

Válasz Dr. Barna Balázsnak, az MTA levelező tagjának

Köszönöm Barna Balázs akadémikus úrnak, hogy elbírálta értekezésemet, és köszönöm a dolgozatról alkotott elismerő véleményét.

Megjegyzéseire és kérdéseire az alábbiakban válaszolok:

A 37. ábrát újra fellapoztam a dolgozatban, és a végleges változatban a fertőzött növényekről készült képek tényleg nem túl nagyok, főleg a lokális tüneteket kell nagyon figyelni. Sajnos a dolgozat szerkesztése során az ábrák elhelyezésénél végül ez a méret maradt meg, és nekem a képeken a sokadik átszerkesztés alkalmával már teljesen egyértelműnek tűntek a tünetek.

A dolgozat a megjelent publikációim alapján, azokat egymás után szerkesztve épült fel, ezért fordulhatott elő, hogy a saját közleményeimet nem idéztem. Az egyes fejezetek végén, esetleg az eredmények megvitatása során illeszthettem volna be ezeket a dolgozatba, amit majd az védés során az előadásban megpróbálok pótolni.

- Milyen módon szabályozhatja a 2b fehérje a szalicilsavon és a jázminsavon alapuló növényi védekezési mechanizmusokat?

Mint ismert, a növények vírusok elleni védekezésében is fontos szerepet játszik a szalicilsav és a jázminsav, mint szignál molekula, ami különböző PR fehérjék szintézisét indukálják.

Jelenleg a 2b fehérje pontos szerepe a szalicilsav illetve jázminsav által indukált védekezési mechanizmusban nem ismert, még csak az első lépések történtek meg a 2b fehérje és ezen a biokémiai útvonalak kapcsolatának vizsgálatában. Jelenlegi ismereteink szerint CMV fertőzés hatására a szalicilsav mennyisége nő a fertőzött *Arabidopsis* növényekben. Mivel a CMV-Arabidopsis kompatibilis kapcsolat és a szalicilsav akkumuláció általában az inkompatibilis interakciókra, illetve indukált rezisztencia esetén jellemző, ez meglepő eredmény volt. Az, hogy a szalicilsav

felhalmozódásban milyen vírus gének játszanak szerepet, az jelenleg sem teljesen ismert. A 2b fehérje önmagában (transzgénikus növényekben) nem képes indukálni a felhalmozódást, míg az a mutáns vírus sem, amelyik nem expresszálja a 2b fehérjét, bár ez a mutáns vírus *Arabidopsis* növényben képes szisztemizálódni. Viszont ezzel a mutáns vírussal 2b transzgénikus növényeken kiválthatjuk a szalicilsav koncentráció emelkedését (Lewsey és mtsai., 2010). Így azt mondhatjuk, hogy a 2b fehérjének bizonyosan van szerepe a szalicilsav szint emelkedésében a vírusfertőzés során, azonban nem ez az egyetlen vírus eredetű faktor, ami szükséges ehhez a folyamathoz. Transzkriptom analízis során megállapították, hogy a 2b fehérje expressziója önmagában a szalicilsav által indukált gének közül csupán néhánynak (5db, pl. ARF4, Ago2) az expressziós szintjét változtatja meg. Külső abszcizinsav kezelés hatására a nem transzgénikus növény esetén 766 esetben, míg 2b transzgénikus növények esetén 1159 esetben találtak expressziós szint változást. Ezek között mintegy 62% volt az átfedő (a nem transzgénikus növényhez viszonyítva), és csupán 19 volt szignifikánsan eltérő. Ezekből adatbanki vizsgálatok során 15 mutatott homológiát korábban leírt sRNS-ekkel, így nem kizárt, hogy a szalicilsav indukálta rezisztencia szabályozásában az RNS csendesítés is szerepet játszik. Ugyanakkor ennek a feltételezésnek Lewsey és Carr (2009) eredményei ellentmondanak, akik azt találták, hogy a géncsendesítésben központi szerepet játszó DCL2, DCL3 és DCL4 komplexeknek nincsen szerepe a szalicilsav által indukált rezisztenciában.

Ugyanakkor úgy tűnik, hogy a szalicilsav indukálta rezisztencia pontos mechanizmusa a vírusfertőzés során gazdanövényenként változó, így általános következtetéseket nem lehet levonni. Például dohány, illetve *Arabidopsis* növények fertőzése során a szalicilsav indukálta rezisztencia a CMV szisztemikus mozgását gátolja (késlelteti), míg például tök növényeknél már a sejtről-sejtre terjedést is (Ji és Ding, 2001, Mayers és mtsai. 2005).

