

Válasz Dr. Lukács Noémi egyetemi tanárnak

Köszönöm Dr. Lukács Noéminek, az MTA doktorának a dolgozatom bírálatát és munkám kedvező megítélését.

Kérdéseire a válaszaim a következők:

Mit ért azon, hogy az N193 negatív polaritású (47. oldal)?

Ennek a kérdésnek a megválaszolásában a dolgozat 12. ábrája (48. oldal) segít. Mint közismert, a lizin bázikus, pozitív töltésű, hosszú oldalláncú aminosav, míg az aszparagin a poláros aminosavak közé tartozik és lényegesen rövidebb az oldallánca. A Trk7-CMV és az R-CMV köpenyfehérje van der Waals felületének ábrázolása (A, B) jól mutatja a két aminosav oldalláncainak elhelyezkedését a CP felületén, demonstrálva, hogy a lizin oldallánca az aszparaginéhoz képest dominánsabb a fehérje felületén. A C és D ábrákon az elektrosztatikus potenciáljának megjelenítésénél pontosan megfigyelhető, hogy míg a lizint hordozó izolátumnál pozitív töltésű rész alakul ki, ugyanez a rész az aszparagin jelenléte esetén negatív. Talán a dolgozatban pontatlanul fogalmaztam, hiszen itt nem egy-egy aminosav töltését vizsgáljuk hanem a fehérje felszínét, aminek a töltése az adott környezetben lokalizálódó aminosavak kémiai sajátosságainak összességétől függ.

Kísérletei alapján kizárható-e, hogy a vírusakkumuláció szerepet játszik a *N. glutinosánál* megfigyelt törpülés előidézésében?

Teljesen nem zárható ki, hogy a vírusakkumulációban mutatkozó különbségek szerepet játszanának a tünetbeli különbségek kialakulásában. Egyrészt protoplaszt rendszerben vizsgálva a különböző konstrukciókat, nem találtunk különbséget a különböző izolátumok replikációjában. Másrészt a kísérleteket *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi növényeken is megismételtük, ahol a két vírus hasonló, mozaik tüneteket indukál. Megállapítottuk, hogy a fertőzés kinetikája ebben az esetben is hasonló a két izolátum esetén és a víruskoncentrációban megfigyelt különbség is megfigyelhető volt ebben az esetben is. Így *N. glutinosa*-n az indukált tünetekben megfigyelt különbséget nem valószínű, hogy magában a vírus felhalmozódásban megfigyelt különbség okozza. Valószínűbbnek tartom, hogy valamilyen receptor molekulával az egyik CP képes kölcsönhatásba lépni, míg a másik nem.

Mivel magyarázza, hogy a 461P bevitele ilyen nagy szerkezeti változást okozott, míg a 459P szerkezeti hatása csekély?

Az 1a fehérjének nem ismert a másodlagos szerkezete, így az ismertetett munkák során elkészítettük a mutáció körüli régió jósolt fehérjeszerkezetét. Az eredmények szerint a 461-es aminosav egy 12 aminosav hosszúságú α -hélix második aminosavaként helyezkedik el. Ezt az α -hélixet három aminosav megszakítással egy másik, hét aminosav hosszúságú α -hélix előzi meg. A két hélix érdekessége, hogy az egyik oldalán elsősorban hidrofób aminosavak helyezkednek el, míg a másik felén bázikus és neutrális aminosavak találhatók. Így az egész régió amfipatikus, α -hélixnek tekinthető (40. ábra 86. oldal). A 459-es pozíció a két hélixet összekötő részen található, így ennek a megváltoztatásának kisebb szerepe van (40. ábra 86. oldal) a fehérjeszerkezetre. A hélix részbe beépített prolin (461) a 46. ábrán (96. oldal) jól látható módon a hélix szerkezetet teljesen megváltoztatja, ezért fehérjekémikusok "hélix törő" aminosavként is szokták emlegetni. Mint a kísérletek során látható volt, ennek következtében a fehérje el is veszítette működőképességét (41. ábra 88. oldal), így ennek a hélixnek az integritása kulcsfontosságú.

