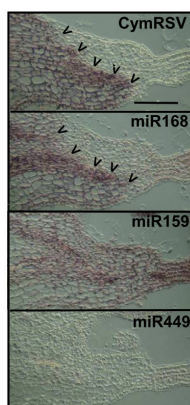


dc\_35\_10

dc\_35\_10

**MTA Doktori Pályázat**  
**Doktori értekezés tézisei**

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



**Havelda Zoltán**

**Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont**

**Gödöllő, 2010**

## 1. 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 edénnyaláb rendszer segítségével eljutni a növény távolabbi szöveteibe így kialakítva a szisztemikus (egész növényre kiterjedő) fertőzést. Mivel a vírusok obligát paraziták, ezért életciklushoz fel kell használniuk a gazdasejt erőforrásait. A vírus fertőzés alapvetően átszabja a megfertőzött növény génextpressziós 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.

dc\_35\_10

3. *In situ* hibridizálási kísérletekkel kimutattuk, hogy a "shut off" jelenség (egy gazdanövény mRNS-ek kifejeződésének erőteljes gátlása) megfigyelhető a CMV-tök sziklevél rendszerben is. 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 gazdapatogén 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 leszállítására 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 szisztémikus levelekben kialakuló "shut off" jelenség molekuláris mechanizmusát vizsgáló kísérleteink azt mutatták, hogy a jelenségért a célgének 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 (az RNS csendesítés központi végrehajtó fehérjéjét, AGO1, kódoló mRNS-t kontroláló miRNS) 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.

## **5. 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., Burgyan 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., Burgyan 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, Valoczi A and Burgyan 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, Valoczi 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)

### 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 koncentrálnak. Számos, a hatékony kis RNS kimutatás témakörében írt, metodikai publikációnk jelent meg, amely lehetővé teszi az érdeklődők számára a részletes protokollok elérését.

### 4. TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

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.



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 ígérését. 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.

## 2. 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 vírúsfertőzési folyamatokban.

6. 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(1):140-51. (IF: 6.565)
7. Hornyik C, **Havelda Z\***, Burgyan 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 Burgyan, 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)

(\* levelező szerző)

**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. Szittya, G., Silhavy, D., Molnar, 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, Válóczy 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)

*Összes közlemény: száma 26, impakt faktor 103.568, független hivatkozás 510  
Első és utolsó szerzős közlemények impakt faktora: 81,36*

*A dolgozatban szereplő közlemények: száma 13, impakt faktor 74.897  
A dolgozatban szereplő első és utolsó szerzős közlemények impakt faktora:  
71.186*

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.