretettel és teremti meg a sikeres munkához is szükséges kiegyensúlyozott boldog családi hátteret, hanem közvetlen munkatársamként is nélkülözhetetlen és hatékony munkát végez a kísérletek tervezésében, végrehajtásában és a laboratóriumi munkák irányításában. Hálás köszönet illeti a gyermekeinket a türelemért és szeretetért, amivel körül vesznek és szüleinket az önzetlen támogatásért és a sok segítségért.

8. MELLÉKLETEK

8.1. A különböző miRNS-ek kimutatására tervezett LNA és DNS oligonukleotidok táblázata

Próba neve	a próba szekvenciája (5'-3')	T _m (°C)	miRNA szekvenciája (5'-3')
miR171DNA	gatattggcgcggtcaatca	66	ugauugagccgcgccaauauc
miR171_LNA2	gAtAtTgGcGcGgCtCaAtCa	83	ugauugagccgcgccaauauc
miR171_LNA3	gAtaTtgGcgCggCtcAatCa	78	ugauugagccgcgccaauauc
miR171_LNA3/2MM	gAtaTtgGcgAagCtcAatCa	ND	ugauugagccgcgccaauauc
miR171_LNA3/MM11	gAtaTtgGcgAaggCtcAatCa	ND	ugauugagccgcgccaauauc
miR171_LNA3/MM8	gAtaTtgAcgCggCtcAatCa	ND	ugauugagccgcgccaauauc
miR171_LNA3/MM14	gAtaTtgGcgCggAtcAatCa	ND	ugauugagccgcgccaauauc
miR122a_LNA3	acAaaCacCatTgtCacActCca	78	uggagugugacaaugguguuugu
miR124_LNA3	tgGcaTtcAccGcgTgcCttAa	80	uuaaggcacgcggugaaugcca
miR128_LNA3	aaAagAgaCcgGttCacTgtGa	77	ucacagugaaccggucucuuuu
miR161_LNA3	cCccGatGtaGtcActTtcAa	73	uugaaagugacuacaucggggg
miR167_LNA3	tAgaTcaTgcTggCagCttCa	79	ugaagcugccagcaugaucua
miR319_DNA	gggagctcccttcagtccaa	66	uuggacugaaggagcucucc
miR319_LNA3	ggGagCtcCctTcaGtcCaa	78	uuggacugaaggagcucucc
TCV_LNA3	gAacTtcCggActCtaGgaTc	74	gauccuagaguccggaaguuc

1.táblázat A különböző miRNS-ek kimutatására tervezett LNA és DNS oligonukleotidok
Az LNA nukleotidot-nagybetű, RNS-t és DNS-t kisbetű jelzi, mismatch pirossal jelzett

8.2. Rövidítések jegyzéke

AMCV	- articsóka foltos levélfodrosodás vírus (<i>Artichoke mottled crinkle virus</i>)
AGO	-Argonaute
2b	-a CMV RNS csendesítést gátló fehérjéje
cDNS	-komplementer DNS
crTMV	- keresztesvirágúakat fertőző dohány mosaic virus (<i>Cruciferae infecting Tobacco mosaic virus</i>)
DCL	- DICER gén
DICER	- enzimkomplex, mely a dsRNS siRNS-ekké való hasítását végzi
DIG	- digoxigenin
DI RNS	- defektív interferáló RNS, szubvirális elem
dpi	-infiltrálást követő nap (day post inoculation)
dsRNS	- duplaszálú RNS (double stranded RNA)

dc_35_10

CIRV	- szegfű itáliai gyűrűsfoltosság vírus (<i>Carnation Italian ringspot virus</i>)
CMV	-uborka mozaik vírus (<i>Cucumber mosaic virus</i>)
CNV	-uborka nekrosis vírus (<i>Cucumber necrosis virus</i>)
COX	- mitokondrium kódolt citokróm oxidáz I alegység
CP	-köpenyfehérje (coat protein)
CP29	-kloroplasztisz pigment kötő fehérje
Cph	-ciklofillin
CymRSV	- <i>Cymbidium gyűrűsfoltosság vírus</i> (<i>Cymbidium ringspot virus</i>)
Cym19stop	-mutáns vírus, mely nem kódolja a vírus szuppresszor fehérjét
dsRNS	-kettősszálú RNS
DCL	-DICER-LIKE
GapA/B	-sejtmagban kódolt kloroplasztisz gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz A és B alegység
GAPDH	-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GST	- glutathion-S-transzferáz
HEN1	-HUA ENHANCER1
HST	-HASTY
HYL1	-HYPONASTIC LEAVES1
HSP-70	-Hő sokkfehérje (heatshock protein) 70
kb	-kilobázis
kDa	-kilodalton
LNA2	-locked nucleic acid, minden második nukleotidja van LNA monomerre cserélve
LNA v. LNA3	-locked nucleic acid, minden 3. nukleotidja van LNA monomerre cserélve
MIR	-miRNS gének
MP	-a sejtről-sejtre történő mozgásért felelős fehérje (movement protein)
MPV	- marokkói paprika vírus (<i>Moroccan pepper virus</i>)
miRNS	-mikro RNS (micro RNA)
NRV	- Neckar folyó vírus (<i>Neckar river virus</i>)
nt	-nukleotid
ORF	-nyitott leolvasási keret
PCR	-polimeráz láncreakció
PLCV	- Pelargonium levélgöndörödés vírus (<i>Pelargonium leaf curl virus</i>)
PPD	-PAZ/PIWI DOMAIN

dc_35_10

pre-miRNA	-miRNS prekursor
pri-miRNA	-a miRNS gének transzkriptumai
PSbMV	- borsó maggal-terjedő mozaik vírus (<i>Pea seed-borne virus</i>)
PTGS	-transzkripció utáni géncsendesítés (posttranscriptional gene silencing)
PVX	- burgonya X-vírus (<i>Potato X virus</i>)
RdRP	-RNS-függő RNS-polimeráz enzim
RISC	-siRNS-ekkel indukálható enzimkomplex, mely a mRNS hasítását, vagy a traszlációs gátlást katalizálja (RNA-induced silencing complex)
RMV	- <i>Ribgrass mosaic virus</i>
RNáz	-ribonukleáz
rRNS	- riboszomális RNS
Rubisco	- sejtmag kódolt ribulóz-biszfoszfát karboxiláz
RT-PCR	-reverz transzkriptáz-polimeráz láncreakció
SAM	- S adenozil metionin
SE	-SERRATE
sg	-szubgenomi
siRNS	-kis interferáló RNS (small interfering RNA)
ssRNS	-egyszálú RNS (single strand)
TBSV	- paradicsom bokros törpülés vírus (<i>Tomato bushy stunt virus</i>)
TBSV-P	- paradicsom bokros törpülés vírus paprika izolátum (<i>Tomato bushy stunt virus pepper isolate</i>)
TCV	-tarlórépa göndörödés vírus (<i>Turnip crinkle virus</i>)
TEV	- dohány karcolatos vírus (<i>Tobacco etch virus</i>)
TMV(U1)	- dohány mozaik vírus (<i>Tobacco mosaic virus</i>)(Ui törzs)
TSWV	-paradicsom foltos hervadás vírus (<i>Tomato spotted wilt virus</i>)
Tub	- α tubulin
UTR	-nem transzlálódó régió (untranslated region)
wt	-vad típusú (wild type)
XRN4	- exoribonukleáz
ZLL/zll	-ZWILLE az AGO10 elnevezése <i>Arabidopsis thaliana</i> -ban

8.3. Az értekezéshez kapcsolódó publikációk listája.

Az értekezés alapját képező impakt faktorral rendelkező közlemények.

1. Várallyay E, Válóczy A, Agyi A, Burgyán J and **Havelda Z** (2010) Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation. **The EMBO Journal**, doi:10.1038/emboj.2010.215 (IF: 8.993)
2. Várallyay E., Burgyán J. and **Havelda Z.** (2008) MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probe. **Nature Protocols**, 3:(2) 190-196. (IF: 4.170)
3. Várallyay E., Burgyán J. and **Havelda Z.** (2007) Detection of microRNAs by northern blot analyses using LNA probes. *METHODS: A COMPANION TO METHODS IN ENZYMOLOGY*, 43 (2) : 140-45 (IF: 3.667)
4. **Havelda Z.**, Várallyay E, Válóczy A and Burgyán J (2008) Plant virus infection-induced persistent host gene downregulation in systemically infected leaves. **Plant Journal**, 55:(2) pp. 278-288. (IF: 6.493)
5. Wheeler G, Válóczy A, **Havelda Z** and Dalmay T. (2007) In situ detection of animal and plant microRNAs. *DNA and Cell Biology*, 26(4):251-5. (IF: 1.861)
6. Válóczy A, Várallyay E, Kauppinen S, Burgyán J, **Havelda Z.** (2006) Spatio-temporal accumulation of microRNAs is highly coordinated in developing plant tissues. **Plant J.** 47(1):140-51. (IF: 6.565)
7. Hornyik C, **Havelda Z.**, Burgyán J. (2006) Identification of sequence elements of tombusvirus-associated defective interfering RNAs required for symptom modulation. **Arch Virol.** 151(3):625-33. (IF: 1.850)
8. **Havelda, Z.**, Hornyik C., Válóczy A. and Burgyán, J. (2004) Defective interfering RNA hinders the activity of tombusvirus encoded post-transcriptional gene silencing suppressor. **J. Virol.** 79 (1):450-7. (IF: 5.178)
9. Simon AE, Roossinck MJ and **Havelda Z** (2004) Plant virus satellite and defective interfering RNAs: New paradigms for a new century. **ANNUAL REVIEW OF PHYTOPATHOLOGY** 42: pp. 415-437. (IF: 6.714)
10. Válóczy A., Hornyik C., Varga N., Burgyán, J., Kauppinen S. and **Havelda, Z.**, (2004) Sensitive and specific detection of microRNAs by Northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes. **Nucleic Acid Research** 14;32(22):e175. (IF: 7.260)
11. **Havelda, Z.**, Hornyik, C., Crescenzi, A., and Burgyán, J. (2003). In situ characterization of Cymbidium Ringspot Tombusvirus infection-induced posttranscriptional gene silencing in *Nicotiana benthamiana*. **J Virol** 77, 6082-6086. (IF: 5.225)

12. **Havelda, Z.**, and Maule, A.J. (2000). Complex spatial responses to cucumber mosaic virus infection in susceptible *Cucurbita pepo* cotyledons. **Plant Cell** 12, 1975-1986. (IF: 11.093)
13. **Havelda, Z.**, Szittyá, G., and Burgyan, J. (1998). Characterization of the molecular mechanism of defective interfering RNA-mediated symptom attenuation in tombusvirus-infected plants. **J Virol** 72, 6251-6256. (IF: 5.828)

Az értekezéshez kapcsolódó könyvfejezetek.