Thompson és munkatársai (2006) publikációja nyomán több kérdés is megfogalmazódott. Egyrészt az említett munkában számos esetben az alaninre változtatott aminosavak visszamutáltak az eredeti aminosavvá, ami a mi esetünkben ez nem volt jellemző, másrészt az említett aminosav triád megváltoztatása során az argininnek csak a méretváltozása indukálhatta-e a változást a vírus hosszútávú mozgásában.

A mutánsok elkészítése során mi nem a cucumovírusoktól teljesen idegen aminosav sorrendeket építettünk be a köpenyfehérjébe, hanem két azonos szerkezetű vírus között cseréltünk ki kisebb, a virion felületén elhelyezkedő részeket. Mindkét vírus szisztemikusan fertőz számos dohány fajt, tehát a vírus alapvető funkcióihoz szükséges szerkezettel rendelkezik. Valószínűleg ezzel magyarázható, hogy a mi esetünkben nem volt jellemző a mutáció, hiszen a cucumovírusokra jellemző aminosav sorrendeket használtunk, igaz az eredetitől eltérő kombinációban. A teljes képhez azért az is hozzátartozik, hogy ha a mutánsokat 8-10 hónapon át teszt növényeken tartottuk fent, akkor fordult elő aminosav változás a loop régiókban is, főleg ha valamilyen extrém időjárás körülménye (pl. 35 °C feletti hőmérséklet a nyári időszakban) fordult elő. Éppen ezért a fertőzések, vírustisztítások során folyamatosan ellenőriztük a mutánsok nukleinsav sorrendjét. A nukleinsav sorrend változás a kísérletek kevesebb, mint 5%-ában fordult elő, és akkor is különböző pozícióban, így ezzel a továbbiakban érdemben nem foglalkoztunk. Természetesen ebben az irányban is lehetne további kísérleteket tervezni. Egyébként számos más vírussal (pl. BMV) korábbi munkák során bizonyították az RNS szerkezetének

elsődleges fontosságát az RNS rekombináció folyamatában, rekombinánsok kialakulásában illetve helyreállítódásában.

A CMV hosszútávú mozgásáról jelenleg is sokkal kevesebb adat áll rendelkezésünkre, mint a sejtről-sejtre terjedéséről. Nagy valószínűséggel virion formájában szállítódik a floémbe, de a virion összeszerelődésének helye, valamint hogy a floémból milyen formában és hol jut ki, máig sem tisztázott. Eddig egy floém proteinnel való közvetlen kölcsönhatását bizonyították (phloem protein 1, PP1) tők növényeknél, amely protein a plazmodezmáknál lokalizálódik (Requena és mtsai. 2006), de ennek a kölcsönhatásnak a biológiai funkciója sem teljesen tisztázott. Feltételezések szerint egyéb fehérjékkel is kialakulnak kölcsönhatások a vírus hosszútávú mozgása során, azonban ezekről konkrét adatok jelenleg nincsenek. Feltételezésünk szerint az általunk azonosított fehérje régió is szerepet játszik gazdanövény specifikus kölcsönhatások kialakulásában uborka növényen, de természetesen ennek bizonyításához a kölcsönhatásban résztvevő partner molekulát kellene azonosítani. Ennek azonosítása és szerkezetének meghatározása után lehetne pontos képet alkotni arról, hogy mi okozhatja a kölcsönhatás és a hosszútávú mozgás elmaradását. Itt mindenképpen a kölcsönhatásban résztvevő molekulák felszíni szerkezetét kellene vizsgálni, ami a szerkezetet illetve a töltéseloszlást is érinti.

Léteznek-e saját vagy irodalmi adatok arra vonatkozólag, hogy a CP 62. és 65. aminosavának alaninra történő kicserélése hogyan befolyásolja az MP-CP kompatibilitást, azaz a hosszútávú terjedést?