A CMV fertőzés hatása a jázminsav szintre és az általa szabályozott folyamatokra sokkal egyértelműbb. A CMV fertőzés hatására a fertőzött növényekben a jázminsav szint nem változik a kontroll növényekhez képest. Ugyanakkor a vírusfertőzés

következtében, vagy akár a 2b fehérje önálló expressziója során a jázminsavval indukálható géneknek csak 10%-a reagál a jázminsav kezelésre. Tehát a CMV fertőzés nem közvetlenül a jázminsav szinten keresztül befolyásolja a növények válaszreakcióit, hanem az általa indukált gének expresszióját gátolva, azonban ennek a folyamatnak a pontos mechanizmusa jelenleg nem ismert. Ugyanakkor a vírusátvitelben fontos szerepe lehet ennek a folyamatnak. A CMV terjedésében a levéltetveknek van a legfontosabb szerepe, több mint 90 levéltetűfajról bizonyították, hogy képes a CMV-t nem perzisztens módon terjeszteni. A jázminsav indukálta védekezési mechanizmusnak a levéltetvek elleni védekezésben is fontos szerepe van, és ennek hiányában a vírus terjedése is hatékonyabbnak bizonyulhat (Lewsey és mtsai., 2010).

- Vannak-e léziós, CMV rezisztens mutánsai az *Arabidopsis*-nak? Milyen reakciót ad az Ns-CMV a vad típusú növényen?

Közismert, hogy a különböző CMV izolátumok fertőzik az *Arabidopsis* növényt. A tünetek az izolátumok többségénél klorózis, halvány mozaik és a növények törpülése. Az Ns-CMV izolátum tüneteit vizsgáltuk *Arabidopsis thaliana* Columbia (Col-0) ökotípuson, amin az inokulált leveleken nagyméretű nekrotikus léziókat figyeltünk meg, ugyanakkor a vírus szisztemizálódott is.

Jelenleg olyan CMV izolátum nem ismert, ami csak lokális léziót indukálna *Arabidopsis* növényen, azonban a CMV izolátumok változatosságát ismerve kellően sok izolátum, illetve *Arabidopsis* ökotípus átvizsgálása során nem kizárt, hogy lehetne ilyen CMV-gazdanövény párt találni.

-27. ábra: A CymRSV egyáltalán nem mutatható ki *N. tabacum* cv. Xanthi illetve *N. glutinosa* fertőzött leveleiben a CymRSV MP génre specifikus radioaktív próbával. Mennyire gátlódik ennek a hibrid vírusnak a replikációja?

A 27. ábrán bemutatott Northern hibridizáció a fertőzött növények szisztemikusan fertőzött leveleiből készült. Az *N. tabacum* cv. Xanthi illetve *N. glutinosa* növények inokulált levelein a CymRSV lokális léziókat indukál, mint ahogy *N. tabacum* növények fertőzött levelein a 28. ábrán be is mutatom. Ezek a léziók *N. tabacum* cv.

Xanthi növényeknél nekrotikusak, míg *N. glutinosa* növényeknél klorotikus léziók alakulnak ki. Így nagy valószínűséggel a vírusfertőzés során, a fertőzött levelekben a replikáció nem gátódik hiszen lokális tünetek kialakulnak, azonban a vírus hosszútávú mozgása gátolt, illetve a növény védekező reakciói lokalizálhatják a vírust és ezért nem mutatható ki a nem fertőzött levelekből.

- Milyen receptorok ismerik fel, hogy az R-CMV köpenyfehérje 193-as aminosava szerin vagy lizin, és milyen folyamatok vezethetnek a törpüléshez vagy a mozaikos tünetek kialakulásához?

- Milyen receptorok vesznek részt az Ns-CMV 1a fehérje 461-es aminosava felismerésében, és milyen jelátviteli illetve biokémiai utak vezetnek a nekrotikus vagy szisztemikus reakció kialakulásához?

Erre a két kérdésre együtt szeretnék válaszolni, hiszen jelenleg még egyik esetben sem ismert az a receptor, ami közvetlenül kölcsönhatásba lép a köpenyfehérjével illetve az 1a fehérjével és különböző biokémiai utak aktiválódása során elvezet a megfigyelt fenotípus kialakulásához. Sőt, nem csak ezekben az esetekben nem történt meg a biokémiai utak térképezése, hanem különböző CMV izolátumok által indukált és valamelyik vírus fehérjéhez bizonyítottan köthető tünet esetén is meglehetősen kezdeti stádiumban tartanak a kutatások. Az egyetlen CMV-gazdanövény rendszer, ahol jelentős eredményeket elért a HL-CMV és *Arabidopsis thaliana* kölcsönhatás. Ez a CMV izolátum liliumról származik, és *Arabidopsis* növény inokulált és szisztemikus levelein is nekrotikus léziókat indukál. Bizonyították, hogy a HL-CMV 2b fehérjének karboxi-terminális része közvetlen kölcsönhatásba lép a növény Catalase3 (CAT3) enzimével, aminek következtében csökken a sejtekben a kataláz aktivitás és megnő a sejtekben a H₂O₂ koncentráció. Ugyanakkor a CAT3 enzim lokalizációja is megváltozik, az eredetileg a citoplazmában lokalizálódó enzim a sejtmagban halmozódik fel. Ugyanakkor más, nekrotizist nem okozó CMV izolátumok 2b fehérjeje nem képes direkt kölcsönhatást kialakítani a CAT3 enzimmel. Ez a munka nagyon szépen példázza, hogy a technikai feltételek lassan kialakulnak ahhoz, hogy a vírusok által indukált patológiai jellemzők biokémiai hátterét is megérthessük. Ugyanakkor hasonló tünetek kialakulásához különböző biokémiai