14. **Havelda Z.** (2010) *In situ* detection of miRNAs using LNA probes. *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, (Edited by Pamela Green and Blake C. Meyers) pp. 127-136.
15. **Havelda Z.** (2009) Biogenesis and function of plant microRNAs. In *Regulation of Gene Expression by Small RNAs.*, CRC press, (Edited by Dr. John Rossi and Rajesh K. Gaur) 173-196.
16. Kauppinen S. and **Havelda Z.** (2008) Detection of siRNAs and miRNAs. *Plant Virology Protocols in the Methods in Molecular Biology*, Humana Press, (Edited by P. Nagy, G. Foster and E. Johansen) pp. 217-227.
17. Maule A.J. and **Havelda Z.** (2007) *In situ* detection of plant viruses and virus-specific products. *Plant Virology Protocols in the Methods in Molecular Biology*, Humana Press, (Edited by P. Nagy, G. Foster and E. Johansen) pp. 201-216 .

További, a témához kapcsolódó impakt faktoros publikáció.

18. Szittyá, G., Silhavy, D., Molnár, A., **Havelda, Z.**, Lovas, A., Lakatos, L., Banfalvi, Z., and Burgyan, J. (2003). Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. **EMBO J.** 22, 633-640. (IF: 10.456)
19. Mérai Zs, Kerényi Z, Molnár A, Barta E, Válczi A, Bisztray Gy, **Havelda Z**, Burgyán J, Silhavy D. (2005) Aureusvirus P14 is an Efficient RNA Silencing Suppressor that Binds Double-stranded RNAs without Size Specificity. **J. Virol.** 79(11):7217-26. (IF: 5.178)

dc_35_10

Az összes közlemény száma: **26**

Az összes közlemény impact factora: **103.568**

Az összes közleményre kapott összes hivatkozás száma: **602**

Az összes közleményre kapott független hivatkozás száma: **510**

Az összes első és utolsó szerzős referált közlemény száma és impact factora: **14, IF 81,36**

A dolgozatban szereplő közlemények száma: **13**

A dolgozatban szereplő közlemények impact faktora: **74.897**

A dolgozatban szereplő első és utolsó szerzős közlemények száma és impact faktora: **11, IF: 71.186**

8.4. Az értekezéshez kapcsolódó publikációk első oldalainak másolata.

Az értekezés alapját képező impakt faktorral rendelkező közlemények.

JOURNAL OF VIROLOGY, July 1998, p. 6251–6256
 0022-538X/98/\$04.00+0
 Copyright © 1998, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 72, No. 7

Characterization of the Molecular Mechanism of Defective Interfering RNA-Mediated Symptom Attenuation in Tombusvirus-Infected Plants

ZOLTÁN HAVELDA, GYÖRGY SZITTYA, AND JÓZSEF BURGYÁN*

*Agricultural Biotechnology Center, Plant Science Institute,
 2101 Gödöllő, Hungary*

Received 11 December 1997/Accepted 9 April 1998

Different tombusviruses were able to support the replication of either homologous or heterologous defective interfering (DI) RNAs, and those infected plants usually developed typical attenuated symptoms. However, in some helper virus-DI RNA combinations the inoculated plants were necrotized, although they contained a high level of DI RNA, suggesting that the accumulation of DI RNA and the resulting suppression of genomic RNA replication were not directly responsible for the symptom attenuation. Moreover, the 19-kDa protein product of ORF 5, which is known to play a crucial role in necrotic symptom development, accumulated at the same level in the infected plants in the presence of protective homologous DI RNA and in the presence of nonprotective heterologous DI RNA. It was also demonstrated, by chimeric helper viruses, that the ability of heterologous DI RNA to protect the virus-infected plants against systemic necrosis is determined by the 5'-proximal region of the helper virus genome. The results presented suggest that DI RNA-mediated protection did not operate via the specific inhibition of 19-kDa protein expression but, more likely, DI RNAs in protective DI-helper virus combinations specifically interacted with viral products, preventing the induction of necrotic symptoms.

Defective interfering (DI) RNAs are shortened forms of viral genomes that have generally lost all essential viral genes for movement, replication, and encapsidation. DI RNAs require the presence of a helper virus to provide *trans*-acting factors necessary for replication and often multiply and accumulate at the expense of the helper virus from which they originated. Interference with the helper virus frequently results in remarkable symptom attenuation (16, 18). The most extensively studied plant virus DI RNA systems are those found in association with tombusviruses and carmoviruses (18, 25).

The genome of a tombusvirus is a linear, single-stranded monopartite RNA molecule of positive polarity, about 4,700 nucleotides long, that contains five open reading frames (ORFs) coding for proteins with approximate molecular masses of 33, 92, 22, and 19 kDa and for the coat protein (41 kDa) (18). The genomic RNA (ca. 4,700 nucleotides) acts as mRNA for the production of a 33-kDa protein (p33; ORF 1), and by readthrough of an amber termination codon, a 92-kDa protein (p92; ORF 2) is synthesized. It was demonstrated elsewhere that both p33 and p92 are required for viral replication (6, 12, 23). The 41-kDa coat protein (ORF 3) is translated from the subgenomic RNA 1 (sg1 RNA) (18). The two nested ORFs (4 and 5) are located at the 3' terminus of the virus genome, encoding a 22-kDa (p22) protein and a 19-kDa (p19) protein, respectively. Both p22 and p19 are translated from sg2 RNA (18). p22 is required for cell-to-cell movement (6, 15, 20) and is also involved in symptom determination (21). Although the precise function of p19 has not been elucidated, it has an important role in necrotic symptom development (6, 15, 21). It is also

suggested that p19 participates in virus spread in a host-specific manner (22).

Several reports from different laboratories demonstrated the presence and generation of DI RNAs in infection with tombusviruses: tomato bushy stunt virus cherry strain (TBSV-Ch [9]), Cymbidium ringspot virus (CymRSV [2, 3]), cucumber necrosis virus (7, 14), carnation Italian ringspot virus (CIRV [17]), and tomato bushy stunt virus pepper isolate (TBSV-P [this paper]). Sequence analyses revealed that tombusvirus DI RNAs possess a common structural arrangement containing conserved sequence blocks derived from the 5'-proximal terminus, an internal region of the replicase gene, and the 3'-proximal terminus of the viral genome (18, 26). The presence of DI RNAs in virus-infected plants suppresses the virus accumulation and attenuates the lethal necrotic symptoms regardless of whether DI RNA was in the inoculum or was provided by transgenic *Nicotiana benthamiana* plants expressing CymRSV DI-13 RNA (11). The implications of tombusvirus DI RNAs in symptom attenuation were considered on two levels. A general competition for viral replicase between the genomic RNA and the more competitive DI RNAs probably occurs (10), and symptom attenuation appears via a selective inhibition of expression of p19 and p22, which are important symptom determinants (24).

The aim of the present study was to analyze the mechanism of DI RNA-mediated symptom attenuation in tombusvirus-infected plants containing either homologous or heterologous DI RNAs. For this purpose, we used the previously described biologically active cDNA clones of genomic RNAs of CymRSV (6) and CIRV (3) and the corresponding DI RNAs (DI-13 RNA of CymRSV [11] and DI-7 RNA of CIRV [17]). In addition, a new tombusvirus (TBSV-P) was isolated from pepper plants (*Capsicum annuum* L.) in a Hungarian greenhouse. The virus genome was cloned and sequenced, and a full-length TBSV-P cDNA clone was prepared (4), from which highly infectious *in vitro* RNA transcripts could be transcribed with

* Corresponding author. Mailing address: Agricultural Biotechnology Center, Plant Science Institute, P.O. Box 411, 2101 Gödöllő, Hungary. Phone: (36-28)430-600. Fax: (36-28)430-482. E-mail: burgyan@abc.hu.

Complex Spatial Responses to Cucumber Mosaic Virus Infection in Susceptible *Cucurbita pepo* Cotyledons

Zoltan Havelda and Andrew J. Maule¹

John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UH, United Kingdom

Cucumber mosaic virus infection of its susceptible host *Cucurbita pepo* results in a program of biochemical changes after virus infection. Applying a spatial analysis to expanding infected lesions, we investigated the relationship between the changes in enzyme activity and gene expression. Patterns of altered expression were seen that could not be detected by RNA gel blot analysis. For all the host genes studied, there was a downregulation (shutoff) of expression within the lesion. In addition, two distinct types of upregulation were observed. The expression of *heat shock protein 70* (HSP70) and *NADP⁺-dependent malic enzyme* (NADP-ME) showed induction in apparently uninfected cells ahead of the infection. This response was more localized than the upregulation exhibited by *catalase* expression, which occurred throughout the uninfected regions of the tissue. The experiments showed that virus infection induced immediate and subsequent changes in gene expression by the host and that the infection has the potential to give advance signaling of the imminent infection.

INTRODUCTION

In a compatible interaction between a virus and its host, there must be substantial diversion of metabolites into the accumulation of virus-specific proteins and nucleic acids. In most susceptible plants, this interaction is not accompanied by cell death, and infected cells continue to function despite the presence of massive quantities of virus-specific products. This diversion of resources is evident in the whole plant as changes in plant physiology, growth, and development, that is, symptom formation. How plant cells accommodate virus synthesis while still sustaining some capacity in the plant for further growth is relatively poorly understood. We would expect the exploitation of host metabolism to be transitory, however, thus reducing the immediate damage to the host to a window of time sufficient for the exponential accumulation of progeny virus to a maximally tolerated amount. Because plant viruses invade host tissues progressively, such transitory effects would be spatially restricted and not necessarily detectable by gross analysis of the infected tissues.