Ilyen mutáns vírusokat sem mi, sem mások nem készítették. Ennek a két aminosavnak szintén egy, a vírus fehérje felületén elhelyezkedő nagyobb régiót vizsgálva van jelentősége. Ebben az esetben a MP térszerkezetének ismerete lenne a kulcsa a kölcsönhatás teljes jellemzésének. A MP azonban membránfehérje, amelyek tisztítása és kristályosítása még jelenleg is nagyon nehéz technikai problémákat vet fel. Egyelőre egyetlen növényi vírusnak az MP szerkezete sem ismert, így homológia modellezéssel sem megoldható a feladat, így jelenleg ezeknek a kísérleteknek a folytatása még nem időszerű.

Mi az oka annak, hogy a vizsgált esetekben általában a fehérje töltéseloszlásban bekövetkező változás tűnik felelősnek a hatásért?

A bemutatott növény-vírus rendszerekben a tüneti determinánsok teljes egészében valamely vírus fehérje aminosav sorrend változásaihoz köthetők, és valószínűleg jelenleg még nem azonosított kölcsönhatásokban vesznek részt a gazdanövény valamely faktoraival. A molekuláris felismerés legegyszerűbb és máig használt

modelljét Emil Fischer 1894-ben írta le, amely a zár és kulcs analógiáján alapszik. Ez az elmélet alapjaiban máig helytálló, azonban sokat finomodott, és sokkal bonyolultabbá is vált. A „zár” megfelel egy fehérje felszínén található kötőhelynek, a „kulcs” ebbe a molekuláris mélyedésbe kötődik be. A „zár-kulcs” illeszkedés legalább háromféle kölcsönhatásból épül fel: térbeli, elektrosztatikus és hidrofób kölcsönhatásokból. A térbeli illeszkedés azt jelenti, hogy a kölcsönható atomok nem közelíthetik meg egymást a van der Waals sugaruknál jobban, de a kötőhelynek a lehető legszorosabban betöltöttnek kell lennie úgy, hogy a kölcsönható atomcsoportok közötti üres tér a minimális legyen. Az elektrosztatikus illeszkedés maximális ionos és poláris (hidrogén kötés, vagy más) kölcsönhatást igényel a „zár-kulcs” molekulák atomcsoportjai között. A hidrofób illeszkedés megfelel a vizes oldatban történő apoláris csoportok asszociációs viselkedésének. A kölcsönható molekulák alakja és konformációja folyamatosan változik, ami szintén hatással van a molekuláris felismerés kialakulására. Ugyanakkor a merev test megközelítés gyakran alkalmazható, mert a nagyobb fehérjék konformációs energia minimumához jól meghatározott viszonylag állandó szerkezetek tartoznak. A kisebb kötődő „kulcs” molekulák esetén előfordul, hogy a kisebb molekula számára kedvezőtlen konformációban illeszkedik a gazda molekulához, mert a kötődés energiája stabilizálja ebben a konformációban. A számítástechnika robbanásszerű fejlődésével napjainkban a molekulamodellzés a dokkolás folyamatát már pár tíz nanoszekundumos molekuladinamikai szimulációval is nyomon tudják követni egy fehérje ligandum kötését, éppen ezért a molekulafelszín kisebb töltéseloszlás változásai is jól értelmezhetőek. Munkánk során folyamatosan próbáltunk ezeknek a kihívásoknak is megfelelni, az eredményeinket ebben az összefüggésben is értelmezni. Természetesen voltak olyan eredmények, ahol nagyobb szerkezeti változást találtunk (pl. C461P), de olyan eredmények is, ahol a töltéseloszlás fontosságát kísérletesen is sikerült bizonyítanunk (pl. kompatibilitás-R3SPT62K65R). Én azt gondolom, hogy egyrészt a kísérleti eredményeket mindig az elérhető új módszerek tükrében kell értelmezni, másrészt a leírt kísérleti rendszerekben még további lehetőségek vannak. A továbblépéshez mindenképpen szükséges a kölcsönhatásokban résztvevő növényi faktorok és biokémiai utak azonosítása.

Véleménye szerint a virális RNS-ek, a fehérjék vagy a virális komponensek mennyiségi viszonyai játsszák a nagyobb szerepet a vírustünetek kialakulásában?