utakon is eljuthatunk, hiszen az Ns-CMV esetén a többi CMV-től eltérő tünetekért az 1a fehérje 461-es aminosava felelős, míg 2b fehérjéje igen hasonló az Rs-CMV 2b fehérjééhez, és ez utóbbi CMV nem indukál nekrotikus tüneteket az *Arabidopsis Col-0* növényeken (Inaba és mtsai., 2011) .

Még egy esetben ismerjük a jellemző tünetek kialakulásának mechanizmusát, ez pedig az Y-sat RNS által indukált klorózis, azonban ez nem vírusfehérjék által indukált biokémiai utak aktiválódásán keresztül történik, hanem géncsendesítésen alapul. Ebben az esetben a sat-RNS mintegy 22 nt hosszúságú része komplementer a dohány magnézium protophorphyrin chelatase I alegységének mRNS-ével, ami nélkülözhetetlen a klorofill szintézishez. Ennek a mRNS-nek a csendesítése és a ChII fehérjehiánya okozza a sárga tüneteket ebben az esetben. Természetesen a sárga tünetek csak azoknál a fajoknál alakulnak ki, ahol teljes a homológia a sat-RNS és a célgén között (Shimura és mtsai. 2011, Smith és mtsai. 2011).

A jövőben a molekuláris biológiai technikák fejlődésével várhatóan mind több esetben fogunk pontos képet kapni az egyes vírusok által indukált tünetekhez elvezető biokémiai utakról, illetve hálózatokról, hiszen sok esetben különböző vírusfehérjék indukálnak nagyon hasonló tüneteket. Gondolok itt a transzkriptom szekvenálástól a különböző fehérje alapú, kölcsönhatásokban résztvevő partnerek azonosítására alkalmas technikákig (pl. GST pull down assay, immunoprecipitáció).

Még egyszer szeretnék köszönetet mondani opponensemnek a bírálataért.

Budapest, 2013. október 14.

Dr. Salánki Katalin

A válaszaim során felhasznált irodalmak jegyzéke:

Inaba, J.-I., Kim, B. M., Shimura, H., and Masuta, C. (2011). Virus-induced necrosis is a consequence of direct protein-protein interaction between a viral RNA-silencing suppressor and a host catalase. *Plant Physiol.* 156:2026–2036.

Ji, L.-H., and Ding, S.-W. (2001). The suppressor of transgene RNA silencing encoded by Cucumber mosaic virus interferes with salicylic acid-mediated virus resistance. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 14:715–724.

Lewsey MG, Carr JP. (2009). Effects of DICER-like proteins 2, 3 and 4 on cucumber mosaic virus and tobacco mosaic virus infections in salicylic acid-treated plants. *J Gen Virol.* 2009 Dec;90(Pt 12):3010-4. doi: 10.1099/vir.0.014555-0. Epub 2009 Aug 26.

Lewsey, M. G., Murphy, A. M., MacLean, D., Dalchau, N., Westwood, J. H., Macaulay, K., Bennett, M. H., Moulin, M., Hanke, D. E., Powell, G., Smith, A. G., and Carr, J. P. (2010). Disruption of two defensive signaling pathways by a viral RNA silencing suppressor. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 23:835–845.

Mayers, C. N., Lee, K.-C., Moore, C. A., Wong, S.-M., and Carr, J. P. (2005). Salicylic acid-induced resistance to Cucumber mosaic virus in squash and *Arabidopsis thaliana* : Contrast-ing mechanisms of induction and antiviral action. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 18:428–434.

Shimura, H., Pantaleo, V., Ishihara, T., Myojo, N., Inaba, J.-I., Sueda, K., Burgyan, J., and Masuta, C. (2011). A viral satellite RNA induces yellow symptoms on tobacco by target-ing a gene involved in chlorophyll biosynthesis using the RNA silencing machinery. *PLoS Pathog.* 7:e1002021.

Smith, N. A., Eamens, A. L., and Wang, M.-B. (2011). Viral small interfering RNAs target hostgenes to mediate disease symptoms in plants. *PLoS Pathog.* 7:e1002022