Strong support for the transitory nature of responses to virus infection came from a unique study that applied a spatial analysis to changes in host physiology after infection of squash/marrow (*Cucurbita pepo*) cotyledons with *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Técsi et al., 1996). The study showed that relative to an advancing infection front, changes in pri-

mary and secondary metabolism occurred at specific times after the onset of virus replication and virus gene expression. Hence, the center of the lesion had an increase in glycolysis and respiration and a decrease in the Benson–Calvin cycle. Conversely, at the extreme edge of the lesion, the enzymes involved in mobilizing carbon for macromolecular synthesis (anaplerotic reactions) had a transient increase in activity. For these enzymes, the earliest change was seen for the NADP⁺-dependent malic enzyme (NADP-ME) (Técsi et al., 1996). There was also a corresponding increase of other anaplerotic activities (e.g., glucose-6-phosphate dehydrogenase [G6P-DH]) of the oxidative pentose phosphate pathway, which persisted into the center of the lesion. This led to the proposition that virus infection triggered a program of physiological responses that resulted in symptom expression.

Transient responses have also been observed in pea tissues infected with *Pea seed-borne mosaic virus* (potyvirus), *Pea early browning virus* (tobravirus), *White clover mosaic virus* (potexvirus), or *Beet curly top virus* (geminivirus) (Wang and Maule, 1995; Aranda et al., 1996; Escaler et al., 2000a), although these cases assessed changes in host gene expression rather than in host physiology. In infected pea tissues, three patterns of gene expression relative to an advancing infection front were observed. Many host gene transcripts were depleted in a zone occupying 10 to 12 cells behind the infection front, a phenomenon akin to the shutoff of host genes observed for many animal virus infections (Aranda and Maule, 1998). Some other host genes—*heat shock protein 70* (HSP70), *polyubiquitin*,

¹ To whom correspondence should be addressed. E-mail andy.maule@bbsrc.ac.uk; fax 44-1603-450045.

In Situ Characterization of *Cymbidium Ringspot Tombusvirus* Infection-Induced Posttranscriptional Gene Silencing in *Nicotiana benthamiana*

Zoltán Havelda,^{1*} Csaba Hornyik,¹ Aniello Crescenzi,² and József Burgyán¹

Agricultural Biotechnology Centre, H-2101 Gödöllő, Hungary,¹ and Dipartimento di Biologia, Difesa e biotecnologie Agro-Forestali, Università degli Studi della Basilicata, Campus Macchia Romana, I-85100 Potenza, Italy²

Received 6 November 2002/Accepted 17 February 2003

In plants, posttranscriptional gene silencing (PTGS) is an ancient and effective defense mechanism against viral infection. A number of viruses encode proteins that suppress virus-activated PTGS. The p19 protein of tombusviruses is a potent PTGS suppressor which interferes with the onset of PTGS-generated systemic signaling and is not required for viral replication or for viral movement in *Nicotiana benthamiana*. This unique feature of p19 suppressor allowed us to analyze the mechanism of PTGS-based host defense and its viral suppression without interfering with other viral functions. In contrast to the necrotic symptoms caused by wild-type tombusvirus, the infection of p19-defective mutant virus results in the development of a typical PTGS-associated recovery phenotype in *N. benthamiana*. In this report we show the effect of PTGS on the viral infection process for *N. benthamiana* infected with either wild-type *Cymbidium Ringspot Tombusvirus* (CymRSV) or a p19-defective mutant (Cym19stop). In situ analyses of different virus-derived products revealed that PTGS is not able to reduce accumulation of virus in primary infected cells regardless of the presence of p19 PTGS suppressor. We also showed that both CymRSV and Cym19stop viruses move systemically in the vasculature, with similar efficiencies. However, in contrast to the uniform accumulation of CymRSV throughout systemically infected leaves, the presence of Cym19stop virus was confined to and around the vascular bundles. These results suggest that the role of p19 is to prevent the onset of mobile signal-induced systemic PTGS ahead of the viral infection front, leading to generalized infection.

Almost all eukaryotes possess a homology-dependent RNA degradation system that has evolved to protect against invasive or mobile foreign genetic elements. This mechanism is referred to as posttranscriptional gene silencing (PTGS) for plants, gene quelling for fungi, and RNA interference for animals (14, 26, 30). The targets could be transgenes, viruses, or transposons or any RNA homologous to the inducer molecules that are degraded by activated PTGS. The mechanism of virus-induced PTGS is not completely understood, but double-stranded (ds) RNA replication intermediates of an RNA virus are strong inducers (28). The accumulation of small 21- to 25-nucleotide-long interfering RNAs (siRNAs) corresponding to both plus and minus strands of the inducer RNA are a characteristic of PTGS (29). In addition to the cell-autonomous defense function in higher plants, PTGS is associated with a mobile signal that instructs target RNA degradation at a distance (16; O. Voinnet and D. C. Baulcombe, Letter, *Nature* **389**:553, 1997). The mobile signal, which must consist at least in part of homologous RNA, is suggested to spread from cell to cell through plasmodesmata and systemically via the vascular system of plants (15). The findings that plant viruses encode proteins that suppress PTGS provide the most compelling evidence for the function of PTGS as a natural antiviral defense mechanism (12, 13, 25). Several virus-encoded RNA silencing suppressor proteins have been characterized to date

(25). These suppressor proteins act at different stages of the silencing pathway, targeting the initiation, the maintenance, or the systemic signaling events of PTGS (4, 12).

The members of the genus of *Tombusvirus* contain a positive-sense single-stranded RNA genome with five open reading frames (ORFs) (19). ORF5 of tombusviruses encodes a 19-kDa protein (p19) which is one of the best-characterized PTGS suppressor protein and is also a pathogenicity determinant (2, 5, 20). p19 blocks systemic, but not local, virus-induced silencing and binds PTGS-generated ds siRNAs in vitro (21, 22). It may act by sequestering the PTGS specificity determinant ds siRNAs, thereby preventing the induction of systemic PTGS signaling. The majority of viral suppressor proteins identified so far are also involved in additional viral functions (e.g., they are required for cell-to-cell trafficking [27], long-distance movement [7, 11], and replication [11]). Recent data suggest that some of these activities may be connected to PTGS suppressor activity (11). However, the silencing suppressor activity of p19 is uncoupled from viral movement and replication functions in *N. benthamiana* (17, 18, 22). This feature of p19 provides a unique experimental system for investigating plant responses to a wild-type virus versus a p19 mutant virus that is defective only in PTGS suppressor activity. Infection with p19-defective tombusviruses (e.g., Cym19stop) resulted in the development of a typical PTGS-associated recovery phenotype for *N. benthamiana* (17, 18, 22). The recovered leaves of Cym19stop-infected plants were resistant to infection by another recombinant virus carrying a sequence element homologous to that of the inducing virus (22).

The work presented here addresses the role of systemic

* Corresponding author. Mailing address: Agricultural Biotechnology Centre, Szent-Györgyi Albert út 4, P.O. Box 411, H-2101 Gödöllő, Hungary. Phone: 36-28-526-100. Fax: 36-28-526-145. E-mail: havelda@abc.hu.

PLANT VIRUS SATELLITE AND DEFECTIVE INTERFERING RNAs: New Paradigms for a New Century

Anne E. Simon

Department of Cell Biology and Molecular Genetics, University of Maryland College
Park, College Park, Maryland 20742; email: Anne.Simon@umail.umd.edu

Marilyn J. Roossinck

The Noble Foundation, Plant Biology Division, Ardmore, Oklahoma 73402;
email: mroossinck@noble.org

Zoltán Havelda

Agricultural Biotechnology Center, Plant Biology, Gödöllő, Hungary;
email: havelda@abc.hu

Key Words subviral RNAs, virus-induced gene silencing, *Turnip crinkle virus*,
Cucumber mosaic virus, *Tomato bushy stunt virus*

■ **Abstract** Although many subviral RNAs reduce or intensify disease symptoms caused by the helper virus, only recently have clues concerning the mechanism of disease modulation been revealed. New models for DI RNA-mediated reduction in helper virus levels and symptom attenuation include DI RNA enhancement of post-transcriptional gene silencing (PTGS), which is an antiviral defense mechanism in plants. Symptom enhancement by the satRNA of *Cucumber mosaic virus* is caused by minus-strand induction of the programmed cell death pathway. In contrast, symptom enhancement by satC of *Turnip crinkle virus* is due to satC interference with virion formation, leading to increased levels of free coat protein, which is the viral suppressor of PTGS. Mutualism between satRNA and helper virus can be seen for the satRNA of *Groundnut rosette virus*, which contributes to the virus by allowing virion assembly. These novel findings are leading to re-evaluation of the relationships between subviral RNAs, helper viruses, and hosts.

INTRODUCTION

One feature that distinguishes plant viruses from animal viruses is their common association with a variety of subviral RNAs. Subviral RNAs can be distinguished from the viral genome by their dispensability for normal virus propagation. Subviral RNA replication is completely dependent on enzymes encoded by their helper virus and thus amplification is limited to coinfecting cells. There are two subgroups

Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes

Anna Válczi, Csaba Hornyik, Nóra Varga, József Burgyán, Sakari Kauppinen¹ and Zoltán Havelda*

Agricultural Biotechnology Center, Szent-Györgyi Albert ut 4, Gödöllő H-2100, Hungary and ¹Department of Functional Genomics, Exiqon, Byggestubben 9, DK-2950 Vedbaek, Denmark

Received September 29, 2004; Revised and Accepted November 16, 2004

ABSTRACT

We describe here a new method for highly efficient detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA (locked nucleic acid)-modified oligonucleotides. In order to exploit the improved hybridization properties of LNA with their target RNA molecules, we designed several LNA-modified oligonucleotide probes for detection of different microRNAs in animals and plants. By modifying DNA oligonucleotides with LNAs using a design, in which every third nucleotide position was substituted by LNA, we could use the probes in northern blot analysis employing standard end-labelling techniques and hybridization conditions. The sensitivity in detecting mature microRNAs by northern blots was increased by at least 10-fold compared to DNA probes, while simultaneously being highly specific, as demonstrated by the use of different single and double mismatched LNA probes. Besides being highly efficient as northern probes, the same LNA-modified oligonucleotide probes would also be useful for miRNA *in situ* hybridization and miRNA expression profiling by LNA oligonucleotide microarrays.