A vírustünetek egy igen átfogó fogalom, hiszen rengeteg növényi vírust ismerünk, amelyek igen különböző gazdanövényeket fertőznek és ezeken is a legváltozatosabb tüneteket okozzák. A CMV mint közismert a legszélesebb gazdanövénykörrel

rendelkező vírus, ugyanakkor az izolátumai patológiai jellemzői között is igen nagy különbségek vannak, gondolok itt a fertőzés lokális-szisztemikus jellegére egy adott növényen, vagy az indukált tünetek jellegére. A fertőzés kialakulásához a vírusnak számos növényi komponenssel kell együttműködnie a replikáció, sejtről-sejtre, illetve a hosszútávú terjedés során ami egyáltalán elvezethet a tünetek kialakulásáig. Ugyanakkor a CMV 2b fehérjéről az utóbbi időben egyre több adat áll rendelkezésre, hogy hogyan képes a növényen belül különböző kis RNS útvonalak működésébe beavatkozni, így a növény fejlődésére is hatást gyakorolni. Ráadásul bizonyították, hogy a 2b fehérje a gazdanövény genomjának epigenetikai módosítására is képes (Kanazawa és mtsai. 2011).

Jelenleg több adat áll rendelkezésre a különböző vírusfehérjékhez köthető tünetváltozásokról (összefoglaló: Palulaitis és García-Arenal 2003), de az utóbbi években a sat-RNS indukálta klorózis tünetek kialakulásának mechanizmusát is nagyon szépen feltérképezték (Shimura és mtsai. 2011, Smith és mtsai. 2011). Ebben az esetben egy, a klorofil szintézishez szükséges fehérje mRNS-e bomlik el, mivel a sat-RNS ezzel homológ nukleinsav sorrendű részt tartalmaz. Ez, a géncsendesítésen alapuló mechanizmus csak teljes homológia esetén működik, és így a sat-RNS nukleinsav sorrendjének megváltoztatásával olyan növényen is sikerült klorózist indukálni, ahol az eredeti sat-RNS csak mozaik tüneteket okozott. A virális komponensek mennyisége sem kizárt, hogy tünetbeli különbséget okoz (pl. tök növényen egyes CMV izolátumok nem szisztemizálódnak és ezt az alacsonyabb replikációs hatékonysághoz kötik), és az is ismert, hogy a különböző vírus fehérjék mennyisége a vírusfertőzés során eltérő módon változik, azonban ezeknek a változásoknak a szerepét a betegség tünetek kialakulásában még nem vizsgálták.

Összességében szerintem nem lehet a vírustünetek kialakulásának okait ennyire leegyszerűsíteni, hogy a vírus RNS-nek vagy fehérjéknek van döntő szerepe. Esetleg egy-egy izolátum-gazdanövény-tünet kombinációban valamelyik szerepét ki lehet emelni, de a vírusfertőzés mindig egy olyan folyamat, ahol a különböző komponensek összehangolt, precíz működése nélkülözhetetlen.

Végül még egyszer szeretném megköszönni Professzor Asszonynak, hogy elbírálta a dolgozatomat.

Budapest, 2013. október 14.


Dr. Salánki Katalin

A válaszaim során felhasznált irodalmak jegyzéke:

Fischer E. 1894. Ber. Deutsch. Chem. Ges. 27:2984.

Kanazawa, A., Inaba, J.-I., Shimura, H., Otagaki, S., Tsukahara, S., Matsuzawa, A., Kim, B. M., Goto, K., and Masuta, C. (2011). Virus-mediated efficient induction of epigenetic modifications of endogenous genes with phenotypic changes in plants. *Plant J.* 65:156–168.

Palukaitis, P., and García-Arenal, F. (2003). Cucumoviruses. *Adv. Virus Res.* 62:242323.

Requena, A., Simon-Buela, L., Salcedo, G., and García-Arenal, F. (2006). Potential involvement of a cucumber homolog of phloem protein 1 in the long-distance movement of Cucumber mosaic virus particles. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19:734–746.

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 targeting 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 host genes to mediate disease symptoms in plants. *PLoS Pathog.* 7:e1002022