INTRODUCTION

MicroRNAs (miRNAs) are 19–25 nt non-coding RNAs that are processed from longer endogenous hairpin transcripts by the enzyme Dicer (1,2). To date, >1100 microRNAs have been identified in invertebrates, vertebrates and plants according to the miRNA registry database and many miRNAs that correspond to putative genes have also been identified (3). Some miRNAs have multiple loci in the genome (4) and occasionally, several miRNA genes are arranged in tandem clusters (5). Growing evidence suggests that miRNAs play crucial roles in eukaryotic gene regulation. The first miRNA genes to be discovered, *lin-4* and *let-7*, base-pair incompletely to repeated elements in the 3' untranslated regions (UTRs) of other

heterochronic genes in *Caenorhabditis elegans*, and regulate the translation directly and negatively by antisense RNA–RNA interaction (6,7). Other miRNAs are thought to interact with target mRNAs by limited complementarity and suppressed translation as well (5,8). Many studies have shown, however, that given a perfect complementarity between miRNAs and their target RNA, could lead to target RNA degradation rather than inhibit translation (9,10), suggesting that the degree of complementarity determines their functions. By identifying sequences with near complementarity, several targets have been predicted, most of which appear to be potential transcriptional factors that are crucial in cell growth and development. The high percentage of predicted miRNA targets acting as developmental regulators and the conservation of target sites suggests that miRNAs exhibit a wide variety of regulatory functions and exert significant effects on cell growth, development and differentiation (11,12), including human development and disease. For example, a recent study determined that two different human miRNA genes (*miR15a* and *miR16a*) are clustered and located within the intron of *LEU2*, which, in turn, lies within the deleted minimal region of the B-cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL) tumour suppressor locus, and that both miRNA genes are deleted or down-regulated in the majority of CLL cases (13).

The current view that miRNAs represent a newly discovered, hidden layer of gene regulation has resulted in high interest among researchers in the discovery of miRNAs, their targets, expression and mechanism of action. Most miRNA researchers use northern blot analysis combined with polyacrylamide gels to examine the expression of both the mature and precursor miRNAs, since it allows both quantitation of the expression levels as well as miRNA size determination (5,7,8,13). A major drawback of this method is its poor sensitivity, especially when monitoring expression of low-abundant miRNAs. Consequently, a large amount of total RNA per sample is required for northern analysis, which is not feasible when the cell or tissue source is limited. We describe here a new method for highly efficient detection of miRNAs by northern blot analysis using locked nucleic acid (LNA)-modified oligonucleotide probes, and demonstrate its significantly improved sensitivity and high specificity by

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +36 28 526100; Fax: +36 28 526145; Email: havelda@abc.hu
Correspondence may also be addressed to Sakari Kauppinen. Tel: +45 45 66 08 88; Fax: +45 45 66 18 88; Email: sk@exiqon.com

Defective Interfering RNA Hinders the Activity of a Tombusvirus-Encoded Posttranscriptional Gene Silencing Suppressor

Zoltán Havelda,*† Csaba Hornyik,† Anna Válczi, and József Burgián

Agricultural Biotechnology Center, Institute of Plant Biology, Gödöllő, Hungary

Received 20 May 2004/Accepted 13 August 2004

Defective interfering (DI) RNAs are subviral replicons originating from the viral genome and are associated with many plant RNA viruses and nearly all animal RNA viruses. The presence of DI RNAs in tombusvirus-infected plants reduces the accumulation of helper virus RNA and results in the development of attenuated symptoms similar to those caused by tombusviruses defective in p19, the posttranscriptional gene silencing (PTGS) suppressor. In situ analysis of infected plants containing DI RNAs revealed that the extent of virus infection was spatially restricted as was found for p19-defective tombusvirus. Previously, p19 was shown to suppress PTGS by sequestering the small interfering RNAs (siRNAs), which act as the specificity determinant for PTGS. Our results demonstrate that DI RNAs dramatically elevate the level of virus-specific siRNAs in viral infections, resulting in the saturation of p19 and the accumulation of unbound siRNAs. Moreover, we showed that, at low temperature, where PTGS is inhibited, DI RNAs are not able to efficiently interfere with virus accumulation and protect the plants. These data show that the activation of PTGS plays a pivotal role in DI RNA-mediated interference. Our data also support a role for 21-nucleotide siRNAs in PTGS signaling.

Defective interfering (DI) RNAs are deletion mutant RNAs of the parental viral genome generated spontaneously by replicase errors and are associated with many plant RNA viruses and nearly all animal RNA viruses (17). DI RNAs generally have lost essential viral genes for movement, replication, and encapsidation and thus require the presence of a helper virus for providing all the *trans*-acting proteins necessary for these functions. Interference with the helper virus by the DI RNA frequently results in remarkable symptom modification associated with a substantial decrease in helper virus levels (22).

Some of the most extensively studied plant virus DI RNA systems are those found in association with species of the *Tombusvirus* genus (18). Tombusviruses have a plus-sense RNA genome of about 4.7 kb that contains five open reading frames (ORF). ORF5 encodes a 19-kDa protein (p19) that is an important symptom determinant (1, 19). In addition, p19 has been identified as a potent posttranscriptional gene silencing (PTGS) suppressor (21, 23, 30). A number of DI RNAs from tombusvirus infections have been described (32), and all possess common structural features, which include noncontiguous elements corresponding to the terminal regions and an internal segment of the parental genome (18). DI RNAs do not code for any proteins and replicate by utilizing helper virus-encoded RNA-dependent RNA-polymerase. The presence of DI RNAs in virus-infected plants dramatically suppresses virus accumulation and attenuates the lethal necrotic symptoms normally associated with infection of the helper virus. A general assumption is that the reduction in helper virus levels by DI RNAs is due to competition for replication

components, which in turn leads to development of attenuated symptoms (17, 18). Protoplast transfection experiments demonstrated that DI RNAs interfere with the accumulation of helper virus (2, 10, 14). Analyses of protoplasts cotransfected with tomato bushy stunt virus (TBSV) and DI RNAs revealed that suppression of the viral genomic RNA was mediated by a reduction in the rate at which the viral genomic RNA accumulated (10). Other studies suggested that the presence of TBSV DI RNAs specifically reduces the level of subgenomic (sg) RNA 2, which encodes the movement protein and p19 (20). Recently it was demonstrated that DI RNAs of cymbidium ringspot virus (CymRSV) activate PTGS, which efficiently targets the helper virus genome, while DI RNAs are poor targets for degradation (23). These results strongly suggested the involvement of PTGS in DI RNA-mediated symptom modulation.

PTGS is an adaptive, sequence-specific RNA degradation system that plays a role in the control of transposons, preservation of genome integrity, and defense against viruses (28, 31). This mechanism is activated by double-stranded (ds) RNA (dsRNA), which is cleaved into 21- to 26-nucleotide (nt) ds small interfering RNAs (siRNAs) (4) by an RNase III-like enzyme called DICER (5). The siRNAs generated are associated with an enzyme complex called RNA-induced silencing complex (RISC) and guide the RISC to degrade any RNA with sequence homology to the inducer dsRNA. In plants, in addition to its cell-autonomous defense function, PTGS is associated with a mobile signal that instructs target RNA degradation at a distance (29). The sequence specificity of PTGS implies that the signal must consist of nucleic acid components homologous to the target RNA. Previously it has been reported that longer siRNAs are associated with PTGS long-distance signaling (3); however, a recent study suggests that 21-nt siRNAs play a central role in short-distance and probably

* Corresponding author. Mailing address: Agricultural Biotechnology Center, Institute of Plant Biology, P.O. Box 411, 2100 Gödöllő, Hungary. Phone: 36 28 526100. Fax: 36 28 526145. E-mail: havelda@abc.hu.

† Z.H. and C.H. contributed equally to this work.

Author's address: Dr. Zoltán Havelda, Agricultural Biotechnology Center, Plant Biology Institute, Szent-Györgyi A. út 4, Gödöllő, 2100 Hungary; e-mail: havelda@abc.hu

Arch Virol (2006) 151: 625–633
DOI 10.1007/s00705-005-0651-5

**Archives of
Virology**
Printed in Austria

Identification of sequence elements of tombusvirus-associated defective interfering RNAs required for symptom modulation

Brief Report

C. Hornyik, Z. Havelda, and J. Burgyán

Agricultural Biotechnology Center, Plant Biology Institute, Gödöllő, Hungary

Received June 6, 2005; accepted August 18, 2005
Published online November 17, 2005 © Springer-Verlag 2005

Summary. Defective interfering (DI) RNAs of tombusviruses are short, non-coding, symptom-modulating RNAs originating from the viral genome. The presence of homologous DI RNA in virus infection attenuates the otherwise lethal viral symptoms. *Nicotiana benthamiana* plants infected with tomato bushy stunt tombusvirus pepper isolate (TBSV-P) show severe symptoms, which culminate in the death of the plant. In contrast, plants co-inoculated with TBSV-P and TBSV-P-derived DI RNA display attenuated symptoms. However, co-inoculation of TBSV-P with heterologous DI RNA, originating from Carnation Italian ringspot tombusvirus results in development of apical necrotic symptoms. To localize the symptom-determining factors on DI RNA genome, chimeras of protective and non-protective DI RNAs have been constructed. All chimeras were biologically active and accumulated to a high level in the presence of helper virus. We identified a 5' proximal sequence element of the DI RNA as the most important symptom determinant region. However, our results demonstrated that the symptom modulating ability of this region is also influenced by the sequence composition of whole DI RNAs.

*

The members of the genus *Tombusvirus* contain a positive-sense single stranded RNA genome about 4700 nucleotides with five open reading frames (ORF) [10]. Several defective interfering (DI) RNAs have been described in tombusvirus infections, and all possess common structural features that maintain non-contiguous elements of the parental genome corresponding to 5' terminal region (A block), an internal segment (B block), and a 3' terminal region (C block) ([10], Fig. 1a). DI RNAs of tombusviruses represent about the one tenth of the size of the viral genome and have lost all coding capacity [18]. They are incapable of autonomous



Detection of microRNAs by Northern blot analyses using LNA probes

Éva Várallyay, József Burgyán, Zoltán Havelda *

Agricultural Biotechnology Center, Szent-Györgyi Albert ut 4, Gödöllő H-2100, Hungary

Accepted 13 April 2007

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are small, endogenous, non-coding RNA species, about 21 nucleotides in length, which modulate the expression of animal and plant target genes at the post-transcriptional level. It has been shown that miRNA based gene regulation plays a pivotal role in pathways involved in growth and development. Understanding miRNA mediated processes requires new technologies enabling efficient detection of small RNA species. Here we report the optimization of a miRNA Northern blot detection method based on LNA (locked nucleic acid)-modified oligonucleotide hybridization. This technique allows sensitive and highly specific detection of mature miRNAs.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: MicroRNA; LNA (locked nucleic acid); Northern blot

1. Introduction

Northern blot analysis of small RNA species, such as miRNAs, is a widely used technique to assess accumulation levels of miRNAs of interest. This technique, combined with polyacrylamide gel electrophoresis, allows examination of expression properties of target miRNAs, determination of their sizes, and validation of predicted miRNAs. However, the main drawback of this method is its low sensitivity which creates a requirement for large amounts of total RNA for samples. This disadvantage is especially pronounced when monitoring expression of low-abundant miRNAs or when cell or tissue source of RNA samples is limited.

To evade the sensitivity problem of miRNA Northern blotting technology, locked nucleic acid (LNA)-modified oligonucleotide probes were used to enhance the efficiency of hybridization [1]. LNA-modified oligonucleotides have been shown to exhibit improved thermal stability when hybridized to their target molecules [2,3]. LNA monomers are bicyclic, high-affinity RNA analogues having a modified

ribose moiety [4]. In LNAs the furanose ring in the sugar-phosphate backbone is chemically locked in an N-type (C3'-endo) conformation by the introduction of a 2'-O,4'-C methylene bridge. This chemical modification induces a conformational change that brings about enhanced base stacking and phosphate backbone pre-organization [5]. Since LNAs possess similar water solubility as DNAs or RNAs, LNA-modified oligonucleotides can be used easily in many biological experimental applications. Moreover, the introduction of LNA residues results in increased stability against endo- and 3'-exonucleases [6]. The superior properties of LNA-modified oligonucleotides make them an ideal tool for detecting small RNA molecules. In Northern blot hybridization assays, LNA-modified oligonucleotide probes detected mature miRNAs by at least a 10-fold higher efficiency than traditional DNA probes [1]. Moreover, LNA-modified oligonucleotide probes were highly specific, as demonstrated by the use of different single- and double-mismatched LNA probe molecules. The enhanced efficiency, stability and the discriminatory power of LNA-modified oligonucleotide probes render them especially useful in miRNA Northern blotting. LNA-modified oligonucleotide probes were also used for in situ hybridization experiments, indicating their potential in miRNA detection at the tissue level as well

* Corresponding author. Fax: +36 28 526145.
E-mail address: havelda@abc.hu (Z. Havelda).

In Situ Detection of Animal and Plant MicroRNAs

GUY WHEELER,¹ ANNA VALOCZI,² ZOLTAN HAVELDA,² and TAMAS DALMAY¹

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) are recently discovered short regulatory RNA molecules representing a new layer in posttranscriptional gene expression regulation. Although more than 450 human miRNAs have been identified, only a very few of them have been characterized in detail. The precise understanding of miRNA-mediated processes requires the reliable spatial and temporal analyses of miRNA accumulation at tissue/cell level. However, the detection of miRNAs by *in situ* hybridization (ISH) is technically challenging because of the small size of target sequences. It was shown recently that locked nucleic acid nucleotide-containing probes can anneal to short nucleic acids with high specificity. This enabled several research groups to analyze the expression patterns of miRNAs in both plant and animal tissues. This review focuses on the results of recent publications on the detection of miRNAs by ISH.

INTRODUCTION

MICRORNAs (miRNAs) are recently discovered short regulatory molecules 20–24 nucleotides in length (Kloosterman and Plasterk, 2006). Analysis of miRNA expression patterns by *in situ* hybridization (ISH) is not possible by standard ISH protocols due to the small size of the mature miRNAs. The breakthrough came from the development of modified oligonucleotides called locked nucleic acids (LNAs). Chimeric oligonucleotide probes containing LNA-modified nucleotides in selected positions were shown to exhibit enhanced thermal stability when hybridized to their target molecules (Brausch and Corey, 2001; Kurreck *et al.*, 2002). LNA monomers are bicyclic high-affinity RNA analogues having a modified ribose moiety (Kauppinen *et al.*, 2006). In LNAs, the furanose ring in the sugar-phosphate backbone is chemically locked in an N-type (C3'-endo) conformation by the introduction of a 2'-O,4'-C methylene bridge. This conformational change results in enhanced base stacking and phosphate backbone preorganization (Petersen *et al.*, 2002). Moreover, the introduction of LNA residues results in increased stability against endo- and 3'-exonucleases (Frieden *et al.*, 2003). Since LNAs possess water solubility similar to DNAs or RNAs, LNA-modified oligonucleotides can be used easily in many biological applications. The superior properties of LNA-modified oligonucleotides make them an ideal tool for detecting small RNA molecules. In northern blot hybridization assays, LNA-modified

oligonucleotide probes detected mature miRNAs with at least 10-fold higher efficiency than the traditional DNA probes (Valoczi *et al.*, 2004). Moreover, the LNA-modified oligonucleotide probes were highly specific, demonstrated by the use of different single and double mismatched LNA probes. The enhanced efficiency, stability, and discriminatory power of LNA-modified oligonucleotide probes also render them useful in miRNA *in situ* detection.

IN SITU HYBRIDIZATION OF ANIMAL EMBRYOS

Aboobaker *et al.* (2005) described the expression patterns of several precursor miRNA molecules in *Drosophila* using long (approximately 1 kb) RNA probes antisense to miRNA loci. However, this approach could only detect the longer precursor molecules, and LNA probes are necessary to identify the expression patterns of the mature miRNAs. The first ISH experiments using LNA probes, which were reported by Weinholds *et al.* (2005), described a large database of the spatial expression patterns of over 100 zebrafish miRNAs. In this broad study, they looked at the expression signals of 115 miRNAs that are conserved between vertebrates using digoxigenin (DIG)-labeled LNA probes, and compared these to microarray data for the same miRNAs, over different stages of the development of zebrafish embryos. Their method for whole mount *in situ* hybridization

¹School of Biological Sciences, University of East Anglia, Norwich, United Kingdom.

²Agricultural Biotechnology Centre, Godollo, Hungary.

TECHNICAL ADVANCE

Spatio-temporal accumulation of microRNAs is highly coordinated in developing plant tissues

Anna Válczi¹, Éva Várallyay¹, Sakari Kauppinen², József Burgán¹ and Zoltán Havelda^{1,*}

¹Agricultural Biotechnology Center, Plant Biology Institute, Szent-Györgyi Albert út 4, Gödöllő, H-2001, Hungary, and

²Wilhelm Johannsen Centre for Functional Genome Research, Institute of Medical Biochemistry and Genetics, University of Copenhagen, Blegdamsvej 3, DK-2200, Denmark

Received 12 September 2005; revised 6 February 2006; accepted 24 February 2006.

*For correspondence (fax: +36 28526145; e-mail havelda@abc.hu).

Summary

MicroRNAs (miRNAs) are an abundant class of small, endogenous non-protein-coding RNAs, approximately 21 nucleotides in length, that modulate the expression of animal and plant target genes at the post-transcriptional level. Recent work has shown that miRNA-based gene regulation plays a crucial role in pathways involved in plant growth and development. However, knowledge about the timing and spatial regulation of plant miRNA expression is still limited. Here we used *in situ* analysis to demonstrate that miRNAs accumulate spatially and temporally in a highly restricted manner in *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis thaliana*. The presence of the seven investigated miRNAs was characteristic of the developing organs, implying a role in cell-fate establishment, differentiation and cell-cycle progression. Spatial analyses revealed that six of the studied miRNAs were present in vascular bundles, suggesting that mobile miRNAs in the phloem could contribute to the coordination of organogenesis and development. The obvious absence of miR167 in vascular bundles represented an exception to this observation, implying an active process in regulating the presence of miRNAs in the vascular system. Taken together, our results imply that the spatially and temporally organized accumulation of miRNAs plays a pivotal role in fine-tuning of target gene expression in plant development.

Keywords: plant, miRNA, expression, *in situ* hybridization, LNA.

Introduction

The development of multicellular organisms is regulated by spatially and temporally coordinated complex regulatory networks that organize cell division and differentiation. The discovery of a novel gene-regulatory mechanism, based on microRNAs (miRNAs), has had a significant impact on the understanding of developmental processes. miRNAs are approximately 21 nucleotide-long non-coding RNA molecules that are generated by sequential processing of longer precursor molecules (termed pre-miRNA; Baulcombe, 2004; Dugas and Bartel, 2004; Filipowicz *et al.*, 2005; Kidner and Martienssen, 2005). The plant miRNA loci encode capped and polyadenylated transcripts (pri-miRNAs) that are processed to pre-miRNAs in the nucleus, probably by the Dicer-like enzyme DCL1. The genetically defined pre-miRNAs possess a self-complementary fold-back structure that is

processed to a double-stranded intermediate comprising the miRNA and the complementary miRNA* strands, respectively. The miRNA-miRNA* duplex is unwound and the miRNA is subsequently loaded in the RISC complex, while the miRNA* strand is eliminated. In plants, the miRNA-target duplex shows near-perfect or perfect base pairing, and the RISC acts via cleavage of the target mRNA. In contrast, most animal miRNAs and their target mRNAs form imperfect duplexes resulting in translational inhibition by RISC. However, there are also exceptions in plants. The near-perfect complementarity of plant miR172 and its target sequence in *APETALA2* (*AP2*) predicts induction of cleavage-based regulation, but instead the translational inhibition of *AP2* mRNA was reported (Aukerman and Sakai, 2003; Chen, 2004).

PROTOCOL

MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes

Éva Várallyay, József Burgyán & Zoltán Havelda

Agricultural Biotechnology Center, Plant Virology Group, Szent-Györgyi Albert ut 4, Gödöllő H-2100, Hungary. Correspondence should be addressed to Z.H. (havelda@abc.hu).

Published online 17 January 2008; doi:10.1038/nprot.2007.528

MicroRNAs (miRNAs) are short, about 21 nucleotides in length, noncoding, regulatory RNA molecules representing a new layer in post-transcriptional regulation of gene expression. Intensive miRNA research has necessitated the development of effective miRNA detection methods such as northern analyses, quantitative real-time PCR and microarrays. Northern analysis is a widely used method for miRNA analyses because it is generally a readily available technology for laboratories and does not require special equipment and technical knowledge. The major disadvantages of the northern blot technology using the traditional DNA oligonucleotide probes are its poor sensitivity and the high time consumption. Here, we describe an improved protocol for miRNA northern blot analysis, which includes RNA extraction, polyacrylamide gel electrophoresis and northern blotting, and the hybridization and detection of locked nucleic acid (LNA)-modified oligonucleotide probes. The use of LNA-modified oligonucleotide probes allows highly sensitive and specific detection of mature miRNAs and also dramatically reduces the period of time necessary for carrying out the protocol. Using this approach, the hybridization, washing and signal-detection steps can be performed ideally in 4 h.

INTRODUCTION

miRNA-mediated regulation processes play a central role in the growth and development of plants and animals. miRNAs are generated by sequential processing of genome-encoded, long, single-stranded RNA molecules possessing the ability to form highly structured stem-loop structures. The recent discovery of miRNA-controlled gene regulatory mechanisms has had a significant impact on the understanding of developmental processes in both plants and animals. Since then, several hundred miRNAs have been identified in diverse species and deposited in miRNA databases, and the importance of this regulatory network is becoming more and more important. Understanding their precise role requires reliable detection of their accumulation during the developmental program. However, the detection of miRNAs is technically demanding because of their small size.

The most straightforward approach to assess the role of a particular miRNA in a biological process is the analysis of the accumulation level of mature miRNAs in the investigated samples. Several alternative technological approaches have been employed to investigate miRNA accumulation. The principle of quantitative real-time PCR is based on the quantitative relationship between the amount of target miRNA and the amount of PCR product^{1,2}. This approach requires small amounts of starting material and can provide accurate results; however, it requires careful primer design and also special equipment and expertise. Microarray analysis of miRNA accumulation provides the advantage of high throughput; however, it also requires special tools and expertise³. Probably the most simple and widespread approach to assess the accumulation of target miRNAs is polyacrylamide gel electrophoresis of RNA samples combined with northern blot analysis. The advantage of this technique is that it does not require any special equipment or expertise and allows both quantitation of the expression level of miRNA and determination of the size of the RNA. Traditionally, DNA oligonucleotide probes complementary to the target miRNAs have been used in northern blot experiments for analysis of small RNAs. The main problem in using DNA oligonucleotide probes is their poor sensitivity, which is especially pronounced when

investigating miRNAs of low abundance. On these occasions, large amounts of purified total RNA samples must be generated, which is not feasible when the cell or tissue source is limited. To avoid this problem, we have developed a new method based on LNA-modified oligonucleotide probes⁴ (Fig. 1a).

LNA monomers are bicyclic, high-affinity RNA analogues possessing a modified ribose moiety⁵. The furanose ring in the sugar-phosphate backbone is chemically locked in an N-type (C3'-endo) conformation by the introduction of a 2'-O-4'-C methylene bridge, resulting in enhanced base stacking and phosphate backbone pre-organization⁶. DNA oligonucleotides modified by the introduction of LNAs at every third nucleotide position are used in the northern blotting method for analysis of small RNAs described here⁴. The mismatch discrimination power of oligonucleotide probes increased after LNA modification, demonstrated by the use of single and double mismatched LNA probes⁴ (Fig. 1b). The sensitivity of the detection of miRNAs by LNA-modified oligonucleotide probes in northern blot experiments has also been shown to increase dramatically in comparison to traditional DNA probes (see Fig. 2b). As LNA-modified oligonucleotide probes are very stable and their chemical properties are very similar to DNA oligonucleotides, they can be easily incorporated into standard laboratory procedures. LNA-modified oligonucleotide probes detecting miRNAs can be ordered from Exiqon (<http://www.exiqon.com>) and a website for probe design is also available (<http://lnatools.com>).

Here, we describe the step-by-step protocol of northern blotting for analysis of small RNAs, emphasizing the advantage of LNA-modified oligonucleotide probes in miRNA detection. Using LNA-modified oligonucleotide probes in northern blot experiments for analysis of small RNAs provides reliable, sensitive and rapid detection of mature miRNAs from even limited amounts of RNA samples from any organism. The protocol described here is very simple and does not require any expensive equipment or special expertise. As LNA-modified oligonucleotide probes can also be used for *in situ* hybridization^{7,8}, the data gained during northern

Plant virus infection-induced persistent host gene downregulation in systemically infected leaves

Zoltán Havelda^{†,*}, Éva Várallyay[†], Anna Válczi and József Burgyán

Agricultural Biotechnology Center, Plant Virology Group, Szent-Györgyi Albert út 4, Gödöllő, H-2001 Hungary

Received 26 October 2007; revised 29 February 2008; accepted 12 March 2008; published online 27 May 2008.

*For correspondence (fax +36 28526145; e-mail havelda@abc.hu).

[†]These authors contributed equally to this work.

Summary

Understanding of virus infection-induced alterations in host plant gene expression and metabolism leading to the development of virus disease symptoms is both scientifically and economically important. Here, we show that viruses belonging to various RNA virus families are able to induce efficient host gene mRNA downregulation (shut-off) in systemically infected leaves. We demonstrate that the host gene mRNA shut-off overlaps spatially with virus-occupied sectors, indicating the direct role of virus accumulation in this phenomenon. The establishment of shut-off was not directly connected to active viral replication or the RNA-silencing machinery. Importantly, the induced shut-off phenomenon persisted for several weeks, resulting in severe deficiency of mRNA for important housekeeping genes in the infected plants. Interestingly, we found that some other RNA viruses do not induce or only slightly induce the shut-off phenomenon for the same set of genes, implicating genetic determination in this process. Nuclear run-on experiments suggest that plant viruses, similarly to animal viruses, mediate suppression of host mRNA synthesis in the nucleus. By investigating various host–virus interactions, we revealed a correlation between the intensity of the shut-off phenomenon and the severity of disease symptoms. Our data suggest that efficient and persistent downregulation of host genes may be an important component of symptom development in certain host–virus interactions.

Keywords: virus, host, gene, downregulation, symptom.

Introduction

In compatible plant–virus interactions, the invading virus interferes with the accumulation and/or function of host components such as host proteins and nucleic acids, as well as inducing host defence reactions (Whitham *et al.*, 2006). The complex pattern of molecular changes induced by virus infection leads to the development of various disease symptoms, ranging from mild symptoms to severe responses such as stunting, abnormal colorations, various developmental defects or death. One of the most important recent challenges in plant virology is dissection of the complex molecular mechanisms behind disease symptom formation.

One of the most striking effects of virus infection are the profound changes in the expression of host genes. Global profiling of host mRNA transcript alterations has provided a wealth of information about the immense impact of virus infections (Golem and Culver, 2003; Marathe *et al.*, 2004;

Senthil *et al.*, 2005; Whitham *et al.*, 2003). However, this technology is not able to distinguish between changes induced directly by viral replication and general stress responses mounted by the host plant. *In situ* investigation has proven to be a powerful tool for revealing the relationship between the presence of a virus and expression of a selected set of host genes (Aranda *et al.*, 1996; Wang and Maule, 1995). Applying *in situ* technology to virus-infected cotyledons and embryonic tissues revealed downregulation of the expression of host genes, a phenomenon that is termed host gene shut-off (Escaler *et al.*, 2000a,b; Havelda and Maule, 2000; Wang and Maule, 1995). In pea embryonic tissues, infection with pea seed-borne mosaic virus (PSBMV) induced suppression of several endogenous genes at the zone of infection front (Wang and Maule, 1995). The induced host gene shut-off was transient, as gene expression returned to a near-normal level after passing the viral

Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation

Éva Várallyay¹, Anna Válczi², Ákos Ágyi¹, József Burgyán^{1,3} and Zoltán Havelda^{1,*}

¹Agricultural Biotechnology Center, Plant Virology and Bioinformatics Group, Gödöllő, Hungary, ²Department of Stem Cell Biology, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany and ³Istituto di Virologia Vegetale, CNR Strada delle Cacce, Torino, Italy

Virus infections induce the expression of *ARGONAUTE1* (*AGO1*) mRNA and in parallel enhance the accumulation of miR168 (regulator of *AGO1* mRNA). Here, we show that in virus-infected plants the enhanced expression of *AGO1* mRNA is not accompanied by increased *AGO1* protein accumulation. We also show that the induction of *AGO1* mRNA level is a part of the host defence reaction, whereas the induction of miR168, which overlaps spatially with virus-occupied sectors, is mediated mainly by the Tombusvirus p19 RNA-silencing suppressor. The absence of p19 results in the elimination of miR168 induction and accompanied with the enhanced accumulation of *AGO1* protein. In transient expression study, p19 mediates the induction of miR168 and the down-regulation of endogenous *AGO1* level. P19 is not able to efficiently bind miR168 in virus-infected plants, indicating that this activity is uncoupled from the small RNA-binding capacity of p19. Our results imply that plant viruses can inhibit the translational capacity of *AGO1* mRNA by modulating the endogenous miR168 level to alleviate the anti-viral function of *AGO1* protein.

The EMBO Journal advance online publication, 7 September 2010; doi:10.1038/emboj.2010.215

Subject Categories: RNA; plant biology

Keywords: *AGO1*; host defence; miR168; plant virus; RNA-silencing suppressor

Introduction

During virus infection, siRNAs are generated from viral double-stranded RNA products and secondary RNA structures by the activity of RNase-III ribonuclease Dicer-like (DCL) proteins (Molnar *et al.*, 2005; Ding and Voinnet, 2007). Virus-specific siRNAs are then incorporated into the RNA-induced-silencing complex (RISC) determining its specificity and bringing about the degradation of complementary viral RNAs (Pantaleo *et al.*, 2007). RNA-silencing suppressors of viruses can inhibit this mechanism at different steps by

biding to viral siRNAs, double-stranded RNAs or directly interacting with *AGO1* (Merai *et al.*, 2006; Burgyán, 2008; Mlotshwa *et al.*, 2008). Therefore, elimination of RNA-silencing suppressors from the virus-infection process can result in decreased virus accumulation and the development of the recovery phenotype (Qiu *et al.*, 2002; Qu and Morris, 2002; Szittyá *et al.*, 2002).

Plant miRNAs represent another RNA-silencing pathway and are indispensable for the control of wide variety of biological functions, including development, hormone responses, feedback mechanisms and biotic and abiotic stresses (Voinnet, 2009). MiRNAs are generated by sequential processing of genome-coded long single-stranded RNA precursor molecules possessing specific secondary structures by DCL1 and other factors. DCL1 processing liberates the miRNA/miRNA* duplex and the selected strand (the miRNA) is exported to the cytoplasm, whereas the miRNA* strand is usually degraded. In contrast, the generation of virus-specific siRNAs is mediated mainly by DCL4 and also by DCL2 (Ding and Voinnet, 2007). Small RNAs generated by the activity of DCL enzymes are incorporated into ARGONAUTE (*AGO*) proteins, which are the central components of the RISC complex. *AGO1*, the most important *AGO* protein in the miRNA pathway, is responsible for the cleavage or translational inhibition of target RNAs determined by the loaded miRNA (Mallory and Bouche, 2008; Mallory *et al.*, 2008). As a feedback mechanism, *AGO1* homeostasis itself is controlled by coordinated action of miR168 (Rhoades *et al.*, 2002; Vaucheret *et al.*, 2004) and *AGO1*-derived siRNAs (Mallory and Vaucheret, 2009) on *AGO1* mRNA. Moreover, additional components of the miRNA-mediated feedback regulation of *AGO1* have been also described involving the *AGO1*-mediated post-transcriptional stabilization of miR168 and the co-regulated expression of *AGO1* and *MIR168* genes (Vaucheret *et al.*, 2006). These results show the existence of a complex refined feedback regulatory loop, which balances *AGO1* and miR168 accumulation.

Analyses of affinity-purified *AGO1* revealed that it is preferably associated with miRNAs and mediates target mRNA cleavage (Baumberger and Baulcombe, 2005; Qi *et al.*, 2005; Mi *et al.*, 2008). However, *AGO1* also recruits virus-specific siRNAs and is involved in RNA-silencing-mediated defence mechanisms (Zhang *et al.*, 2006). It was also shown that virus-specific siRNAs of Cymbidium ringspot virus (CymRSV) and miRNAs co-fractionate with large protein complexes, which contain *AGO1* likely corresponding to RISC complexes (Pantaleo *et al.*, 2007; Csorba *et al.*, 2010). Moreover, it was shown that cucumber mosaic virus (CMV) 2b RNA-silencing suppressor directly interacts with siRNA-loaded *AGO1* inhibiting its slicing activity (Zhang *et al.*, 2006). P0 RNA-silencing suppressor of a Polerovirus mediates the targeted degradation of *AGO1* (Pazhouhandeh *et al.*, 2006; Baumberger *et al.*, 2007; Bortolamiol *et al.*, 2007; Csorba *et al.*, 2010). In line with these observations, it was found that *ago1* hypomorphic

*Corresponding author. Plant Virology and Bioinformatics Group, Agricultural Biotechnology Center (ABC), Szent Györgyi A. ut 4., Gödöllő H-2100, Hungary. Tel.: +36 28526155; Fax: +36 25526145; E-mail: havelda@abc.hu

Received: 11 February 2010; accepted: 12 August 2010

10 Biogenesis and Function of Plant microRNAs

Zoltan Havelda

CONTENTS

Overview	173
10.1 Introduction	174
10.2 Biology of miRNAs	174
10.2.1 Biogenesis	174
10.2.2 Activity	176
10.2.3 Mobility	177
10.2.4 Evolution	179
10.3 Functions of miRNAs	180
10.3.1 Regulation of Development	181
10.3.1.1 miR164	181
10.3.1.2 miR160 and miR167	182
10.3.1.3 miR156	182
10.3.1.4 miR165 and miR166	183
10.3.1.5 miR159 and miR319	183
10.3.1.6 miR172	184
10.3.2 Abiotic and Biotic Stresses	184
10.3.3 Regulation of ta-siRNA Phasing	185
10.3.4 Regulation of Plant miRNA Pathway	186
10.4 Conclusions	186
Acknowledgments	186
References	188

OVERVIEW

The recent discovery of the miRNA-mediated gene-regulatory mechanism has had a significant impact on the understanding of developmental processes in both plants and animals. Plant-associated miRNAs were identified by a cloning method in 2002, 10 years after the discovery of animal miRNAs [1–3]. Since then, several hundred miRNAs have been identified in diverse plant species and deposited in an miRNA database (miRBase) [4–6].

This review focuses on the recent research progress on plant miRNAs, highlighting the importance of miRNA-mediated regulation in developmental processes and other biological functions.

Chapter 15

Detection of siRNAs and miRNAs

Sakari Kauppinen and Zoltán Havelda

Abstract Small RNAs such as small interfering RNAs (siRNAs) and microRNAs (miRNAs) play crucial roles in establishing general host defense mechanisms against viral infections in plants and the development of disease symptoms. Understanding these fundamental processes requires the sensitive and specific detection of small RNA species. However, because of the small size of miRNAs and siRNAs, their detection is technically demanding. Here, we describe methods for robust and sensitive detection of small RNAs by Northern blot analysis and in situ hybridization.

Keywords siRNA; miRNA; Detection; Northern blot; In situ hybridization; LNA

1 Introduction

Post-transcriptional gene silencing (PTGS) has been identified as an antiviral defence system in plants (1). Double-stranded (ds) RNA or highly structured RNA, which is generated during viral replication, serve as inducers of PTGS (1, 2), thereby mediating the processing of these RNA precursors to ca. 21–26 nucleotide small interfering RNAs (siRNAs). In turn, the siRNAs guide the cleavage of their cognate target RNAs (3). To evade this robust host defense mechanism, plant viruses generally encode silencing suppressors (4). Regulation of endogenous gene expression is mediated by another class of 21 nucleotide small RNAs, called microRNAs (miRNAs) (5). Recent data show that virus-induced disease development can be associated, at least partly, by interference with miRNA-mediated regulation (6). Investigation of small RNA-mediated processes in virus-infected plants is the prerequisite for understanding the relationship between viruses and their host plants. Northern blot analysis combined with polyacrylamide gel electrophoresis is widely used to examine the expression of (si)miRNAs, since it allows both quantitation of the expression levels as well as determination of the RNA size. A major drawback of using conventional DNA oligonucleotide probes in miRNA detection is their poor sensitivity, especially when monitoring expression

From: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 451, *Plant Virology Protocols*:

217

From Viral Sequence to Protein Function

Edited by G.D. Foster, I.E. Johansen, Y. Hong, and P.D. Nagy © Humana Press, Totowa, NJ

Chapter 14

In Situ Detection of Plant Viruses and Virus-Specific Products

Andrew J. Maule and Zoltán Havelda

Abstract The ability to combine nucleic acid hybridisation or immunospecific reactions with structural and ultrastructural analysis of virus-infected tissues has provided the opportunity to resolve the spatial details of infection with respect to the production of virus-specific products and the nature of the host response. These technologies may seem lengthy and complex but offer high rewards in terms of revealing the details of host–virus interactions not otherwise accessible.

Keywords Plant virus; In situ hybridisation; Immunocytochemistry; Spatial resolution

1 Introduction

Plant viruses infect susceptible host tissues in a progressive mode whereby multiplication at the primary infection site is extended through cell-to-cell spread to become dispersed in a single tissue, and by long distance spread in the vasculature to achieve a systemic infection. Within the vasculature, virus movement occurs passively according to sink-source demands in the host plant. Symptoms also differ between inoculated tissues and distal tissues infected via the vasculature. Hence, both virus multiplication and the host response to virus invasion are highly spatially regulated. For example, cells at the edge of an expanding lesion reveal very different properties with respect to host gene expression from cells either outside or in the centre of the lesion (1, 2). Hence, virus infection should be viewed as a dynamic interaction with the host where the details of that interaction can only be understood when spatial relationships are taken into account. Since the properties of the interaction can vary across single cell boundaries technologies that provide an equivalent level of resolution are required. In situ hybridisation and immunocytochemistry provide such resolution

In situ hybridisation involves the hybridisation of tagged RNA probes to target viral nucleic acids within thin sections of tissue and the detection of the positive reaction with an antibody recognising the substituted nucleotide used to tag the RNA probe. An example of the power of in situ hybridisation is shown in [Fig. 1](#)

From: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 451, *Plant Virology Protocols*:

201

From Viral Sequence to Protein Function

Edited by G.D. Foster, I.E. Johansen, Y. Hong, and P.D. Nagy © Humana Press, Totowa, NJ

Chapter 9

In Situ Detection of miRNAs Using LNA Probes

Zoltán Havelda

Abstract

A spatial and temporal analysis of miRNA accumulation by in situ analyses is the prerequisite of understanding the precise biological functions of miRNAs. Since miRNAs are very short molecules, their in situ analysis is technically demanding. Here, we describe a protocol for miRNA in situ detection in plants based on LNA-modified oligonucleotides probes. LNA modification significantly enhances the sensitivity and specificity of miRNA detecting probes and provides relatively easy in situ miRNA detection.

Key words: miRNA, Plant, LNA, In situ hybridization

1. Introduction

Understanding the precise role of miRNAs in the biological processes requires the spatial and temporal investigation of mature miRNA accumulation by in situ hybridization. The technical problem associated with this technology derives from the length of the target RNAs (21–25 nt), which inhibits their reliable and sensitive detection. Locked nucleic acid (LNA) modified oligonucleotide-based probes have been introduced to enhance both the sensitivity and the specificity of miRNA detection by northern blotting and in situ hybridization (1–3). LNA modifications in DNA oligonucleotides bring about a dramatically higher target affinity and specificity compared to a traditional DNA oligonucleotide (4). Using this technology, miRNAs can be detected relatively easily in both plant and animals (Fig. 1). Here we describe a detailed protocol for in situ hybridization of plant tissue sections using LNA-modified oligonucleotides as probes.

Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation

György Szittyá, Dániel Silhavy,
Attila Molnár, Zoltán Havelda, Ágnes Lovas,
Lóránt Lakatos, Zsófia Bánfalvi and
József Burgán¹

Agricultural Biotechnology Center, Plant Biology, PO Box 411,
H-2101, Gödöllő, Hungary

¹Corresponding author
e-mail: burgyan@abc.hu

G.Szittyá and D.Silhavy contributed equally to this work

Temperature dramatically affects plant–virus interactions. Outbreaks of virus diseases are frequently associated with low temperature, while at high temperature viral symptoms are often attenuated (heat masking) and plants rapidly recover from virus diseases. However, the underlying mechanisms of these well-known observations are not yet understood. RNA silencing is a conserved defence system of eukaryotic cells, which operates against molecular parasites including viruses and transgenes. Here we show that at low temperature both virus and transgene triggered RNA silencing are inhibited. Therefore, in cold, plants become more susceptible to viruses, and RNA silencing-based phenotypes of transgenic plants are lost. Consistently, the levels of virus- and transgene-derived small (21–26 nucleotide) interfering (si) RNAs—the central molecules of RNA silencing-mediated defence pathways—are dramatically reduced at low temperature. In contrast, RNA silencing was activated and the amount of siRNAs gradually increased with rising temperature. However, temperature does not influence the accumulation of micro (mi) RNAs, which play a role in developmental regulation, suggesting that the two classes of small (si and mi) RNAs are generated by different nuclease complexes.

Keywords: heat masking/miRNA/RNA silencing/siRNA/temperature dependence

Introduction

RNA silencing is a sequence-specific post-transcriptional, gene-inactivation mechanism that operates in diverse eukaryotes. Accumulation of short (21–26 nucleotide), complementary guide RNAs corresponding to the sequence of target RNA occurs during RNA silencing in plants and animals (Hamilton and Baulcombe, 1999; Hammond *et al.*, 2000; Parrish *et al.*, 2000). These complementary guide RNAs provide the sequence-specificity of target RNA silencing. The double-stranded (ds) RNA-specific enzyme, DICER, produces two types of guide RNAs, small interfering (si) RNAs and micro (mi) RNAs. siRNAs are ds molecules generated from long

dsRNAs and mediate defensive responses against molecular parasites [referred to as post-transcriptional gene silencing (PTGS) in plants and RNA interference (RNAi) in animals] (reviewed in Voinnet, 2001; Zamore, 2001; Hannon, 2002). miRNAs are single-stranded molecules excised by DICER from short hairpin precursors and miRNAs are hypothesized to play a critical role in both animal and plant developmental regulation (Grishok *et al.*, 2001; Hutvagner *et al.*, 2001; Llave *et al.*, 2002; Reinhart *et al.*, 2002). Both siRNAs and miRNAs incorporate into a multicomponent nuclease complex (RISC) and guide RISC to target homologous mRNAs for cleavage at near perfect base-pairing (Elbashir *et al.*, 2001; Hutvagner and Zamore, 2002), or for translational repression at partial complementarity (Reinhart *et al.*, 2000). In plants, siRNAs might also act as the specificity determinants for other complexes, including dsRNA amplification by RNA-dependent RNA polymerase (RdRP), systemic silencing (see below) and RNA-directed methylation of homologous DNA (reviewed in Waterhouse *et al.*, 2001; Mlotshwa *et al.*, 2002).

A good deal of evidence suggests that RNA silencing plays a natural role in plant defense against molecular parasites, including viruses (reviewed in Voinnet, 2001). Virus-induced RNA silencing operates at both single-cell and whole-plant levels. Accumulation of dsRNA intermediates of virus replication in a plant cell induces silencing activity, which degrades the dsRNA itself and the cognate mRNAs (referred to as cell-autonomous silencing). Cell-autonomous silencing also generates a mobile signal that triggers the degradation of homologous mRNAs in distant cells (systemic silencing) (Palauqui *et al.*, 1997; Voinnet and Baulcombe, 1997). Consistent with the antiviral nature of RNA silencing in plants, many plant viruses have evolved silencing-suppressor proteins that block cell-autonomous or systemic silencing (Li and Ding, 2001). Transgene expression can also trigger RNA silencing. Virus- and transgene-induced silencing pathways are similar except that transgene-derived dsRNAs are likely generated by a plant encoded RdRP from aberrant transcripts. Transgene-induced RNA silencing is widely used in plant biotechnology. Phenotypes of virus-resistant plants expressing virus-derived sequences and transgenic plants, in which an endogenous gene is inactivated by ectopic expression of sense or antisense RNAs, are based on transgene-induced RNA silencing (Di Serio *et al.*, 2001; Rovere *et al.*, 2002).

Plant–virus interactions are strongly modified by environmental factors; especially by temperature. High temperature is frequently associated with attenuated symptoms ('heat masking') and with low virus content of virus-infected plants (Johnson, 1922; Hull, 2002). In contrast, rapid spread of virus diseases and the development of severe symptoms are frequently associated with

Aureusvirus P14 Is an Efficient RNA Silencing Suppressor That Binds Double-Stranded RNAs without Size Specificity†

Zsuzsanna Mérai,¹ Zoltán Kerényi,¹ Attila Molnár,^{1†} Endre Barta,¹ Anna Válczi,¹ György Bisztray,² Zoltán Havelda,¹ József Burgán,¹ and Dániel Silhavy^{1*}

¹Agricultural Biotechnology Center, Gödöllő, Hungary, and ²Department of Genetics and Horticultural Plant Breeding, Budapest University of Economic Sciences and Public Administration, Budapest, Hungary²

Received 1 September 2004/Accepted 17 January 2005

RNA silencing is a conserved eukaryotic gene regulatory system in which sequence specificity is determined by small RNAs. Plant RNA silencing also acts as an antiviral mechanism; therefore, viral infection requires expression of a silencing suppressor. The mechanism and the evolution of silencing suppression are still poorly understood. Tombusvirus open reading frame (ORF) 5-encoded P19 is a size-selective double-stranded RNA (dsRNA) binding protein that suppresses silencing by sequestering double-stranded small interfering RNAs (siRNAs), the specificity determinant of the antiviral silencing system. To better understand the evolution of silencing suppression, we characterized the suppressor of the type member of Aureusviruses, the closest relatives of the genus *Tombusvirus*. We show that the *Pothos latent virus* (PoLV) ORF 5-encoded P14 is an efficient suppressor of both virus- and transgene-induced silencing. Findings that in vitro P14 binds dsRNAs and double-stranded siRNAs without obvious size selection suggest that P14, unlike P19, can suppress silencing by sequestering both long dsRNA and double-stranded siRNA components of the silencing machinery. Indeed, P14 prevents the accumulation of hairpin transcript-derived siRNAs, indicating that P14 inhibits inverted repeat-induced silencing by binding the long dsRNA precursors of siRNAs. However, viral siRNAs accumulate to high levels in PoLV-infected plants; therefore, P14 might inhibit virus-induced silencing by sequestering double-stranded siRNAs. Finally, sequence analyses suggest that P14 and P19 suppressors diverged from an ancient dsRNA binding suppressor that evolved as a nested protein within the common ancestor of aureusvirus-tombusvirus movement proteins.

RNA silencing (also termed posttranscriptional gene silencing in plants and RNA interference in animals) is a conserved eukaryotic gene inactivation system that plays regulatory roles in many biological processes including development, maintenance of genome stability, and antiviral responses (2, 6, 12, 25, 54). RNA silencing is induced by accumulation of double-stranded RNAs (dsRNAs). dsRNAs are first processed by an RNase III-like nuclease called DICER (in plants termed DICER-LIKE, or DCL) into short (21 to 25 nucleotide [nt]) RNAs, and then these short RNAs incorporate and guide different silencing effector complexes to homologous nucleic acids for suppression (2, 6, 12, 16, 25, 54). In plants, RNA silencing acts at both single-cell (cell-autonomous silencing) and at whole-plant (systemic silencing) levels. Cell-autonomous silencing inactivates genes in the cells in which dsRNAs accumulated. Moreover, cell-autonomous silencing generates mobile silencing signals that confer suppression of homologous mRNAs in neighboring cells (short distance) and in distant tissues (long-distance systemic silencing) (29, 31, 32, 56).

DICERs can process dsRNAs into two functionally different small RNAs, micro-RNAs (miRNAs) and small interfering

RNAs (siRNAs). miRNAs are involved in the control of many endogenous protein-encoding mRNAs, while siRNAs mainly play a role in suppression of molecular parasites such as transposons, transgenes, and viruses (2, 6, 12, 16, 25). In *Arabidopsis*, matured miRNAs are 21- to 22-nt-long single-stranded RNAs (ssRNAs) that are excised from endogenous hairpin RNA precursors by DCL1 (60). siRNAs, which are generated from long dsRNAs, accumulate as short (21 to 22 nt) or long (23 to 25 nt) double-stranded molecules having 2-nt 3' overhangs.

miRNA- and short siRNA-mediated silencing pathways share components. Both types of small RNAs are incorporated into and guide a multicomponent nuclease (RNA-induced silencing complex, or RISC) to homologous mRNAs for suppression. RISC cleaves targeted mRNA in the case of (near) perfect base-pairing between mRNA and guide RNA. When the guide RNA is only partially complementary to the mRNA, RISC mediates translational repression (2, 6, 12). siRNAs also guide other silencing effector complexes. In addition to RISC, short siRNAs are supposed to provide sequence specificity for a host-encoded RNA-dependent RNA polymerase that transforms homologous mRNAs into dsRNAs, thus amplifying silencing. Moreover, short siRNAs could be involved in short-distance systemic silencing (15, 18). Long siRNAs would play a role in long-distance systemic silencing (15) and in transcriptional silencing by directing the histone/DNA methylation of homologous DNA (7, 15, 25, 51).

RNA silencing plays an antiviral role in plants, in insects, and perhaps in other eukaryotes (2, 13, 22, 37, 46, 59). DCL2 and perhaps other DCL enzymes generate viral siRNAs from

* Corresponding author. Mailing address: Agricultural Biotechnology Center, Plant Science Institute, P.O. Box 411, H-2101 Gödöllő, Hungary. Phone: 36 28 526 194. Fax: 36 28 526 145. E-mail: silhavy@abc.hu.

† Present address: The Sainsbury Laboratory, John Innes Centre, Colney Lane, Norwich NR4 7UH, United Kingdom.

‡ Supplemental material for this article may be found at <http://jvi.asm.org/>.